HAL
open science

# Développement d'un procédé de traitement de matrices d'origine viticole polluées par des herbicides par couplage bioaugmentation/phytoremédiation : sélection d'un triplet " bactéries - sorbant - plante " testé en microcosme

Paul Bois

**To cite this version:**

Paul Bois. Développement d'un procédé de traitement de matrices d'origine viticole polluées par des herbicides par couplage bioaugmentation/phytoremédiation : sélection d'un triplet " bactéries - sorbant - plante " testé en microcosme. Interactions entre organismes. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2010. Français. NNT : . tel-00514809

**HAL Id: tel-00514809**

**https://theses.hal.science/tel-00514809v1**

Submitted on 3 Sep 2010

**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.

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE HAUTE-ALSACE
Discipline : Biologie des Organismes

Présentée et soutenue publiquement par :

Paul BOIS

Le 17 mai 2010

# Développement d'un procédé de traitement de matrices d'origine viticole polluées par des herbicides par couplage bioaugmentation/phytoremédiation : sélection d'un triplet « bactéries - sorbant - plante » testé en microcosme

**JURY**

| | | |
|---|---|---|
| M. Bernard MONTUELLE | CEMAGREF, Lyon | Rapporteur |
| Mme Dominique PATUREAU-STEYER | INRA, Narbonne | Rapporteur |
| Mme Sylvie DOUSSET | CNRS/UHP, Nancy | Examinateur |
| M. Julien TOURNEBIZE | CEMAGREF, Antony | Examinateur |
| Mme Najat NASSR | RITTMO, Colmar | Membre invitée |
| Melle Karine JEZEQUEL | LVBE/UHA, Colmar | Co-Directrice de Thèse |
| M. Thierry LEBEAU | LVBE/UHA, Colmar | Directeur de Thèse |

Ce travail de thèse a été cofinancé par les partenaires suivants :

- projet européen LIFE Environment (ARTWET LIFE06 ENV/F/000133), «Mitigation of agricultural non-point source pesticide pollution and phytoremediation in artificial wetland ecosystems»
- programme «pilote de dépollution biologique appliqué à des sédiments viticoles» (Région Alsace, Conseil Général 68)

# Merci

Je voudrais tout d'abord remercier sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail. Je souhaiterais également remercier de tout cœur mes deux co-directeurs de thèse, Thierry Lebeau et Karine Jézéquel, qui m'ont fait confiance en me confiant ce travail et qui m'ont accompagné avec rigueur et bonne humeur au cours de ces années de recherche.

Ce travail de thèse est le fruit d'un travail d'équipe plus que le résultat d'un travail en solitaire...

Merci à tous les membres présents (David, Marie-Paule, Camille et Jean-Yves) et passés (Stéphane, Laurent, Cécile, Jérôme et Armelle) de l'Equipe de Dépollution Biologique des Sols pour les bons moments passés ensemble et pour les discussions scientifiques... ou autres ! Mention spéciale à David, avec qui j'ai partagé tant de bons moments et parfois de galères ; la thèse n'aurait pas été aussi agréable sans lui !

Un grand nombre de mercis vont en direction de Strasbourg, et au-delà : à Gwénaël et aux gens de l'ENGEES (dont Caroline, Adrien, merci pour les corrections !), à Stéphane Vuilleumier et à Hans Richnow, Ivonne Nijenhuis et toute l'équipe du département Isobio de l'UFZ de Leipzig, pour leur accueil pendant mon séjour là-bas.

Ces années de thèse sont aussi des années d'enseignement, merci à tous les enseignants des départements GB et GTE de l'IUT de Colmar pour cette première expérience ; le compte ne serait pas complet sans Annie et Jean-Marie, merci pour tout ! Je voudrais aussi remercier Cécile Joyeux, sans qui ce travail n'aurait jamais pu être mené à bien... et l'équipe de RITTMO, pour le prêt régulier de matériel.

Merci aussi à tous les doctorants du bâtiment VTPA : Gaëlle, Karine, Sylvain, Mélanie et Noémie pour la bonne ambiance ! Sans oublier les enseignants-chercheurs du LVBE.

Enfin, j'aimerais adresser mes profonds remerciements à Ophélie (comment dire ?), à ma famille et à mes amis, trop nombreux pour être tous cités (une pensée vaut mille mots...), pour leur présence et leur soutien qui m'ont accompagné et aidé à surmonter les difficultés tout au long de cette thèse : «I'm nobody without you...».

Je dédie ce travail de thèse à mon grand-père Louis.

« Nous n'héritons pas la terre de nos ancêtres, nous l'empruntons à nos enfants »

Antoine de Saint-Exupéry

**INTRODUCTION.....1**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....6**

**1. La protection des cultures.....6**

**1.1. Généralités .....6**

***1.1.1. Cultures et ravageurs.....6***

***1.1.2. Données mondiales et locales.....8***

**1.2. Cas de la vigne .....9**

***1.2.1. Emploi des fongicides.....9***

***1.2.2. Emploi des herbicides.....10***

**2. Les produits phytopharmaceutiques dans l'environnement .....14**

**2.1. Distribution dans les différents compartiments .....15**

***2.1.1. Dans les sols….....15***

***2.1.2. dans l'atmosphère.....18***

***2.1.3. dans les eaux.....19***

***2.1.4. Cas du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA .....21***

***2.1.5. Interactions .....26***

**2.2. Écotoxicité .....27**

***2.2.1. Généralités .....27***

***2.2.2. Le cas des herbicides .....28***

**2.3. Réglementation .....32**

***2.3.1. Législation Européenne.....32***

*2.3.2. Législation Française* ..... *33*

**3. Le traitement des produits phytopharmaceutiques** ..... **35**

**3.1. Approche physico-chimique** ..... **35**

**3.2. Approche biologique** ..... **35**

*3.2.1. Généralités* ..... *35*

*3.2.2. La bioremédiation* ..... *37*

*3.2.3. La phytoremédiation* ..... *44*

*3.2.4. Méthodes d'évaluation des systèmes de traitement in situ* ..... *47*

*3.2.5. Bioremédiation des polluants étudiés* ..... *52*

**4. L'ingénierie écologique appliquée à la problématique des produits phytopharmaceutiques** ..... **57**

**4.1. Généralités** ..... **57**

**4.2. La Zone Humide Artificielle (ZHA)** ..... **58**

*4.2.1. Caractérisation* ..... *58*

*4.2.2. Capacités épuratrices* ..... *61*

*4.2.3. Un cas particulier de ZHA : le bassin d'orage (BO)* ..... *62*

**4.3. Ingénierie écologique appliquée à la ZHA** ..... **64**

*4.3.1. Amélioration de la rétention des produits phytopharmaceutiques* ..... *64*

*4.3.2. Couplage bioaugmentation/phytoremédiation* ..... *65*

**MATERIEL ET METHODES** ..... **69**

**1. Données générales** ..... **69**

**1.1. Bassin versant** ..... **69**

**1.2. Bassin d'orage** ..... **69**

**1.3. Composition du sédiment** ..... **70**

**1.4. Milieux, solutions-mères** ..... **70**

**1.5. Analyses chromatographiques** ..... **71**

**1.6. Analyses des résultats** ..... **72**

**2. Conditions particulières de chaque expérience** ..... **73**

**2.1. Tests de sorption** ..... **73**

***2.1.1. Matériaux sorbants*** ..... *73*

***2.1.2. Cinétiques*** ..... *73*

***2.1.3. Isothermes*** ..... *74*

**2.2. Sélection de souches** ..... **74**

***2.2.1. Stratégie de prélèvement*** ..... *74*

***2.2.2. Analyses de la structure de la communauté bactérienne*** ..... *75*

***2.2.3. Détermination de la microflore bactérienne cultivable*** ..... *75*

***2.2.4. Tests de tolérance - Isolement des bactéries cultivables*** ..... *76*

***2.2.5. Tri génétique*** ..... *77*

***2.2.6. Tri fonctionnel*** ..... *78*

***2.2.7. Conservation de souches*** ..... *78*

**2.3. Expériences en logettes** ..... **79**

***2.3.1. Dispositif commun*** ..... *79*

***2.3.2. Expérience en logettes I*** ..... *83*

*2.3.3. Expérience en logettes II* ..... *83*

*2.3.4. Expérience en logettes III* ..... *84*

*2.3.5. Expérience en logettes IV* ..... *84*

*2.3.6. Expérience en logettes V* ..... *85*

*2.3.7. Expérience en logettes VI* ..... *86*

**RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 1 ..... 89**

**Tests de matériaux de sorption ..... 89**

**1.1. Cinétiques de sorption ..... 89**

*1.1.1. Performances de sorption* ..... *89*

*1.1.2. Modifications de sorption selon la matrice liquide* ..... *91*

*1.1.3. Modifications des sorptions individuelles en présence d'autres composés* ..... *94*

**1.2. Isothermes de sorption ..... 99**

**RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 2 ..... 102**

**Sélection de souches ..... 102**

**2.1. Caractérisation préliminaire du sédiment ..... 104**

*2.1.1. Physico-chimie* ..... *104*

*2.1.2. Analyse microbiologique* ..... *106*

**2.2. Tri des populations ..... 109**

*2.2.1. Sélection de populations bactériennes tolérantes* ..... *109*

*2.2.2. Différenciation génétique* ..... *112*

**2.3. Tri fonctionnel ..... 114**

*2.3.1. Performances de dissipation* ..... *114*

*2.3.2. Choix d'un consortium* ..... *118*

**RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 3** ..... **123**

**Expériences en logettes** ..... **123**

**3.1. Résultats** ..... **124**

*3.1.1. Récapitulatif des expériences et des analyses associées* ..... *124*

*3.1.2. Survie de l'inoculum dans le sol (Expérience I)* ..... *125*

*3.1.3. Expériences à faibles concentrations en polluants* ..... *126*

*3.1.4. Expériences à fortes concentrations en polluants* ..... *129*

**3.2. Fonctionnement du système** ..... **140**

*3.2.1. Paramètres physico-chimiques* ..... *141*

*3.2.2. Paramètres biologiques* ..... *146*

*3.3. Efficacité du procédé* ..... *150*

*3.3.1. Évolution des teneurs en polluants dans les effluents* ..... *150*

*3.3.2. Évolution des teneurs en polluants dans le mélange sable-sédiment* ..... *153*

**CONCLUSION - PERSPECTIVES** ..... **157**

**ANNEXES** ..... **163**

**INDEX DES ABREVIATIONS** ..... **177**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... **182**

**VALORISATION SCIENTIFIQUE** ..... **222**

# Table des Figures

## Synthèse bibliographique

**Figure I.1a : Principaux marchés pour les produits phytosanitaires.....8**

**Figure I.1b : Principaux pays consommateurs de produits phytosanitaires.....8**

**Figure I.2 : Répartition des ventes de produits phytosanitaires en France.....8**

**Figure I.3 : Traitements phytosanitaires des principales cultures en France.....8**

**Figure I.4a : Occupation des sols par les principales cultures en France.....9**

**Figure I.4b : Impact phytosanitaire théorique des principales cultures en France.....9**

**Figure I.5 : Répartition des produits phytosanitaires dans l'environnement.....14**

**Figure I.6 : Etat de pollution de la nappe phréatique alsacienne par l'atrazine.....20**

**Figure I.7 : Interactions microorganisme-polluant.....40**

**Figure I.8 : Devenir des contaminants lors de la phytoremédiation.....45**

**Figure I.9 : Voies de dégradation aérobies du glyphosate.....52**

**Figure I.10 : Voies de dégradation du diuron.....54**

**Figure I.11 : Différents types de ZHA.....59**

**Figure I.12 : Trajet des pesticides sur un bassin versant.....62**

## Matériel et méthodes

**Figure II.1 : Situation géographique du lieu de l'étude.....69**

**Figure II.2 : Pluviométrie moyenne sur le site d'étude.....69**

**Figure II.3 : Arrivées d'eau du bassin d'orage et points de prélèvement.....69**

**Figure II.4 : Configurations du bassin d'orage.....70**

**Figure II.5 : Sorbants utilisés.....73**

**Figure II.6 : Bacs PEHD en logettes climatisées.....79**

**Figure II.7 : Sonde redox.....80**

**Figure II.8 : Plan des microplaques utilisées pour le dénombrement.....81**

**Figure II.9 : Schéma d'implantation des plantes dans les bacs PEHD.....83**

**Figure II.10 : Plants de *Phragmites australis*.....84**

## Résultats - discussion : tests de sorption

**Figure III.1 : Performances de sorption dans les différentes matrices liquides.....91**

**Figure III.2 : Evolution de la sorption du glyphosate en mélange avec du cuivre.....94**

**Figure III.3 : Evolution de la sorption du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA en milieu complexe (mélange de polluants).....95**

## Résultats - discussion : sélection de souches

**Figure III.4 : Population bactérienne cultivable initiale selon les points de prélèvement.....106**

**Figure III.5 : Répartition de la population bactérienne selon les points de prélèvement en fonction de la stratégie de croissance.....107**

**Figure III.6 : Diversité microbienne au sein du bassin d'orage.....107**

**Figure III.7 : Evolution quantitative de la population bactérienne cultivable du sédiment suite à la pression de pollution.....109**

**Figure III.8 : Evolution de la répartition quantitative entre stratégies r et stratégies K en fonction de la pression sélective.....110**

**Figure III.9 : Evolution de la diversité microbienne du bassin d'orage avant/après pression de pollution.....111**

**Figure III.10 : Proximité génétique des différents isolats obtenus.....112**

**Figure III.11 : Caractéristiques des isolats tolérants distincts génétiquement.....113**

**Figure III.12 : Performances de dissipation des isolats (vue globale).....114**

**Figure III.13 : Performances de dissipation des isolats (vue détaillée).....115**

**Figure III.14 : Corrélations entre caractéristiques géographiques et fonctionnelles des isolats.....117**

**Figure III.15 : Choix du consortium pour la bioaugmentation.....118**

**Figure III.16 : Stabilité des consortia après cryogénisation. .....120**

## Résultats - discussion : expériences en logettes

**Figure III.17 : Population cultivable totale dans le sol (Expérience I).....125**

**Figure III.18 : Evolution du potentiel redox (Expérience II).....126**

**Figure III.19 : Evolution du pH de la solution de sol (Expérience III).....128**

**Figure III.20 : Evolution du potentiel redox (Expérience III).....128**

**Figure III.21 : Evolution du pH de la solution de sol (Expérience IV).....130**

**Figure III.22 : Evolution du potentiel redox (Expérience IV).....130**

**Figure III.23 : Biomasse totale récoltée à la fin de l'expérience (Expérience IV).....131**

**Figure III.24 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience IV).....131**

**Figure III.25 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience IV).....132**

**Figure III.26 : Evolution du potentiel redox (Expérience V).....135**

**Figure III.27 : Evolution de l'humidité (Expérience V).....135**

**Figure III.28 : Biomasse végétale fraîche récoltée à la fin de l'expérience (Expérience V).....135**

**Figure III.29 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience V).....136**

**Figure III.30 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience V).....136**

**Figure III.31 : Evolution du potentiel redox (Expérience VI).....137**

**Figure III.32 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience VI).....138**

**Figure III.33 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience VI).....139**

# Table des Tableaux

## Synthèse bibliographique

**Tableau I.1 : Techniques d'épandage de produits phytosanitaires.....8**

**Tableau I.2 : Traitement de la vigne par fongicides, herbicides et insecticides.....10**

**Tableau I.3 : Classification des herbicides en fonction de leurs caractéristiques.....10**

**Tableau I.4 : Carte d'identité du glyphosate.....11**

**Tableau I.5 : Principales propriétés physico-chimiques du glyphosate.....11**

**Tableau I.6 : Carte d'identité du diuron et du 3,4-DCA.....12**

**Tableau I.7 : Propriétés physico-chimiques du diuron et du 3,4-DCA.....12**

**Tableau I.8 : Paramètres influençant la sorption des pesticides dans le sol.....15**

**Tableau I.9 : Echelle de capacité d'adsorption.....17**

**Tableau I.10 : Persistance des composés étudiés.....29**

**Tableau I.11 : Valeurs de toxicité des composés étudiés.....29**

**Tableau I.12 : Récapitulatif des différentes techniques de dépollution.....35**

**Tableau I.13 : Stratégies de croissance des microorganismes.....39**

**Tableau I.14 : Paramètres à prendre en compte pour la mise au point d'un procédé de bioaugmentation-phytoremédiation *in situ*.....47**

**Tableau I.15 : Techniques d'analyse de diversité microbienne, avantages et inconvénients.....51**

**Tableau I.16 : Microorganismes dégradant le glyphosate.....52**

**Tableau I.17 : Microorganismes dégradant le diuron.....54**

**Tableau I.18 : Microorganismes dégradant le 3,4-DCA.....55**

## Matériel et méthodes

**Tableau II.1 : Composition du sol viticole d'origine, du sédiment du bassin d'orage et du mélange sable-sédiment.....70**

**Tableau II.2 : Composition du milieu LB.....71**

**Tableau II.3 : Composition du milieu minimum MM.....71**

**Tableau II.4 : Composition de l'eau de ruissellement du bassin d'orage (EBO) et de l'extrait de sédiment (ES).....71**

**Tableau II.5 : Caractéristiques des matériaux sorbants utilisés.....73**

**Tableau II.6 : Récapitulatif des expériences en logette.....76**

## Résultats - discussion : tests de sorption

**Tableau III.1 : Sorption des polluants, exprimée en pourcentage de la concentration initiale.....89**

**Tableau III.2 : Paramètres pour les isothermes de sorption.....100**

## Résultats - discussion : sélection de souches

**Tableau III.3 : Récapitulatif du nombre de colonies isolées pour chaque point de prélèvement à partir de la culture de sédiment dans un milieu MM enrichi en Glyphosate, Diuron, 3,4-DCA et Cu.....112**

**Tableau III.4 : Nombre, origine et stratégie de croissance des colonies distinctes non dissipantes pour chaque polluant.....115**

**Tableau III.5 : Performances de dégradation aérobie du glyphosate.....116**

**Tableau III.6 : Performances de dégradation du diuron.....116**

**Tableau III.7 : Performances de dégradation du 3,4-DCA.....117**

**Tableau III.8 : Identité des souches composant le consortium 106.....121**

## Résultats - discussion : expériences en logettes

**Tableau III.9 : Tableau synoptique des expériences menées en logettes climatisées.....124**

**Tableau III.10 : Détail des conditions expérimentales.....124**

**Tableau III.11 : Tableau synoptique des paramètres mesurés lors des expériences.....124**

**Tableau III.12 : Concentrations en polluants dans l'eau au bout d'une semaine (Expérience II).....127**

**Tableau III.13 : Humidité du mélange sable-sédiment (Expérience III).....128**

**Tableau III.14 : Concentrations en polluants dans l'eau à l'entrée et à la sortie du bac (Expérience III).....129**

**Tableau III.15 : Humidité du mélange sable-sédiment (Expérience IV).....130**

**Tableau III.16 : Abattement du diuron et du 3,4-DCA dans le mélange sable-sédiment (Expérience VI).....140**

**Tableau III.17 : Récapitulatif des abattements dans l'eau (Expérience II).....151**

**Tableau III.18 : Récapitulatif des abattements dans l'eau (Expériences IV, V et VI).....151**

**Tableau III.19 : Récapitulatif des abattements dans le mélange sable-sédiment (Expériences IV, V et VI).....154**

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

La protection des cultures a été de tout temps une préoccupation humaine. Des produits naturels ont été utilisés pour cela depuis l'Antiquité et ont progressivement cédé leur place aux produits de synthèse au cours du XX$^{e}$ siècle. La consommation de produits phytopharmaceutiques par l'agriculture française se montait à 59000t en 2007. La première culture utilisatrice de ces produits est la viticulture qui consomme à elle seule 20% des produits phytopharmaceutiques alors qu'elle n'occupe que 4% de la SAU française (Aubertot et coll. 2005). Ainsi, la pression environnementale induite par la viticulture est forte. L'étude du comportement des produits phytopharmaceutiques dans l'environnement montre que tous les compartiments (sol, eau, air) sont susceptibles de subir une contamination durable par ces produits. En outre, de plus en plus d'études montrent le risque écotoxicologique posé par ces produits ce qui incite, voire oblige, à réduire les doses employées. Mais même en les réduisant, la dispersion des xénobiotiques dans l'environnement ne pourra être totalement évitée, sans compter qu'il faudra gérer le passif des produits déjà épandus qui se sont accumulés au fil des ans dans l'environnement. De plus les métabolites de dégradation de ces molécules parfois plus toxiques que les molécules parents doivent également être inclus dans cette gestion. La prise en compte des produits phytopharmaceutiques introduits volontairement dans un agrosystème est ainsi une chose ; l'élimination des surplus lors de phénomènes de volatilisation, ruissellement, lessivage, etc. en est une autre qui doit faire l'objet d'une gestion la plus rigoureuse possible afin d'éviter toute pollution des compartiments connexes aux agrosystèmes.

Notre étude se base sur le fonctionnement d'un bassin d'orage (BO). Cette zone humide artificielle, à l'origine ouvrage hydraulique construit à l'exutoire d'un bassin versant viticole pour réguler les flux d'orage et éviter les inondations, présente également des capacités naturelles d'épuration (bioatténuation). De nombreuses molécules issues des traitements en viticulture convergent vers ce BO ; une partie y est dégradée par l'écosystème en place (microflore, végétaux). Le niveau d'épuration varie fortement, entre autres en fonction des périodes d'application des produits et de leur temps de séjour dans le BO lors de phénomènes ruisselants.

Ce temps de séjour dépend des débits d'eau entrant dans le BO (temps de séjour hydraulique) et des capacités de rétention (sorption) de l'ouvrage. Dans les cas extrêmes, le temps de séjour des molécules phytopharmaceutiques est largement inférieur au temps nécessaire pour que les microorganismes et/ou plantes aient une action suffisante sur ces molécules. Les valeurs-seuils fixées par la législation en vigueur sont alors régulièrement dépassées pour les eaux sortant de ce BO.

L'idée de ce travail de thèse est d'amener ce type d'écosystème à une efficacité d'épuration suffisante. Il faudra pour cela commencer par s'assurer que le temps de séjour des polluants dans le système est suffisant pour envisager un traitement biologique. La polycontamination organique et métallique des eaux, sols et sédiments dans les zones viticoles nécessite par ailleurs de mettre en oeuvre des techniques de dépollution spécifiques aux deux types de polluants. Dans la perspective d'un traitement biologique le plus performant et le plus contrôlé possible par une démarche d'ingénierie écologique[1], la bioaugmentation est une technique prometteuse pour l'élimination de molécules de propriétés physico-chimiques différentes, puisqu'elle utilise des microorganismes spécifiques potentiellement capables de les dégrader. De plus l'état physiologique des microorganismes inoculés, la taille et le conditionnement des inocula de même que la possibilité d'apporter des consortia créés artificiellement pour la pollution visée, font de la bioaugmentation la technique *a priori* la plus adéquate pour la mise en œuvre d'un procédé de traitement biologique. Mais l'efficacité variable de cette technique, en raison d'une survie ou d'une adaptation souvent insuffisante des microorganismes inoculés aux milieux instables dans lesquels ils sont introduits, limite son développement. Le couplage de la bioaugmentation et de la phytoextraction est l'approche innovante choisie dans ce travail pour traiter ces deux types de pollution, organique et métallique. La plante joue un rôle à la fois direct essentiellement dans l'extraction des métaux (le cuivre dans notre étude) et indirect dans la survie et l'activité des microorganismes inoculés (apport continu de nutriments sous forme de rhizodépôts et rôle de support microbien du système racinaire). Enfin, la transposition des procédés de dépollution mis au point en laboratoire dans des conditions contrôlées à des échelles et des conditions réelles est une cause récurrente d'échec des

[1] Ensemble des savoirs et des méthodes visant à la manipulation *in situ* de systèmes écologiques dans un contexte écosystémique complexe

procédés proposés. La mise au point d'un procédé en microcosmes, en conditions proches de la réalité pourrait permettre d'augmenter les chances de réussite d'un tel procédé en conditions réelles *in situ*.

Notre étude s'est concentrée sur la mise au point d'un procédé de dépollution biologique de sédiments et d'eau de ruissellement d'origine viticole riches en glyphosate, diuron, 3,4-dichloroaniline et cuivre. Seuls les composés organiques font l'objet du présent travail. Le glyphosate et le diuron ont été choisis car ils représentaient en 2006 les deux principaux herbicides utilisés en France (respectivement 70% et 21% des surfaces traitées pour le glyphosate et le diuron) (Agreste 2006). Afin de traiter ces molécules potentiellement polluantes, le procédé vise d'une part à augmenter leur temps de séjour dans le BO grâce à l'emploi de matériaux sorbants et d'autre part à améliorer l'épuration naturelle observée en employant la technique de bioaugmentation en présence de plantes. Il consiste ainsi à proposer un triplet « inoculum bactérien-sorbant-plante » dont chaque composante a préalablement fait l'objet d'études séparées en laboratoire.

La première étape a consisté à sélectionner des matériaux sorbants adaptés à chaque polluant, dans des conditions se rapprochant de celles rencontrées dans le BO (composition du milieu de culture, polycontamination). Outre la capacité de sorption des polluants par les matériaux testés, leur sélection s'est également attachée à prendre en compte la vitesse de sorption afin qu'elle soit compatible avec le temps de séjour minimum des polluants dans le BO.

La seconde étape a porté sur la sélection de bactéries provenant du BO d'étude pour réaliser la dissipation des polluants organiques. La sélection ne s'est pas basée uniquement sur les performances de dissipation des herbicides ; certaines caractéristiques écologiques du BO ont été prises en compte en fonction de la localisation horizontale et verticale des prélèvements et de la présence ou non dans la rhizosphère des macrophytes le colonisant. Ainsi les bactéries sélectionnées devraient être aptes à survivre et être actives dans un environnement oligotrophe aux conditions biotiques et abiotiques instables.

La troisième étape a consisté à associer dans des microcosmes ces deux éléments avec des macrophytes (*Phragmites australis*) sélectionnés auparavant pour leur tolérance au cuivre et leur

capacité d'extraction de ce métal. Les trois composantes ont ensuite été assemblées et mises en œuvre dans des microcosmes mimant, à l'échelle 1/150000ème (en volume) du bassin d'orage étudié, le fonctionnement du BO mentionné plus haut lors d'épisodes pluvieux (apports de polluants à une concentration, fréquence et pour un régime hydraulique donnés). Les conditions de couplage permettant de traiter au mieux la pollution ont été déterminées.

Ce manuscrit débute par l'étude du contexte de travail et des données disponibles sur la problématique étudiée, sous forme de synthèse bibliographique ; il se poursuit par l'exposé des différentes méthodes et protocoles utilisés lors du travail expérimental. Les résultats obtenus lors des différentes expériences sont ensuite exposés et discutés. Pour conclure, une synthèse du travail effectué et des résultats obtenus est présentée, suivie de perspectives qui s'ouvrent à la suite de cette étude.

# PARTIE I

# -

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. La protection des cultures

### 1.1. Généralités

#### *1.1.1. Cultures et ravageurs*

Assurer une production alimentaire en quantité et en qualité suffisante pour permettre de nourrir les populations a été de tous temps une préoccupation pour l'Homme. Mais les espèces végétales que l'Homme cultive pour cela peuvent être soumises à des pressions de la part d'autres organismes vivants : végétaux, champignons, insectes, rongeurs et autres organismes vivants, alors considérés comme des ravageurs. Ces pressions peuvent avoir un effet négatif sur les cultures, conduisant dans le pire des cas à l'absence de récolte. Ainsi l'épidémie de mildiou qui a ravagé les cultures de pomme de terre en Irlande a donné lieu à la Grande Famine entre 1845 et 1849, entraînant entre cinq cent mille et un million de morts. La protection des cultures contre les différentes agressions qui peuvent les atteindre est ainsi une préoccupation allant de pair avec celle de la nutrition. Afin d'assurer leur protection, l'Homme utilise des produits phytopharmaceutiques que l'on peut définir comme les produits destinés à « protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas autrement définies ci-après ; exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ; assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs; détruire les végétaux indésirables ou détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux » (Directive 91/414/CEE). Les produits phytopharmaceutiques peuvent être de natures variées ; on trouvera aussi bien des molécules organiques (de structure chimique simple ou complexe) que des produits minéraux, des associations de molécules organiques, de

produits minéraux ou des deux. Ils peuvent être d'origine naturelle ou artificielle, on parle alors de produits de synthèse, dénommés xénobiotiques.

Initialement, les substances utilisées étaient d'origine naturelle. Dans l'Antiquité, le soufre était utilisé par les Chinois et les Grecs comme agent de fumigation. Pendant le Moyen Age, les aconits (plantes) étaient employés pour faire fuir les rongeurs ; au XVII$^{e}$ siècle les feuilles de tabac furent employées pour leurs propriétés insecticides (Gavrilescu 2005). Puis l'origine des produits s'est diversifiée avec l'utilisation de produits synthétisés par l'Homme : les xénobiotiques. L'usage de produits comme l'arsénite de cuivre (insecticide), le sulfate de cuivre (fongicide) ou encore le trioxyde d'arsenic (herbicide) est conjoint au développement de la chimie minérale au XIX$^{e}$ siècle, tandis que les xénobiotiques organiques sont apparus dans les années 30 avec les progrès de la chimie de synthèse durant la première guerre mondiale (ORP 2007). On distingue aujourd'hui les catégories suivantes parmi les produits phytopharmaceutiques, définies en fonction de la cible à atteindre (Waxman 1998) :

-les produits fongicides, destinés à lutter contre les champignons. Ils peuvent être de nature minérale (« bouillie bordelaise » constituée d'un mélange de sulfate de cuivre et de chaux, sels de zinc) ou organique (carbamates, métaux liés à une molécule organique) ;

-les produits herbicides, destinés à lutter contre les plantes indésirables ou « adventices ». Ils peuvent être de nature minérale (cyanure de calcium, sulfate de fer) ou organique (urées substituées, triazines) ;

-les produits insecticides, destinés à lutter contre les insectes (carbamates, organochlorés) ;

-les autres produits, parmi lesquels on trouve les produits contre les rongeurs (rodenticides), les nématodes (nématicides)…

On peut ajouter à la substance active de base un produit additionnel qui améliore l'efficacité de la molécule active de différentes manières (Tominack 2000) : l'adjuvant peut augmenter l'homogénéité du mélange, faciliter sa dilution et son application, augmenter sa stabilité ou la pénétration de la substance active grâce aux surfactants. On parlera alors de substance formulée. Les produits phytopharmaceutiques peuvent être appliqués sur les cultures

au moyen de produits possédant des formes physiques variées, qui détermineront alors la méthode d'application (Waxman 1998) : par pulvérisation (manuelle ou motorisée) ou brumisation pour des formes liquides, fumigation ou épandage de granulés pour des formes solides, semis dans le cas de semences enrobées. Ces techniques sont utilisées selon les contraintes de terrain. On utilisera plutôt la pulvérisation, les granulés ou les semences traitées pour des applications en champ (tableau I.1), sachant que les objectifs sont de perdre le moins de produit possible, de protéger au mieux la personne utilisant le produit et d'appliquer le produit le plus efficacement possible.

### *1.1.2. Données mondiales et locales*

De nombreux produits différents sont aujourd'hui disponibles sur le marché avec environ 520 matières actives pour 3000 spécialités commerciales (ORP 2007). Le marché mondial des produits phytopharmaceutiques représentait 23,9 milliards d'euros en 2007, l'Europe étant le deuxième consommateur derrière l'Amérique du Nord (figure I.1a, d'après UIPP 2007). En 2006, la France occupe la 4$^{e}$ place du marché des produits phytopharmaceutiques avec un chiffre d'affaires de 1,65 milliards d'euros (figure I.1b, ibid.). En 2007, 59000 tonnes de produits phytopharmaceutiques de synthèse et 18300 tonnes de Cuivre et de Soufre ont été vendues en France (UIPP 2007). L'agriculture consomme la plus grande part de ces produits (entre 90 et 94%), les particuliers, les collectivités et les industriels se répartissant le reste (ORP 2007). Les herbicides sont les produits les plus vendus en 2006/2007, suivis par les fongicides (figure I.2, d'après UIPP 2007). Les cultures majoritaires reçoivent toutes des traitements phytopharmaceutiques (figure I.3, d'après Agreste 2006).

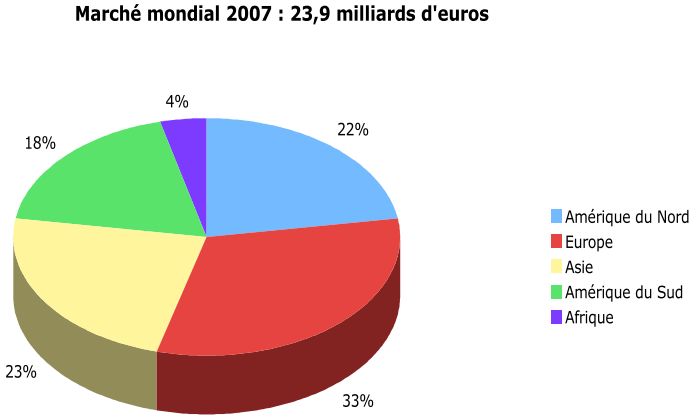



**Figure I.1a : Principaux marchés pour les produits phytosanitaires.**
(UIPP 2007)

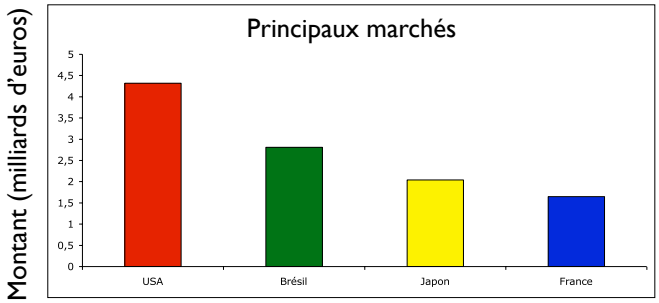



**Figure I.1b : Principaux pays consommateurs de produits phytosanitaires.**
(UIPP 2007)

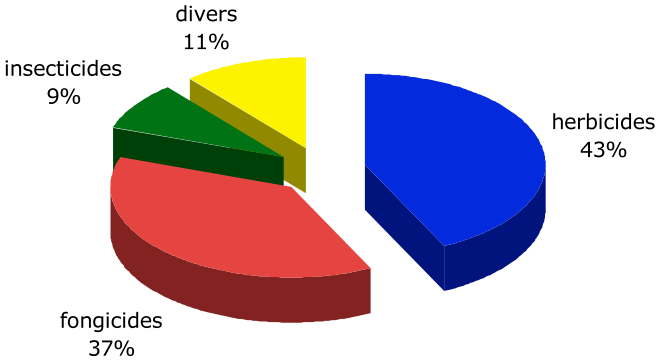



**Figure I.2 : Répartition des ventes de produits phytosanitaires en France.**
(UIPP 2007)

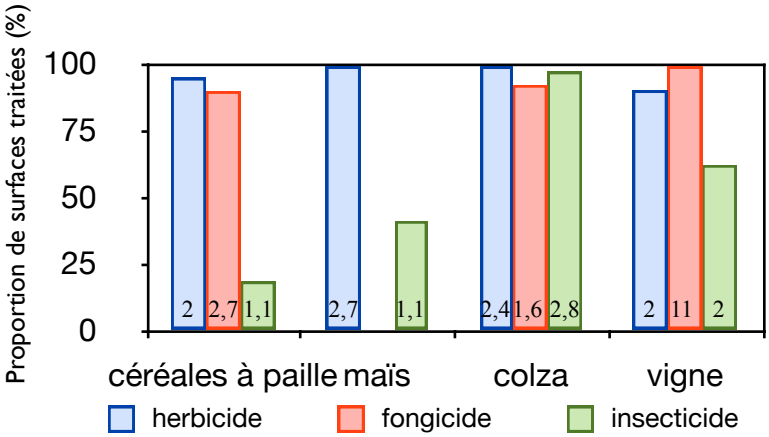



**Figure I.3 : Traitements phytosanitaires des principales cultures en France.**
(Agreste 2006) ; en ordonnées figurent les pourcentages de surface ayant reçu un traitement. Les chiffres au pied des barres indiquent le nombre de traitement annuel moyen par famille de produits.

**Tableau I.1 : Techniques d'épandage de produits phytosanitaires.**
(Waxman 1998)

| Technique | Forme du produit | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|---|
| Pulvérisation (manuelle) | Liquide | ▪économique<br>▪manipulation aisée<br>▪rangement et stockage faciles | ▪pression et taux de sortie variables<br>▪pas assez d'agitation pour garder les poudres en suspension<br>▪(besoin d'agitation fréquente) |
| Pulvérisation (motorisée) | Liquide | ▪plus grande capacité que les pulvérisateurs manuels<br>▪réglage possible de la pression<br>▪agitation intégrée | ▪coût relativement élevé |
| Epandage de pesticides en granulés | Solide | ▪peu coûteux<br>▪forme simple à manipuler<br>▪pas besoin d'en mélanger dans l'eau<br>▪faible risque de dérive<br>▪faible risque d'exposition du manipulateur | ▪coûteux en pesticides<br>▪usage spécifique, les granulés n'adhérant pas au feuillage<br>▪calibrage pour chaque formulation<br>▪hétérogénéité de la distribution en fonction des terrains |
| Semis de substances traitées | Solide | ▪facilité d'utilisation | ▪mort de la semence si excès de produit ; absence de protection si trop peu |

## 1.2. Cas de la vigne

La vigne arrive en 4e position pour l'occupation des sols, les céréales à paille occupant la plus grande part de la SAU française (figure I.4a, d'après Aubertot et coll. 2005). Mais si la vigne n'occupe que 3% de la SAU française, elle consomme environ 20% des produits phytopharmaceutiques vendus (ibid.). Si l'on rapporte le pourcentage de vente à la SAU, on en déduit grossièrement l'impact environnemental qui, de manière relative atteint voire dépasse de 3 fois celui des céréales à paille (blé et autres), du maïs et du colza (figure I.4b, ibid.). La vigne étant une culture pérenne elle peut être affectée par de nombreuses pathologies non spécifiques, ce qui explique le nombre important de traitements par des produits phytopharmaceutiques.

### *1.2.1. Emploi des fongicides*

#### Généralités

Les différentes affections fongiques que peut subir la vigne peuvent être prévenues par l'emploi de produits empêchant le développement des spores à la surface de la plante. Si des infections se déclarent, elles peuvent être traitées par des mesures prophylactiques : coupe des parties contaminées et protection de la zone mise à nu avec des produits fongicides. Le nombre de traitements annuels nécessaires est variable, il est d'au moins 3 pour le mildiou, au printemps surtout. Il peut être renouvelé si un nouvel épisode apparaît (ISPB 2009), tout en restant dans la limite des doses autorisées. Ces dernières sont variables selon les produits, elles vont de 1 à $5kg.ha^{-1}.an^{-1}$ pour les fongicides organiques et de 12 à $15kg.ha^{-1}.an^{-1}$ pour les fongicides minéraux (Ministère de l'Agriculture 2009). La quasi-totalité des parcelles viticoles françaises reçoit des fongicides, avec 11 traitements en moyenne (Agreste 2006). En Alsace la moyenne est de 10 traitements (ibid.)

#### Le cuivre

Le cuivre est utilisé en viticulture comme produit fongicide contre le mildiou, l'oïdium et le Brenner (Ministère de l'Agriculture 2009). Il se présente sous différentes formes : sulfate de

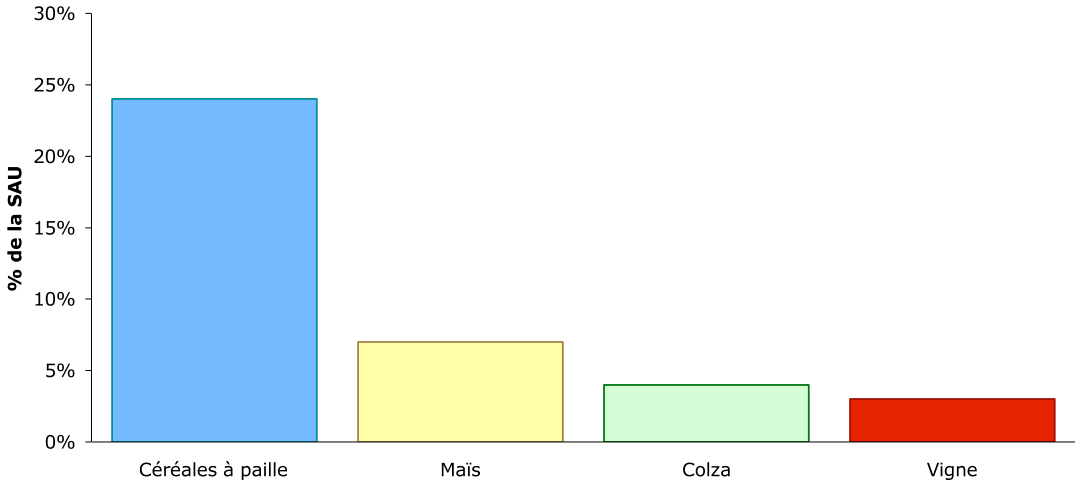



**Figure I.4a : Occupation des sols par les principales cultures en France.**
(Aubertot et coll. 2005)

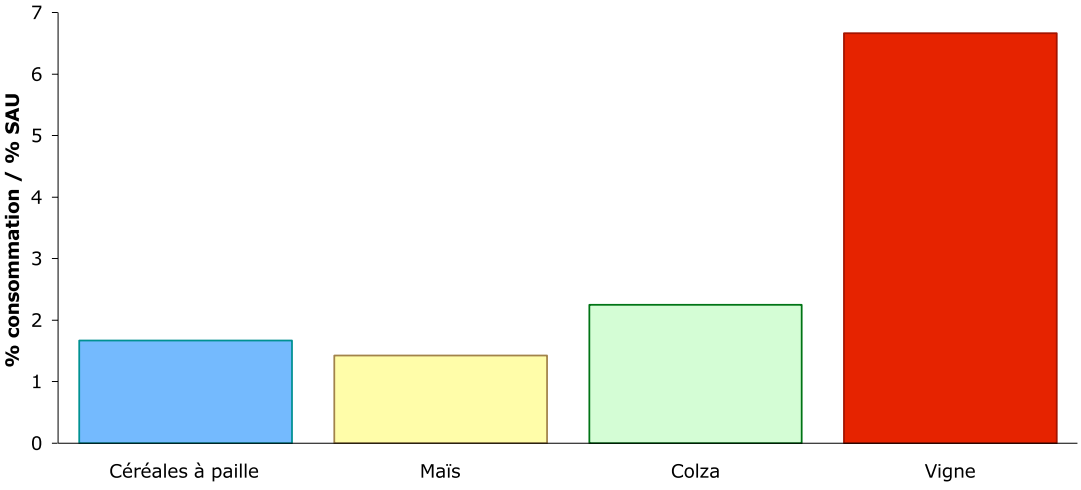



**Figure I.4b : Impact phytosanitaire théorique des principales cultures en France.**
(Aubertot et coll. 2005)

cuivre (35% des surfaces traitées), hydroxyde de cuivre (27% des surfaces traitées) et oxychlorure de cuivre (22% des surfaces traitées). C'est donc le premier fongicide minéral utilisé en France en viticulture avec 84% de surfaces cumulées traitées, contre 56% des surfaces traitées avec du soufre (Agreste 2006). La quasi-totalité des parcelles viticoles françaises et notamment alsaciennes reçoivent un fongicide chimique (tableau I.2, d'après Agreste 2006) ; le cuivre est donc fortement présent dans le vignoble alsacien. Il est à noter que le cuivre prend une place particulière parmi les fongicides puisque c'est le seul fongicide autorisé en viticulture biologique, à raison de $6 kg.ha^{-1}.an^{-1}$ (Règlement 2092/91, CEE 1991). Le sulfate de cuivre utilisé seul brûlant les feuilles en raison de son acidité (IPSB 2009), on lui adjoint de la chaux pour le neutraliser : c'est la bouillie bordelaise, inventée dans les années 1880.

### *1.2.2. Emploi des herbicides*

#### Généralités

La vigne peut subir la concurrence des adventices (pérennes et annuelles) vis-à-vis des nutriments, diminuant ainsi la vigueur de la vigne. Les adventices peuvent aussi être vecteurs de maladies, d'origine fongique ou autre (virus, nématodes). Afin de contrer ces deux effets considérés comme néfastes pour la vigne, les parcelles viticoles sont désherbées, le plus souvent à l'aide d'herbicides de synthèse. Les herbicides agissent par inhibition des processus vitaux de la plante comme la photosynthèse, la synthèse de pigments, d'acides aminés, d'acides gras ou de cellulose (Casida 2009). On peut les classer en fonction notamment de leur moment d'application et de leur mode d'action (tableau I.3, AFPP 2007). En cas d'utilisation d'herbicides pré-levées, il est possible d'appliquer le produit à l'automne ou au printemps, ce qui n'assure pas toujours la même efficacité au traitement. Le moment auquel on applique l'herbicide est alors important (Kadir et Al-Khatib 2006).

La grande majorité des parcelles viticoles françaises est désherbée en partie chimiquement (tableau I.2) avec 2 traitements en moyenne. Le pourcentage de parcelles désherbées en totalité avec des produits chimiques est de 19% en moyenne sur la France, et de 9% en Alsace en raison

**Tableau I.2 : Traitement de la vigne par fongicides, herbicides et insecticides.**
(Agreste 2006)

| | Alsace | France |
|---|---|---|
| **Fongicides** | | |
| Parcelles viticoles recevant un fongicide chimique | 99 % | 99 % |
| Nombre annuel moyen de traitements | 10 | 11 |
| **Herbicides** | | |
| Parcelles viticoles recevant un herbicide chimique | 87 % | 90 % |
| Nombre annuel moyen de traitements | 2 | 2 |
| **Insecticides** | | |
| Parcelles viticoles recevant un insecticide chimique | 74 % | 62 % |
| Nombre annuel moyen de traitements | 2 | 2 |

**Tableau I.3 : Classification des herbicides en fonction de leurs caractéristiques.**
(AFPP 2007)

| Classification | Moment d'application | Caractéristique |
|---|---|---|
| Pré-levée | avant apparition des adventices | |
| Post-levée | après apparition des adventices | |
| Foliaire | | pulvérisé sur les feuilles, absorbé par celles-ci |
| Racinaire | | appliqué sur le sol, absorbé par les racines |
| De contact | Post-levée | peu mobile dans la plante, dommage des tissus autour des points d'impact et de pénétration |
| Systémique | Pré- ou post-levée | migration dans la plante depuis les points de pénétration |
| Total | | efficace sur adventices et espèces cultivées |
| Sélectif | | toléré par une espèce cultivée dans certaines conditions |

d'un enherbement des parcelles pratiqué depuis de nombreuses années pour lutter contre l'érosion hydrique. Les trois principales molécules actives des herbicides utilisés en France en 2006 étaient le glyphosate (70% des surfaces traitées), le diuron (21% des surfaces traitées) et l'aminotriazole (20% des surfaces traitées) (Agreste 2006).

Les quantités autorisées en viticulture traditionnelle sont variables selon les produits. Elles varient de 0,2 à 5kg.ha$^{-1}$.an$^{-1}$ selon les herbicides (Ministère de l'Agriculture 2009). L'utilisation de ces produits est interdite en viticulture biologique (Règlement 2092/91, CEE 1991).

Il est à noter que le désherbage est de plus en plus contesté, pour des raisons de pollution environnementale (sol, eau) et de qualité de la vigne et des sols viticoles. La couverture végétale des sols viticoles permet en effet d'une part de diminuer la croissance végétative de la vigne, améliorant la qualité des raisins (Monteiro et Lopes 2007), d'autre part d'améliorer la quantité de matière organique et la dynamique du carbone dans le sol et ainsi d'améliorer le fonctionnement microbiologique du sol (Steenwerth et Belina 2008) et enfin de maintenir des populations de nématodes « utiles » (Rahman et coll. 2009).

Le glyphosate

Le glyphosate (N-phosphonométhylglycine) est un herbicide de la famille des organophosphonates (n° CAS 1071-83-6). C'est l'un des produits phytopharmaceutiques les plus vendus au monde et son succès se maintient notamment depuis l'apparition de cultures transgéniques tolérantes. Il a été mis au point dans les années 70 par la firme Monsanto, qui le commercialise sous la marque Roundup®. Le brevet étant tombé dans le domaine public depuis 2000, d'autres firmes commercialisent cet herbicide. Le glyphosate, de formule brute $C_3H_8NO_5P$, comporte un groupement phosphonate (liaison carbone-phosphore) et un groupement acide carboxylique (tableau I.4). Il est zwitterionique[2] à tous les pH ce qui en fait un composé très polaire et donc très soluble dans l'eau (tableau I.5). Le glyphosate est un herbicide foliaire systémique et non-sélectif, pour plantes annuelles et vivaces, utilisé sur tout type de culture, seul

[2] il possède des charges « partielles »

**Tableau I.4 : Carte d'identité du glyphosate.**

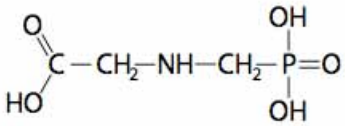
| Formule brute | Formule semi-développée | Masse molaire | Groupements chimiques |
|---|---|---|---|
| $C_3H_8NO_5P$ |  | $169 g.mol^{-1}$ | acide carboxylique -COOH phosphonate $CPO_3H_2$ |

**Tableau I.5 : Principales propriétés physico-chimiques du glyphosate.**
[a] : Piccolo et Celano 1994 ; [b] : IPCS 1994.

| $K_{ow}$ | $K_{oc}$ | Point de fusion | Pression de vapeur | Solubilité dans l'eau | Constante de Henry | Forme à température ambiante |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $1,6.10^{-3}$[b] | 554-34000$L.kg^{-1}$[a] | 184,5°C | $< 1,31.10^{-5}$ Pa[b] | $10,1 g.L^{-1}$ (20°C)[b] | $< 7.10^{-11} Pa.m^3.mol^{-1}$[b] | Solide cristallin |

ou en mélange (Torstensson et Aamisepp 1977). Il doit être appliqué en post-levée et agit par inhibition d'une enzyme impliquée dans la synthèse des acides aminés. La molécule de glyphosate seule adhérant difficilement aux feuilles, on lui adjoint un produit surfactant (sel d'isopropylamine, triméthylsulfonium) améliorant le contact et la pénétration du produit dans la plante. Les quantités maximales annuelles autorisées sont : pour les graminées et adventices annuelles, 1,4kg.ha$^{-1}$ ; pour les dicotylédones bisannuelles, annuelles et adventices bisannuelles, 2,2kg.ha$^{-1}$ ; pour les adventices vivaces, 2,9kg.ha$^{-1}$ (Ministère de l'agriculture 2009).

Les principaux métabolites du glyphosate détectés dans l'environnement sont l'AMPA (acide amino-méthyl phosphonique) et le glyoxylate, métabolites majoritaires, et la sarcosine et le phosphate, métabolites minoritaires (Jacob et coll. 1988). L'AMPA est systématiquement dosé dans les différents compartiments environnementaux car considéré comme métabolite «significatif» (> 10% de la substance mère en quantité) et par suite comme produit phytopharmaceutique. Or la toxicité de l'AMPA par rapport aux animaux est très faible (SERA 2003), nous ne le considérerons donc pas dans l'étude à venir.

Le diuron

Le diuron (N,N-diméthyl-(3,4)-dichloro-phénylurée) est un herbicide chloré de la famille des urées substituées (n° CAS 330-54-1). Utilisé à hauteur de 3000t par an en Europe et 300t par an en France (Agence de l'eau Seine-Normandie 2008), il a été interdit à l'utilisation en France depuis le 13 décembre 2008 (Ministère de l'Agriculture 2007), en application d'une directive européenne (2007/417/CE, 2008/809/CE). Le diuron, de formule brute $C_9H_{10}N_2OCl_2$, comporte un groupement urée et un groupement phényl sur lequel sont substitués deux atomes de chlore (tableau I.6). Le diuron est un composé polaire et moyennement soluble dans l'eau (tableau I.7). C'est un herbicide de contact qui doit être appliqué en pré-levée ; il agit sur les parties vertes de la plante par inhibition de la photosynthèse (Casida 2009). Lorsqu'il atteint le système racinaire, il peut être absorbé par la plante (Moncada 2005). Il est utilisé seul ou en mélange et a été longtemps employé pour le désherbage des chaussées et des voies de chemin de fer. La quantité maximale autorisée était de 3kg.ha$^{-1}$.an$^{-1}$.

**Tableau I.6 : Carte d'identité du diuron et du 3,4-DCA.**

| | Formule brute | Formule semi-développée | Masse molaire | Groupements chimiques |
|---|---|---|---|---|
| **Diuron** | $C_9H_{10}N_2OCl_2$ | | 233g.mol$^{-1}$ | urée + phényl |
| **3,4-DCA** | $C_6H_5NCl_2$ | | 162g.mol$^{-1}$ | aniline + phényl |

**Tableau I.7 : Propriétés physico-chimiques du diuron et du 3,4-DCA.**

[a] : Giacomazzi et Cochet 2004 ; [b] : IHCP 2006 ; [c] : INERIS 2005.

| | $K_{ow}$ | $K_{oc}$ | Point de fusion | Pression de vapeur | Solubilité dans l'eau | Constante de Henry | Forme à $T_{ambiante}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Diuron[a]** | 398 | 485L.kg$^{-1}$ | 158-159°C | 0,91.10$^{-5}$ Pa (25°C) | 42mg.L$^{-1}$ (20°C) | 5,1.10$^{-5}$Pa.m$^3$.mol$^{-1}$ | Solide cristallin |
| **3,4-DCA** | 501[b] | 10000L.kg$^{-1}$[c] | 72°C[b] | 0,184Pa (20°C)[b] | 580mg.L$^{-1}$ (20°C)[b] | 0,05Pa.m$^3$.mol$^{-1}$[b] | Solide cristallin |

Le principal métabolite de dégradation du diuron (tableau I.6) est le 3,4-dichloroaniline ou 3,4-DCA (Salvestrini et coll. 2002, Giacomazzi et Cochet 2004), le DCPMU et le DCPU étant minoritaires. Le 3,4-DCA est un composé polaire et soluble dans l'eau (tableau I.7). Cette molécule (n° CAS 95-76-1) sert d'intermédiaire de synthèse de nombreux produits : herbicides comme le diuron et le linuron, bactéricides/fongicides comme le trichlorocarbanilide et teintures azoïques.

## 2. Les produits phytopharmaceutiques dans l'environnement

Afin d'expliquer le transfert involontaire des produits phytopharmaceutiques dans des compartiments de l'environnement contigus aux compartiments sources, deux types de sources sont à distinguer : les sources ponctuelles et les sources diffuses. Dans le cas d'une source ponctuelle, l'entrée dans l'environnement provient de rejets à des concentrations élevées. Ce peut être le cas d'effluents d'usines ou d'une application sur chemins de fer ou routes. C'est également le cas lorsque des réservoirs utilisés pour le traitement des produits phytopharmaceutiques sont accidentellement ou intentionnellement vidés dans le réseau d'assainissement. Dans le cas d'une source diffuse, l'entrée dans l'environnement se fait sur une large surface (Carter 2000), et les concentrations sont plus faibles. C'est notamment le cas de l'épandage agricole de ces produits, objet de ce mémoire. Ajoutons enfin que la fréquence d'application des produits phytopharmaceutiques influe de manière claire sur la quantité de produits atteignant l'environnement.

Lors de l'application des produits phytopharmaceutiques, une partie du produit n'atteint pas sa cible ce qui n'est pas souhaitable au moins du point de vue économique, et préjudiciable pour l'environnement, puisqu'une partie du produit est gaspillée. Les phénomènes de dérive, sorption, volatilisation et transport dans l'air ou l'eau permettent d'expliquer la répartition des produits dans les différents compartiments de l'environnement (figure I.5).

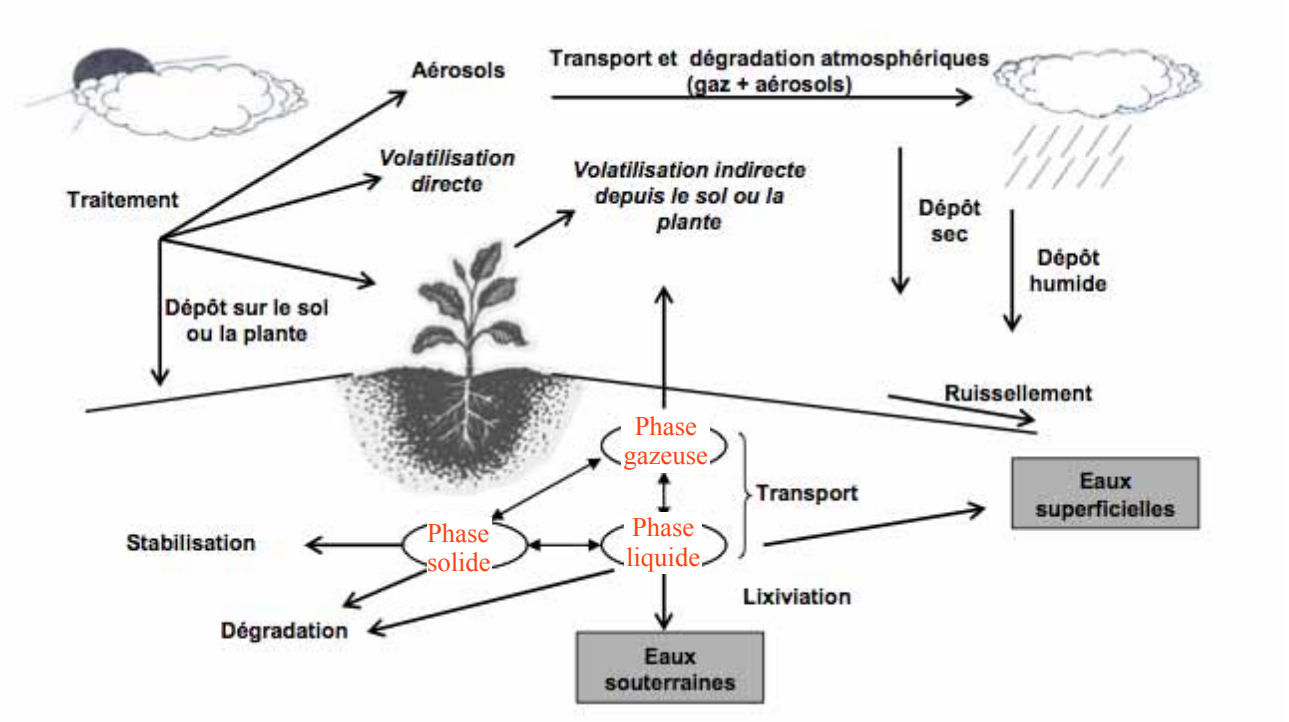



**Figure I.5 : Répartition des produits phytosanitaires dans l'environnement.**
(d'après Guigon-Moreau 2006)

## 2.1. Distribution dans les différents compartiments

### *2.1.1. Dans les sols…*

Le spray drift

L'une des causes de dispersion dans l'environnement est la dérive du panache de pulvérisation ou spray drift. Ce phénomène entraîne le dépôt d'une partie du produit à côté de sa cible initiale, sur le sol ou les végétaux adjacents (Reichenberger et coll. 2007). Ce phénomène de dérive, qui peut concerner entre 0,1 et 9% de la quantité de produit épandue (Carlsen et coll. 2006) peut être atténué par l'utilisation de matériel d'épandage optimisé et la mise en place de zones tampon végétalisées (haies) autour de la zone d'application, la réduction de la dérive pouvant alors atteindre 90%. Éviter le traitement lorsqu'il y a beaucoup de vent permet également de diminuer l'importance de la dérive (Carter 2000). En résumé, la limitation de ce phénomène est aisée et donne de bons résultats.

La sorption

Un coefficient utilisé pour rendre compte du phénomène de sorption des produits phytopharmaceutiques est le $K_d$, défini par le rapport de la concentration du produit dans la matrice solide sur sa concentration dans la matrice liquide. Il s'exprime donc en $L.kg^{-1}$. Par définition, une forte affinité pour la phase solide, i.e. une forte sorption du composé, se traduira par un $K_d$ élevé.

**La sorption des produits organiques** dépend de la polarité des molécules ou de manière équivalente de leur nature hydrophile - hydrophobe (tableau I.8, d'après Delle Site 2000 pour les produits organiques). Le pH, la CEC, l'humidité du sol et la solubilité dans l'eau auront une influence pour les composés polaires. Et contrairement aux métaux, le potentiel redox n'a pas d'influence directe sur la sorption des produits organiques. Ces facteurs sont des grandes tendances, qui ne peuvent être utilisés sans une connaissance préalable de la molécule à laquelle on s'intéresse. En effet, d'autres différences de propriétés chimiques entre deux molécules

**Tableau I.8 : Paramètres influençant la sorption des pesticides dans le sol.**
(d'après Kabata-Pendias 2001 et Delle Site 2000)

| Composés minéraux | Composés organiques apolaires | Composés organiques polaires |
|---|---|---|
| ▪pH<br>▪Eh<br>▪Fraction fine des sols<br>▪Matière organique<br>▪Oxydes et hydroxydes (Fe, Mn, Al)<br>▪Microorganismes | ▪Argile<br>▪Matière organique<br>▪Taille des particules<br>▪Surface spécifique<br>▪Nature du solvant | ▪Humidité du sol<br>▪CEC<br>▪pH<br>▪Solubilité<br>▪Matière organique |

organiques de polarité voisine peuvent expliquer des propriétés de sorption différentes.

La capacité de sorption d'un composé dépendra aussi de la matrice solide considérée, que ce soit en raison de ses caractéristiques physico-chimiques (Alva et Singh 1990, Weber et coll. 2004) ou de sa structure (Novak et coll. 2001). La polarité des molécules peut donner une indication sur leur répartition dans les sols, comme le montre l'étude de Csutoras et Kiss (2007). La sorption de molécules de polarité croissante sur deux sols de forêt à différentes profondeurs a été évaluée : la molécule la plus polaire (diuron) est le plus sorbé. Margoum et coll. (2006) ont observé que la masse de la phase solide rapportée à la masse de la phase liquide a également une influence sur la capacité de sorption des produits phytopharmaceutiques. Dans le cas du sédiment, c'est la texture et le contenu en matière organique qui influencent la sorption (Gao et coll. 1998). Ainsi la sorption des produits phytopharmaceutiques étudiés se concentre sur les particules les plus fines (argile-limon) et les plus grosses (sable), tandis que la destruction de la matière organique du sédiment provoque une redistribution des produits sur les particules les plus fines.

La sorption peut également être modifiée par des paramètres relatifs à la composition de la phase liquide. Plusieurs études (Spark et Swift 2002, Li et coll. 2005, Flores-Cespedes et coll. 2006) montrent que la sorption d'un composé peut varier en présence de matière organique dissoute. La présence de cations dans l'électrolyte est l'une des causes (Alva et Singh 1991) de même que la présence de plusieurs autres produits phytopharmaceutiques, par effet de compétition (Xing et coll. 1996, Dion et coll. 2001, Covelo et coll. 2007). Cette modification de la sorption due à la matrice liquide revêt une grande importance lors de l'évaluation des capacités de sorption d'un composé. En effet, cette évaluation est souvent faite en laboratoire dans une matrice bien définie, généralement de l'eau distillée, avec les composés purs. Dans l'environnement où les produits sont souvent mélangés et dissous dans une matrice complexe, la sorption risque d'être différente de celle déterminée en laboratoire, modifiant ainsi la répartition théorique des produits phytopharmaceutiques entre sol et eau.

Même en laboratoire, l'équilibre peut être atteint après un temps plus long que celui usuellement testé, ce qui modifie les données théoriques de sorption utilisées pour prévoir le comportement des produits phytopharmaceutiques dans les sols (Pignatello et Xing 1996). Par ailleurs, une fois l'équilibre atteint, la sorption des produits phytopharmaceutiques dans le sol peut évoluer au cours du temps (Mamy et Barriuso 2007) : modification du $K_d$ de 7 herbicides après 140 jours d'expérience. La sorption apparente des produits phytopharmaceutiques les plus faiblement sorbés augmente au cours du temps et pour tous les herbicides étudiés, la contribution des différents mécanismes impliqués dans la sorption se modifie, la formation de résidus liés devenant généralement le phénomène majoritaire. L'étude de Zhang et coll. (2007) sur deux produits hydrophobes, l'hexachlorobenzène et le dichlorodiphényltrichloroéthane, montre, elle aussi, que la répartition des composés sur la matière organique du sol se modifie au cours du temps.

La sorption des produits phytopharmaceutiques dépendant souvent de la quantité de carbone organique présent dans le sol, un autre paramètre dérivé du $K_d$ et exprimant la sorption a été défini. Le $K_{oc}$ est défini comme le rapport du $K_d$ sur le pourcentage de carbone organique présent dans la matrice solide $f_{oc}$. Ce coefficient présente l'avantage de pouvoir servir pour le calcul des coefficients de sorption d'un sol à un autre. On peut classer les produits phytopharmaceutiques sur une échelle de $K_{oc}$, qui permet d'évaluer le comportement d'un produit dans un sol (tableau I.9).

D'un point de vue plus technique enfin, l'emploi de surfactants modifie la sorption des produits phytopharmaceutiques (Margoum et coll. 2006). Sánchez-Camazano et ses collaborateurs (1995) ont étudié l'effet de l'ajout de surfactants de différentes natures à des molécules non ioniques. La sorption est modifiée et la modification observée dépend du caractère ionique du surfactant. De même, certaines pratiques culturales comme les techniques d'application, l'utilisation de produits concentrés et d'amendements peuvent entraîner l'augmentation de la quantité de produits phytopharmaceutiques dans les sols (Gevao et coll. 2000).

**Tableau I.9 : Echelle de capacité d'adsorption.**
(Gavrilescu et coll. 2005)

| Valeur du $K_{oc}$ ($L.kg^{-1}$) | « Force » de l'adsorption |
|---|---|
| $K_{oc} < 50$ | Faible |
| $50 < K_{oc} < 5000$ | Modérée |
| $K_{oc} > 5000$ | Forte |

La probabilité de présence des produits phytopharmaceutiques dans les sols est donc loin d'être nulle : certains sols atteignent ainsi une concentration en molécules organochlorées de l'ordre de 0,1mg.$kg_{sol\ sec}^{-1}$ dans le sol superficiel d'une exploitation agricole chinoise (Shi et coll. 2005) et une concentration en molécules organochlorées de l'ordre de 1mg.$kg^{-1}$ dans des zones urbaines fortement polluées en Chine (Fu et coll. 2009a). On retrouve également des produits phytopharmaceutiques dans des sédiments au Japon et en Italie à des concentrations de l'ordre de 1µg.$kg^{-1}$ (Carafa et coll. 2007, Kitada et coll. 2008), les produits organochlorés s'accumulant fortement dans les sédiments (Liu et coll. 2008a). Et si la présence des produits phytopharmaceutiques dans les sols est avérée, elle peut également être durable, comme le montre l'étude effectuée sur l'atrazine en France par Gutierrez et Baran (2009) : huit ans après l'arrêt de l'utilisation de cet herbicide sur des cultures de maïs, les auteurs en ont retrouvé dans le sol de la zone d'application.

*2.1.2. dans l'atmosphère*

**Volatilisation :** les produits phytopharmaceutiques peuvent passer dans l'atmosphère par volatilisation spontanée, exception faite des produits métalliques, autres que le mercure et le sélénium, qui ne sont pas concernés par ce phénomène. Ce phénomène dépend des caractéristiques propres au composé telles que la pression de vapeur (Rüdel 1997) et la solubilité dans l'eau, des conditions environnementales, i.e. température du sol et de l'air, humidité et composition en matière organique du sol (Van den Berg et coll. 1999).

**Erosion éolienne :** Les produits phytopharmaceutiques peuvent aussi être transférés dans l'atmosphère par érosion des particules de sol sur lesquelles ils sont sorbés. Ce phénomène est surtout valable pour les produits fortement sorbés et les métaux. Une fois dans l'atmosphère, les pesticides peuvent être transportés sur des distances parfois longues, en témoigne le cas de deux insecticides, le DDT et le dieldrin, retrouvés aux Barbades sur des poussières venant du Sahara (Risebrough et coll. 1968, Seba et Prospero 1971, Prospero et Seba 1972). Les produits transportés peuvent se redéposer au sol par dépôt sec ou humide. La présence

de produits phytopharmaceutiques dans l'atmosphère est avérée : plusieurs études montrent la présence de produits phytopharmaceutiques dans l'atmosphère terrestre en de nombreux endroits (Chernyak et coll. 1996, Scheyer et coll. 2005, Dvorska et coll. 2008, Pozo et coll. 2009). Globalement, la masse de produits déposée par l'intermédiaire des eaux de pluie est estimée à environ 2% de la masse totale de produit appliqué (Vogel et coll. 2008).

*2.1.3. dans les eaux*

Les produits phytopharmaceutiques peuvent enfin passer dans l'eau qui est un important vecteur de dispersion des produits phytopharmaceutiques en raison de sa mobilité. Le spray drift à proximité d'une zone humide, le transfert dans les eaux de percolation et de ruissellement sont les principaux phénomènes permettant d'expliquer le transport des produits phytopharmaceutiques dans ce compartiment de l'environnement (Carter 2000).

La contamination des eaux par spray drift peut se produire lorsque le panache de pulvérisation rencontre une zone humide. Elle contribue alors faiblement à la contamination des eaux (Kreuger 1998). De plus elle est aisément maîtrisable à l'aide des techniques utilisées pour limiter le spray drift (végétation coupe-vent) (Dabrowski et coll. 2005).

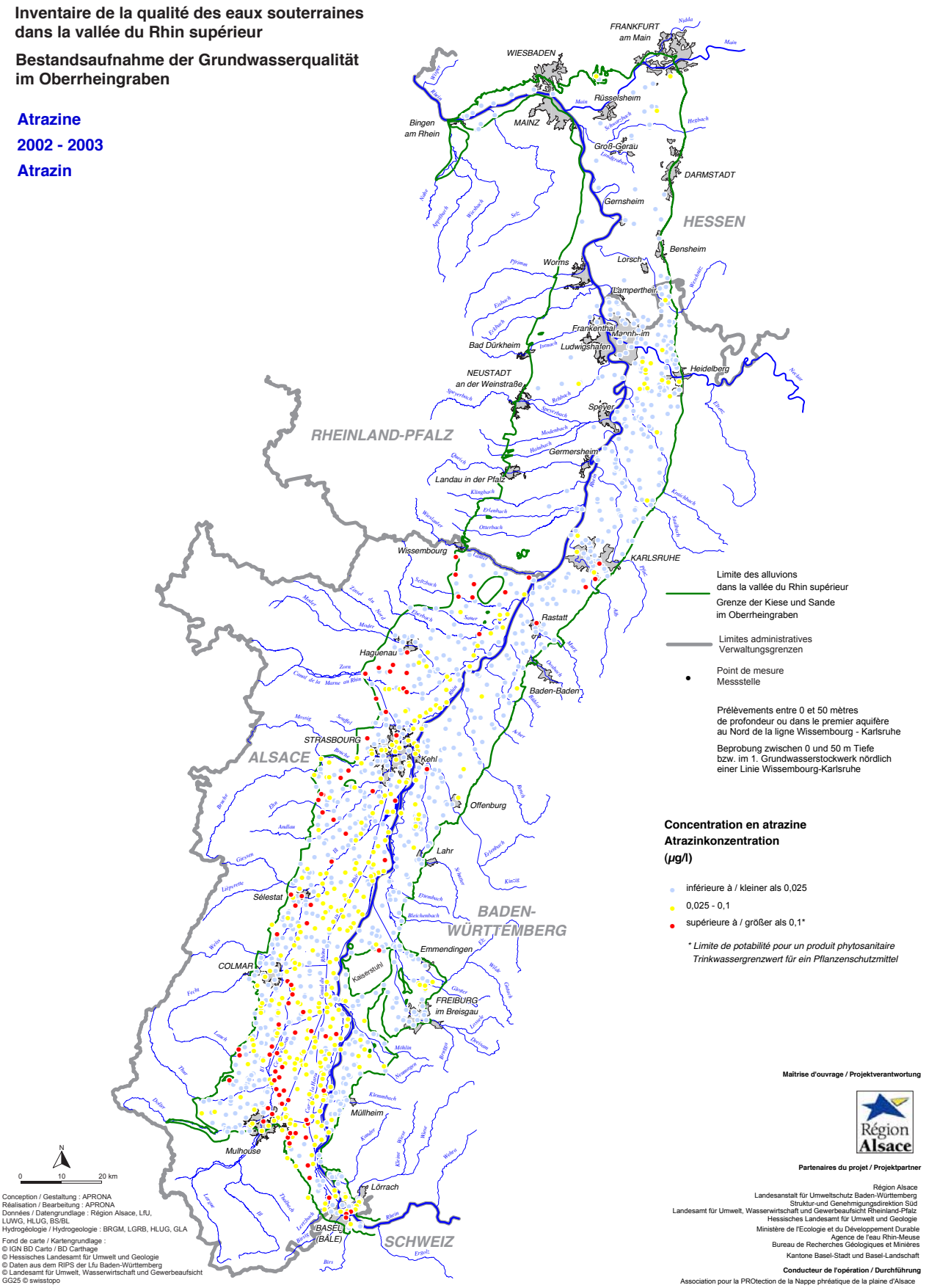
L'intervalle de temps entre le traitement phytopharmaceutique et le premier événement pluvieux détermine en grande partie la quantité de produit phytopharmaceutique qui sera transférée dans l'eau (Wauchope 1978, Kreuger 1998, Vryzas et coll. 2009). Le transfert des produits phytopharmaceutiques dans les eaux, qu'elles soient de percolation ou de ruissellement, a lieu par l'intermédiaire de deux phénomènes, le lessivage des produits ou l'érosion des particules de sol sur lesquelles les produits sont adsorbés. Les molécules ayant plus d'affinité pour la phase liquide, c'est-à-dire ceux dont le $K_d$ est faible, auront tendance à être transférés par lessivage tandis que les produits ayant plus d'affinité pour la phase solide seront plutôt transférés par érosion des particules de sol (Gouy et coll. 1999). En outre les caractéristiques de sorption des produits phytopharmaceutiques évoluant au cours du temps, la répartition du transfert entre

lessivage et érosion sera modifiée conjointement (Louchart et coll. 2007). Dans tous les cas on retrouvera des produits phytopharmaceutiques en solution, solubilisés ou adsorbés sur des particules de sol selon les propriétés des produits considérés.

**Percolation :** les produits entraînés par les eaux de pluie à travers les sols par percolation se dirigent finalement vers la nappe phréatique. La contamination des aquifères par les produits phytopharmaceutiques est connue depuis les années 60 (Colten 1998) et est rapportée dans différents pays (Kookana et coll. 1998, Lapworth et coll. 2006, Guzzella et coll. 2006b, IFEN 2007, Arias-Estévez et coll. 2008). En Alsace, la nappe phréatique est contaminée par les produits phytopharmaceutiques dont l'atrazine en différents endroits (figure I.6). Typiquement, la quantité de produits transférée dans les eaux souterraines se situe entre 0,1 et 1% de la quantité de produit appliquée et peut atteindre jusqu'à 5% de la quantité initiale (Flury 1996). Le transfert se fait là aussi en fonction de l'affinité du produit pour la phase solide, donc en fonction de la valeur du cœfficient de sorption. Le sol peut donc jouer un rôle de filtre pour les produits phytopharmaceutiques. La quantité d'insecticides transférée sur une durée de huit semaines dans les eaux souterraines est d'environ 0,001% pour un insecticide (le triazophos) de $K_{oc}$ élevé ($1800 L.kg^{-1}$) tandis que cette quantité atteint 1,3% de la quantité appliquée pour un insecticide (le dimethoate) de $K_{oc}$ faible (20) (Ciglasch et coll. 2005). Le transfert dans les eaux souterraines dépend aussi de la structure du sol rencontré (Ghodrati et coll. 1992, Bejat et coll. 2000, Siczek et coll. 2008), et des éventuels chemins préférentiels le long desquels le transfert des produits phytopharmaceutiques est plus aisé (Stone et Wilson 2006).

**Ruissellement de surface :** le ruissellement de l'eau peut se produire sur n'importe quel sol à partir du moment où les capacités d'infiltration et de stockage en surface de ce dernier sont dépassées (Reichenberger et coll. 2007). Dans certains cas la quantité de produit transportée par les eaux de surface peut être importante, entre 18 et 42% dans le cas du MCPA, un herbicide (Comoretto et coll. 2008). La proportion de produit lié à des particules (sédiment) dans l'eau de surface peut également être élevée et atteindre 23% de la quantité initiale de produit dans le cas du propiconazole, la sorption de la molécule sur ces particules étant plus élevée que sur le sol

**Figure I.6 : Etat de pollution de la nappe phréatique alsacienne par l'atrazine.**
(APRONA 2005)



d'origine ; cette sorption plus forte pourrait être due à la teneur en matière organique de ces particules fines, plus élevée que celle du sol d'origine (Wu et coll. 2004). Cependant en moyenne, l'eau de surface entraîne environ 1% des produits épandus par ruissellement (Wauchope 1978, Carter 2000, Aubertot et coll. 2005). Comme pour les sols, la quantité de produits transférée dans les eaux dépend des pratiques culturales (Zablotowicz et coll. 2006). Ainsi le transfert d'herbicides dans l'eau de ruissellement sur des parcelles viticoles est plus faible en cas de labour, en raison d'une meilleure répartition du produit et d'un volume ruisselé plus faible (Louchart et coll. 2001). Il existe aussi une forte variation temporelle du transfert (Garmouma et coll. 1997, Carafa et coll. 2007), due à la période d'épandage des produits et aux périodes de fortes pluies. On peut noter que le temps influe sur les capacités de sorption des produits phytopharmaceutiques et génère donc une différence de leur transfert dans les eaux : ainsi le Kd du diuron est multiplié par 164 en l'espace de 7 ans (Louchart et Voltz 2007).

### *2.1.4. Cas du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA*

Le glyphosate

**Dans le sol et les sédiments :** le glyphosate est considéré comme fortement adsorbé, que ce soit sur les sols (Vereecken 2005) ou les sédiments (Goldsborough et Brown 1993, Wang et coll. 1994). La sorption s'opère par l'intermédiaire des minéraux argileux, de la matière organique, des oxydes et des hydroxydes du sol. Les complexes fer-acide humique composant la matière organique sont impliqués dans la sorption sur les sédiments (Piccolo et coll. 1995). La sorption du glyphosate sur la matière organique contenue dans les sols est confirmée par une étude d'Albers et coll. (2009) ; cependant, l'effet des acides humiques sur sa sorption reste à confirmer, les expériences de sorption sur sol complet ne permettant pas de distinguer clairement l'effet de la matière organique de l'effet des oxydes de fer et d'aluminium. La sorption du glyphosate sur la matière organique se fait par liaison hydrogène (Piccolo et Celano 1994, Piccolo et coll. 1996). Une étude de la sorption du glyphosate sur trois sols de compositions différentes a été réalisée par Morillo et coll. (2002). Elle est la plus élevée sur le sol présentant la plus grande proportion d'oxydes amorphes d'aluminium, suivi par le sol présentant un taux

d'oxydes plus faible mais une plus grande proportion de matière organique. En revanche sa sorption est faible sur le sol contenant le plus de silicates, la CEC la plus élevée et le plus fort taux de minéraux argileux. Ceci est en contradiction avec l'étude de Dion et coll. (2001) dans laquelle la sorption du glyphosate semble être gouvernée par la présence de minéraux argileux, mais qui peut s'expliquer par la faible teneur en matière organique des sols dans cette étude. Ainsi les constituants du sol expliquant la sorption du glyphosate peuvent être classés par ordre d'importance : oxydes et hydroxydes métalliques > matière organique > minéraux argileux. Le pH influence la sorption du glyphosate sur ces sols, celle-ci diminuant lorsque le pH augmente (de Jonge et de Jonge 1999, Morillo et coll. 2002, Farenhorst et coll. 2009, Zhao et coll. 2009). Le glyphosate a tendance à former des complexes avec les cations grâce au caractère multidenté du groupement phosphonate (Popov et coll. 2001). Sa sorption sur les hydroxydes de fer notamment se fait également par l'intermédiaire de ce groupement (Sheals et coll. 2002). Le groupement phosphonate et le groupement phosphate présentant des analogies structurelles pouvant conduire à la sorption compétitive entre le glyphosate et le phosphate, la sorption du glyphosate diminuant lorsque la quantité de phosphate dans le milieu augmente (de Jonge et de Jonge 1999, Dion et coll. 2001). Il apparaît cependant dans une étude de Barrett et coll. (2007) réalisée avec du Roundup® que le glyphosate peut déplacer les phosphates déjà en place aussi bien sur sol minéral qu'organique. Ces résultats paraissent en contradiction avec ceux de Dion et coll. (2001), mais la comparaison est difficile, la formulation du glyphosate différant entre les deux études. La situation est finalement complexe, l'addition de phosphate pouvant modifier le pH ce qui joue en retour sur la sorption du glyphosate (Zhao et coll. 2009) et la structure des minéraux argileux pouvant aussi modifier la compétition entre les deux composés (Gimsing et coll. 2007). La variation de composition et de propriétés physico-chimiques des sols avec la profondeur explique ainsi la variation du niveau de sorption du glyphosate (Sørensen et coll. 2006, Farenhorst et coll. 2009), elle-même sous l'influence de la composition de la matrice liquide en contact avec ce sol. Celui-ci est en effet susceptible d'interagir avec la matière organique dissoute (Madhun et coll. 1986). Finalement, la teneur en glyphosate dans différents sols cultivés varie significativement : 0,17 et 0,73mg.kg$^{-1}$ dans un sol de jardin public (Ibañez et coll. 2005) et 0,5 et 5mg.kg$^{-1}$ dans un sol agricole (Peruzzo et coll. 2008).

**Dans l'atmosphère :** le glyphosate est non volatile (Kamrin 2000) et ne sera donc transféré dans l'atmosphère que lors d'une éventuelle érosion éolienne des particules de sol sur lesquelles il est adsorbé.

**Dans l'eau :** le glyphosate est photostable dans l'eau (Rueppel et coll. 1977). La quantité de glyphosate désorbé dépend du sol et du débit d'eau, qui modifie l'équilibre de sorption (Beltran et coll. 1998). La concentration en glyphosate dans les eaux est positivement reliée aux flux préférentiels (Stone et Wilson 2006). Cependant, bien qu'appliqué, on n'en retrouve parfois pas dans les eaux de surface (Kreuger 1998), ce qui peut s'expliquer par sa forte sorption dans les sols (tableau I.4). Sa forte capacité de sorption peut également expliquer sa décroissance rapide dans les eaux de surface et sa perte considérée comme limitée dans les eaux (Screpanti et coll. 2005), en particulier de surface (Malone et coll. 2004) ou de percolation (Dousset et coll. 2004). Le glyphosate fait pourtant partie des polluants majeurs des rivières d'Ile de France (Fauchon et coll. 2007), la contamination étant d'origine agricole et urbaine (Botta et coll. 2009). On peut ainsi en retrouver entre 0,1 et 0,7mg.$L^{-1}$ dans les eaux (Peruzzo et coll. 2008). Certaines études évoquent tout de même un risque de contamination des eaux souterraines : une étude de Landry et coll. (2005) montre qu'après application de glyphosate à des doses agricoles (5,7kg.$ha^{-1}$) dans une colonne de sol calcaire soumise aux précipitations extérieures, on peut en retrouver entre 0,1 et 17µg.$L^{-1}$ dans l'eau de percolation.

<u>Le diuron</u>

**Dans le sol et les sédiments:** le diuron est un herbicide modérément sorbé dont la sorption augmente avec la quantité de matière organique (Gonzalez-Pradas et coll. 1998, Landry et coll. 2004, Weber et coll. 2004, Lanyi 2005, Ahangar et coll. 2008). La structure chimique de la matière organique influe sur sa sorption : elle est positivement corrélée à la quantité de groupements aromatiques et négativement corrélée à la présence de chaînes carbonées linéaires (Ahangar et coll. 2008). Ceci corrobore les résultats d'Albers et coll. (2008) qui ont montré que la sorption du diuron se faisait par l'intermédiaire de liaisons réversibles entre les électrons Pi du noyau aromatique du diuron et ceux de la matière organique. Vu le caractère non-ionique du

diuron, sa sorption n'est pas influencée par le pH (Weber et coll. 2004, Sheng et coll. 2005) et ne paraît pas non plus liée aux argiles (Weber et coll. 2004). Concernant la sorption du diuron sur le sable, deux études donnent des résultats contradictoires : alors que Fernandez-Bayo et coll. (2008) ne trouvent pas de corrélation entre la quantité de sable dans le sol et la sorption du diuron, ce qui semble indiquer une absence de sorption du diuron sur ce matériau, Rae et coll. (1998) et Albers et coll. (2008) ont eux observé le contraire. Le diuron est modérément sorbé sur un sol calcaire, où l'on retrouve environ cinq fois plus de diuron que dans la phase liquide (Gooddy et coll. 2002). La solubilité dans l'eau et un $K_{oc}$ modéré (tableau I.7) semblent expliquer une sorption moindre du diuron comparé à d'autres herbicides (Landry et coll. 2004). La sorption du diuron est sensible aux conditions de séchage du sorbant : la sécheresse de la matière organique du sol, sorbant principal du diuron, diminue sa désorption, ce qui peut influencer son comportement dans les sols en conditions naturelles (Lennartz et Louchart 2007). Elle est également influencée par la présence d'autres composés dans la matrice liquide : l'interaction du diuron avec la matière organique dissoute a été montrée par Madhun et coll. (1986) et pourrait faciliter son lessivage (Thévenot et coll. 2009), de même que sa sorption sur les colloïdes du sol (Wang et Keller 2009a). La présence de certains composés dans la phase liquide peut indirectement diminuer la désorption du diuron par modification de la surface de sorption (Lanyi 2005). Enfin, la formulation joue sur sa sorption (Chaplain et coll. 2001), de même que l'utilisation de surfactants (Wang et Keller 2009b). On retrouve du diuron dans des sols agricoles (Belmonte Vega et coll. 2005) à des quantités variant entre 0,4 et 0,9mg.kg$^{-1}$ (Field et coll. 2003).

**Dans l'atmosphère :** le diuron n'est pas sujet à la volatilisation (Guzzella et coll. 2006a). Il peut cependant être transféré dans l'atmosphère par érosion éolienne, et retomber avec les eaux de pluie, comme le montre l'étude de Scheyer et coll. (2007).

**Dans l'eau** : Comme pour le glyphosate, la présence du diuron dans l'eau fait écho à ses propriétés de sorption, son comportement dans l'eau diffère donc sensiblement de celui du glyphosate. Son transfert dans l'eau se fait majoritairement sous forme dissoute (Gouy et coll. 1999). On en retrouve dans les eaux de surface (Kreuger 1998, Field et coll. 2003, Claver et coll.

2006), à des concentrations comprises entre 0,4 et 8,5µg.$L^{-1}$ (Mitchell et coll. 2005). Il fait partie des polluants majeurs des rivières d'Ile de France (Fauchon et coll. 2007) et se retrouve dans 34,6% des eaux de surface françaises en 2005 (IFEN 2007). Il est sujet à lessivage (Barra Caracciolo et coll. 2005) et présente ainsi un risque de contamination des eaux souterraines (Landry et coll. 2006), parfois avéré (Field et coll. 2003). Comme pour le glyphosate, le lessivage dépend de l'intensité du ruissellement (Louchart et coll. 2001) et des pratiques agricoles (Lennartz et coll. 1997). Sa sorption augmente avec le temps, la fuite par lessivage vers les eaux de surface diminuera donc dans le même temps (Louchart et coll. 2000, Louchart et Voltz 2007).

Le 3,4-DCA

**Dans le sol et les sédiments** : peu de données existent sur la sorption du 3,4-DCA dans les sols. Sa sorption est généralement plus forte que celle du diuron dans le sol, étant donné les différences de $K_{oc}$ (tableau I.7). Alors que le diuron se lie réversiblement aux substances humiques, la sorption du 3,4-DCA sur ces substances est irréversible (Albers et coll. 2008) après quelques jours. Comme pour le diuron, la sorption du 3,4-DCA est forte sur le sable (Rae et coll. 1998). La sorption peut être modifiée par l'ajout de substances dans la phase liquide ; Gonzalez-Pradas et coll. (2005) ont ainsi observé une augmentation de la sorption du 3,4-DCA sur sol calcaire par ajout de carbone organique dissout dans la phase liquide connexe à ce sol.

**Dans l'atmosphère :** le 3,4-DCA n'est pas sujet à la volatilisation (IHCP 2006). Il ne peut donc être transféré dans l'atmosphère que par érosion éolienne.

**Dans l'eau** : le 3,4-DCA est le polluant le plus présent dans les eaux de surface (Claver et coll. 2006) aux endroits où le diuron est le plus employé, ce qui est dû à la dégradation chimique du diuron lessivé. Ceci est en apparente contradiction avec le fait que le 3,4-DCA est fortement sorbé sur les sols : le 3,4-DCA retrouvé provient sans doute de la dégradation du diuron présent dans l'eau.

### *2.1.5. Interactions*

Les traitements phytopharmaceutiques actuels utilisent la plupart du temps plusieurs produits, ce qui peut poser question quant au comportement des produits phytopharmaceutiques en mélange dans l'environnement. En effet certaines études de sorption sont menées sur un seul produit, sans tenir compte d'éventuelles interactions entre molécules. Or il est fort probable que la présence de plusieurs produits à la fois modifie le comportement dans l'environnement des molécules par rapport aux études en laboratoire.

**Interactions entre produits organiques** : les interactions entre produits organiques peuvent avoir un effet sur la sorption de chacun des composés (Pelekani et coll. 2000, Leistra et Matser 2004, Tao et Tang 2004, De Wilde et coll. 2009), il peut donc y avoir sorption compétitive entre eux.

**Interactions entre produits organiques et minéraux** : la relative fréquence des produits minéraux dans les agrosystèmes[3] (cf. l'exemple du cuivre en viticulture, § 1.2.1) a conduit à l'étude d'éventuelles interactions entre ces produits et les produits organiques. Des études de Barrett et coll. (2006) et de Wang et coll. (2006) ont ainsi montré que le glyphosate pouvait remobiliser les ETM du sol ; Guo et coll. (2008) ont quant à eux observé que la présence de produits phytopharmaceutiques organochlorés modifiait la sorption du plomb (-40%) et du cadmium (+60%) sur des sédiments. La modification de comportement peut varier d'un compartiment de l'environnement à l'autre : une étude de Jacobson et coll. (2005) montre que la présence de cuivre n'influe pas beaucoup sur la sorption du diuron dans le sol, mais sur sa présence dans les eaux de lessivage. De même des études montrent l'existence de phénomènes de sorption compétitive entre métaux, tel que le cuivre, et les produits phytopharmaceutiques organiques (Pei et coll. 2006, Liu et coll. 2009a). Quelques autres encore, menées plus particulièrement sur les interactions entre le cuivre et le glyphosate (Undabeytia et coll. 1996,

[3]Ensemble des écosystèmes constitués par divers milieux naturels modifiés et gérés par l'Homme pour les utiliser à des fins de productions : culture, élevage etc. Un Agrosystème est donc contrôlé en permanence par l'Homme. Ce sont des écosystèmes totalement artificiels où le temps de renouvellement de la biomasse est extrêmement court.

Maqueda et coll. 1998, Morillo et coll. 2000, Popov et coll. 2001, Morillo et coll. 2002) ont notamment mis en évidence la formation de complexes issus de ces deux molécules à tous les pH, la présence de l'un modifiant la sorption de l'autre, de manière variable suivant le type de sol.

## 2.2. Écotoxicité

Une fois dans l'environnement, l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la biocénose peut être évalué par leur écotoxicité. Celle-ci a été définie par Truhaut (1977) comme l'« étude du devenir des polluants (circulation et transformation géochimique) et de leurs effets sur l'environnement de l'Homme, c'est-à-dire les milieux biotiques et les éléments vivants qui les peuplent ».

### *2.2.1. Généralités*

**Persistance** : La toxicité ne peut s'exercer que si la molécule présente une certaine persistance, ou rémanence, dans l'environnement. De fait, certains produits phytopharmaceutiques organiques sont persistants dans l'environnement (Jones et de Voogt 1999). Le cas des produits minéraux est un cas particulier puisque ceux-ci sont par nature persistants. Mais un autre paramètre, la bioaccessibilité, doit être pris en compte dans l'évaluation de l'écotoxicité d'un composé : une molécule peut en effet être persistante et n'avoir aucun effet sur la biocénose si elle ne lui est pas accessible (Welp et Brümmer 1999). Le corollaire de la persistance environnementale de certains produits phytopharmaceutiques est la capacité de certains à se stocker dans les chaînes trophiques (Roche et coll. 2009) ou bioaccumulation. Cette bioaccumulation concerne également les humains (Garry 2004, Barr et coll. 2007).

**Toxicité** : La toxicité des produits phytopharmaceutiques envers les organismes non-cibles, ou toxicité non-spécifique, est largement rapportée et couvre une large gamme d'effets.

Ainsi, ils peuvent être neurotoxiques[4] (Colosio et coll. 2003), reprotoxiques[5] (Clementi et coll. 2008, Peiris-John et Wickremasinghe 2008) et cancérigènes (Landau-Ossondo et coll. 2009) parmi d'autres effets chez les humains. Ils ont également des effets directs sur les écosystèmes, modifiant leur diversité microbienne (Schäfer et coll. 2007, Widenfalk et coll. 2008) et leur fonctionnement (Schäfer et coll. 2007) et des effets indirects (Fleeger et coll. 2003) en perturbant notamment les chaînes trophiques (Relyea et Hoverman 2006). Une étude de De Silva et coll. (2009) montre que la toxicité d'un produit varie avec certains paramètres physico-chimiques telle que la température. La spéciation de certains produits phytopharmaceutiques varie en fonction de ces mêmes conditions, ce qui peut entraîner une modification de leur toxicité (Witters 1998, Welp et Brummer 1999). Pour terminer, les produits phytopharmaceutiques employés sont rarement des molécules actives seules mais le plus souvent accompagnées de surfactants, dont la toxicité n'est pas nulle (Krogh et coll. 2003).

La toxicité des produits phytopharmaceutiques est susceptible de varier en présence d'autres produits phytopharmaceutiques ou d'adjuvants. La toxicité résultante peut être diminuée –, on parlera d'effet antagoniste – ou au contraire magnifiée, on parlera d'effet synergique (Hartgers et coll. 1998, Liu et coll. 2009b, Niemi et coll. 2009, Tejada et coll. 2009). Le caractère antagoniste ou synergique de l'association peut varier en fonction de la quantité de produits appliquée (Tsui et coll. 2005, Liu et coll. 2008b, Slaba et coll. 2009).

### *2.2.2. Le cas des herbicides*

<u>Généralités</u>

L'effet toxique des herbicides peut s'exprimer sur des plantes non considérées comme indésirables (Boutin et coll. 2004) ou sur des organismes utilisant les voies métaboliques perturbées par ces produits (Knauert et coll. 2008, Magnusson et coll. 2008). Cependant des effets toxiques des herbicides, directs aussi bien qu'indirects, ont été recensés sur des communautés microbiennes du sol (Zabaloy et coll. 2008), des microorganismes tests (Bonnet et

---

[4] affectant les fonctions neurologiques des organismes

[5] affectant les fonctions reproductrices des organismes

coll. 2006), des arthropodes « utiles » aux oiseaux ou au sol (Taylor et coll. 2006) et sur la vie terrestre en général (Freemark et coll. 1995). Il apparaît donc que les herbicides ont un spectre d'action plus large que celui pour lequel ils avaient été initialement prévus, ce qui peut être préoccupant.

Impact environnemental du glyphosate

**Rémanence** : Le glyphosate est modérément persistant dans les sols (tableau I.10). Il n'est pas sujet à l'hydrolyse, très faiblement à la photolyse en milieu aqueux (IPCS 1994). On en retrouve dans les boues de stations d'épuration à des concentrations de l'ordre du $mg.kg^{-1}$ (Ghanem et coll. 2007). Une étude de Newton et coll. (1994) a montré la sorption complète du glyphosate dans un sol de forêt au bout de 400 jours.

**Toxicité** (tableau I.11) : Concernant la toxicité du glyphosate envers la microflore du sol, l'effet semble faible à légèrement négatif. Une étude menée par Busse et coll. (2001) montre qu'il présente des effets toxiques sur les communautés microbiennes et fongiques du sol, mais en milieu liquide uniquement, des concentrations agricoles (5-50$mg.kg^{-1}$) dans un sol n'affectant pas ces communautés, voire les favorisant, le glyphosate étant utilisé comme source de carbone. En revanche, le glyphosate modifie la composition de la microflore du sol de par sa toxicité (Ratcliff et coll. 2006, Widenfalk et coll. 2008). Cette toxicité, évaluée en termes de biomasse microbienne par Gomez et coll. (2009) par application de glyphosate sur un sol historiquement traité par l'herbicide, se traduit par une diminution de la biomasse au bout de 4 jours, diminution réversible car cet effet n'est plus observé au bout de 45 jours. Enfin, la toxicité du glyphosate peut altérer la structure fonctionnelle microbienne du sol ; cette altération se traduit par l'utilisation d'un moins grand nombre de substrats différents en raison d'une diminution de la diversité fonctionnelle des microorganismes capables de les utiliser (Lupwayi et coll. 2009).

Le traitement de sols au glyphosate peut cependant empêcher la culture d'autres plantes à la suite du traitement (Tesfamariam et coll. 2009), et favoriser l'apparition de pathologies dans les cultures par inhibition de métabolismes protecteurs des plantes notamment : flétrissement de

**Tableau I.10 : Persistance des composés étudiés.**
[a] : Kamrin 2000 ; [b] : IHCP 2006.

| | Glyphosate | Diuron | 3,4-DCA |
|---|---|---|---|
| **1/2 vie dans le sol (j)** | 1-174[a] (47 en moyenne) | 30-365[a] (jusqu'à 1000 observé) | 1000[b] (lorsque lié à des composants du sol) |
| **1/2 vie dans l'eau (j)** | 12-70[a] (eau stagnante) | stable en eau neutre[a] | hydrolyse : non[b]<br>photolyse : 9[b] |

**Tableau I.11 : Valeurs de toxicité des composés étudiés.**
[a] : Bonnet et coll. 2007 ; [b] : Tixier et coll. 2000 ; [c] : Kamrin 2000 ; [d] : IPCS 2004 ; [e] : Dejonghe et coll. 2002 ; [f] : Giacomazzi et Cochet 2004 ; [g] : INERIS 2005 ; [h] : Tsui et Chu 2003 ; [i] : Cardone et coll. 2008 ; [j] : Tomlin 2009 ; [k] : Nascimento et coll. 2006.

| | Glyphosate | Diuron | 3,4-DCA |
|---|---|---|---|
| **Bioaccumulation** | très faible[c] | faible[c] | oui[c] |
| **Toxicité aiguë ($DL_{50}$)** | orale[a] : 5,6g.kg$^{-1}$ (rat)<br>dermale[a] : 5g.kg$^{-1}$ | orale[a] : 3,4g.kg$^{-1}$ (rat)<br>dermale[a] : > 2g.kg$^{-1}$ | orale[g] : 0,5g.kg$^{-1}$ (rat)<br>dermale[g] : > 1g.kg$^{-1}$ |
| **Toxicité chronique** | CSEO > 31mg.kg$^{-1}$.j$^{-1}$ (2 ans, rats)[j] | CSEO > 6,25mg.kg$^{-1}$.j$^{-1}$ (2 ans, rats)[f] | CSEO > 0,05µg.L$^{-1}$.j$^{-1}$ (42 jours, *Brachydanio rerio*)[f] |
| **Reprotoxicité** | > 0,15g.kg$^{-1}$.j$^{-1}$ (rare)[a] | 1mg.L$^{-1}$ (lézard)[i] | non connue[g] |
| **Tératogénicité** | > 300mg.kg$^{-1}$.j$^{-1}$[d] | 0,25g.kg$^{-1}$.j$^{-1}$ (rat)[a] | non connue[g] |
| **Mutagénicité** | non[a] | non[a] | non classé[g] |
| **Carcinogénicité** | non[a] | 2,5mg.L$^{-1}$ (rat)[k] | oui[e] |
| **Microtox®, $CE_{50}$ 15 min (mg.L$^{-1}$)** | 17,5 ± 2,0[h] | 66,87 ± 7,47[b] | 0,61 ± 0,08[a] |
| **Microtox®, $CE_{50}$ 30 min (mg.L$^{-1}$)** | - | 58,07 ± 6,71[b] | 0,61 ± 0,08[a] |
| **Ecotoxicité** | 35,3mg.L$^{-1}$ <$CL_{50}$<147mg.L$^{-1}$ (48h, poissons)[h] | 4,3 mg.L$^{-1}$ <$CL_{50}$<42mg.L$^{-1}$ (48h, poissons)[f] | CSEO >2,1µg.L$^{-1}$ (18 jours, *Oncorhynchus mykiss*)[f] |

plantules de blé et d'orge (*Fusarium*), pourriture de racines de soja (*Corynespora*) et de racines de canne à sucre (*Marasmius*), chloroses variées du citron (*Xylella fastidiosa*) et piétin-échaudage de cultures céréalières (*Gaeumannomyces graminis*) (Yamada et coll. 2009).

Les études évoquées précédemment semblent cependant converger vers une faible toxicité du glyphosate ; en fait, il semble que le glyphosate formulé soit nettement plus toxique que la molécule active seule (Tsui et Chu 2003, 2004, Dos Santos et coll. 2005, Contrardo-Jara et coll. 2009, El Shenawy 2009). Il subsiste finalement un doute, entre des études selon lesquelles le glyphosate ne présente aucun danger (Williams et coll. 2000, Monsanto 2005) ou très peu (Zabaloy et coll. 2008, Mijangos et coll. 2009) et celles selon lesquelles sa toxicité et celle de ses différentes formulations sont bien réelles (Beuret et coll. 2005, Bonnet et coll. 2006, Gasnier et coll. 2009, Manas et coll. 2009), allant jusqu'à la nécrose de cellules embryonnaires humaines (Benachour et Seralini 2009).

L'AMPA, métabolite principal du glyphosate dans l'environnement, présente une toxicité spécifique faible par rapport à celle du glyphosate, il est donc considéré comme non toxique (SERA 2003).

Impact environnemental du diuron et du 3,4-DCA

**Rémanence** : Le diuron est persistant dans les sols (tableau I.10). On retrouve du diuron dans les boues d'épuration à des concentrations de l'ordre de 10µg.kg$^{-1}$ (Ghanem et coll. 2007). Sa photodégradation est mineure (Giacomazzi et Cochet 2004).

**Toxicité** (tableau I.11) : Le diuron est génotoxique pour certains poissons mais l'effet semble réversible (Bony et coll. 2008), tandis qu'il ne semble pas présenter de toxicité pour les lombrics (Bauer et coll. 1997). Il est en revanche reprotoxique à 1mg.L$^{-1}$ pour les lézards (Cardone et coll. 2008) et carcinogène à 2,5mg.L$^{-1}$ pour les rats (Nascimento et coll. 2006).

Le diuron est toxique pour les microorganismes (Tixier et coll. 2000). L'effet toxique du diuron sur les communautés bactériennes du sol peut s'exercer de différentes façons : une étude

menée par El-Fantroussi et coll. (1999) montre à la fois une baisse de la diversité microbienne du sol et de sa fonctionnalité associée à la microflore lors de son utilisation, tandis qu'une étude de Prado et coll. (2001) met en évidence la mort des microorganismes suite à son application. Un effet négatif indirect (Pesce et coll. 2006) et direct (Tadonléké et coll. 2009) sur les communautés bactériennes aquatiques a également été démontré.

La phytotoxicité du diuron peut parfois être compensée par la présence d'autres molécules (Teisseire et coll. 1999, Knauert et coll. 2010) mais aussi être irréversible (Jones 2005).

**Le 3,4-DCA** : comme évoqué précédemment (cf. § 1.2.2.), le 3,4-DCA est le principal métabolite environnemental du diuron. C'est un composé persistant dans l'environnement (tableau I.10), non sujet à l'hydrolyse, sans biodégradation significative en station d'épuration et dans les eaux de surface (INERIS 2005).

Sa toxicité est très supérieure à celle du diuron pour les microorganismes (tableau I.11, Tixier et coll. 2002). Le 3,4-DCA est toxique pour les poissons (Monteiro et coll. 2006) et les algues (Chen et coll. 2009). La toxicité du 3,4-DCA ($CE_{50}$) dans le sol est de $10 mg.kg^{-1}$ (Hund-Rinke et coll. 2005). Les CSEO du 3,4-DCA vis-à-vis de divers organismes (protozoaires, insectes, crustacés, algues, mammifères) varient entre $1 \mu g.L^{-1}$ et $5 mg.L^{-1}$ (Giacomazzi et Cochet 2004).

## 2.3. Réglementation

### *2.3.1. Législation Européenne*

L'impact négatif des produits phytopharmaceutiques (entre autres substances) sur l'environnement est avéré. Afin de limiter voire de résorber cet impact, la directive cadre sur l'eau adoptée en 2000 (Directive 2000/60/CE) fixe un cadre législatif de référence pour les pays européens, l'objectif à atteindre étant le bon état écologique et chimique des eaux de surface et des eaux souterraines d'ici 2015. Le bon état des eaux est défini dans la directive par un certain nombre d'éléments de qualité. Pour chaque élément, un « bon état » est défini précisément. La qualité de trois groupes de paramètres permettant d'atteindre un bon état écologique et chimique est évaluée : les éléments biologiques (présence et composition des communautés animales et végétales), hydromorphologiques (continuité du flux, état des berges et du lit) et physico-chimiques (pH, niveau d'oxygène, salinité, niveau de produits synthétiques et non synthétiques). La restauration ou le maintien des eaux s'évalue donc en fonction d'un ensemble cohérent de paramètres, qui doivent témoigner d'un bon état général, pas juste d'une diminution de la pollution. D'un point de vue opérationnel, la conservation des sites non pollués et la restauration des sites pollués doivent permettre d'atteindre cet objectif. Cette directive a été complétée en 2008 (Directive 2008/105/CE) par l'établissement de valeurs limites de concentrations dans les eaux souterraines et de surface pour un certain nombre de produits indiqués dans l'Annexe I du texte de loi (Annexe 1). Au-delà des grandes idées, la législation européenne devient donc plus concrète. La directive prévoit également la mise en place à partir de cette année par chaque État membre de sanctions effectives en cas de non-respect de la directive. Il y aura donc une incitation concrète au respect de cette directive.

Il existe actuellement un projet analogue de directive cadre pour les sols. Ce n'est pour le moment qu'une proposition (indexée COM(2006) 232 final) qui a été adoptée en première lecture en 2007. Elle prévoit la préservation des sols non pollués et la restauration des sols pollués.

L'amendement 8 (rapport du 24 octobre 2007), qui modifie le texte en confiant plus de pouvoir aux Etats membres, diminue la force de la proposition initiale car l'Europe ne fixerait pas de critères aussi contraignants que ceux de la directive cadre sur l'eau.

Le sédiment, lui, ne dispose pas de législation propre. Il est cependant indiqué dans la directive européenne sur l'eau de 2008 que des valeurs limites de concentration en polluants dans le sédiment doivent être définies par les Etats membres. Les valeurs à définir doivent tenir compte de la nature particulière du sédiment en matière de rétention/relargage de produits et ne seront donc pas forcément les mêmes que celles définies pour l'eau.

Si les directives donnent une orientation générale et des objectifs à atteindre dans un délai donné, elles ne sont pas directement applicables dans chaque pays membre. Les gouvernements nationaux doivent s'adapter aux nouvelles réglementations et transcrire les directives européennes en droit local.

### *2.3.2. Législation Française*

Le décret du 20 décembre 2001 (n°2001-1220) fixe les valeurs limites pour les produits phytopharmaceutiques dans les eaux destinées à la consommation humaine. Les valeurs maximales à respecter suivent la directive européenne de 1980 (Directive 80/778/CEE), corrigée ensuite par la directive de 1998 (Directive 98/83/CE) et sont les suivantes : la concentration d'un produit phytopharmaceutique pris individuellement ne doit pas dépasser $0{,}1 \mu g.L^{-1}$, et la concentration en mélange ne doit pas dépasser $0{,}5 \mu g.L^{-1}$. Il est à noter que cette limite correspond aux limites analytiques rencontrées dans les années 1980 lors de la rédaction de la première directive. Cette limite ne correspond donc malheureusement pas à des données toxicologiques sur les produits phytopharmaceutiques. Il n'existe pas de texte de loi équivalent réglementant la quantité de produits dans les sols ou les sédiments. L'obligation de traitement des sols n'apparaît qu'indirectement dans des textes de loi portant sur la protection des eaux souterraines (Directive 80/68/CEE). L'action de dépollution des sols est donc encouragée par la loi française mais de manière beaucoup moins directe et précise que pour l'eau. Signalons enfin qu'il existe une

réglementation régissant l'épandage des boues de station d'épuration : le décret N°97-1133 du 8 décembre 1997 et l'arrêté d'application du 8 janvier 1998. Cet arrêté impose des teneurs limites en métaux, HAP et PCB au delà desquelles l'épandage de boues n'est pas autorisé.

Le risque de contamination par les produits phytopharmaceutiques des compartiments environnementaux connexes aux agrosystèmes est réel et pose un problème en raison de la toxicité immédiate et à long terme des produits concernés. A l'heure actuelle la législation ne fixe des valeurs-seuils que pour les eaux, mais il serait pertinent de s'occuper également des sols et sédiments. Ceux-ci peuvent en effet constituer un puits pour les produits phytopharmaceutiques et constituer eux-mêmes une source potentielle et durable de produits phytopharmaceutiques.

D'un point de vue éthique enfin, il paraît responsable de traiter une pollution qui peut durer une décennie, surtout si l'on souhaite que les générations futures pâtissent le moins possible de nos ignorances passées et de nos erreurs actuelles…

# 3. Le traitement des produits phytopharmaceutiques

Historiquement, les sols pollués se gèrent de deux manières : par l'excavation et la mise en décharge ou l'isolement physique *in situ*. Le traitement des matrices afin de les dépolluer n'est donc pas la règle générale, en l'absence d'une Directive « sol » toujours en gestation. L'incitation à traiter les sols s'est faite en partie grâce à la législation (Directive Européenne 99/31/CE), qui décourage la mise en décharge (Scullion 2006) et encourage le traitement des sols pollués. Le traitement de l'eau, lui, est maintenant obligatoire de par la loi (cf. § 2.3). Afin de dépolluer ces matrices, des techniques variées existent, qui se basent sur deux approches : l'approche physico-chimique et l'approche biologique. Le but du traitement est de dégrader les produits visés jusqu'à la dose légale.

## 3.1. Approche physico-chimique

Les techniques de traitement physico-chimique sont plus onéreuses que les techniques biologiques (tableau I.12, Mulligan et coll. 2001) et peuvent altérer le fonctionnement biologique des sols (Lear et coll. 2007, Norini 2007), ce qui n'est pas souhaitable si l'on veut réutiliser le sol après traitement.

## 3.2. Approche biologique

### *3.2.1. Généralités*

La remédiation biologique des compartiments pollués de l'environnement concerne autant les molécules organiques qu'inorganiques (Singh et coll. 2008) et s'appuie sur la participation d'organismes vivants, microorganismes, végétaux ou animaux. Les méthodes biologiques présentent un coût généralement plus faible que celui des méthodes physico-chimiques (Alkorta et Garbisu 2001, Khan et coll. 2004, Honders et coll. 2003) et une relative simplicité de mise en oeuvre. Ces dernières nécessitent l'utilisation d'un matériel moins

**Tableau I.12 : Récapitulatif des différentes techniques de dépollution.**

| Méthode | Type de polluant | Principe | Avantages/ inconvénients | Coût (€/t) |
|---|---|---|---|---|
| **Confinement/ encapsulation** | Tout type | **Traitement *ex situ***<br>Confinement des sols comme déchets ultimes contaminés, par des barrières étanches (argile, textiles synthétiques) | Nécessite une surveillance<br>Utilisé pour les sols hautement pollués<br>Risque de dégradation des couches imperméables et relargage des polluants | 10 à 220 |
| **Désorption thermique** | Organiques (HAP, PCB, pesticides)/ inorganique (mercure) | **Traitement sur site et *ex situ***<br>Chauffage de la terre à 100-600°C pour vaporiser les contaminants et traitement des efflux | A basse température, n'altère pas la teneur en matière organique du sol ; Remédiation efficace >99% et indépendante de la concentration en polluants<br>Detruit la flore et faune du sol | 40 à 250 |
| **Lavage du sol** | Organiques (COV, HAP, pesticides) / inorganiques (métaux) | **Traitement sur site ou *ex situ***<br>Excavation et lavage de la partie fine du sol à l'aide de fluides (eau, solvants) pour désorber les contaminants | Nécessite d'avoir plusieurs solvants en cas de polycontamination<br>Dépend de la teneur en argile et limon<br>Traitement des eaux de lavage | 130 |
| **Soil flushing** | Organiques/ inorganiques | **Traitement *in situ***<br>Injection ou infiltration d'eau avec/sans solvants ou surfactants et récupération des eaux injectées | Traitement des eaux de récupération et des COV ; ne nécessite pas d'excavation<br>Dépend de la géologie du terrain et notamment de la perméabilité et de la nature du sol ; raitement de longue durée | 20 à 190 |
| **Solidification/ stabilisation** | Organiques/ inorganiques | **Traitement *in situ* et *ex situ***<br>Immobilisation ou réduction de la mobilité des polluants par des moyens chimiques ou physiques | La vitrification et autres procédés *in situ* sont limités par la profondeur de la pollution ; nécessite une surveillance à long terme ; augmentation du volume de déchets à confiner | 60 à 250 |
| **Venting/ bioventing** | Organiques (COV) | **Traitement *in situ***<br>Injection d'un flux d'$O_2$ (ou de nutriments = bioventing) dans le sol pour augmenter la désorption des COV et accélérer leur biodégradation | Plus ou moins efficace selon la géologie et l'hydrogéologie du terrain<br>Traitement de l'air extrait ; traitement rapide ( 2 mois à 2 ans) ; efficace sur les COV, BTEX | 15 à 70 |
| **Biopile** | Organiques | **Traitement sur site ou *ex situ***<br>Excavation de la terre et traitement en andains avec aération, apport de nutriments et contrôle de la T° et du pH (biostimulation) | Récupération des lixiviats et des COV ; traitement rapide (6 mois à 2 ans)<br>Efficacité limité à 95% en particulier avec HAP récalcitrants et en concentrations élevées ; inhibition possible si présence de métaux toxiques<br>Nécessite une grande surface (mais moins que le landfarming) | 80 à 175 |
| **Bioréacteur** | Organiques | **Traitement *ex situ***<br>Mélange du sol avec nutriments et inoculum bactérien (biostimulation/bioaugmentation) | Conditions contrôlées ; traitement de gaz et des lixiviats produits ; efficace pour les molécules récalcitrantes ; faible durée du traitement (1 à 6 mois)<br>Nécessite l'installation d'un équipement spécial et coûteux (de 0,1 à $1{,}52.10^6$ €) | 70 à 300 |
| **Landfarming** | Organiques (BTEX, HAP) | **Traitement sur site ou *ex situ***<br>bioremédiation sur les terres excavées et épandues en couche fine (1,5 cm), addition possible d'eau et de nutriments | Nécessite une grande surface ; pas de récupération des COV<br>Efficace pour les hydrocarbures légers<br>Conditions contrôlées (pH, $O_2$, nutriments, humidité) pour dégradation efficace | 20 à 45 |
| **Phytoremédiation** | Organiques (HAP, PCB, pesticides) /inorganiques | **Traitement *in situ***<br>Utilisation de végétaux pour biosorber, stabiliser ou accumuler des métaux | Conserve les propriétés agronomiques du sol, méthode non-destructive<br>Méthode longue (plusieurs années)<br>Traitement des déchets | 10 à 20 |
| **Bioatténuation (Mulligan et Yang 2004)** | Organiques/Inorganiques | **Traitement in situ**<br>rien à faire | Décontamination potentiellement complète ; coûts peu élevés<br>Méthode longue ; surveillance obligatoire ; mobilité des polluants; métabolites plus dangereux que les composés parents | 0 |
| **Bioremédiation (Iwamoto et Nasu 2001)** | Organiques | **Traitement *in situ***<br>Utilisation de microorganismes pour dégrader les polluants | Elimine définitivement les polluants ; diminue les coûts par rapport à des méthodes physiques<br>S'applique à des polluants en concentration modérée et spatialement étendus (pollution diffuse) | nd |

sophistiqué et sont moins invasives. Elles présentent également l'avantage de permettre la réutilisation biologique du système après traitement (Dorn et Salanitro 2000), puisque celui-ci ne subit pas de modification structurale ou fonctionnelle d'ampleur. Comme pour la remédiation physico-chimique, les traitements peuvent s'effectuer sur place (traitements *in situ*), ou nécessiter une phase de transport du matériel à traiter (traitements sur site et *ex situ*). Dans le cas de traitements *ex situ*, le sol traité est automatiquement considéré comme un déchet (van Hees et coll. 2008), ce qui rend difficile sa réutilisation post-traitement. Les traitements *in situ* ne nécessitent pas le transport de la matrice à décontaminer ce qui diminue les coûts (Cunningham et coll. 1995), mais ces techniques peuvent souffrir d'un certain nombre d'inconvénients (faibles températures, carences en nutriments, disponibilité des polluants et absence éventuelle de potentiel de dégradation) qui limitent l'activité biologique et l'efficacité potentielle du traitement (Romantschuk et coll. 2000). A ce titre une nuance entre biodisponibilité et bioaccessibilité a été proposée par Semple et coll. (2007) : la fraction biodisponible d'un contaminant est « la fraction libre et disponible dans le milieu qui peut à un instant donné traverser la membrane cellulaire d'un organisme résidant dans le milieu », tandis que la fraction bioaccessible d'un contaminant est « la fraction qui peut à un instant donné traverser la membrane cellulaire d'un organisme résidant dans le milieu si celui-ci y avait accès ; mais elle peut être physiquement éloignée de l'organisme ou disponible seulement après quelque temps ». C'est donc la fraction bioaccessible qui est la cible potentielle de la bioremédiation. Les avantages et inconvénients des différentes méthodes sont regroupés dans le tableau I.12. Il existe deux grandes familles de techniques, celles utilisant les microorganismes (on parlera de bioremédiation) et celles utilisant les plantes (on parlera de phytoremédiation).

### *3.2.2. La bioremédiation*

Les produits organiques diffèrent des produits inorganiques par leur dégradabilité, qui permet en général aux premiers la dégradation de la molécule en métabolites (molécules plus petites mais proches de la molécule-mère) et peut dans le meilleur des cas aller jusqu'à la minéralisation, décomposition du contaminant en molécules élémentaires ($CO_2$, $NH_3$, ...). C'est cette particularité qui est mise à profit dans les techniques de remédiation biologique de ces contaminants. Dans le cas où la diminution de polluant observée ne peut être attribuée de manière certaine à de la dégradation mais fait également intervenir la stabilisation et les transferts en phase gazeuse, liquide ou solide, on parlera de dissipation (Calvet et coll. 2005). On peut également parler d'atténuation naturelle lorsque les phénomènes en jeu sont biotiques ou/et abiotiques.

**La bioatténuation** est une méthode relativement simple, puisqu'elle consiste à laisser le système évoluer seul et à constater la diminution de la teneur en polluants, par les phénomènes de biodégradation, volatilisation, dispersion, dilution, décroissance radioactive (Mulligan et Yong 2004). Elle est parfois appelée bioremédiation intrinsèque (Alexander 1999). Elle a été observée pour des pesticides, notamment le diuron (Pesce et coll. 2009) et le mecoprop (Williams et coll. 2003). La bioatténuation ne garantit pas que les polluants soient durablement dégradés, mais au moins qu'ils ne soient plus bioaccessibles (Pang et Close 2001). La bioatténuation peut fonctionner dans des situations variées : 99,9% de diesel à une concentration de $5 mg.kg^{-1}$ est ainsi bioatténué au bout de 74 jours dans un sol argileux (Berry et Burton 1997), et un abattement de 90% de TCE par adsorption sur du sol a été constaté par Brigmon et coll. (1998). La température et le manque de nutriments peuvent fortement affecter l'efficacité de la bioatténuation : en 3 ans, 50% de diesel à $2,6 \mu g.kg^{-1}$ est dissipé dans un sol alpin (Margesin et Schinner 2001), tandis que 20000L de fuel renversés accidentellement sur un sol subantarctique présentant une activité microbienne sont peu dégradés un an après (Delille et Pelletier 2002). La bioatténuation des HAP de faible poids moléculaire est aussi possible avec des taux d'atténuation variant entre 0,000027 et $0,063 j^{-1}$ (Rogers et coll. 2002). L'absence de gestion des polluants rend le résultat de

cette méthode aléatoire, mais elle peut néanmoins être tentée dans un premier temps, avant de passer éventuellement à des méthodes plus sophistiquées, mais aussi plus coûteuses.

**La bioremédiation** utilise des microorganismes afin de dépolluer des matrices, mettant à profit les larges possibilités métaboliques de ces derniers à utiliser entre autres les produits phytopharmaceutiques présents dans l'environnement (Hussain et coll. 2009). Ces capacités leur permettent de s'adapter aux contaminants et de les dégrader (Rouchaud et coll. 2000, Sorensen et coll. 2001, Moran et coll. 2006, Arbeli et Fuentes 2007, Hussain et coll. 2009). La bioremédiation convient pour de nombreuses substances organiques, tels que les solvants chlorés, les HAP, les MTBE et les mélanges de polluants (Scow et Hicks 2005) mais également les produits phytopharmaceutiques (Gavrilescu 2005). Deux grands types de métabolisme sont exploitables (Calvet et coll. 2005) :

- le métabolisme actif dans lequel le microorganisme utilise un produit phytopharmaceutique comme source d'énergie ou de nutriments. La dégradation est réalisée par des enzymes spécifiques. La dégradation présente une phase de latence suivie d'une phase de dégradation rapide lors de la première occurrence du produit, la phase de latence étant raccourcie voire supprimée par l'application répétée du produit ;
- le métabolisme passif ou cométabolisme dans lequel le produit phytopharmaceutique représente une substance non utilisée pour la croissance du microorganisme, mais qui est modifiée, en présence d'un autre produit issu de la croissance du microorganisme (Prescott et coll. 2003) ; la dégradation est alors lente. En cas de cométabolisme, la source aditionnelle de nutriments sera utilisée pour la croissance microbienne et les enzymes non spécifiques (principalement synthétisées pour la détoxification cellulaire) pourront dégrader fortuitement et partiellement les polluants.

Dans une optique de temps de traitement réduit, on cherchera donc à privilégier les micoorganismes dont le métabolisme envers les produits phytopharmaceutiques à dégrader est de type actif. Une autre caractéristique des microorganismes, à savoir la stratégie de croissance, peut être mise à profit en bioremédiation. Les microorganismes peuvent être classés de ce point de vue selon deux catégories : les microorganismes à stratégie de croissance rapide ou stratégie r et ceux

**Tableau I.13 : Stratégies de croissance des microorganismes.**
(Van Elsas et coll. 2005)

| | r (zymogène) | K (autochthone) |
|---|---|---|
| **Taux de croissance en présence de nutriments** | élevé | faible |
| **Quantité de source d'énergie permettant la croissance** | beaucoup | peu |
| **Capacité de colonisation** | élevée | faible |
| **Dégradabilité de la source de carbone privilégiée** | forte | faible |
| **Capacités compétitives (pour les nutriments)** | élevée | faible |
| **Persistance de la colonisation** | faible | forte |
| **Potentiel de survie** | faible | forte |
| **Type d'écosystème de résidence** | jeune, instable | équilibré |

à stratégie de croissance lente ou stratégie K, aisément différenciables une fois extraits du sol (De Leij et coll. 1993). Les caractères métaboliques associés à ces deux catégories diffèrent en un certain nombre de points (tableau I.13). La proportion de bactéries à stratégie r dans le sol est comprise entre 5 et 20% en régime stationnaire, mais peut se modifier très vite en cas d'apport de nutriments : les populations à stratégie r sont alors les plus rapides dans l'utilisation de ce nouveau substrat (Hu et coll. 1999, Stenström et coll. 2001), notamment en cas de charges polluantes temporellement variables (Kotsou et coll. 2004). L'équilibre r-K se rétablit environ un mois après le pic de nutriments (Stenström et coll. 2001). Les microorganismes à stratégie K apparaissent eux plus adaptés dans le cas de pollution stable dans le temps et plus faible (tableau I.13).

Les conditions physico-chimiques influencent fortement l'ampleur de la biodégradation (Zhang et Bennett 2005) : ainsi le temps de dégradation des polluants peut être multiplié par deux entre une modalité aérobie et une autre anaérobie (Celis et coll. 2008) et les capacités dégradantes d'un sol sont fortement dépendantes du pH, avec un optimum de dégradation autour de pH 7 (Bending et coll. 2003), plutôt que dans un sol de pH 4-5 (Singh et coll. 2003). Un taux d'humidité trop faible peut multiplier la durée de dégradation par 1,5 à 5 (Pesaro et coll. 2004).

L'efficacité de la bioremédiation dépendra de la capacité de dégradation des microorganismes utilisés et de la disponibilité du produit pour les microorganismes, c'est-à-dire au mieux la bioaccessibilité de ce dernier. Les interactions possibles entre les microorganismes et les polluants sont schématisées dans la figure I.7 (adapté d'après ibid.). Ainsi dans une étude de Grenni et coll. (2009), le temps de 1/2 vie du contaminant étudié dans le sol passe de 14 à 19 pour un amendement du sol avec des résidus de chêne et de 14 à 43 jours pour un amendement du sol avec des résidus de pin ; les auteurs expliquent cette dégradation réduite par une plus faible biodisponibilité du polluant pour les microorganismes. Enfin dans une étude sur la dégradation de l'atrazine par des microorganismes dans un mélange sol - eau (Park et coll. 2003), la portion d'atrazine dissoute est dégradée dans la majorité des modalités étudiées, contrairement à la portion sorbée.

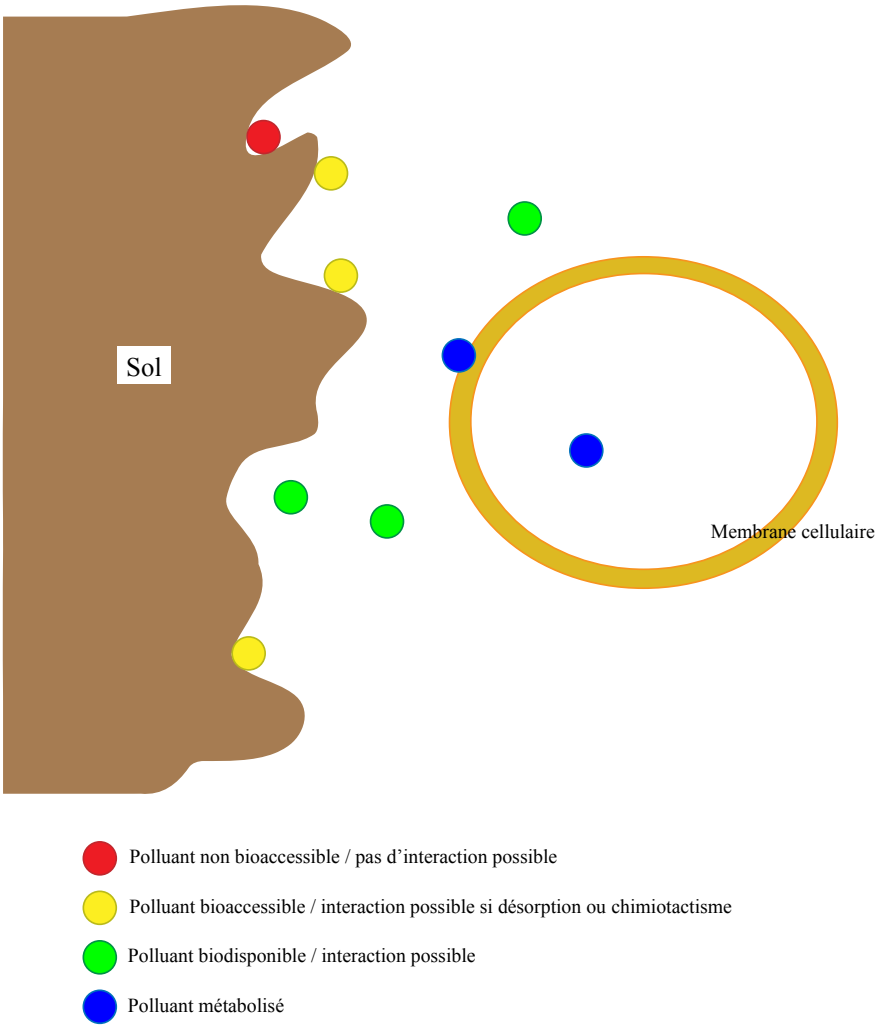



**Figure I.7 : Interactions microorganisme-polluant.**
(d'après Semple et coll. 2007)

Deux autres techniques de bioremédiation existent :

- **La biostimulation** consiste à apporter des nutriments (source de carbone, accepteur final d'électron) au milieu afin de favoriser la croissance des microorganismes (Saison et coll. 2006) et augmenter ainsi la capacité de dépollution du système. Cette méthode peut être efficace dans des situations variées. Par exemple, l'ajout d'amendements minéraux à un sol contaminé artificiellement par des hydrocarbures à 30mg.kg$^{-1}$ a permis d'atteindre 93% de dégradation en 4 semaines, contre 7% dans le même temps pour la modalité témoin (non biostimulée) (Ayotamuno et coll. 2009) ; et 97% de lindane (insecticide) à 75µg.kg$^{-1}$ et 280µg.kg$^{-1}$ ont été dissipés en 240 jours dans un sol après ajout de nutriments, contre 20% dans le même temps pour la modalité non biostimulée (Dadhwal et coll. 2009). L'ajout de nutriments dans une aquifère contaminée par des solvants chlorés à des concentrations variant entre 0,5 et 10mg.L$^{-1}$ a généré une dégradation de ces composés avec une durée de 1/2 vie de l'ordre de 15 jours en biodégradation aérobie par injection d'oxygène (Devlin et coll. 2004) ; l'ajout d'un surfactant dans une aquifère a permis la déchloration réductrice de tétrachloroéthène par stimulation de la microflore anaérobie réductrice (Ramsburg et coll. 2004). Du MTBE contenu dans des eaux souterraines a pu être dégradé suite à une injection d'oxygène (Smith et coll. 2005) dans les eaux souterraines. Pour le traitement des effluents, il existe une technique particulière, le biobed (Grégoire et coll. 2008). Ce système est constitué du sol de l'exploitation, dont on espère que la microflore est adaptée aux polluants à traiter, et d'un substrat additionnel (par exemple de la paille pour apporter du carbone et des éléments minéraux) pour stimuler les microorganismes. On fait alors passer l'effluent à travers la biomasse jusqu'à obtenir un taux de dégradation suffisant. Selon les polluants présents dans l'effluent à traiter, différentes populations microbiennes adaptées à leur dégradation seront sélectionnées dans la biomasse (Vischetti et coll. 2008), ce qui permet d'obtenir des taux de dégradation élevés (97% au bout de 196 jours) pour des concentrations initiales elles aussi élevées (50mg.L$^{-1}$) (Spliid et coll. 2006). Cette technique est notamment employée avec succès dans le cas d'effluents viti-vinicoles, où des taux de dégradation de produits phytopharmaceutiques supérieurs à 80% sont obtenus pour des concentrations initiales en polluants entre 3 et 100mg.L$^{-1}$ (Esteve et coll. 2007). L'un des inconvénients de la biostimulation vient de la stimulation non spécifique qui favorise tous les microorganismes sans viser

particulièrement ceux performants pour la dépollution, voire favorise des organismes inadaptés à l'objectif du traitement (Bento et coll. 2005, Lebeau 2008). Pour s'affranchir de la non spécificité de la plupart des substrats, une autre technique de bioremédiation existe ;

- **La bioaugmentation** vise à traiter les matrices polluées par l'ajout sélectif de cultures pures ou de consortia microbiens, ou de gènes de dégradation adaptés afin qu'il soient transférés à la microflore indigène (Gentry et coll. 2004a, El-Fantroussi et Agathos 2005). Cette technique s'avère utile lorsque la matrice à traiter est pauvre en microorganismes pour la dégradation du polluant considéré ou lorsque les microorganismes ne sont pas adaptés.

Quelle que soit leur origine, les microorganismes sont cultivés en masse, *ex situ*, en conditions contrôlées, avant d'être inoculés dans la matrice à traiter. Cette technique peut être mise en place dans des matrices liquides ou solides (ibid., Grundmann et coll. 2007, Nurk et coll. 2009) et peut être utilisée pour des polluants variés : solvants chlorés, MTBE, nitrophénols, pentachlorophénols, HAP, carburants, polychloro-biphényls et plusieurs produits phytopharmaceutiques (Gentry et coll. 2004a). Une étude menée par Siripattanakul et coll. (2009) sur de l'atrazine à 1,5mg.$L^{-1}$ dans une colonne de sable traitée par bioaugmentation (cellules immobilisées) a montré une dissipation de cet herbicide allant de 42 à 80%. Cirja et coll. (2009) ont constaté au bout de 5 jours une diminution de 93% de la radioactivité associée à la présence de nonylphénol dans un bioréacteur bioaugmenté avec une souche de *Sphingomonas*, contre 50% seulement pour le contrôle non bioaugmenté. La bioaugmentation peut permettre d'améliorer un système de traitement des hydrocarbures mais pas la minéralisation des polluants : l'étude de Domde et coll. (2007) montre que l'emploi de la bioaugmentation permet de réduire de 50% la demande chimique en oxygène contre 15% pour une modalité non bioaugmentée. La bioaugmentation peut également s'appliquer à des pollutions anciennes (50 ans) et permet d'obtenir un taux de dégradation de 41% au bout de 64 jours pour des sols contenant 8,15mg.$kg^{-1}_{sol}$ de HAP, contre 35% pour la modalité non bioaugmentée (Li et coll. 2009). Cette technique peut offrir un gain de temps substantiel pour la remédiation : 43 jours ont été ainsi nécessaires à la bioaugmentation pour obtenir le même résultat de dégradation de polychloroéthènes que la biostimulation au bout de 121 jours (Lendvay et coll. 2003).

**Origine des microorganismes** : les microorganismes utilisés peuvent être importés : bactéries exogènes obtenues à partir d'un sol (Marron-Montiel et coll. 2006), sélectionnées par cultures successives dans du milieu contenant la molécule à dégrader (Kolic et coll. 2007) ou bactéries « de laboratoire » bien étudiées et dont les paramètres de fonctionnement optimal sont connus (Niu et coll. 2009). Mais l'utilisation de microorganismes indigènes peut être un avantage car ces derniers sont déjà adaptés à leur milieu, ce qui permet de réduire le temps de latence après inoculation et d'améliorer les performances de dégradation (Devinny et Chang 2000, Capelli et coll. 2001, Bento et coll. 2005). Qui plus est, la sélection peut se faire par rapport au caractère rhizosphérique ou non du sol, la proportion de bactéries r ou K étant variable entre un sol rhizosphérique et non-rhizosphérique (Sarathchandra et coll. 1997, Kozdroj et van Elsas 2000). La bioaugmentation peut aussi se pratiquer avec du sol ou sédiment exposé au polluant, méthode appelée « sol activé » (Runes et coll. 2001, Gentry et coll. 2004b). On favorise alors au sein de la communauté bactérienne, les populations tolérantes au(x) polluant(s) ciblés ; dans le meilleur des cas celles qui le(s) dégradent. Cette sélection « naturelle » évite ainsi une étape lourde de sélection dirigée et permet par ailleurs de valoriser des bactéries non cultivables puisqu'on ne passe pas par une étape préalable de culture.

**Souche pure ou consortium** : la dégradation observée peut être améliorée par un effet de syntrophisme : « association où la croissance d'un organisme dépend ou est améliorée par des facteurs de croissance, des aliments ou des substrats, fournis par un autre organisme se développant à proximité. Parfois les deux organismes en bénéficient » (Prescott et coll. 2003). Ce phénomène est différent du mutualisme, défini comme « une interaction positive entre des microorganismes différents dont les deux partenaires bénéficient » (Orphan 2009). Ainsi une étude menée par Richard et Vogel en 1999 montre le bénéfice apporté par la bioaugmentation de consortia plutôt que de souches pures. Dans cette étude, un consortium de sept bactéries a été isolé d'un sol contaminé, avec pour objectif de dégrader le carburant diesel. Sur les sept membres du consortium, seuls trois dégradent le polluant utilisé, les quatre autres souches ne présentant pas de capacité de dégradation. Pourtant la dégradation des polluants, testée dans un sol, varie entre 10 et 60% avec des souches isolées du consortium et atteint 90% avec le consortium complet. De même, une étude de Muller et coll. (2010) a montré que l'utilisation de consortia

permet de dégrader efficacement un cocktail d'oestrogènes synthétiques et naturelles. Il arrive même que certaines souches prises isolément ne puissent dégrader un polluant, mais y arrivent en coculture syntrophique (Meckenstock 1999).

**Efficacité des microorganismes** : le principal problème rencontré en bioaugmentation est la survie de l'inoculum (Gentry et coll. 2004a, Braud et coll. 2009). Le déclin de *Pseudomonas fluorescens* est ainsi de 0,2 à 1 log tous les 10 jours selon le type de sol, le type de souche, son potentiel génétique et ses caractéristiques physiologiques (Van Elsas et coll. 1991, 1992). En effet les souches inoculées peuvent ne pas s'adapter dans le cas de souches exogènes, mal fonctionner (Silva et coll. 2009) en raison de carences en nutriments, de prédation (Bouchez et coll. 2000) ou d'immobilité (Alexander 1999), voire ne pas survivre (van Veen et coll. 1997, Moran et coll. 2006, Fu et coll. 2009b). Une solution à ce problème peut être de réinoculer périodiquement le système, ce qui permet un gain sensible d'efficacité (Newcombe et Crowley 1999), ou d'immobiliser l'inoculum dans un support adapté, éventuellement en co-localisant des substrats avec l'inoculum au sein du support. L'immobilisation d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* dans des billes d'alginate mélangé avec du lait écrémé permet ainsi d'obtenir une concentration bactérienne au minimum 2 fois supérieure à celle obtenue avec des modalités non immobilisées ou non supplémentées après 8 semaines d'incubation dans un sol (Braud et coll. 2009). D'autres essais ont été menés pour stimuler une population donnée en apportant des nutriments spécifiquement métabolisés par cette population ; cette option ne semble être bénéfique que dans le cas d'une co-localisation inoculum-substrat (Duquenne et coll. 1996).

**Facteurs de variation de l'efficacité** : dans les cas où les souches inoculées survivent, un certain nombre de facteurs sont susceptibles de faire varier l'efficacité de la bioaugmentation (Steinle et coll. 2000), tels que la concentration en polluant, la température, la taille de l'inoculum et la présence d'un substrat additionnel. La présence de nutriments supplémentaires tels que l'extrait de levure ou le citrate autres que les polluants pourrait retarder l'adaptation des microorganismes aux polluants et par suite leur dégradation (Wolicka et coll. 2009). D'autre part, une étude menée par Grundmann et coll. (2007) semble montrer que le pH du sol influe sur la durée d'efficacité de la bioaugmentation. Des facteurs propres à l'inoculum ont également une influence sur l'efficacité de la bioaugmentation : dans l'étude de Rousseaux et coll. (2003), un

inoculum d'une concentration minimale de $10^{10}$UFC.kg$^{-1}$ a été nécessaire pour observer une augmentation de la dégradation de l'atrazine dans un sol. Enfin, d'autres facteurs tels que la présence de plantes, l'humidité du sol ont un impact sur les communautés microbiennes du sol (Singh et coll. 2009), ce qui peut jouer indirectement sur la bioaugmentation.

**Améliorations possibles** : L'immobilisation des souches bioaugmentées peut permettre une augmentation significative des performances de dégradation (Cassidy et coll. 1996, Pattanasupong et coll. 2004), notamment en protégeant les cellules de la toxicité des polluants (Bazot et Lebeau 2008). La conjugaison de la biostimulation et de la bioaugmentation semble également augmenter le taux de biodégradation (El-Fantroussi et Agathos 2005, Lima et coll. 2009). L'utilisation de matériaux servant à la fois de sorbants pour les molécules et de support pour les souches bactériennes peut également permettre d'améliorer la dégradation du polluant (Duquenne et coll. 1999, Leglize et coll. 2007).

Pour terminer, la bioaugmentation n'est pas toujours la meilleure solution, la biostimulation pouvant parfois suffire (Smith et coll. 2005, Silva et coll. 2009). Pour autant, dans l'idée de se rapprocher d'un procédé de traitement le mieux contrôlé possible, c'est la technique de bioremédiation la plus sophistiquée, à l'évidence la plus appropriée pour y parvenir.

### *3.2.3. La phytoremédiation*

Généralités

La capacité de certaines plantes à accumuler les métaux à des teneurs élevées (caractère hyperaccumulateur) et à dégrader les polluants organiques permet d'envisager leur utilisation pour des traitements biologiques de décontamination peu coûteux, pertinents à de faibles profondeurs et à des niveaux de contamination en métaux relativement faibles (2,5-100mg.kg$^{-1}$) mais demandant du temps (Mulligan et coll. 2001). La phytoremédiation peut s'appliquer à tous les compartiments de l'environnement (Susarla et coll. 2002). Les polluants peuvent être traités par phytoextraction (passage dans les tissus de la plante, Olette et coll. 2008), phytodégradation, phytostabilisation, phytovolatilisation, rhizofiltration (sorption sur les racines) et rhizoremédiation (combinaison de bioremédiation et de phytoremédiation) (Macek et coll. 2000,

Kuiper et coll. 2004). Les différents devenirs des polluants sont récapitulés dans la figure I.8 (d'après Singh et Jain 2003). L'efficacité de la phytoremédiation découle de la disponibilité du polluant pour la plante ; cette disponibilité dépend de ses caractéristiques physico-chimiques, tels que le caractère lipophile d'un composé organique (Turgut 2005), de son âge et du type de sol (Cunningham et coll. 1995). En fonction de l'usage ultérieur de la plante, le mécanisme de détoxification peut être avantageux ou au contraire présenter des risques pour l'Homme et l'environnement (Verkleij et coll. 2009).

Cas des polluants organiques

**La phytoremédiation** appliquée aux composés organiques peut traiter une grande diversité de composés : explosifs, hydrocarbures, solvants chlorés, produits phytopharmaceutiques (Susarla et coll. 2002). Les produits phytopharmaceutiques sont concernés par la phytostabilisation (Syversen et Bechmann 2004, Popov et coll. 2006), la phytoaccumulation (Miglioranza et coll. 2004, Amaya-Chavez et coll. 2006, Garcinuno et coll. 2006, Olette et coll. 2008) et la phytodégradation (Pascal-Lorber et coll. 2004). La métabolisation une fois dans la plante est réalisée par un certain nombre d'enzymes (Susarla et coll. 2002), la détoxification des produits phytopharmaceutiques se faisant par l'intermédiaire d'une enzyme glutathione (Coleman et coll. 1997). L'efficacité obtenue peut être bonne, telle que rapportée par Mo et coll. (2008) avec la phytoextraction de 47 à 70% de DDT (insecticide) à 30mg.kg$^{-1}$ par des herbacées et du maïs après 70 jours de traitement. Des cas de phytoremédiation plus rapide, avec 98% de lambda-cyalothrin (insecticide) à 2,8g.ha$^{-1}$ extraits dans des racines d'une plante aquatique en 8 jours (Bouldin et coll. 2006), ont été montrés. Il est cependant difficile d'évaluer la part respective de la phytoremédiation et de la rhizodégradation car ces études ne dissocient généralement pas le rôle joué par la plante (accumulation) de la dégradation par les rhizobactéries. Cependant une étude réalisée par Mc Kinlay et Kasperek (1999) essaie d'apporter des éléments de réponse, et a montré que le rôle des macrophytes dans l'absorption et le métabolisme des pesticides demeure limité : la dégradation totale d'atrazine par des plantes « stériles » nécessite 40 jours, contre 7 lorsque la microflore associée à la plante est conservée. Des inoculations successives à partir des plantes « stériles », permettent ainsi de réduire le temps de

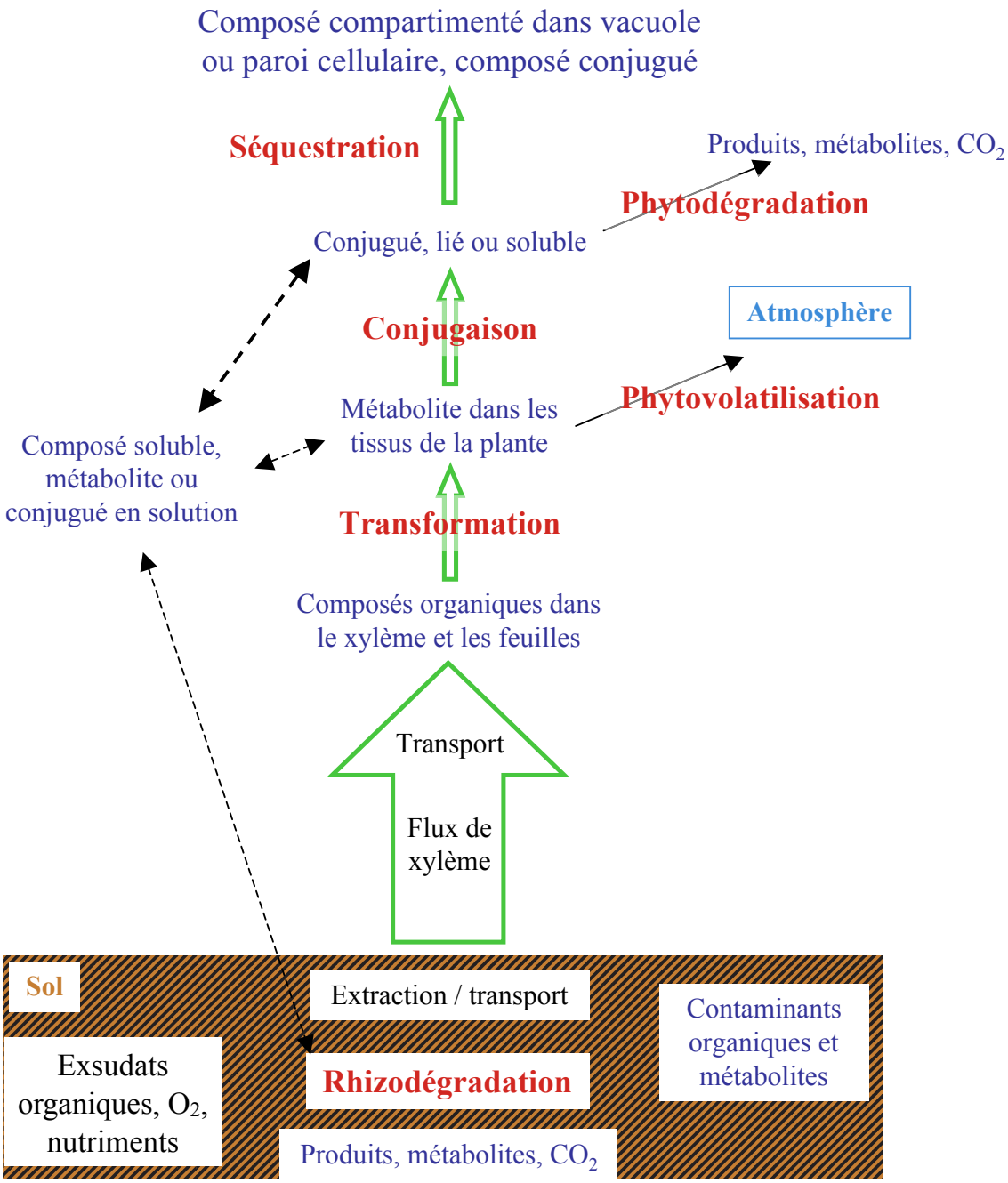



**Figure I.8 : Devenir des contaminants lors de la phytoremédiation.**
(d'après Singh et Jain 2003). Les flêches vertes indiquent le transport dans la plante, les flêches pointillées indiquent les transports possibles dans le cas des plantes aquatiques; en rouge les phénomènes intervenant lors de la phytoremédiation.

dégradation de 40 à 7 jours, les microorganismes colonisant progressivement les plantes.

**La rhizoremédiation** est une méthode qui combine phyto et bioremédiation (Kuiper 2004, Gerhardt et coll. 2009), pour une dégradation améliorée grâce à l'effet rhizosphère (Cunningham et coll. 2005, Wang et coll. 2009c). Ainsi la dégradation du pentachlorophénol est deux fois plus rapide dans un sol bioaugmenté et planté que dans un sol uniquement bioaugmenté (Dams et coll. 2007a), et la demi-vie de la simazine (herbicide) dans un sol passe de 73 jours pour une modalité non plantée non inoculée à environ 8 jours pour une modalité plantée inoculée (Liao et Xie 2008). La rhizosphère correspond à une zone de biomasse et d'activité microbienne élevée située à l'interface sol-racine et sous l'influence des racines des plantes. La biomasse microbienne peut y être entre 5 et 100 fois plus élevée que dans le sol avoisinant : c'est «l'effet rhizosphère» (Anderson et coll. 1993, Arshad et coll. 2007). Cette augmentation de population est due à l'apport par la plante d'un grand nombre de nutriments via les exsudats racinaires (acides aminés, sucres, mucilage[6]) et à la mise à disposition des microorganismes d'une importante surface de colonisation faisant office de niche écologique (Anderson et coll. 1993). En retour les microorganismes peuvent protéger les plantes et favoriser leur croissance : on parle alors de rhizobactéries supports de croissance pour les plantes, PGPR[7] en Anglais (Zhuang et coll. 2007). L'action de ces microorganismes se fait à plusieurs niveaux : protection des plantes contre certains composés toxiques tels les herbicides (Henderson et coll. 2006), dégradation de certains composés phytotoxiques (Li et coll. 2008), amélioration du développement du système racinaire de la plante (Zhuang et coll. 2007) et production d'inhibiteurs de stress (Saleem et coll. 2007). La rhizodégradation peut parfois être efficace sans l'ajout de microorganismes exogènes, comme le montre l'étude de Plangklang et Reunsang (2008) dans laquelle la dissipation du carbofuran, un insecticide, est aussi efficace avec que sans inoculum supplémentaire. Cette étude souligne l'importance de l'adaptation des souches à la rhizosphère à laquelle on les destine. L'amélioration de la dégradation du phénanthrène constatée dans l'étude de Corgié et coll. (2003) est visiblement sous le contrôle de la rhizosphère, les taux de dégradation décroissant de 86%, 48% et 36% pour

[6] substance gélatineuse sécrétée par les racines des plantes, permettant une meilleure pénétration de la racine dans le sol pendant la croissance

[7] Plant-Growth Promoting Rhizobacteria

des distances à la racine respectivement de 0-3, 3-6 et 6-9mm. L'effet de la plante peut être spectaculaire, comme dans l'étude de Liu et coll. (2007) : la dissipation du 4-chloronitrobenzène dans un sol au bout de 2 jours d'action passe de 0% pour la modalité non bioaugmentée à 100% pour la modalité bioaugmentée et plantée avec de la luzerne cultivée (*Medicago sativa L.)*. Mais si les exsudats racinaires peuvent avoir un effet bénéfique sur les microorganismes par apport de nutriments, ils peuvent dans certains cas diminuer la biodégradation des polluants en les resolubilisant, les rendant ainsi non disponibles pour les microorganismes en raison de leur lessivage (Joner et coll. 2002).

### *3.2.4. Méthodes d'évaluation des systèmes de traitement in situ*

La dissipation d'un polluant dans un système de traitement *in situ* peut être due à différents facteurs ; volatilisation, migration hors du site de traitement, sorption sur les particules de sol et transformations abiotiques rendent la biodégradation *in situ* difficile à prouver (Sturman et coll. 1995). La mise au point d'un tel système de traitement doit donc nécessairement s'accompagner d'un suivi de ses performances et de son impact environnemental permettant de s'assurer de son efficacité à différents points de vue ; le suivi de plusieurs paramètres est alors nécessaire (Höhener et coll. 1998, tableau I.14). Une étude multi-échelle de Davis et coll. (2003) sur l'influence de l'hétérogénéité du sol, des hydrocarbures en phase non aqueuse et de la distribution de l'humidité du sol fait état de la variabilité des performances de dégradation lors du passage du laboratoire au champ, montrant ainsi l'importance du suivi des performances de dégradation, plus que la simple extrapolation.

<u>Réduction de la charge polluante</u>

**Evaluation directe** : la réduction de la charge polluante peut s'évaluer directement par suivi de la concentration en polluants dans les matrices suivies (eau, sol, sédiment) à l'aide de techniques classiques d'extraction et d'analyses (Menendez-Vega et coll. 2007). Si ces techniques sont fiables en laboratoire – au taux d'extraction près pour les matrices solides – en présence de modalités de contrôle non bioremédié, elles sont sujettes à caution au champ en raison de

**Tableau I.14 : Paramètres à prendre en compte pour la mise au point d'un procédé de bioaugmentation-phytoremédiation *in situ.***

[a] : Blankenberg et coll. 2006 ; [b] : Lebeau 2008 ; [c] : Van Cauwenberghe et Roote 1998 ; [d] : Gavrilescu 2005 ; [e] : Romantschuk et coll. 2000 ; [f] : Pesaro et coll. 2004 ; [g] : EPA 1993.

| | Utilité / Influence | Conditions optimales |
|---|---|---|
| **Configuration du système de traitement** | Si le volume du système est insuffisant, le polluant ne sera pas retenu[a] | Suffisant pour avoir un temps de rétention compatible avec la biodégradation[b] |
| **Population bactérienne indigène** | Permet d'estimer la quantité de microorganismes présente et de détecter d'éventuelles populations d'intérêt pour la bioaugmentation[c] | - |
| **Végétation** | Evaluer si la végétation éventuellement en place convient au système envisagé | Espèces résistantes à la pollution visée et aux conditions environnementales du système, capables de maintenir (survie, activité) les microorganismes apportés |
| **Type de sol[d]** | - TOC, teneur en argiles (disponibilité des nutriments et des polluants)<br>- porosité, perméabilité, densité (teneur en eau) | - |
| **Teneur du sol en nutriments** | Evaluer si les microorganismes auront assez d'éléments minéraux (N, P, K, ...) et d'accepteurs d'électrons ($O_2$, $NO_3^-$, $SO_4^{2-}$) pour utiliser les polluants comme source de carbone[c] | C : N : P = 120 : 10 : 1 (proportion molaire)[d] |
| **pH du sol** | Trop élevé (alcalin) ou trop faible (acide), il peut empêcher les microorganismes de se développer[c] | 5,5-8,5[d] |
| **Conditions rédox / Teneur en oxygène dans le sol** | En cas de conditions anaérobies et/ou réductrices, la dégradation risque d'être lente et partielle[c] | Eh > 50mV[d]<br>$O_2$ dissout > 0,2mg.L$^{-1}$ [d]<br>espace poral rempli d'air > 10% pour la dégradation aérobie[d] |
| **Humidité du sol** | Un taux d'humidité trop faible empêchera la biodégradation ou la ralentira[f] | 25-85% de la capacité au champ[d] |
| **Température** | Une température trop basse ne permettra pas la dégradation microbienne dans le sol[e] | 15-45°C[d] |
| **Type de polluants[c]** | Evaluer la réactivité chimique, la dégradabilité, la distribution dans les différentes phases (potentiel de lessivage / biodisponibilité) des polluants et les effets d'interaction | - |
| **Niveau de pollution** | - évaluer si les concentrations présentes permettent à des microorganismes de se développer (toxicité)[c]<br>- permet de sélectionner des plantes/souches microbiennes ayant des capacités de résistance suffisantes | concentrations maximales recensées + marge[g] |
| **Modalités de bioaugmentation** | Fournir à l'inoculum une taille et une formulation (par exemple, cellules immobilisées) suffisante pour une survie/dégradation optimale | Survie à long terme de l'inoculum |
| **Performances / Impact environnemental** | Un système ne dégradant que partiellement les polluants pour donner des métabolites encore plus toxiques ne pourra être satisfaisant | - Minéralisation de 100% des polluants organiques ; extraction de 100% des polluants métalliques<br>- Aucun impact environnemental négatif ; restauration du système |

l'absence de contrôle abiotique permettant de discriminer biodégradation et dégradation (Sturman et coll. 1995).

**Evaluation indirecte** : la réduction de la charge polluante peut s'évaluer de manière indirecte par l'intermédiaire de plusieurs techniques.

Ainsi la respirométrie qui détermine la biodégradation par suivi de la consommation d'$O_2$ (Taok et coll. 2007) ou du dégagement de $CO_2$ (Richard et Vogel 1999). L'avantage de cette technique est qu'elle est rapide et aisée à mettre en place ; son inconvénient est qu'elle ne permet pas de distinguer la consommation d'$O_2$ ou le dégagement de $CO_2$ dus à la biodégradation de ceux dus à la dégradation chimique des polluants et à la dégradation d'autres composés dans la matrice (EPA 1993). L'emploi de molécules marquées à l'aide d'isotopes permet de s'affranchir de ce problème, par le phénomène de fractionnement isotopique (Meckenstock et coll. 2004). L'utilisation des molécules marquées étant différente lors de la dégradation chimique et de la biodégradation en raison de la plus grande stabilité (et donc de la moindre utilisation biologique) des isotopes lourds, la modification de ratio $^{isotope}C/^{12}C$ due à la dégradation du polluant permettra de distinguer la biodégradation des autres phénomènes. De plus, l'isotope $^{14}C$ du carbone est radioactif ce qui permet de localiser et quantifier le polluant enrichi dans la matrice sol (Von Wiren-Lehr et coll. 1997, Langenbach et coll. 2000) ou les plantes (Bankston et coll. 2002, Pascal-Lorber et coll. 2004). L'utilisation de $^{14}C$ est ainsi très répandue en laboratoire (Anderson et coll. 2002, Sorensen et coll. 2008, Badawi et coll. 2009, Doublet et coll. 2009, Satsuma et coll. 2009) mais présente l'inconvénient de ne pouvoir s'appliquer au terrain en raison de la radioactivité de cet isotope. L'utilisation d'isotopes stables est donc de plus en plus fréquente (Braeckevelt et coll. 2007, 2008, Hofstetter et coll. 2008, Imfeld et coll. 2008, 2009), surtout pour le suivi du fractionnement isotopique des polluants, l'application au terrain étant possible, même si elle se heurte à des interférences de matrices lorsqu'elle est employée sur des échantillons environnementaux (Blessing et coll. 2008).

Il est également possible d'évaluer la réduction de la charge polluante par le suivi de la toxicité de l'effluent ou du sol/sédiment (Schulz et Peall 2001, Sherrard et coll. 2004, Bouldin et coll. 2005, Dams et coll. 2007b) par des tests du type Microtox® faciles à mettre en place mais

dont l'inconvénient est de n'être pas directement extrapolable de la bactérie à l'humain (EPA 1993). De plus cette méthode donne des résultats globaux qui ne renseigneront pas sur la dégradation de la molécule-mère, notamment si le métabolite principal est plus toxique que le composé parent, comme c'est le cas pour le diuron ; la disparition du diuron est masquée par la plus grande toxicité du 3,4-DCA (Tixier et coll. 2002). De plus, l'augmentation de la toxicité de la matrice mesurée peut être en désaccord avec la diminution de quantité de polluants (en masse) constatée par l'intermédiaire de l'évaluation directe (chimique) des polluants (Patureau et coll. 2008) : il peut donc être pertinent de combiner plusieurs types de suivi des polluants dans une matrice pour s'assurer de l'efficacité de la bioremédiation.

La biodégradation peut également être évaluée par d'autres moyens (Ivanov et coll. 2004), tels que la diminution de la concentration en accepteurs d'électrons (Hunkeler et coll. 1999) et en nutriments ou la croissance des populations dégradantes, bien que ces méthodes ne puissent constituer une preuve à elles seules (Sturman et coll. 1995).

Suivi des populations microbiennes

Si une biodégradation est observée à l'aide des techniques précédemment évoquées, il peut être bon de pouvoir la relier à l'action des microorganismes sélectionnés par biostimulation ou bioaugmentation. Le suivi des populations et/ou communautés microbiennes est alors important.

**Suivi de populations** : le suivi de la population inoculée est important pour évaluer sa survie et sa répartition dans le sol et peut permettre d'expliquer les performances de dégradation observées (Sturman et coll. 1995). Certaines techniques de suivi de la bioaugmentation, telles que le FISH[8] ou le marquage GFP[9], sont spécifiques d'une population bactérienne donnée. Le FISH utilise la fixation de fluorophores sur l'ARN ribosomal pour suivre les populations choisies (Boon et coll. 2003). Aucune culture préalable n'est nécessaire et l'identification de bactéries dans des assemblages de populations par microscopie à épifluorescence, confocale ou par cytométrie de flux est ainsi possible (Pernthaler et coll. 2001). Il permet de suivre dans une

[8] Fluorescent In Situ Hybridization

[9] Green Fluorescent Protein

matrice donnée des genres bactériens bien définis, par exemple les *Acinetobacter* (Wagner et coll. 1994). Cependant la faible accessibilité de l'ARN ribosomal, la faible teneur cellulaire en ribosome et l'imperméabilité de la membrane cellulaire peuvent expliquer les échecs parfois rencontrés de cette méthode (Behrens et coll. 2003). La GFP est une protéine dont le gène de synthèse peut être intégré aux microorganismes que l'on souhaite suivre (Atkins 2000) : cette protéine étant naturellement fluorescente, elle sera détectable par les mêmes moyens que le FISH, sa persistance pouvant parfois créer un bruit de fond gênant pour le suivi (ibid.). De plus la protéine a besoin d'oxygène pour sa maturation, ce qui peut être un inconvénient (Watanabe et Hamamura 2003). Cette technique a été employée avec succès pour le suivi de souches dégradantes dans des sols (Jansson et coll. 2000, Braud et coll. 2009) et dans des boues activées (Boon et coll. 2003).

**Suivi de fonctions** : le suivi de l'activité des microorganismes peut se faire de manière indirecte par le suivi de gènes de dégradation ou de protéines synthétisées par ces microorganismes et impliquées dans la dégradation des polluants. Il existe actuellement un certain nombre de fonctions (fixation de l'azote, réduction des nitrates,...) dont les gènes sont répertoriés et potentiellement détectables par cette méthode (Smith and Osborn 2009). Ce suivi permet notamment d'évaluer le potentiel de bioatténuation d'un site comme le montre l'étude de Baldwin et coll. (2008) qui a recensé les différents gènes de dégradation de BTEX et leur abondance dans des eaux contaminées. L'étude réalisée par Nyyssönen et coll. (2009) sur la détection de gènes de dégradation des HAP dans une aquifère contaminée montre que la quantité de gènes présente est spatialement liée au traitement de biostimulation mis en place, ce qui confirme l'efficacité de ce traitement.

Impact environnemental

**Diversité microbienne** : il peut être pertinent d'évaluer la diversité microbienne du système au cours du traitement, pour évaluer globalement le maintien d'une population favorisée par bioaugmentation ou biostimulation, ou s'assurer du maintien d'une certaine biodiversité au sein du système malgré le traitement. L'analyse de diversité microbienne n'est pas simple ; il faut s'affranchir au maximum de l'hétérogénéité du sol et de l'incultivabilité de nombreux

microorganismes (Kirk et coll. 2004). Il existe deux grandes familles d'analyses, la première basée sur des techniques biochimiques nécessitant de cultiver les microorganismes et la seconde basée sur des techniques de biologie moléculaire basées sur l'extraction et l'amplification de l'ADN d'intérêt (tableau I.15). Les analyses biochimiques telles que le comptage sur boîte ou l'établissement des profils physiologiques des communautés présentent l'avantage d'être faciles d'usage, mais ne concernent que les microorganismes cultivables. Certaines analyses biochimiques (l'analyse des méthyls esters d'acides gras) et les analyses moléculaires au contraire peuvent être utilisées pour la population non cultivable mais sont plus complexes à mettre en œuvre (ibid.). Il convient selon les cas d'adapter la technique d'analyse à l'objectif de l'étude. Ainsi une étude d'Hartmann et coll. (2005) montre que la RISA, moins précise que la DGGE ou la TTGE, est plus adaptée lorsque l'objectif est une recherche rapide et globale de différences entre traitements, plus que l'analyse phylogénétique précise des microorganismes affectés. La T-RFLP est une autre méthode d'analyse qui inclut un marqueur fluorescent sur l'une des sondes à ADN utilisée. En conclusion, les auteurs indiquent que des deux techniques de RISA et T-RFLP, la RISA est rapide et générale, de coût et de travail modérés, la T-RFLP plus complexe mais offrant la possibilité d'identification phylogénétique. La T-RFLP rejoint en cela la DGGE et la TTGE qui offrent cette possibilité après excision et amplification des bandes obtenues. Ces techniques présentent l'avantage de pouvoir être employées sur des échantillons environnementaux, et doivent être utilisées en complémentarité afin d'obtenir le maximum d'informations sur la diversité microbienne au sein des systèmes étudiés (Malik et coll. 2008). L'utilisation de ces techniques moléculaires doit se faire avec précaution car un certain nombre de biais existe tant au niveau expérimental, pendant la phase de PCR par exemple (Kanagawa 2003) qu'au niveau fondamental, étant donné le polymorphisme intraspécifique de l'ADNr 16S (Roudière et coll. 2007).

**Respirométrie** : Il existe d'autres méthodes de suivi des populations microbiennes ; parmi celles-ci, les mesures respirométriques déjà évoquées permettent d'évaluer l'activité globale du système bioaugmenté et peuvent donc être utiles pour observer un regain d'activité suite à la dégradation des polluants. Elles peuvent cependant être faussées car elles rendent

**Tableau I.15 : Techniques d'analyse de diversité microbienne, avantages et inconvénients.**
(d'après Kirk et coll. 2004)

| Technique | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|
| Guanine plus cytosine (G+C) | Pas de biais de PCR; inclut tout l'ADN extrait ; quantitatif, inclut les membres rares des communautés | Nécessite de grandes quantités d'ADN ; dépend de l'efficacité de la lyse et de l'extraction ; faible résolution |
| Réassociation et hybridation d'acides nucéliques | Tout l'ADN est extrait; pas d'influences des biais de PCR; étude de l'ADN ou de l'ARN; peut être étudié *in situ* | Manque de sensibilité ; besoin de séquences en grand nombre pour qu'elles soient détectées ; dépend de l'efficacité de la lyse et de l'extraction |
| Microsondes ADN et hybridation ADN | idem hybridation d'acides nucléiques ; de nombreux gènes peuvent être analysés ; spécificité améliorée si utilisation de gènes ou de fragments d'ADN | Ne détecte que les espèces les plus abondantes ; Nécessite de cultiver les microorganismes ; précis seulement dans le cas de systèmes à faible diversité |
| Electrophorèse sur gel à gradient de température et de dénaturation (TTGE, DGGE) | Grand nombre d'analyses simultanées possibles ; fiable, reproductible et rapide | Biais dus à la PCR ; dépend de l'efficacité de la lyse et de l'extraction ; la manipulation des échantillons peut influencer les communautés (par exemple si stockage trop long, les communautés varient) ; une seule bande peut représenter plusieurs espèces (et réciproquement); ne détecte que les espèces dominantes |
| Polymorphisme de conformation à simple brin (SSCP) | idem DGGE/TGGE ; pas de queue GC, pas de gradient | Biais dus à la PCR ; les brins simples d'ADN ont plus d'une conformation stable |
| Analyse de restriction d'ADN ribosomal amplifié (ARDRA) ou polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) | Détecte les changements structuraux dans une communauté microbienne | Biais dus à la PCR ; gels souvent trop compliqués à analyser |
| Polymorphisme de longueur de fragment terminal de restriction (T-RFLP) | Gels plus simples qu'en RFLP (nombre plus réduit de brins d'ADN puisque seuls ceux porteurs du fluorochrome sont détectés) ; peut être automatisé ; analyse d'un grand nombre d'échantillons ; grande reproductibilité ; compare des différences entre les communautés microbiennes | Biais dus à la PCR ; dépend de l'efficacité de la lyse et de l'extraction ; le type de Taq peut augmenter la variabilité ; choix de primers universels ; l'enzyme de restriction utilisée influencera l'empreinte de la communauté |
| Analyse de l'espace intergénique ribosomal (RISA) / Analyse automatisée (ARISA) | Grande reproductibilité ; profil de communautés ; peut être automatisé (ARISA) | Nécessite de grandes quantités d'ADN ; résolution souvent faible ; biais de PCR |
| Comptage sur boîtes | Rapide et peu coûteux | Pas de détection des microorganismes non cultivables ; organismes à croissance rapides favorisés ; espèces fongiques à large production de spores favorisées |
| Profil physiologique des communautés (CLPP) | Rapide, reproductible, relativement peu coûteux ; différencie les communautés microbiennes ; génère un grand nombre de données ; possibilité d'utiliser des kits bactériens, fongiques ou des sources de carbone spécifiques de sites (Biolog) | Ne représente que la fraction cultivable des communautés ; organismes à croissance rapides favorisés ; ne représente que les organismes capables d'utiliser les sources de carbone disponibles ; diversité métabolique potentielle, pas la diversité in situ ; sensible à la densité de l'inoculum |
| Analyse des méthyl esters d'acides gras (FAME) | Pas de culture des microorganismes, extraction directe du sol ; suivi des organismes spécifiques ou des communautés | Besoin de beaucoup de matière en cas de spores fongiques ; biais dus aux facteurs externes ; possibilité de confusion entre des microorganismes |

biodisponibles des fractions de produits qui ne l'étaient pas dans l'expérience (Semple et coll. 2006).

La mise au point d'un système de traitement *in situ* de la pollution par couplage de bioaugmentation et phytoremédiation nécessite donc la prise en compte d'un certain nombre de paramètres d'état de l'écosystème, qui permettront d'adapter les techniques au site et d'utiliser les techniques de suivi les plus pertinentes (tableau I.15).

### *3.2.5. Bioremédiation des polluants étudiés*

Cas du glyphosate (tableau I.16)

Il existe des organophosphonates à l'état naturel quoiqu'ils soient assez rares (Pelmont 2005). Ce sont des produits stables et résistants à l'hydrolyse, dont la liaison C-P est stable (résistante à la soude et à l'acide chlorhydrique). Certaines espèces telle que *Enterobacter aerogenes* possèdent 2 voies de dégradation du glyphosate (ibid.). La dégradation du glyphosate observée dans les sols et l'eau dès les années 70 est imputée aux microorganismes (Rueppel et coll. 1977, Torstensson et Aamisepp 1977, Smith et Aubin 1993, Araujo et coll. 2003). La résistance de certaines plantes a été montrée peu de temps après (Amrhein et coll. 1983) et serait due chez certaines espèces à une augmentation de la synthèse de l'enzyme censée être inhibée en présence de glyphosate (Yuan et coll. 2002), ou à la translocation de la molécule dans certaines parties non sensibles de la plante (Lorraine-Colwill et coll. 2003). Les performances de dégradation obtenues par des microorganismes isolés sont parfois très bonnes. Ainsi une dégradation complète de 150mg.$L^{-1}$ de glyphosate en 3 jours par des microorganismes isolés à partir de boues activées est rapportée par Balthazor et Hallas (1986), de 3,38g.$L^{-1}$ en 3 jours par une autre souche isolée d'eaux riches en glyphosate (Jacob et coll. 1988), et plus rapide, 50% de glyphosate à 170mg.$L^{-1}$ dégradé en 40h par des *Pseudomonas pseudomallei* (Penaloza-Vazquez et coll. 1995). La dégradation du glyphosate a été observée pour des microorganismes variés : bactéries du sol (Schowanek et Verstraete 1990), bactéries endophytiques (Kuklinsky-Sobral et coll. 2005), bactéries symbiotiques (Liu et coll. 1991, Zabaloy et coll. 2005), cyanobactéries (Lipok et coll. 2007), champignons (Klimek et coll. 2001, Obojska et coll. 2002), streptomycètes

**Tableau I.16 : Microorganismes dégradant le glyphosate.**

| a | *Arthrobacter atrocyaneus* | *Pseudomonas sp. Lbr* | *Pseudomonas sp. 4ASW* | *Pseudomonas pseudomallei 22* | *Streptomycète* | *Penicillium notatum* | *non identifié* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Type d'organisme** | bactérie | bactérie | bactérie | bactérie | actinomycète | champignon | champignon |
| **[glyphosate] initiale** | 17mg.L$^{-1}$ | 3400mg.L$^{-1}$ | 42mg.L$^{-1}$ | 170mg.L$^{-1}$ | 1700mg.L$^{-1}$ | 85mg.L$^{-1}$ | 170mg.L$^{-1}$ |
| **% de dégradation** | 100 % | 100 % | 100 % | 80 % | 60 % | 100 % | 100 % |
| **Temps de dégradation** | - | 70h | 40h | 120h | 10 jours | - | 21 jours |
| **Vitesse de dégradation** | - | - | 0,58mg$P_i$/L/h | - | 2,35mg$P_i$/L/h | - | - |
| **Métabolisme** | Seule source de P | Seule source de P | Seule source de P | Seule source de P | Seule source de N et P | Seule source de P | Seule source de P |
| **Métabolites** | AMPA | - | Sarcosine | - | Sarcosine | - | - |
| **Source** | Pipke et Amrhein 1988 | Jacob et coll. 1988 | Dick et Quinn 1995 | Penaloza-Vasquez et coll. 1995 | Obojska et coll. 1999 | Bujacz et coll. 1995 | Krzysko-Lupicka et coll. 1997b |

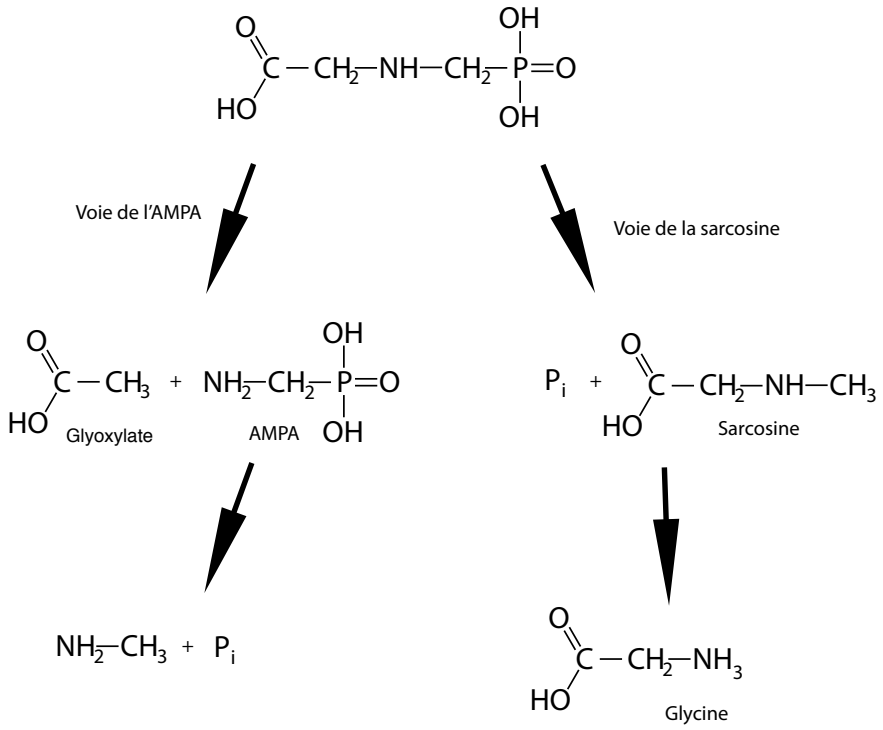



**Figure I.9 : Voies de dégradation aérobies du glyphosate.**
(d'après Jacob et coll. 1988). $P_i$ désigne le phosphate.

(Obojska et coll. 1999, 2003). Il arrive que les microorganismes impliqués dans la dégradation ne soient pas cultivables (Forlani et coll. 1999). Il apparaît que ce métabolisme de dégradation peut être immédiat (von Wiren-Lehr et coll. 1997) ou nécessiter un temps d'adaptation de la microflore par des applications répétées du produit (Quinn et coll. 1988).

Il existe deux voies de dégradation aérobie répertoriées pour le glyphosate (figure I.9) (Ternan et coll. 1998). Dans la première voie de dégradation, le glyphosate est clivé au niveau de la liaison C-N (Balthazor et Hallas 1986, Hallas et coll. 1988, Jacob et coll. 1988, Pipke et Amrhein 1988, Mc Auliffe et coll. 1990, Obojska et coll. 2002, Lipok et coll. 2007) par une enzyme glyphosate oxydoréductase ; les métabolites obtenus sont l'AMPA et le glyoxylate. L'AMPA est ensuite utilisé comme source de phosphate inorganique (Jacob et coll. 1988). C'est cette voie qui est majoritairement observée dans l'environnement. Dans la deuxième, le glyphosate est clivé au niveau de la liaison phosphonate via une C-P lyase (Kent Moore et coll. 1983, Kishore et Jacob 1987, Pipke et Amrhein 1988, Quinn et coll. 1988, 1989, Bujacz et coll. 1995, Dick et Quinn 1995a, 1995b, Krzysko-Lupicka et coll. 1997a). Le métabolite obtenu, la sarcosine, est ensuite dégradé en glycine et formaldéhyde (Shinabarger et Braymer 1986, Pipke et coll. 1987b), deux composés facilement assimilables par les microorganismes. Ce mécanisme est largement présent au sein des espèces bactériennes (Huang et coll. 2005) et des champignons (Krzysko-Lupicka et coll. 1997b). Le glyphosate étant ici utilisé en tant que source de phosphore, cette voie sera inhibée en cas de présence dans le milieu de phosphore libre plus facilement assimilable, tel que le phosphate inorganique (Pipke et coll. 1987a, Quinn et coll. 1989, Lerbs et coll. 1990). Cette voie étant de plus le résultat d'un cométabolisme (Torstensson et Aamisepp 1977), elle sera moins souvent observée dans l'environnement que la première voie de dégradation évoquée. Cependant, certaines études rapportent l'existence d'enzymes C-P lyase inductibles par le substrat et dérégulées par rapport au phosphate, c'est-à-dire indépendantes de sa concentration dans le milieu (McGrath et coll. 1997, 1999, Obojska et coll. 1999).

Parfois le glyphosate peut servir de source d'azote pour des champignons (Klimek et coll. 2001) ou des cyanobactéries (Lipok et coll. 2007), mais seulement lorsqu'il en est la seule source dans le milieu.

La dégradation du glyphosate est influencée par la température, facteur d'activation de

l'activité microbienne (Stenrod et coll. 2005), et peut dans certains cas être améliorée par l'ajout d'un amendement dans le sol (Getenga et Kengara 2004). Il arrive que certains amendements n'aient pas grand effet. Ainsi Accinelli et coll. (2005) n'ont pas observé d'amélioration notable de la dégradation du glyphosate après ajout de résidus de maïs dans un sol. La sorption complète du glyphosate dans les sols (Newton et coll. 1994) pourrait poser problème quant à la dégradation du glyphosate, sa biodisponibilité diminuant au cours du temps ; cependant une étude de Schnürer et coll. (2006) a montré que le glyphosate sorbé peut quand même être dégradé puisqu'il reste biodisponible . Si l'influence des pratiques agricoles sur la dégradation du glyphosate est montrée, l'origine de cet effet n'est pas clairement élucidée (Gimsing et coll. 2004). Enfin, la dégradation du glyphosate ne semble pas affectée par la présence de cuivre (Courde et coll. 2000, Kools et coll. 2005), ce qui peut être intéressant dans le cadre de sols viticoles à teneur élevée en cuivre.

Cas du diuron (tableau I.17)

Le diuron n'est pas directement biodégradable (Lapertot et Pulgarin 2006), ce qui peut expliquer que dans une étude menée dans des sols en lysimètres par Guzzella et coll. (2006a), seulement 50% de diuron soit dissipé après 45 jours d'expérience. D'autres études montrent la dégradation de ce contaminant dans l'environnement (Gooddy et coll. 2002, Cederlund et coll. 2007), ou dans des expériences sur des sols (Dellamatrice et Monteiro 2004, Barra Caracciolo et coll. 2005), les métabolites principaux étant le 3,4-DCA, le dichlorophénylméthylurée (DCPMU) et le dichlorophénylurée (DCPU). Une étude menée par Sorensen et coll. (2003) montre que la dégradation du diuron dans le sol à la suite d'une application agricole est principalement microbienne. Le rôle de l'adaptation des populations dans la dégradation du diuron a été montré par Pesce et coll. (2009). La biodégradation du diuron est mise en évidence pour des mirocorganismes variés : des streptomycètes ont ainsi été trouvés capables de le dégrader (Castillo et coll. 2006), des actinomycètes (Esposito et coll. 1998), des champignons (Vroumsia et coll. 1996, Fratila-Apachitei et coll. 1999, Tixier et coll. 2000, Bending et coll. 2002, Badawi et coll. 2009), des micromycètes (Khadrani et coll. 1999) et des bactéries (Tixier 2002, Widehem et coll. 2002, Batisson et coll. 2007).

**Tableau I.17 : Microorganismes dégradant le diuron.**

| | *non identifié* | *Rhizoctonia solanii* | *Cunninghamella elegans* | *non identifié* | *Arthrobacter globiformis* | *Arthrobacter sp. N2* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Type d'organisme** | bacteries-champignons | champignon | champignon | actinomycète | bactérie | bactérie |
| **[diuron] initiale** | 10mg.L$^{-1}$ | 20mg.L$^{-1}$ | 40mg.L$^{-1}$ | 100mg.L$^{-1}$ | 20mg.L$^{-1}$ | 40mg.L$^{-1}$ |
| **% de dégradation** | 100 % | 97 % | 57,5 % | 4 à 37% | 100 % | 100 % |
| **Temps de dégradation** | 1 à 3 semaines | 7 jours | 7 jours | 7 jours | 3 jours | < 24h |
| **Vitesse de dégradation** | - | - | 0,24mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$ | - | 0,28mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$ | 0,17mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$ |
| **Métabolisme** | - | - | Seule source de C | - | Source de C additionnelle | Source de C additionnelle |
| **Métabolites** | - | - | DCPMU, DCPU | - | 3,4-DCA | 3,4-DCA |
| **Source** | Ellis et Camper 1982 | Vroumsia et coll. 1996 | Tixier et coll. 2000 | Esposito et coll. 1998 | Cullington et Walker 1999 | Tixier et coll. 2002 |

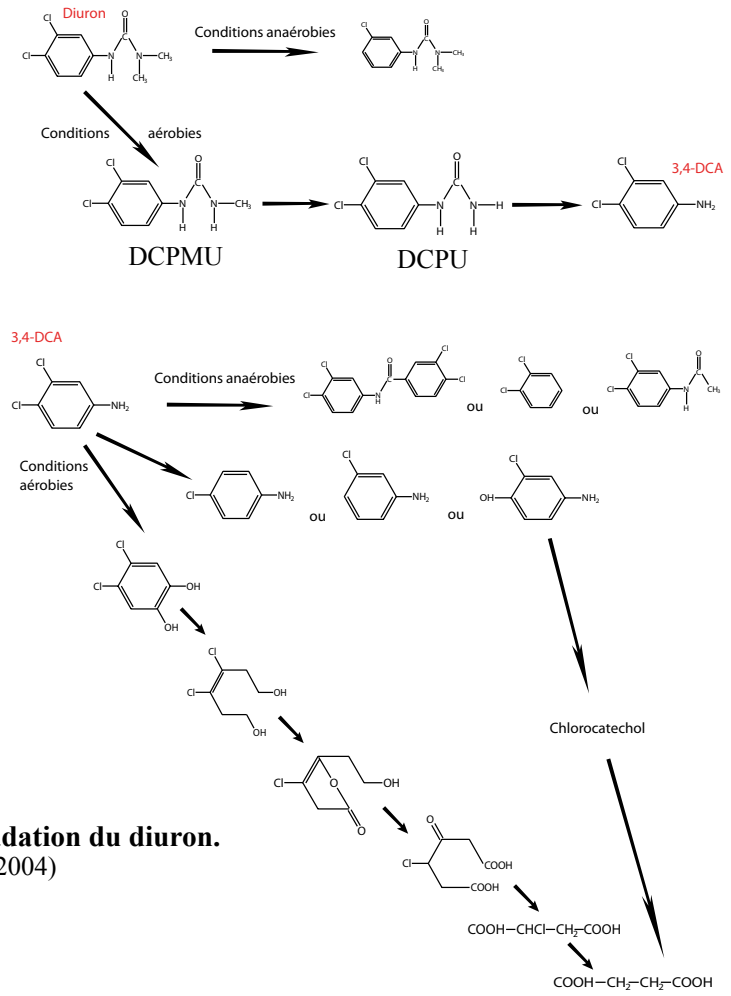



**Figure I.10 : Voies de dégradation du diuron.**
(d'après Giacomazzi et Cochet 2004)

Les voies de dégradation du diuron sont récapitulées dans la figure I.10 (d'après Giacomazzi et Cochet 2004). La dégradation aérobie par des consortia de bactéries et champignons donne le 3,4-DCA comme métabolite majoritaire (Ellis and Camper 1982, Cullington and Walker 1999, Tixier et coll. 2000, 2001, 2002, Turnbull et coll. 2001a, b, Sorensen et coll. 2003), le DCPMU et le DCPU étant des métabolites minoritaires. Un gène de dégradation du diuron responsable de la synthèse d'une enzyme phenylurée hydrolase active dans cette voie de dégradation et se trouvant sur un plasmide d'une bactérie dégradante a été isolé (Turnbull et coll. 2001b). El-Deeb et coll. (2000) ont quant à eux isolé une *Pseudomonas* capable de dégrader $3g.L^{-1}$ de diuron en 120h, avec accumulation d'un composé phénolique. Enfin en conditions anaérobies, la dégradation du diuron se fait par mono-déchloration pour donner comme unique métabolite le composé CPDMU, par un mécanisme enzymatique non élucidé (Attaway et coll. 1982, Stepp et coll. 1985). La dégradation du diuron est souvent incomplète et va donc rarement jusqu'à la minéralisation, mais il est possible de construire des consortia qui dissipent totalement le diuron (Bazot et coll. 2007, Sorensen et coll. 2008), ce qui est d'autant plus intéressant que la toxicité des métabolites peut être importante (Tixier et coll. 2002).

La sorption du diuron dans le sol peut être défavorable à sa biodégradation (Albers et coll. 2008) ; de même, des bactéries isolées du sol et dégradant bien le diuron en conditions de laboratoire ne le dégraderont pas immédiatement dans le sol (Cullington et Walker 1999). Cependant certaines techniques fonctionnent en pratique. La dégradation du diuron en circuit fermé à l'aide de boues activées est possible en conditions aérobies et anaérobies, mais les métabolites formés ainsi que les performances de dégradation seront différentes (Stasinakis et coll. 2009). Enfin sa dégradation ne semble pas affectée par la présence de cuivre (Courde et coll. 2000), ce qui est important dans le cas de sols viticoles à teneur en cuivre élevée.

<u>Cas du 3,4-DCA</u> (tableau I.18)

Le 3,4-DCA, bien que beaucoup plus toxique que sa molécule-mère, peut être dégradé (You and Bartha 1982, Zeyer et Kearney 1982, Bakhaeva et coll. 2001, Travkin et coll. 2003) voire dissipé (Dejonghe et coll. 2003) par des bactéries, dont les origines génétiques sont variées (Dejonghe et coll. 2002), des champignons (Tixier et coll. 2002) et inclut également des

**Tableau I.18 : Microorganismes dégradant le 3,4-DCA.**

| | *Pseudomonas fluorescens 26K* | *Delftia acidovorans* | *Comamonas testosteroni* |
|---|---|---|---|
| **Type d'organisme** | bactérie | bactérie | bactérie |
| **[3,4-DCA] initiale** | 250mg.$L^{-1}$ | 30mg.$L^{-1}$ | 30mg.$L^{-1}$ |
| **% de dégradation** | 100 % | 100 % | 100 % |
| **Temps de dégradation** | 7 jours | 5 jours | 3 jours |
| **Vitesse de dégradation** | 1,49mg.$L^{-1}$.$h^{-1}$ | 0,25mg.$L^{-1}$.$h^{-1}$ | 0,42mg.$L^{-1}$.$h^{-1}$ |
| **Métabolisme** | Source de C additionnelle | Seule source de C | - |
| **Métabolites** | 3,4-dichloroacétanilide | Linéaires non chlorés (supposition) | - |
| **Référence** | Tixier et coll. 2002 | Dejonghe et coll. 2003 | Dejonghe et coll. 2003 |

microorganismes non cultivables, proches des espèces *Variovorax* sp. et *Pseudomonas putida* (El-Fantroussi 2000). La dégradation aérobie du 3,4-DCA par les bactéries peut se faire par déchloration, hydroxylation du noyau aromatique et clivage de ce dernier à l'aide d'une enzyme catécholdioxygénase (Travkin et coll. 2003). En conditions anaérobies, la dégradation du 3,4-DCA donne du dichlorobenzène, du 3,4-dichloroacétanilide et du 3,4-dichloro-N(3,4-dichlorophényl)-benzamide, le dichlorobenzène étant majoritaire (Struijs et Rogers 1989, Travkin et coll. 2002). S'il paraît toxique pour les microorganismes, le 3,4-DCA ne semble pas affecter certaines plantes, qui l'assimilent et le métabolisent facilement (Lao et coll. 2003). La dioxygénation du 3,4-DCA donne un catéchol après désamination ; la réduction anaérobie donne du 1,2-dichlorobenzène.

Comme le diuron, le 3,4-DCA est moins biodégradé lorsqu'il est adsorbé (Bakhaeva et coll. 2001).

Si aucune souche bactérienne capable de dégrader à la fois le diuron, le 3,4-DCA et le glyphosate n'a été reportée dans la littérature, il est possible de minéraliser simultanément diuron, 3,4-DCA et glyphosate en créant un consortium de souches chacune adaptée à la dégradation de l'un de ces polluants (Bazot et Lebeau 2008).

# 4. L'ingénierie écologique appliquée à la problématique des produits phytopharmaceutiques

## 4.1. Généralités

Toute la difficulté dans la mise au point d'un système biologique de remédiation *in situ* réside dans le maintien, dans un écosystème dynamique et complexe, des fonctions dégradantes des microorganismes et des plantes préalablement sélectionnés en laboratoire. C'est pour cette raison que les traitements biologiques, bien qu'étant une voie économiquement et écologiquement intéressante, sont encore peu exploités pour leur manque de fiabilité. Une expertise de l'UE suggère ainsi de capitaliser des expériences portant sur ce type de traitement (Vijgen 2002).

En 2008, l'Institut Ecologie Environnement (IEE) du CNRS proposait d'investir en recherche dans le domaine de l'ingénierie écologique afin de créer de la connaissance à l'interface de plusieurs disciplines n'interagissant pas suffisamment et de trouver des solutions concrètes à un certain nombre de problématiques, dont le traitement des pollutions.

L'ingénierie écologique peut se définir de deux manières : « Au sens strict, c'est l'ensemble des savoirs et des méthodes visant à la manipulation *in situ* de systèmes écologiques (quelques individus, des populations, des communautés, des écosystèmes) dans un contexte écosystémique explicite (autres organismes, dimensions physiques et chimiques). Au sens large, l'ingénierie écologique désigne le corpus des savoirs mobilisables pour la gestion de milieux, la conception, la réalisation et le suivi d'aménagements ou d'équipements inspirés de, ou basés sur, les mécanismes qui gouvernent les systèmes écologiques (auto-organisation, diversité, structures hétérogènes, résilience, par exemple) ». Pour Gosselin (2008), les objectifs associés à l'ingénierie écologique sont les suivants :

- utiliser les écosystèmes naturels ou des idées émanant de leur fonctionnement afin de réduire ou éliminer les problèmes de pollution (compostage, traitement des eaux usées,...) ;
- restaurer les écosystèmes ayant subi une forte perturbation due aux activités humaines (réhabilitation de carrières, restauration de rivières et lacs) ;

- utiliser les ressources de certains écosystèmes tout en préservant leur bon fonctionnement écologique (agriculture, pêche, sylviculture) et leurs populations ;
- gérer les écosystèmes de manière à maintenir ou améliorer leur biodiversité, leurs fonctions et caractéristiques (proche de la biologie conservative) ;
- évaluer l'impact de l'aménagement du territoire sur les écosystèmes environnants en définissant éventuellement des mesures de compensation.

C'est le premier sens qui est concerné dans la présente étude, et l'objectif poursuivi est le premier des cinq explicités par Gosselin (2008). Dans ce mémoire, il s'agira d'exploiter, en les optimisant, certaines propriétés épuratrices d'écosystèmes particuliers, en l'occurrence les zones humides artificielles, pour réduire la pollution engendrée par certains produits phytopharmaceutiques utilisés en viticulture. L'idée est de définir et de prendre en compte les paramètres clés du fonctionnement de ces écosystèmes, tout en gardant à l'esprit que l'on ne les contrôle pas tous.

## 4.2. La Zone Humide Artificielle (ZHA)

### *4.2.1. Caractérisation*

Une zone humide peut être définie de la façon suivante : « (...) les terrains exploités ou non, habituellement inondés ou gorgés d'eau douce, salée ou saumâtre de façon permanente ou temporaire ; la végétation, quand elle existe, y est dominée par des plantes hygrophiles pendant au moins une partie de l'année » (Loi sur l'Eau, 1992). Les zones humides artificielles sont des zones humides créées par l'homme pour remplir différentes fonctions (Kennedy et Mayer 2002) :

- physique : réduction des inondations, protection des côtes, recharge des aquifères et piégeage des sédiments ;

- chimique : amélioration de la qualité de l'eau en sortie de zone humide, par réduction des nutriments (C, N et P) et des polluants, participation aux cycles biogéochimiques (C, N et S) ;

- biologique : augmentation de la biodiversité, niche écologique pour de nombreuses espèces.

La technologie de traitement dans ces zones met à profit la fonction naturellement épuratrice des zones humides, s'affirmant comme une méthode peu coûteuse, respectueuse de l'environnement et permettant de traiter une grande variété d'effluents (ibid.). Les zones humides artificielles reprennent les grandes lignes des caractéristiques de fonctionnement de leurs homologues naturels, ce qui leur confère un fonctionnement physico-chimique et biologique analogue. Il existe plusieurs types de ZHA (figure I.11), suivant le trajet de l'eau dans le bassin (Stottmeister et coll. 2003).

On l'a vu ci-dessus, les zones humides ont un rôle considérable dans la régulation du cycle de l'eau (Mitch et Gosselink 2000, Lewis 2001, Bullock et Acreman 2003). Ainsi un bassin versant qui comprendrait 5% de lacs et de zones humides permettrait de réduire de 40 à 60% les pics de crue (Novitsky 1985). L'évapotranspiration due aux plantes présentes dans la zone humide est un facteur important dans le cycle de l'eau, la quantité d'eau évaporée par ce phénomène pouvant représenter la moitié de la quantité apportée par les précipitations (Zhou et coll. 2009). L'évapotranspiration suit une variation liée à la température de l'air, à l'humidité relative et au rayonnement, ce qui donne une variation journalière et annuelle à ce phénomène (ibid.). De même les conditions redox dans le sol d'une zone humide peuvent être sujet à des variations journalières, passant d'oxydant à réducteur en quelques heures (Dusek et coll. 2008, Nikolausz et coll. 2008), phénomène intéressant pour dégrader des mélanges de polluants exigeant des conditions redox différentes. Enfin la libération de nutriments dans une zone humide peut être soumise au régime hydraulique de la zone (Song et coll. 2007).

La composition et la diversité microbienne dans une zone humide dépendent étroitement de la végétation en place (Calheiros et coll. 2009a, Sleytr et coll. 2009). Ainsi, la présence de plantes relâchant de l'oxygène dans la zone racinaire, caractéristique propre aux macrophytes,

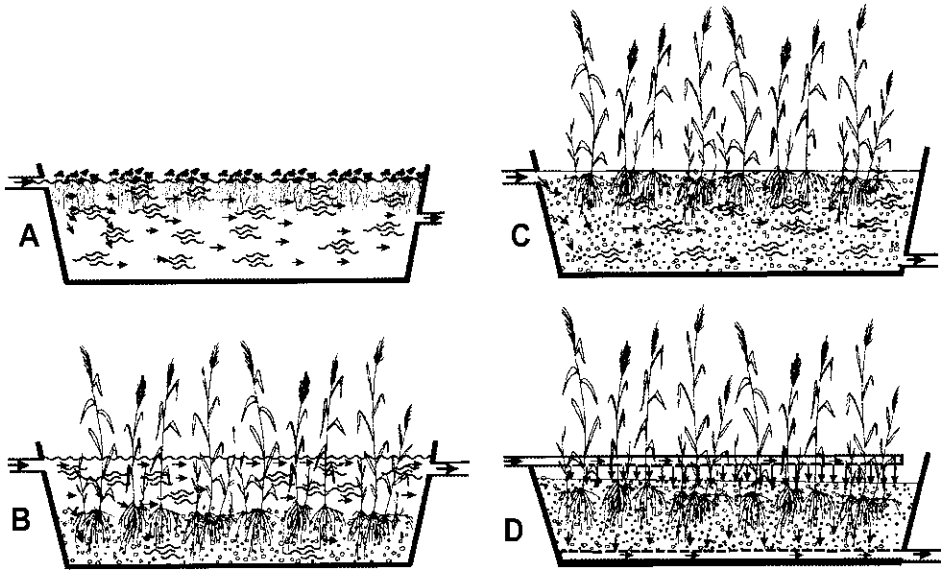



**Figure I.11 : Différents types de ZHA .**
(Stottmeister et coll. 2003). A : lagune avec plantes flottantes ; B : zone humide à flux horizontal de surface ; C : zone humide à flux horizontal de subsurface ; D : zone humide à flux vertical.

pourra permettre l'établissement de communautés aérobies dans cette zone (Truu et coll. 2009). Les ZHA présentant une certaine variabilité spatiale (entrée, sortie des effluents) on pourrait s'attendre à ce que la diversité microbienne évolue selon cette variabilité. Mais une étude de Krasnits et coll. (2009) montre que l'évolution de la diversité microbienne n'est pas gouvernée par la distance à la source de polluants mais plutôt par la profondeur. D'autres études (Ahn et coll. 2007, Baptista et coll. 2008) rapportent l'absence de différence significative entre les communautés microbiennes d'une ZHA plantée ou non. Globalement, les processus microbiens dans les zones humides sont influencés par les conditions hydrauliques, les propriétés des effluents, le type de sol ou de sédiment, le pH, la température et la présence d'inhibiteurs dans les effluents (Truu et coll. 2009). L'étude de Gutknecht et coll. (2006) insiste à ce sujet sur le caractère incomplet des connaissances sur le lien entre l'écologie des microorganismes du sol et les processus qui ont lieu dans ces sols de ZHA.

La présence et le type de macrophytes, plantes aquatiques de grande taille, influencent les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote dans les zones humides (Maltais-Landry et coll. 2009). Ces plantes présentent une grande capacité d'adaptation morphologique et physiologique qui leur permet de faire face aux modifications régulières des conditions physico-chimiques des zones humides (Trémolières et coll. 2008). Parmi les macrophytes potentiellement présents dans les zones humides, le roseau commun *Phragmites australis* présente la particularité, comme tous les macrophytes, de dégager de l'oxygène par les racines, générant une zone aérobie à proximité de celles-ci (Engloner 2008), dont l'étendue radiale est de l'ordre du centimètre (Armstrong et coll. 2000). Ainsi, les conditions physico-chimiques dans les zones humides peuvent varier rapidement en raison de l'hydrologie, mais la végétation présente influe elle aussi sur ces conditions (Wiessner et coll. 2005, Dusek et coll. 2008). La présence de végétation augmente le temps de rétention hydraulique, la hauteur d'eau et réduit les débits dans les zones humides (Kröger et coll. 2009).

### *4.2.2. Capacités épuratrices*

La capacité épuratrice des ZHA est connue depuis longtemps et a souvent été utilisée pour traiter des effluents riches en nutriments (Faulwetter et coll. 2009), avec des coûts peu élevés (Schröder et coll. 2007). De nombreuses études montrent également le potentiel épurateur des ZHA concernant les xénobiotiques dans les eaux de surface, pour des produits pharmaceutiques notamment avec une dissipation comprise entre 50 et 90% en sortie du système (Conkle et coll. 2008), 51% de dégradation après 700h de présence dans une ZHA pour l'ibuprofen (Matamoros et coll. 2008) et une forte dissipation du phénanthrène observée par Machate et coll. (1997). Les dégradations constatées dans ces différentes études ne vont pas jusqu'à la minéralisation. Ces capacités épuratrices ont également été constatées pour différents types de produits phytopharmaceutiques : pour des insecticides (Schulz et coll. 2001) comme le parathion et l'omethoate pour lesquels 100% de dissipation ont été observés en 4 mois (Cheng et coll. 2002), des herbicides (Moore et coll. 2001) tels que l'atrazine (McKinlay et Kasperek 1999), pour lequel 70 à 80% de minéralisation sont obtenus en un mois (Anderson et coll. 2002), le diuron dont la dissipation varie entre 27 et 55% (Rose et coll. 2006) et le glyphosate pour lequel plus de 90% de dissipation est atteint en quelques jours (Tsui et Chu 2008). Les ZHA ont également un potentiel épurateur des eaux souterraines, sur des composés chlorobenzéniques pour lesquels les plantes semblent jouer un rôle important (Braeckevelt et coll. 2007, 2008) ou des composés chloroéthéniques par des mécanismes à la fois anaérobies et aérobies grâce à l'oxygénation de la rhizosphère (Amon et coll. 2007). La dégradation observée dans ces études est à la fois d'origine physico-chimique (Bankston et coll. 2002, Faulwetter et coll. 2009) et d'origine microbienne (Brix 1987, McKinlay et Kasperek 1999, Bankston et coll. 2002, Faulwetter et coll. 2009). L'étude de Bankston et coll. (2002) sur la dissipation de trichloréthylène (TCE) dans une ZHA montre que cette diminution est due à quatre phénomènes : formation de liaisons avec le sol et l'eau, volatilisation, minéralisation et incorporation dans les plantes. Pour le TCE, la volatilisation, la dégradation microbienne et l'incorporation dans les plantes expliquent respectivement 50%, 3-15% et 33-38% de la dissipation. Cependant la proportion des différents phénomènes est sujet à de fortes variations suivant les composés et les conditions physico-

chimiques (Imfeld et coll. 2009) ; McKinlay et Kasperek (1999) montrent ainsi que dans le cadre de leur étude, la dégradation de l'atrazine est principalement due aux microorganismes rhizosphériques. Moore et coll. (2000) ont montré que les performances de filtration de l'atrazine ne seraient suffisantes que si la ZHA avait une longueur minimale pour pouvoir efficacement contenir les eaux de ruissellement agricoles. Cette conclusion rejoint celle de Blankenberg et coll. (2006) qui préconisent d'augmenter la taille de la ZHA pour améliorer la rétention des contaminants. Le débit d'entrée de l'effluent influe aussi sur l'efficacité de la dégradation, les meilleures performances étant obtenues pour de faibles débits d'entrée (Stearman et coll. 2003). De plus, une étude de Moore et coll. (2002) montre que le maximum de sorption dans une ZHA d'un produit phytopharmaceutique, le chlorpyrifos, était réalisé au bout d'une semaine. Enfin, les conditions redox ont un impact significatif sur les processus rhizosphériques et donc sur les performances de dégradation (Weaver et coll. 2004, Sasikala et coll. 2008).

*4.2.3. Un cas particulier de ZHA : le bassin d'orage (BO)*

L'exutoire est le point géographique où l'ensemble des eaux ruisselant sur un bassin versant converge. Des ouvrages à vocation hydraulique (par exemple des bassins d'orage) sont souvent construits au niveau de ces exutoires, afin de limiter les risques d'inondation en cas de fortes précipitations (Grégoire et coll. 2008). Ces ouvrages retiennent par définition l'eau et les sédiments ; par conséquent les produits contenus dans ces matrices sont aussi retenus (Tao et Tang 2004, Winiarski et coll. 2006), au moins le temps que l'eau arrivant dans le bassin en sorte (figure I.12). De manière générale, la présence plus ou moins prolongée de produits phytopharmaceutiques dans l'eau et les sédiments stockés dans un bassin d'orage peut conduire à une reconcentration des polluants au sein de ces ouvrages hydrauliques en raison de l'évaporation biotique et abiotique et de la sorption des produits phytopharmaceutiques sur la matrice solide. Sur 15 bassins d'orage étudiés (12 en zone résidentielle, 1 en zone commerciale, 1 en zone commerciale/artisanale, 1 en zone résidentielle/commerciale), Bishop et coll. (2000) ont trouvé des métaux lourds dans l'eau à des concentrations supérieures à celles fixées par la réglementation canadienne et des métaux lourds, des PCB, du lindane, des HAP, des huiles et graisses dans le sédiment à des concentrations dépassant les limites légales locales ; ces

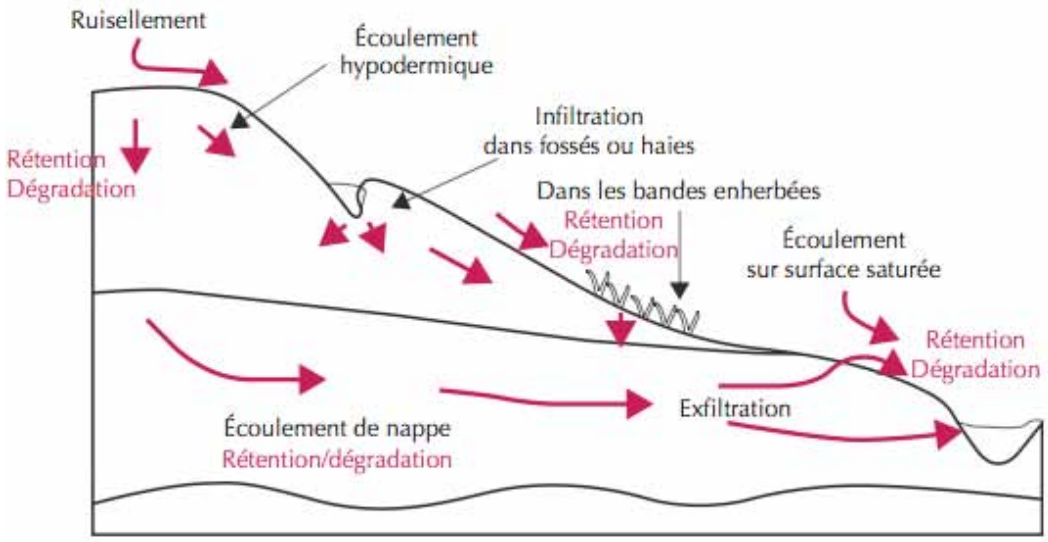



**Figure I.12 : Trajet des pesticides sur un bassin versant.**
(Gouy et coll. 2008)

concentrations sont accompagnées de dysfonctionnements chez la faune indigène. Les débits très variables en entrée des bassins d'orage se répercutent également sur les teneurs en produits phytopharmaceutiques (Domagalski 1997) et métaux (Miller et coll. 2003), une corrélation avec les épisodes orageux étant observée, ce qui fait que la toxicité de ces eaux sera également très variable (Thomas et coll. 2001). Une étude menée par Rabiet et coll. en 2008 montre ainsi qu'une crue peut mobiliser autant de produits phytopharmaceutiques en une fois que l'eau ruisselant pendant un mois en conditions normales. Par ailleurs les études sur les bassins d'orage se concentrent surtout sur les nutriments et sédiments dans ces eaux (Hollinger et coll. 2001), peu d'études ayant été réalisées pour évaluer l'efficacité de traitements (Hatt et coll. 2009) de ces ouvrages hydrauliques. Cependant, des études sont menées et des listes de substances prioritaires dans les eaux d'orage sont établies au niveau européen (Eriksson et coll. 2007).

Les eaux de sortie des agrosystèmes viticoles sont donc polluées, et les traitements actuellement en place ne permettent pas de respecter la législation en vigueur pour les eaux, selon les auteurs d'un rapport du projet Life SWAP CCP (2007). La seule manière d'obtenir le bon état des eaux de sortie est l'utilisation d'un bassin d'orage en aval des parcelles ; cette pratique est la plus économique de toutes celles envisagées.

Un certain nombre de paramètres sont peu souvent pris en compte lors d'expérience de bioremédiation à l'aide de ZHA (Lebeau 2008). On peut ainsi citer les paramètres suivants :

- le temps de rétention des polluants souvent supérieur à celui de l'eau ;
- les pollutions multiples, qui modifient à la fois les comportements de sorption des différentes molécules présentes et les phénomènes de dégradation les concernant ;
- les conditions physico-chimiques changeantes dues aux charges hydriques variables ;
- les charges en polluants rapidement variables dues aux charges hydriques variables.

L'ingénierie écologique appliquée au traitement d'une pollution multiple dans un écosystème type ZHA aura pour objectif d'optimiser ces paramètres par un certain nombre de moyens permettant de respecter la rusticité voulue pour ce procédé (ibid.).

## 4.3. Ingénierie écologique appliquée à la ZHA

### *4.3.1. Amélioration de la rétention des produits phytopharmaceutiques*

Le temps de séjour des produits phytopharmaceutiques dans les bassins d'orage (BO) est parfois trop court pour que le traitement soit efficace (Lebeau 2008). L'augmentation de taille préconisée dans certaines études (Moore et coll. 2000, Blankenberg 2006) n'est parfois physiquement pas possible. Si l'on ajoute à cela des capacités de rétention très variables d'un composé à l'autre (Matamoros et coll. 2007), pouvant aller de 0 à 67% sur 13 produits phytopharmaceutiques testés (Braskerud et Haarstad 2003), la rétention des polluants via l'utilisation de matériaux sorbants ciblés sur les polluants visés apparaît nécessaire d'une part pour un stockage optimisé des polluants dans les BO qui s'apparente à une séparation solide-liquide, d'autre part pour l'amélioration du traitement biologique, cœur de la démarche d'ingénierie écologique. Il existe une grande diversité de matériaux sorbants, du plus simple au plus complexe, du plus économique au plus coûteux. Le choix du sorbant employé dépendra de la (des) molécule(s) que l'on veut piéger et des contraintes financières et techniques imposées par la méthode employée. Les matériaux complexes ont en général d'excellentes performances de sorption (Wyss et coll. 2006, Breguet et coll. 2008), mais ont un coût élevé. Le charbon actif est également un matériau relativement technique suivant l'origine, d'efficacité souvent élevée quoique variable (Lopez-Ramon et coll. 2007, Fontecha-Camara et coll. 2008, Sathishkumar et coll. 2008). Ce matériau permet d'obtenir d'excellentes performances pour certains herbicides tel que le diuron (Yang et Shen 2003). Dans le cas de polluants hydrophiles il existe des matériaux pour tenter de les extraire de l'eau, certains atteignent 92% d'efficacité (Frimmel et coll. 1999). La biomasse microbienne telle que celle des bactéries (Ju et coll. 1997) ou les champignons (Benoît et coll. 1998) peut être utilisée pour la sorption ; on parlera alors de biosorption, c'est-à-dire la fixation des polluants sur les membranes cellulaires des microorganismes (Aksu 2005, Vijayaraghavan et Yun 2008). La biosorption combinée de métaux et de composés organiques, intéressant dans le cas de milieux polycontaminés, peut être réalisée grâce à des associations d'algues et de bactéries (Munoz et coll. 2006). Cependant ces sorbants ne détiennent pas de

structure stable dans le temps puisqu'ils constituent également une source de nutriments. On peut également utiliser des matériaux minéraux dont des argiles (Abate et Masini 2005), efficaces dans le cas de composés lipophiles (Gianotti et coll. 2008). Des argiles expansés, du sable et de la perlite ont ainsi été testés par Dordio et coll. (2007) pour améliorer la sorption d'un composé pharmaceutique et d'un produit phytopharmaceutique dans une zone humide artificielle. Les sédiments peuvent également faire de bons matériaux sorbants (Tao et Tang 2004, Liu et coll. 2008a). L'emploi de matériaux plus rustiques mais moins chers et ne nécessitant pas de préparation particulière, dits « low cost », peut se révéler pertinent et peut être utilisé tant pour les métaux (Bailey et coll. 1999, Kurniawan et coll. 2006) que pour les composés organiques (Ahmaruzzaman et coll. 2008, Sharma et coll. 2008). Parmi ces matériaux, les déchets agricoles (Swami and Buddhi 2006, Sud et coll. 2008, Bhatnagar et Sillanpää 2010) ont fait l'objet de quelques études, notamment avec le cuivre (Kurniawan et coll. 2006), le glyphosate (Akhtar 2007) et le diuron (Fernandez-Bayo et coll. 2008). Boving et coll. (2007) on testé dans une ZHA l'efficacité de rétention d'un filtre constitué par des morceaux de bois sur des HAP présents dans un ruissellement d'orage : l'efficacité atteinte pour la rétention d'HAP varie entre 16 et 66%, et aurait pu être améliorée en augmentant la masse de sorbant.

### *4.3.2. Couplage bioaugmentation/phytoremédiation*

**Choix de la bioaugmentation comme procédé de dépollution :** Dans la présente étude, la pollution à traiter concerne quatre polluants dont un métal (cuivre), deux herbicides de familles chimiques différentes (diuron, glyphosate) et un dernier polluant organique issu d'un des deux herbicides mais dont les propriétés sont différentes (3,4-dichloroaniline). En outre la pollution est à traiter dans un bassin d'orage, zone humide artificielle où les alternances de conditions oxydantes et réductrices peuvent être brutales (Thomas et coll. 2001). La bioaugmentation avec un consortium bactérien peut dans ce cas être une technique pertinente : utiliser un consortium peut permettre de traiter plusieurs types de molécules (Pattanasupong et coll. 2004) dans un environnement polycontaminé par des polluants organiques et inorganiques (Alisi et coll. 2009). La grande majorité des études de bioremédiation effectuées dans des ZHA se basent sur les

propriétés dégradantes des populations bactériennes indigènes, sans traitement autre qu'une éventuelle biostimulation. A contrario, la plupart des études de biodégradation de polluants par bioaugmentation se base sur des inoculations de sol, sans essai en ZHA. Seule une étude de dégradation de l'atrazine à une concentration de 1 à 10mg.kg$^{-1}$ par bioaugmentation dans des microcosmes mimant des ZHA a été menée par Runes et coll. en 2001. Le pourcentage de dégradation obtenu varie entre 2-3% pour les modalités non bioaugmentées et 25-30% pour celles bioaugmentées. La dégradation se maintenait dans les conditions saturées autant qu'insaturées, quoiqu'à des niveaux différents. La bioaugmentation peut être préférable à la biostimulation car cette dernière pourrait parfois entraîner un lessivage des polluants, notamment suite à l'application d'exsudats racinaires artificiels et d'amendement minéraux qui modifient la sorption des HAP (Joner et coll. 2002). Dans notre étude cela serait négatif puisque l'on souhaite garder les contaminants dans le BO. Dans cette démarche de sélection, il peut être bon de tenir compte de la stratégie de croissance du consortium obtenu ; les arrivées de polluants étant par nature très variables (cf. § 4.2.3.) et à des niveaux élevés, on aura tendance à privilégier des souches de stratégie r. Pour commencer, il faut donc rechercher des microorganismes performants et originaires du site d'étude (Bento et coll. 2003). Au vu des capacités épuratrices précédemment évoquées (cf. §4.2.2.), les possibilités métaboliques existent au sein de ces écoystèmes sujets à des pollutions multiples. La recherche de microorganismes indigènes par cultures d'enrichissement peut se faire de différentes manières (Roberts et coll. 1998, Tixier et coll. 2002). Enfin, l'efficacité sur site doit encore être prouvée, certains résultats prometteurs en laboratoire n'étant pas confirmés sur le terrain (Bento et coll. 2003).

**La phytoremédiation, méthode adaptée à l'extraction des métaux, notamment du cuivre, et système de stimulation et de régulation de l'activité microbienne dégradante du glyphosate, diuron et 3,4-DCA :** Les plantes ont un rôle direct (extraction des métaux) à jouer mais aussi indirect pour la dépollution car elles peuvent stimuler les microorganismes « dépolluants » (Brix 1987). Les plantes exercent de plus une fonction de niche écologique pour certains microorganismes compétents. Ainsi, une étude de Toyama et coll. (2006) sur une plante aquatique confirmée par une autre étude en 2009 sur du *Phragmites australis* montre que la

rhizosphère de certaines plantes aquatiques, dont celle de ce dernier, entretient des populations microbiennes dégradant les composés aromatiques. Ce macrophyte présente également la capacité de détoxifier différents composés organiques (Schröder et coll. 2005, Davies et coll. 2009) dont les herbicides, l'activité correspondante étant plus élevée dans les racines que dans les tiges (Schröder et coll. 2005, 2008). Les macrophytes permettent en effet de maintenir des conditions aérobies bénéfiques en terme d'efficacité et de rapidité pour la dégradation des polluants étudiés (cf. § 3.2.5.).

**L'emploi simultané de la bioaugmentation et de la phytoremédiation** peut être intéressant à plusieurs titres pour la dépollution de produits organiques, comme indiqué dans une étude de bioremédiation du pentachlorophénol (PCP) en milieu aqueux et dans un sol (Dams et coll. 2007a). La plante est protégée de la toxicité du polluant par les microorganismes qui le dégradent ; la plante protégée peut alors fournir des nutriments aux microorganismes et la dégradation est plus rapide et plus élevée que pour les modalités non plantées ou non inoculées. Ainsi, la dégradation du PCP dans le sol et l'eau passe respectivement de 1 à 60% dans le sol et de 0 à 90% dans l'eau avec cette technique. L'étude de Runes et coll. menée en 2001 conforte également cette approche de couplage bioaugmentation/phytoremédiation, la quantité d'éthylatrazine dégradée étant plus élevée lorsqu'un consortium microbien est associée à une plante (*Typha latifolia*) que lorsqu'il est seul, avec 45% et 35% de dégradation respectivement. Ainsi, la phytoextraction « assistée » par bioaugmentation donne des résultats prometteurs si quelques précautions sont respectées (Lebeau et coll. 2008). Cependant ce mélange des techniques de bioaugmentation et de phytoextraction, s'il semble offrir de nombreux avantages, ne donne pas toujours d'effets cumulatifs pour les polluants organiques (Jouanneau et coll. 2005). Il apparaît donc pertinent d'appliquer ce concept en ZHA afin d'évaluer son potentiel de remédiation et de l'optimiser, au vu du peu d'études réalisées dans ces conditions.

# PARTIE II

# -

# MATERIEL

# &

# METHODES

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Données générales

### 1.1. Bassin versant

Le bassin versant du Waldweg (figures II.1) est situé à Rouffach (Région Alsace, France : 47°57N, 7°17E). La surface géographique du bassin représente 61,8ha, sa surface hydraulique 38,1ha pour une surface effectivement ruisselante de 18,6ha (Domange 2005). C'est cette surface qui est responsable de l'arrivée de pesticides dans le bassin d'orage, situé à l'exutoire de ce bassin versant. Environ 0,3% des pesticides épandus est entraîné par ruissellement de surface (ibid.). 69% du bassin hydraulique, soit 23ha, est occupé par du vignoble. Une liste des produits appliqués est donnée dans l'annexe 2. La moyenne annuelle des précipitations est de 600mm, le maximum des précipitations se situant vers mai-juin (figure II.2).

### 1.2. Bassin d'orage

Le bassin d'orage (BO), de 325,4m² de superficie, collecte les eaux issues du bassin versant décrit ci-dessus. Il est alimenté par deux arrivées d'eau de ruissellement, la principale étant celle qui collecte les eaux du bassin versant arrivant par la route via la rampe en béton, la seconde correspondant à la conduite située plus à droite (figure II.3.a, b). L'épaisseur moyenne du sédiment, au début de l'étude (en 2006) avant curage, atteignait 50cm, soit un volume de 163m$^3$. Pour améliorer le temps de rétention trop court des pesticides transitant par le BO, l'Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg (ENGEES) l'a curé et remanié en 2007 (figure II.4). Un muret de gabions construit perpendiculairement à l'axe du flux d'eau circulant dans le BO a été disposé aux deux tiers du bassin, délimitant un filtre biologique avant la sortie hydraulique de l'ouvrage. Le BO est classé par l'ENGEES comme un ouvrage du type Zone Humide Artificielle (ZHA) à flux horizontal de subsurface (figure I.11).

**Figure II.1 : Situation géographique du lieu de l'étude.**
A droite, le bassin versant du Waldweg.

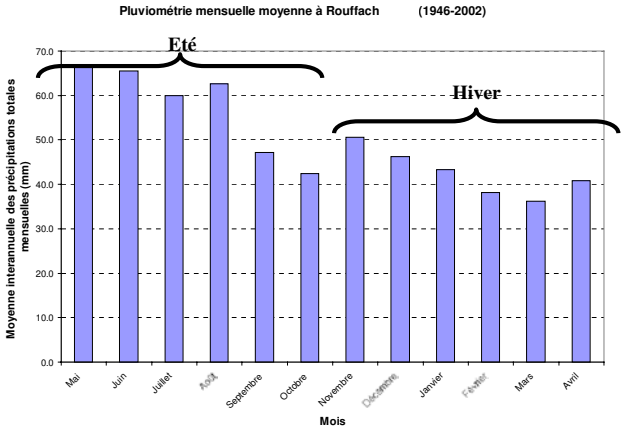



**Figure II.2 : Pluviométrie moyenne sur le site d'étude.**
(d'après Domange 2005)

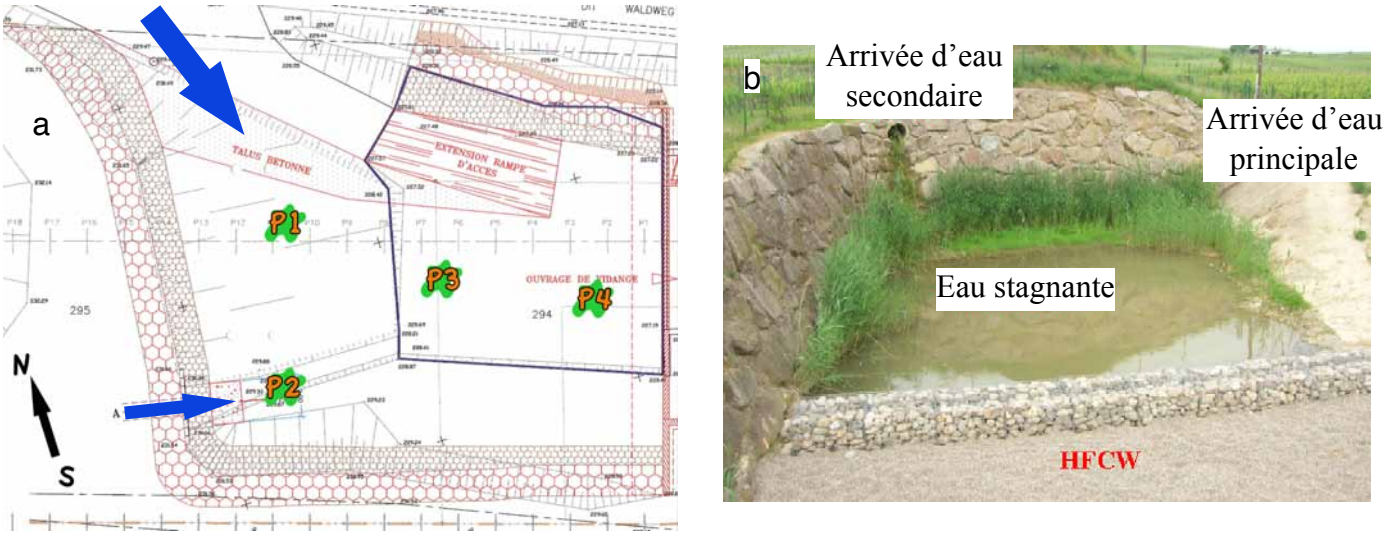



**Figure II.3 : Arrivées d'eau du bassin d'orage et points de prélèvement.**
a : schéma vue de dessus (Source personnelle) ; b : photo vue depuis l'Est (Wanko et coll. 2009).

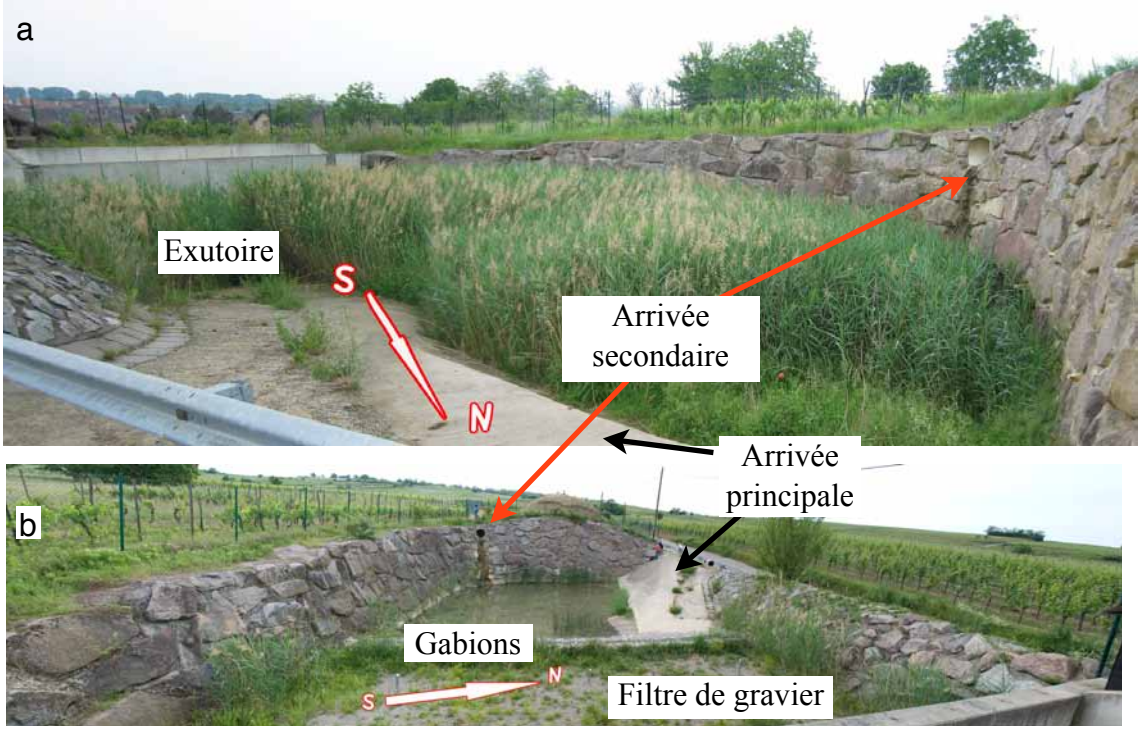



**Figure II.4 : Configurations du bassin d'orage.**
a : ancienne configuration ; b : nouvelle configuration.

**Tableau II.1 : Composition du sol viticole d'origine, du sédiment du bassin d'orage et du mélange sable-sédiment.**
Les points P2 et P4 sont ceux définis dans le matériel et méthodes (§ 2.2.1. et figure II.3). (Imfeld 2009 communication personnelle pour les concentrations des polluants dans le BO).

| Paramètre | Sol viticole | Sédiment du bassin d'orage* | | Mélange sable-sédiment |
|---|---|---|---|---|
| | | P2 | P4 | |
| Argile ($g.kg^{-1}$) | 229 | 436 | 431 | 67 |
| Limon fin ($g.kg^{-1}$) | 289 | 321 | 334 | 68 |
| Limon grossier ($g.kg^{-1}$) | 268 | 98 | 87 | 81 |
| Sable fin ($g.kg^{-1}$) | 94 | 46 | 57 | 93 |
| Sable grossier ($g.kg^{-1}$) | 101 | 92 | 89 | 691 |
| pH eau | 8 | 8.2 | 8.3 | 8 |
| CEC (Metson en $mé.kg^{-1}$) | 112 | 154 | 161 | 44 |
| Carbone organique ($g.kg^{-1}$) | - | 5,6 (± 2,6) | | 12,9 |
| Matière organique ($g.kg^{-1}$) | 20 | 11 | 9 | 22,3 |
| Azote total ($g.kg^{-1}$) | - | - | - | 0,93 |
| Rapport C/N | - | - | - | 13,8 |
| $CaCO_3$ totaux ($g.kg^{-1}$) | 278 | 179 | 184 | 188 |
| $P_2O_5$ (Joret-Hébert en $g.kg^{-1}$) | 634 | 70 | 78 | 0,34 |
| $K_2O$ échangeable ($g.kg^{-1}$) | 311 | 322 | 325 | 0,12 |
| Glyphosate ($mg.kg^{-1}$) | nd | < 0,01 - 0,07 | | <0,01 |
| Diuron ($mg.kg^{-1}$) | nd | < 0,002 - 0,007 | | <0,01 |
| 3,4-DCA ($mg.kg^{-1}$) | nd | < 0,01 | | <0,01 |

* Les valeurs inférieures de polluants correspondent aux seuils de quantification.
nd : non déterminé

## 1.3. Composition du sédiment

Le bassin d'orage se remplit progressivement en raison de la sédimentation des particules en suspension dans l'eau de ruissellement. Les caractéristiques physico-chimiques du sédiment et du sol viticole à l'amont de l'ouvrage (moyenne de plusieurs parcelles) sont données dans le tableau II.1. Lors du réaménagement, la zone située entre le mur de gabions et la sortie (le filtre biologique) a été remplie de sable ((Holcim granulats, Haut-Rhin), type lavé-roulé, de diamètre compris entre 0 et 4mm) pour éviter un colmatage trop rapide. L'ENGEES estime que les proportions de sable et sédiment atteindront à l'équilibre un ratio 80/20.

## 1.4. Milieux, solutions-mères

3 milieux différents ont été utilisés pour les cultures bactériennes :

- un milieu LB (tableau II.2) ;
- un milieu minimum MM (Mc Grath et coll. 1997) (tableau II.3) ;
- un milieu à l'extrait de sédiment (ES) (tableau II.4) se rapprochant des conditions rencontrées par les microorganismes dans le BO. Il est obtenu selon le protocole de Pochon et Tardieux (1957) en mélangeant une même masse de sédiment du bassin d'orage et d'eau distillée. Après autoclavage à 130°C pendant 60min (Subtil-Crépieux, Lyon) le mélange est filtré immédiatement sur filtre en papier plissé à 8µm (Roth, Allemagne) puis stérilisé ou non suivant l'usage prévu (121°C, 20min).

3 milieux ont été utilisés pour les expériences de sorption :

- de l'eau milliQ (Elga, France), notée Eau Ultra Pure (EUP) par la suite ;
- de l'eau de ruissellement du BO (tableau II.4) prélevée à l'arrivée secondaire après un épisode pluvieux (septembre 2007), notée Eau du Bassin d'Orage (EBO) par la suite ;
- le milieu ES.

Pour les expériences en logettes, la base de la solution est de l'eau distillée (Elga, France).

Les solutions-mères de polluants sont refaites régulièrement, et conservées à 4°C :

**Tableau II.2 : Composition du milieu LB.**

| | |
|---|---|
| NaCl | $10g.L^{-1}$ |
| Peptone | $10g.L^{-1}$ |
| Extrait de levure | $5g.L^{-1}$ |

**Tableau II.3 : Composition du milieu minimum MM.**
(McGrath et coll. 1997)

| Produit | Concentration |
|---|---|
| $MgSO_4$ | $0,2mg.L^{-1}$ |
| $CaCl_2$ | $1mg.L^{-1}$ |
| KCl | $0,24g.L^{-1}$ |
| $NH_4Cl$ | $1g.L^{-1}$ |
| Gluconate de sodium | $2,5g.L^{-1}$ |
| Pyruvate de sodium | $2,5g.L^{-1}$ |
| Citrate d'ammonium ferrique | $1mg.L^{-1}$ |
| Tampon phosphate | 1mM |
| Oligoéléments | 0,1% (v/v) d'une solution d'oligoéléments de concentration :<br>- $ZnSO_4.7H_2O$ : $10mg.L^{-1}$<br>- $MnSO_4.4H_2O$ : $3mg.L^{-1}$<br>- $H_3BO_4$ : $30mg.L^{-1}$<br>- $CaCl_2.6H_2O$ : $20mg.L^{-1}$<br>- $CuCl_2.2H_2O$ : $1mg.L^{-1}$<br>- $NiCl_2.2H_2O$ : $2mg.L^{-1}$<br>- $NaMoO_4$ : $3mg.L^{-1}$ |

**Tableau II.4 : Composition de l'eau de ruissellement du bassin d'orage (EBO) et de l'extrait de sédiment (ES).**
(Source : SADEF)

| | **EBO** | **ES** |
|---|---|---|
| Azote total ($mg_N.L^{-1}$) | <100* | 46,5 |
| $NH_4^+$ ($mg_N.L^{-1}$) | 0,34 | 8,03 |
| $NO_3^-$ ($mg_N.L^{-1}$) | <0,1* | 0,11 |
| $H_2PO_4^-$ ($mg_P.L^{-1}$) | 1,2 | 2,7 |
| K ($mg_K.L^{-1}$) | 7 | 27,4 |
| Ca ($mg_{Ca}.L^{-1}$) | 51 | 231 |
| Mg ($mg_{Mg}.L^{-1}$) | 6,5 | 17,7 |
| Na ($mg_{Na}.L^{-1}$) | 2,4 | 60,3 |
| Fe ($mg_{Fe}.L^{-1}$) | 3,4 | 1,61 |
| Mn ($mg_{Mn}.L^{-1}$) | 0,18 | 1,07 |
| $SO_4^{2-}$ ($mg_{SO4}.L^{-1}$) | 10 | 156 |
| Cu ($mg_{Cu}.L^{-1}$) | 0,02 | 0,014 |
| Zn ($mg_{Zn}.L^{-1}$) | 0,03 | 0,47 |
| Carbone organique total ($mg_C.L^{-1}$) | 3,4 | 480 |

* : inférieur à la limite de détection.

- pour le glyphosate (Pureté 95%, Sigma-Aldrich, France), solution à 10g.L$^{-1}$ préparée dans l'eau distillée, conservée dans des flacons en polypropylène, ceux-ci n'adsorbant pas le glyphosate que le verre ;
- pour le diuron et le 3,4-DCA (Pureté 99,5%, Sigma-Aldrich, France), solutions à 20g.L$^{-1}$ préparées dans le DMSO (Pureté >99,8%; Carl Roth, France), conservées dans des flacons en verre, ceux-ci n'adsorbant pas ces deux polluants.

## 1.5. Analyses chromatographiques

L'équipement d'analyse CLHP (Waters, Royaume-Uni) est constitué d'une pompe binaire 1525, d'un détecteur UV-visible 2487 et d'un passeur d'échantillons automatique WISP 715 ; la colonne employée est une RP-18 Purospher 250-4 (Merck, Allemagne). Des flacons adaptés au passeur auxquels on ajoute des inserts en verre pour le diuron et le 3,4-DCA et en polypropylène pour le glyphosate (Interchim, France) sont utilisés pour les analyses.

L'analyse du diuron et du 3,4-DCA se fait avec une phase mobile constituée d'acétonitrile (ACN) de pureté 99,9% (Roth, France) et d'EUP (50 : 50, v/v), à un débit de 1mL.min$^{-1}$ ; les composés sont détectés à 254nm, le temps d'élution caractéristique étant de 15min.

L'analyse du glyphosate nécessite un prétraitement par dérivatisation (Rios et coll. 2002, Khrolenko et Wieczorek 2005). On ajoute à l'échantillon 50% (v/v) de tampon phosphate (0,4M et pH 11) et 20% (v/v) d'une solution de chlorure de p-toluènesulfonyle (Sigma Aldrich, France) à 10g.L$^{-1}$ dans l'ACN. Le mélange est chauffé au bain-marie pendant 10min à 50°C ; un aliquot de 20µL est ensuite injecté dans la CLHP. La phase mobile utilisée est composée de tampon phosphate à 0,06M (pH 2,3 ajusté avec $H_3PO_4$ 85%) et d'ACN (85 : 15, v/v) avec un flux à 1mL.min$^{-1}$. Les composés sont détectés à 240nm, le temps d'élution caractéristique étant de l'ordre de 10min.

La calibration est établie au moyen d'une courbe d'étalonnage avant l'analyse des échantillons. Les concentrations employées pour le glyphosate sont 0, 10, 20, 40 et 60mg.L$^{-1}$, celles employées pour le diuron et le 3,4-DCA sont 0, 5, 7,5, 10 et 20mg.L$^{-1}$.

## 1.6. Analyses des résultats

Les analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées à l'aide du logiciel StatBox Pro (Grimmer Soft, Etats-Unis). Elles se basent sur un dispositif multifactoriel en randomisation qui permet une comparaison de moyennes selon le test de Newman-keuls au seuil de 5%. Les groupes homogènes sont représentés sur les figures par les lettres a,b,c…

Les diagrammes en « boîtes et moustaches » ont été réalisés à l'aide du logiciel R.

Les analyses des correspondances multiples (ACM) et les analyses en composantes principales (ACP) ont été faites à l'aide du logiciel ADE4 (Thioulouse et coll. 1997).

# 2. Conditions particulières de chaque expérience

## 2.1. Tests de sorption

### *2.1.1. Matériaux sorbants*

Sept matériaux sorbants différents ont été utilisés (figure II.5) :

- pulpe de betterave (notée «betterave» dans la suite de l'étude) (sucrerie d'Erstein, Erstein, Bas-Rhin) ;
- résidus de maïs (notés «maïs» dans la suite de l'étude) fournis par des agriculteurs locaux ;
- perlite (Puteaux SA, Yvelines), de diamètre compris entre 0,6 et 6mm ;
- vermiculite (Radis et Capucine, Maine-et-Loire), de diamètre inférieur à 5mm ;
- sable identique à celui présent dans le filtre biologique du BO, dont les caractéristiques sont données au § 1.3. ;
- sédiment prélevé dans le BO avant réaménagement (octobre 2006) dont la composition figure dans le tableau II.1 ;
- du maïs calciné (notées «cendres» dans la suite de l'étude) obtenues par combustion à l'air libre de rafles de maïs, selon le mode opératoire décrit par Yang et coll. (2003).

Les matériaux employés n'ont fait l'objet d'aucun traitement de surface. Les caractéristiques physico-cimiques des différents matériaux sorbants sont rassemblées dans le tableau II.5.

### *2.1.2. Cinétiques*

Des Erlenmeyers de 250mL sont remplis avec 150mL de milieu et 3g de l'un des matériaux à tester (concentration en matériau : $20g.L^{-1}$). Trois matrices sont également testées : EUP, EBO et ES. Les composants étudiés sont rajoutés, selon la modalité, aux concentrations suivantes : pour le glyphosate, $200mg.L^{-1}$ ; pour le diuron et le 3,4-DCA, $100mg.L^{-1}$ ; pour le cuivre, $500mg.L^{-1}$. Le diuron et le 3,4-DCA sont testés individuellement et en mélange {diuron - 3,4-DCA - glyphosate - cuivre}. Pour le glyphosate, trois modalités sont testées : glyphosate seul,

**Figure II.5 : Sorbants utilisés.**
De gauche à droite et de haut en bas : rafles de maïs, pulpe de betterave, perlite, vermiculite, sédiment, sable, cendres de rafles de maïs.

**Tableau II.5 : Caractéristiques des matériaux sorbants utilisés.**

| Sorbants | CEC ($\mu eq.g^{-1}$) | Référence |
|---|---|---|
| Pulpe de betterave | 540 | Dronnet et coll. 1998 |
| | 860 | Altundogan et coll. 2007 |
| Rafles de maïs | 120 | Lehrfeld 1996 |
| Perlite | 60 | Lemaire et coll. 2003 |
| Vermiculite | 650 | Abollino et coll. 2008 |
| | 400 | Malandrino et coll. 2006 |
| Sédiment | 156 | Tableau II.1 |
| Sable | 30 - 80 | Wang et Keller 2008 |
| | 16 | Shawabkeh 2005 |
| Cendres de rafles de maïs | 290 | Sathishkumar et coll. 2009 |

{glyphosate - cuivre} et {diuron - 3,4-DCA - glyphosate - cuivre}. L'agitation est de 200tpm à 20°C, après ajustement du pH de la solution à 4,8 avec HCl à 0,1M et 1M. On prélève à 0, 10 et 30min, 1, 2, 4, 6, 8, 24 et 48h. Le suivi de la concentration est réalisé par dosage à la CLHP. Chaque modalité est réalisée en triplicata.

### *2.1.3. Isothermes*

Des Erlenmeyers de 250mL sont remplis avec 100mL de milieu (EUP, EBO ou ES) et 2g du matériau le plus sorbant déterminé lors des expériences de cinétique. Les polluants, testés individuellement, sont rajoutés aux gammes de concentrations suivantes : pour le glyphosate, 4, 10, 20, 30 et 40mg.L$^{-1}$ ; pour le diuron et le 3,4-DCA, 2, 5, 10, 15 et 20mg.L$^{-1}$. L'ensemble est mis à agiter à 200tpm et 20°C, après ajustement du pH de la solution à 4,8 avec HCl à 0,1 et 1M. Le prélèvement final est réalisé au temps de sorption maximal, déterminé lors des expériences de cinétique. Le suivi de la concentration est réalisé par dosage CLHP. Chaque modalité est réalisée en triplicata. Les données relatives aux isothermes de sorption ont été ajustées au modèle de Freundlich (1906) : $q_e = K.C_e^n$ où $q_e$ est la quantité de pesticide sorbé à l'équilibre (mg kg$^{-1}$), $C_e$ est la concentration à l'équilibre (mg.L$^{-1}$) et K et n sont les paramètres de l'équation de Freundlich. Les données ont été ajustées à l'aide du logiciel EasyPlot software (Spiral Software, Norwich, VT, USA)

## 2.2. Sélection de souches

### *2.2.1. Stratégie de prélèvement*

La sélection a été réalisée à partir d'échantillons de sédiment du BO prélevés *in situ* à 4 endroits et à chaque endroit, à 3 horizons différents (figure II.3), afin de tenir compte de l'hétérogénéité spatiale. Les échantillons ont été prélevés à l'automne 2006 (pour l'évaluation de

la microflore totale) et au printemps 2007 (pour la sélection de souches). Ils sont référencés comme suit :

- Point de prélèvement 1 (P1), situé au niveau de l'arrivée principale d'eau dans le BO ;
- Point de prélèvement 2 (P2), situé à l'aplomb de l'arrivée d'eau secondaire dans le BO ;
- Point de prélèvement 3 (P3), situé au confluent des deux arrivées d'eau ;
- Point de prélèvement 4 (P4), situé dans la zone du BO inondée en permanence ;
- Horizon 1 (H1) : horizon 0-5cm, entièrement rhizosphérique ;
- Horizon 2 (H2) : sédiment adhérent (rhizosphérique) de l'horizon 5-10cm ;
- Horizon 3 (HNA) : sédiment non adhérent (non rhizosphérique) de l'horizon 5-10cm.

Le sédiment non adhérent est prélevé en secouant délicatement le chevelu racinaire ; le sédiment restant sur les racines est le sédiment adhérent. Les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4°C avant leur traitement dans les jours suivant le prélèvement et au congélateur à -20°C pour les analyses par Polymerase Chain Reaction (PCR) associée à la Thermal Temporal Gel gradient Electrophoresis (TTGE) et d'éventuelles analyses ultérieures.

### *2.2.2. Analyses de la structure de la communauté bactérienne*

Les analyses de la structure de la communauté bactérienne par PCR-TTGE, exploitées dans la partie « résultats et discussion » du manuscrit ont été réalisées par Mlle Marie-Paule Norini, post-doctorante (UHA) et Mr Laurent Kremer, ingénieur d'études (RITTMO). Les protocoles sont indiqués dans l'annexe 2.

### *2.2.3. Détermination de la microflore bactérienne cultivable*

Un échantillon de sédiment (1g) est dispersé pendant 1h dans 10mL d'hexamétaphosphate de sodium stérile (1,7g.$L^{-1}$, pH 7,0) à 200tpm à température ambiante. 200µL de la suspension sont ensuite prélevés et dilués jusqu'à un facteur $10^{-6}$ dans des tubes à hémolyse contenant du KCl stérile (9g.$L^{-1}$). Les dilutions $10^{-4}$, $10^{-5}$ et $10^{-6}$ sont étalées (10µL) sur milieu ES solide (agar 15%, m/v). Le décompte des colonies est effectué après 48h de culture à 28°C pour les bactéries à

croissance rapide (dite à stratégie r). Le nombre **N** d'Unités Formant des Colonies (UFC) s'étant développées, pour une dilution **d** donnée à partir d'un volume d'échantillon $\mathbf{V_{éch}}$, permet de retrouver la concentration de bactéries cultivables dans la suspension initiale à l'aide de la formule : [bactéries] en $UFC.mL^{-1} = N/d.V_{éch}$. On obtient ainsi le nombre de colonies à stratégie r, $n_r$. Un deuxième décompte des UFC est effectué après 7 jours de culture à 28°C : ce décompte, noté $n_{total}$, comprend à la fois les UFC à stratégie r précédemment recensées et les UFC des bactéries à croissance lente (dite à stratégie K) s'étant développées par la suite. Le nombre d'UFC à stratégie K, noté $n_K$, est alors obtenu par soustraction : $n_K = n_{total} - n_r$ (Nacamulli et coll. 1997).

*2.2.4. Tests de tolérance - Isolement des bactéries cultivables*

Les échantillons sont ceux prélevés précédemment (P1, P2, P3 et P4 et les 3 horizons par point). 10g de sédiment sont précultivés dans 40mL de milieu MM stérile auquel $40mg.L^{-1}$ de glyphosate, $10mg.L^{-1}$ de diuron, $10mg.L^{-1}$ de 3,4-DCA et $130mg.L^{-1}$ de cuivre sont ajoutés. Le protocole de Widehem et coll. (2002) est ensuite appliqué : la préculture se fait à 20°C sur table d'agitation à 200tpm. Après 48h pour les populations à stratégie r et 7 jours pour les populations à stratégie K, 4mL de la solution sont ajoutés à 71mL de milieu MM stérile enrichi en glyphosate, diuron, 3,4-DCA et cuivre aux mêmes concentrations que celles de la préculture. Après 48h (ou 7 jours) de culture à 20°C sur table d'agitation à 200tpm, deux aliquots sont prélevés ; l'un est congelé en vue d'une analyse de la structure de la communauté bactérienne par TTGE, l'autre est utilisé pour une série de suspensions-dilutions dans du KCl stérile à $9g.L^{-1}$. Les dilutions $10^{-5}$ et $10^{-6}$ sont étalées (100µL) sur milieu ES solide (agar 15%, w/v) sans réplicat. Après incubation à 28°C pendant 4 jours, le décompte est alors effectué. Afin d'obtenir des isolats les plus purs possibles, ceux-ci sont resuspendus individuellement dans 500µL de KCL stérile à $9g.L^{-1}$ et étalés individuellement sur ES solide.

### *2.2.5. Tri génétique*

Le tri génétique des isolats est réalisé en appliquant successivement les techniques Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) et Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) à partir de l'ADN des isolats obtenus précédemment (Nicorarat et coll. 2008). Pour cela, une fraction de chaque isolat est suspendue dans un tube contenant 20µL d'EUP stérile et 20µL de NaOH stérile à 0,1M. Après 10min de chauffage à 95°C, les tubes sont refroidis dans la glace. Pour réaliser une PCR-RISA, 2µL de la suspension sont alors dilués dans 30µL d'EUP stérile et 2µL de cette solution diluée sont ajoutés à un volume réactionnel de 23µL dont la composition est indiquée dans l'annexe 3 de même que le cycle utilisé pour la PCR. Les amorces utilisées sont les amorces Internal Transcribed Spacer Forward (ITSF) et Internal Transcribed Spacer Reverse (ITSR), spécifiques de l'intergène 16S-23S d'ARNr (séquences dans l'annexe 3). La migration des brins d'ADN se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (80mL, m/v) pendant 40min à 110V. Le gel est révélé sous UV et numérisé par un appareil Geldoc (Biorad, Etats-Unis) afin de faire des analyses de diversité sur le logiciel Molecular Analyst Fingerprinting (Biorad, Etats-Unis).

La RFLP est réalisée par digestion enzymatique (enzyme de restriction *Alu*I) des brins d'ADN issus de l'amplification de l'intergène 16S-23S d'ARNr. 8µL d'amplifiats issus de la RISA sont ajoutés à 2µL de mélange à base d'eau distillée stérile, de bases nucléiques et d'amorces (1µL tampon 10× (Buffer Tango) spécifique de l'enzyme utilisé, 0,5µL de l'enzyme *Alu*I et 0,5µL d'EUP) dans un tube Eppendorf de 1,5mL et incubés une nuit à 37°C. La digestion est alors arrêtée par ajout de 2µL d'EDTA à 0,25mM. 1,6µL de tampon de charge 6× sont ajoutés ; les tubes sont agités puis chauffés 15min au bain marie à 65°C et enfin centrifugés quelques secondes. La migration des brins se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5% (80mL, m/v) pendant 2h à 50V. Le gel est révélé sous UV et numérisé par un appareil Geldoc (Biorad, Etats-Unis) pour procéder ensuite aux analyses de diversité sur le logiciel Molecular Analyst Fingerprinting (Biorad, Etats-Unis).

### *2.2.6. Tri fonctionnel*

Les isolats s'étant développés sur les boîtes de Pétri sont précultivés individuellement pendant 24h dans du LB pollué (40mg.$L^{-1}$ glyphosate, 10mg.$L^{-1}$ diuron et 3,4-DCA). Le test de dégradation est ensuite effectué en microplaque : pour chaque isolat, un volume de préculture est ajouté à 200µL de milieu ES pollué (40mg.$L^{-1}$ glyphosate, 10mg.$L^{-1}$ diuron et 3,4-DCA) de manière à partir d'un inoculum bactérien calibré de 1mg.$L^{-1}$ (poids frais). Chaque isolat est traité en duplicat. La culture bactérienne est prélevée après 96h de culture (28°C, 200tpm) et centrifugée 5min à 560*g* et 4°C. Le surnageant est dosé par CLHP pour déterminer le taux de dissipation des polluants.

### *2.2.7. Conservation de souches*

L'idée était de ne pas perdre les capacités de dégradation des organiques, qui est souvent une capacité acquise, alors que la tolérance au cuivre est constitutive. Les souches sont donc mises en culture dans du LB pollué (40mg.$L^{-1}$ glyphosate, 10mg.$L^{-1}$ diuron et 3,4-DCA) pendant 48h. 1,3mL de la culture bien « vortexée » sont ensuite ajoutés à 0,2mL de glycérol dans un cryotube, « vortexé » et mis au congélateur à -20°C ou -80°C si une conservation longue durée (3 ans) est prévue.

## 2.3. Expériences en logettes

Le tableau II.6 récapitule les conditions des expériences en logettes, les protocoles étant détaillés dans ce qui suit.

### *2.3.1. Dispositif commun*

Logettes

Les expériences en logettes ont été réalisées dans une chambre climatisée, équipée de néons Osram S36W/965 Biolux (Bas-Rhin, France), d'une intensité de 3,5µmolphotons.$m^{-2}$.$s^{-1}$ (2300 lumen), et programmable : photopériode réglée sur 16h-8h (jour-nuit), température fixée à 20°C. En revanche l'humidité n'est pas réglable.

Microcosmes

Les bacs utilisés dans les expériences sont en polyéthylène haute densité (PEHD) (Garhin, Thann, France), de dimensions 39cm×24cm×10cm (L×l×h), pour un volume utile de 6,55L (figure II.6), soit un rapport d'échelle de 1/150000$^{e}$ par rapport au volume utile du BO qui est de 1000$m^3$. La sorption du diuron, du 3,4-DCA, du glyphosate et du cuivre sur ce matériau est nulle (données non montrées), ce qui permet de s'affranchir d'une éventuelle sorption parasite de ces composés. Deux ouvertures sont réalisées : une en entrée du bac à 8cm de hauteur et une en sortie à la base du bac ; toutes deux ont un diamètre d'environ 5mm.

Pour chaque expérience, les bacs sont remplis avec 6kg de mélange sable-sédiment dans les proportions 80/20 (m/m). Le sable est le même que celui employé pour les expériences de sorption, le sédiment est celui du BO. Ce mélange, dont l'analyse est donnée dans le tableau II.1, est supposé approcher la composition à l'équilibre du mélange présent dans le BO à l'aval du muret de gabion (filtre biologique, cf. § 1.3.). Il a été stocké en extérieur dans des bidons étanches (humidité du mélange : 11%) et opaques afin d'utiliser le même mélange lors des expériences successives en microcosmes.

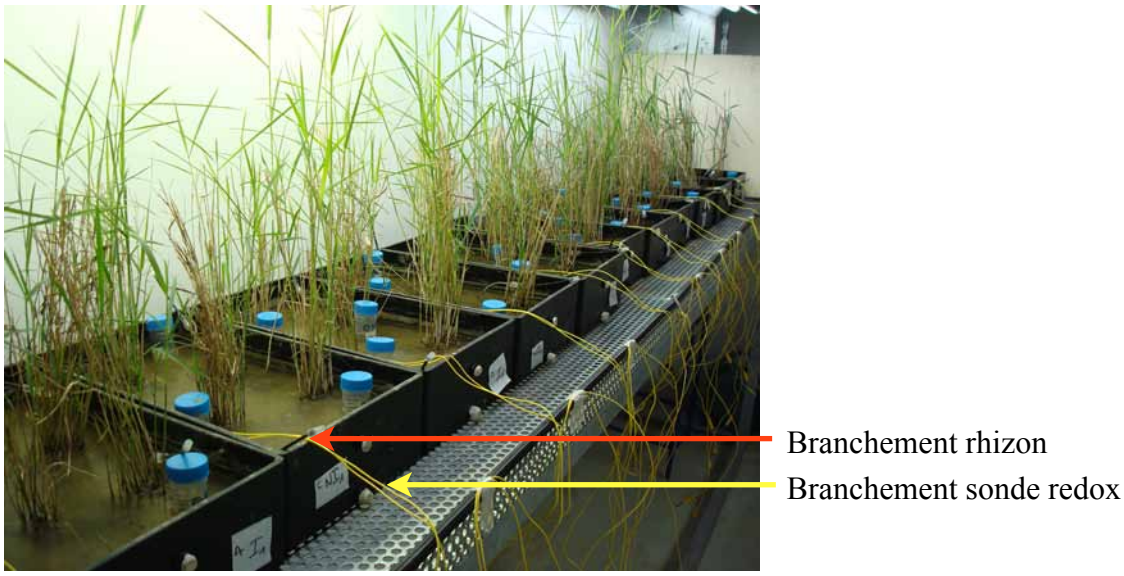



**Figure II.6 : Bacs PEHD en logettes climatisées.**
(Source personnelle) Les rhizons et les branchementts des sondes redox sont indiqués par des flêches.

**Tableau II.6 : Récapitulatif des expériences en logette.**

| | Bioaugmentation | Plantes | Régime hydraulique | Concentration des polluants |
|---|---|---|---|---|
| **I** | - modalité inoculée : $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{sec}$ par bac, une seule fois au début de l'expérience<br>- modalité non inoculée | - modalité plantée : 3 plantes par bac<br>- modalité non plantée | Ajout de 3L d'eau non polluée, pas de vidange | pas de polluants |
| **II** | - modalité inoculée : $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{sec}$ par bac, une seule fois au début de l'expérience<br>- modalité non inoculée | pas de plantes | Ajout de 3L d'eau polluée, pas de vidange | - Cu : 300µg.L$^{-1}$<br>- gly : 50µg.L$^{-1}$<br>- diu : 25µg.L$^{-1}$<br>- 3,4D : 25µg.L$^{-1}$ |
| **III** | - modalité inoculée : $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{sec}$ par bac, une seule fois au début de l'expérience<br>- modalité non inoculée | pas de plantes | - ajout de 1,6L d'eau polluée en 12h<br>- vidange immédiate<br>- opération répétée 2 fois à 15j d'intervalle | - Cu : 1,5mg.L$^{-1}$<br>- gly : 2mg.L$^{-1}$<br>- diu : 400µg.L$^{-1}$<br>- 3,4D : 400µg.L$^{-1}$ |
| **IV** | - modalité inoculée : $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{sec}$ par bac, une seule fois au début de l'expérience<br>- modalité non inoculée | - modalité plantée : 3 plantes par bac<br>- modalité non plantée | - ajout de 1,6L d'eau polluée en 1h30<br>- 4h de rétention<br>- 2h30 de vidange<br>- opération répétée 3 fois à 15j d'intervalle | - Cu : 37,5mg.L$^{-1}$<br>- gly : 50mg.L$^{-1}$<br>- diu : 10mg.L$^{-1}$<br>- 3,4D : 10mg.L$^{-1}$ |
| **V** | - modalité inoculée : $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{sec}$ par bac, renouvelé à chaque évènement<br>- modalité non inoculée | - modalité plantée : 4 plantes par bac<br>- modalité non plantée | - ajout de 1,6L d'eau en 1h30 (en une fois pour le batch, sans vidange)<br>- 4h de rétention<br>- 2h30 de vidange<br>- opération répétée 3 fois à 7j d'intervalle | - Cu : 37,5mg.L$^{-1}$<br>- gly : 50mg.L$^{-1}$<br>- diu : 10mg.L$^{-1}$<br>- 3,4D : 10mg.L$^{-1}$ |
| **VI** | - modalité inoculée : $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{sec}$ par bac, renouvelé toutes les semaines<br>- modalité non inoculée | - modalité plantée : 5 plantes par bac<br>- modalité non plantée | - ajout de 1,6L d'eau en 1h30<br>- 6h de rétention<br>- 2h30 de vidange<br>- opération répétée 2 fois à 15j d'intervalle | - Cu : 56mg.L$^{-1}$<br>- gly : 50mg.L$^{-1}$<br>- diu : 10mg.L$^{-1}$<br>- 3,4D : 10mg.L$^{-1}$<br>- juste Cu pour le 2e évènement |

Les valeurs de concentration massique s'entendent par unité de masse de mélange sable-sédiment.

On ajoute à chaque bac 8g de pulpe de betterave étalés en surface (expériences II à V), ou 100g de pulpe de betterave en aval du bac (expérience VI). Ce sorbant ne servant que pour l'étude sur le cuivre, nous le mentionnons ici uniquement pour information.

Plantes

*Phragmites australis* était présente à 98% dans le bassin d'orage de Rouffach avant réaménagement (Grégoire, communication personnelle), ce qui associé à sa tolérance au cuivre (Huguenot, communication personnelle), explique que cette plante ait été choisie pour les expériences en logette. Les plants âgés de 9 mois (Aquatic'bezançon, France) sont livrés le chevelu racinaire empaqueté dans de la tourbe pour conserver l'humidité lors du transport. Lorsque l'expérience ne commence pas immédiatement à réception des plants, ceux-ci sont plantés dans le mélange sable-sédiment et une lame d'eau est maintenue.

Système d'alimentation

L'eau nécessaire aux expériences est prélevée dans un bidon de 50L en plastique (Eglinsdoerfer, France) par une pompe péristaltique à débit réglable IPC16 (Ismatec, Suisse), équipée de tuyaux Tygon® 3350 (Fisher, France) de diamètre interne 3,17mm. Ces tuyaux sont reliés à des tubes en silicone Tygon® 3350 de diamètre interne de 4,8mm. Il faut s'assurer de l'amorçage de tous les canaux de la pompe sous peine d'obtenir une différence de volume apporté aux différents bacs.

Sondes redox

Le potentiel redox dans le sol est mesuré grâce à des sondes de Platine confectionnées au laboratoire (figure II.7) et connectées à un pH-mètre Hanna Instruments pH 213 (Calvados, France), l'électrode de référence étant une électrode Ag/AgCl.

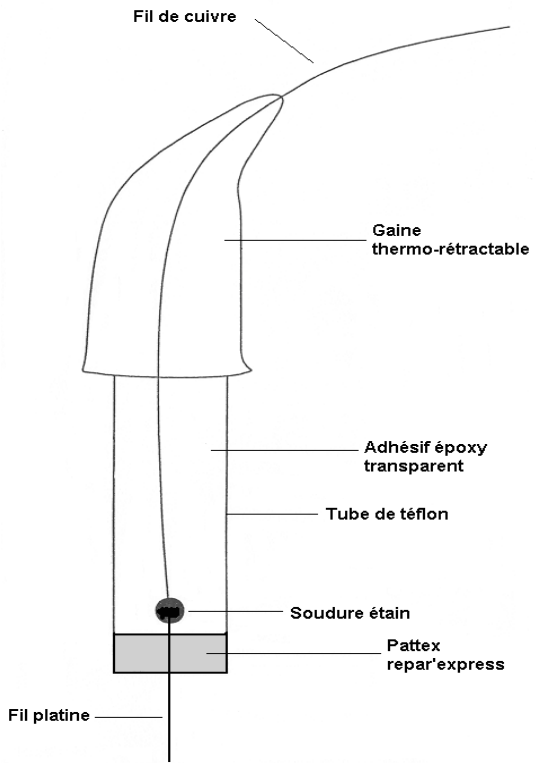



**Figure II.7 : Sonde redox.**
(J.-Y. Cornu)

Mesure de l'humidité

La mesure de l'humidité du sédiment est déterminée selon la norme ISO16586 (X31-433). Une masse de sédiment humide (10g) $\mathbf{M_{hum}}$ est pesée dans des coupelles en aluminium et mise à sécher à l'étuve à 105°C pendant 48h. L'humidité est alors déterminée grâce à la masse de sédiment sec $\mathbf{M_{sec}}$ par la formule :

$$\%_{hum} = (\mathbf{M_{hum}} - \mathbf{M_{sec}}) \times 100/\mathbf{M_{hum}}$$

Détermination du pH

Le pH est déterminé avec un pH mètre Radiometer Analytical PHM 210 (Rhône, France) à 20°C dans les éluats stockés préalablement à 4°C.

Préparation de l'inoculum

Des courbes de calibration reliant la densité optique (DO) et la concentration bactérienne ont été préalablement réalisées pour le consortium 106. Le consortium est précultivé dans du LB et des prélèvements réguliers ($t_0$, $t_0$+4h, $t_0$+6h, $t_0$+20h, $t_0$+26h et $t_0$+45h pour le consortium étudié) sont effectués. A chaque prélèvement une lecture de DO à 600nm (spectromètre Beckman Coulter) de la culture est réalisée et les bactéries sont dénombrées par la méthode du nombre le plus probable (NPP) : 4 dilutions successives ($10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$ et $10^{-7}$) sont inoculées en microplaques, à raison de 40 répétitions par dilution : une répétition = 20µL d'inoculum ajoutés à 180µL de milieu LB dans un puits (figure II.8). Deux lignes au centre de la microplaque ne sont pas inoculées et servent à la fois de témoin négatif et de séparation entre deux dilutions. Les microplaques sont mises à incuber à l'étuve à 28°C. Le nombre de puits positifs est décompté après 48h de culture et rentré dans un tableur pour obtenir la population bactérienne dans l'échantillon prélevé après calcul (Briones et Reichardt 1999).

Deux Erlenmeyers de 2L de milieu LB stérile sont inoculés avec 100µL d'une suspension bactérienne du consortium 106 conservée à -80°C (cf. § 2.2.7.), après décongélation à -20°C pendant environ 3h et à 4°C pendant environ 1h. La culture dure 3 jours à 28°C et 200tpm. Elle est ensuite centrifugée à 1120*g* pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien lavé deux fois à l'eau distillée stérile. Après homogénéisation de la suspension bactérienne homogène, une mesure de DO à 600nm est effectuée permettant de définir le volume

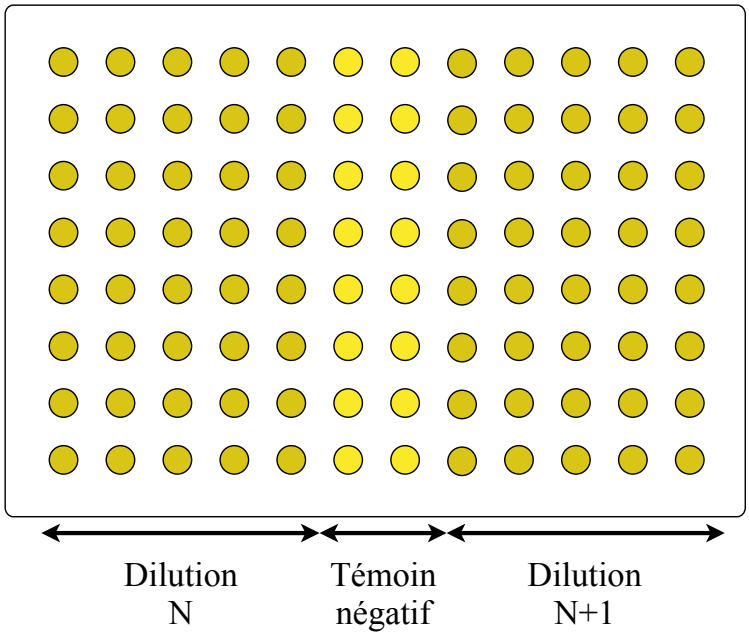



**Figure II.8 : Plan des microplaques utilisées pour le dénombrement.**
En jaune sombre, les puits remplis de milieu LB et inoculés; en jaune clair, les puits remplis uniquement de milieu LB.

de l'inoculum pour avoir un inoculum à une concentration finale de $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{\text{mélange sable-sédiment sec}}$. Pour optimiser la répartition de l'inoculum, la suspension concentrée est diluée avec de l'eau distillée stérile de manière à obtenir un volume d'inoculation de 20 mL. La suspension est répartie à la surface de chaque bac à raison de 1mL par dépôt. Le sol est ensuite homogénéisé manuellement sur la profondeur du bac avec des gants désinfectés. Les bacs non inoculés sont homogénéisés de la même façon.

Dénombrement en microplaques de la microflore totale du sédiment

Un gramme de sédiment est suspendu dans 10mL de KCl stérile (9g.L$^{-1}$) et agité pendant 10 minutes à 200tpm. La population est ensuite déterminée par la méthode du nombre le plus probable (NPP) (cf protocole au § 2.3.1.).

Récupération des éluats

Les eaux en sortie de bacs sont récupérées dans des flacons en verre, préalablement tarés. 4 fractions de même volume sont prélevées successivement et pesées. 50mL de chaque fraction sont stockés à 4°C dans des Falcons en polypropylène pour l'analyse du glyphosate, dans des flacons en verre pour l'analyse du diuron et du 3,4-DCA.

Calcul d'abattement des concentrations en polluants

Les calculs d'abattement pour ces expériences ont été effectués avec les formules suivantes ($C_i$ représente la concentration initiale du polluant, $C_f$ la concentration finale de ce même polluant, $C_{frac}$ la concentration du polluant dans une fraction liquide de volume $V_{frac}$, $V_{tot}$ le volume total d'éluats récupéré, $M_i$ la masse initiale du polluant et $M_f$ la masse finale du polluant).

$(C_i-C_f) / C_i = (C_i - \Sigma C_{frac}.V_{frac}) / C_i = (\Sigma C_i.V_{frac} - \Sigma C_{frac}V_{frac}) / \Sigma C_i.V_{frac}$

et

$(M_i-M_f) / M_i = (C_i.V_{tot} - \Sigma C_{frac}.V_{frac}) / C_i.V_{tot} = (\Sigma C_i.V_{frac} - \Sigma C_{frac}V_{frac}) / \Sigma C_i.V_{frac}$

L'abattement calculé en masse ou en concentration donne donc la même valeur.

### *2.3.2. Expérience en logettes I*

Quatre modalités ont été testées en triplicat : planté-inoculé (PI), planté-non inoculé (PNI), non planté-inoculé (NPI) et non planté-non inoculé (NPNI). Trois plants de *Phragmites australis* alignés (cf. figure II.9) sont ajoutés sans enlever la tourbe. Dans les modalités inoculées, le consortium est ajouté suivant le protocole précisé au § 2.3.1. Dans chaque bac 3L d'eau distillée non polluée sont alors ajoutés en une fois, l'eau étant conservée dans les bacs. La population bactérienne globale est évaluée par méthode NPP (§ 2.3.1.).

### *2.3.3. Expérience en logettes II*

Deux modalités ont été testées en triplicat : inoculée (I) et non inoculée (NI). Aucune plante n'est ajoutée. Dans les modalités inoculées (mêmes concentrations bactériennes qu'à l'expérience I), le consortium est ajouté puis homogénéisé comme précédemment juste avant le premier apport d'eau distillée polluée. Les bacs non inoculés sont homogénéisés de la même façon. Dans chaque bac 3L d'eau distillée polluée (cuivre : 300µg.$L^{-1}$, glyphosate : 50µg.$L^{-1}$, diuron : 25µg.$L^{-1}$, 3,4-DCA : 25µg.$L^{-1}$) sont alors ajoutés . On prélève l'eau dans les bacs en début et en fin d'expérience. La conductivité, le pH, le potentiel rédox du sédiment et les concentrations des polluants dans l'eau et le sédiment sont mesurés. 3 échantillons en duplicats d'environ 1g de mélange sable-sédiment chacun (afin d'avoir suffisamment de matière) sont prélevés à 3 endroits du bac et en surface (0-1cm) pour le dénombrement de la population bactérienne totale et l'analyse de la structure de la communauté bactérienne par TTGE (échantillon immédiatement congelé à -20°C).

L'eau est prélevée à la pipette et stockée dans en flacons en polypropylène (analyses de glyphosate) ou en verre (analyses de diuron et 3,4-DCA), sans filtration. Les prélèvements de sédiment (100g pour le diuron/3,4-DCA, 20g pour le glyphosate) sont stockés de manière analogue. Tous les échantillons sont analysés par IPL (Nambsheim).

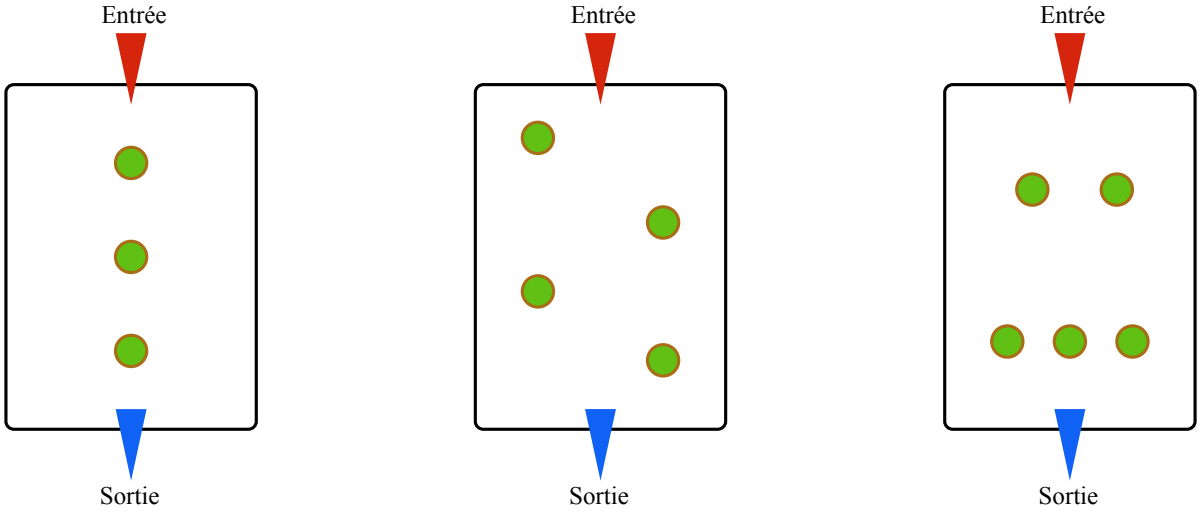



**Figure II.9 : Schéma d'implantation des plantes dans les bacs PEHD.**
A gauche l'implantation pour l'expérience IV, au milieu celle pour l'expérience V, à droite celle pour l'expérience VI.

### *2.3.4. Expérience en logettes III*

Deux modalités ont été testées en triplicat : inoculée (I) et non inoculée (NI). Aucune plante n'est ajoutée. Dans les modalités inoculées (mêmes concentrations qu'à l'expérience I), le consortium est ajouté puis homogénéisé comme précédemment juste avant le premier apport d'eau distillée. Les bacs non inoculés sont homogénéisés de la même façon. Dans chaque bac 1,6L d'eau distillée polluée (Cu, 1500µg.$L^{-1}$, glyphosate, 2000µg.$L^{-1}$, diuron, 400µg.$L^{-1}$ et 3,4-DCA, 400µg.$L^{-1}$) sont alors ajoutés en 12h, l'eau ressortant progressivement des bacs par le trou à l'opposé de l'arrivée d'eau. Après chaque apport d'eau, l'eau en sortie est prélevée et lorsque la vidange est complète, un prélèvement de sédiment est réalisé. Au total 3 apports d'eau distillée sont effectués, 15 jours séparant deux apports successifs. Un dernier prélèvement de sédiment est réalisé un mois après le dernier évènement. La conductivité, le pH, le potentiel rédox du sédiment et les concentrations des polluants dans l'eau et le sédiment sont mesurés. La diversité bactérienne du sédiment est évaluée par TTGE (même protocole de prélèvement que ci-dessus).

L'eau est prélevée, stockée et analysée comme précédemment.

### *2.3.5. Expérience en logettes IV*

4 modalités ont été testées en triplicat : plantée-non-inoculée (PNI), plantée-inoculée (PI), non-plantée-inoculée (NPI), non-plantée-non-inoculée (NPNI). Pour les modalités plantées, 3 plants de *P. australis* sont ajoutés dans chaque bac deux semaines avant le premier apport d'eau distillée (figure II.10), la tourbe enveloppant les racines étant conservée. Une lame d'eau est ajoutée ; les bacs sont vidés de l'eau juste avant le premier évènement. Pour les modalités inoculées, la concentration initiale de l'inoculum bactérien est la même qu'à l'expérience I, l'inoculation étant réalisée comme dans l'expérience précédente, une seule fois, une semaine avant le premier apport d'eau distillée polluée.

On ajoute 1,6L d'eau distillée polluée à chaque bac (Cu, 37,5mg.$L^{-1}$ ; glyphosate, 50mg.$L^{-1}$ ; diuron et 3,4-DCA, 10mg.$L^{-1}$) en 1h30, l'eau est ensuite retenue dans les bacs pendant 4h avant la vidange, qui dure approximativement 2h30. On prélève l'eau de sortie en plusieurs

**Figure II.10 : Plants de *Phragmites australis.***
(D. Huguenot)

fractions. Au total 3 apports d'eau distillée polluée sont effectués, 15 jours séparant deux apports successifs.

On réalise un prélèvement de sédiment (100g de sédiment humide ou 50g de sédiment sec dans un flacon en verre pour l'analyse du diuron et du 3,4-DCA, 20g de sédiment humide ou 10g de sédiment sec dans un flacon en polypropylène pour l'analyse du glyphosate) juste avant et une semaine après chaque apport d'eau. La conductivité, le pH, le potentiel rédox du sédiment sont suivis chaque jour. La population bactérienne globale est évaluée par la méthode NPP juste avant et juste après le premier apport d'eau polluée et juste après les autres évènements pluvieux ; la diversité bactérienne du sédiment est évaluée par TTGE (même protocole de prélèvement que ci-dessus).

L'eau est prélevée et stockée comme précédemment ; les analyses sont réalisées au laboratoire par CLHP (cf. § 1.5.).

### *2.3.6. Expérience en logettes V*

On teste 4 modalités en triplicats : des modalités plantée-non-inoculée (CNI) et plantée-inoculée (CI) en régime hydraulique semi-continu et des modalités plantée-non-inoculée (BNI) et plantée-inoculée (BI) avec un apport d'eau distillée en batch (bacs remplis d'eau distillée polluée au début de l'expérience, sans qu'il y ait d'apport ni de soutirage). Pour les modalités plantées, 4 plants de *P. australis* sont ajoutés en quinconce dans chaque bac 2 semaines avant le premier apport d'eau (figure II.10), la tourbe enveloppant les racines étant otée par rinçage à l'eau ; pour les modalités inoculées, la concentration initiale de l'inoculum bactérien est la même qu'à l'expérience I, l'apport étant réalisé comme dans l'expérience précédente, mais renouvelé avant chaque apport d'eau pour cette expérience. 1,6L d'eau distillée non polluée par bac sont apportés en 1h30 une semaine avant le premier apport d'eau distillée polluée afin d'éviter une modification brutale des conditions biotiques et abiotiques au début de l'expérience.

A chaque apport d'eau on ajoute de l'eau distillée polluée à chaque bac (cuivre, 37,5mg.L$^{-1}$, glyphosate, 50mg.L$^{-1}$, diuron, 10mg.L$^{-1}$ et 3,4-DCA, 10mg.L$^{-1}$) (même régime hydraulique que lors de l'expérience précédente), l'eau est ensuite retenue dans les bacs pendant

4h avant vidange, qui dure approximativement 2h30. L'eau en sortie est prélevée en plusieurs fractions de volume identique. Au total 3 apports d'eau sont réalisés, une semaine séparant deux apports successifs. Pour la modalité, l'eau est apportée et soutirée en une fois.

On réalise un prélèvement de sédiment (même protocole que précédemment) juste avant chaque apport d'eau et une semaine après le dernier apport d'eau. La conductivité, l'humidité, le pH, le potentiel rédox du sédiment sont suivis tous les 2 jours. La population bactérienne globale ainsi que la structure de la communauté bactérienne du sédiment sont déterminées, de la même manière qu'au § 2.3.4., au moment des prélèvements de sol pour le suivi des polluants.

L'eau est prélevée, stockée et analysée comme précédemment.

### *2.3.7. Expérience en logettes VI*

On teste 4 modalités en triplicats : des modalités plantée-non-inoculée (PNI) et plantée-inoculée (PI), des modalités non-plantée-inoculée (NPI) et non-plantée-non-inoculée (NPNI). Pour les modalités plantées, 5 plants de *P. australis* sont ajoutés en 2 lignes (figure II.10) dans chaque bac 22 semaines avant le premier apport d'eau, la tourbe enveloppant les racines ayant été préalablement enlevée par lavage à l'eau. Pour les modalités inoculées, la concentration initiale de l'inoculum bactérien est la même qu'à l'expérience I, l'apport étant réalisé comme dans l'expérience précédente mais cette fois renouvelé chaque semaine après l'évènement pluvieux. 1,6L d'eau distillée non polluée par bac sont apportés en 1h30 suivi d'une rétention de 6h et d'une vidange de 2h30 environ une semaine avant le premier apport d'eau distillée polluée afin d'être dans un état hydraulique qui soit constant au cours de l'expérience.

Contrairement aux expériences précédentes, seulement deux apports d'eau sont effectués. Lors du premier, on ajoute de l'eau distillée polluée à chaque bac (cuivre, 56mg.L$^{-1}$, glyphosate, 50mg.L$^{-1}$, diuron, 10mg.L$^{-1}$ et 3,4-DCA, 10mg.L$^{-1}$) (même régime hydraulique qu'à l'expérience précédente). Un second apport d'eau distillée polluée uniquement en Cu (56mg.L$^{-1}$) est effectué deux semaines plus tard dans les mêmes conditions que le premier. Lors de la vidange, on place 100g de pulpe de betterave en aval de tous les bacs sauf pour le témoin (modalité NPNI). L'eau

en sortie est prélevée en plusieurs fractions de même volume, après être passée à travers la pulpe de betterave pour les bacs où elle a été installée.

Le potentiel rédox du sédiment est suivi. Les bacs sont régulièrement pesés et de l'eau régulièrement ajoutée (balance OHAUS E-Series ES30R, New Jersey, Etats-Unis : portée de 30±0,01kg) de façon à maintenir l'humidité du mélange sable-sédiment. La population bactérienne globale ainsi que la structure de la communauté bactérienne du sédiment sont déterminées chaque semaine, de la même manière que précédemment, au moment des prélèvements de sol. On réalise un prélèvement de sédiment pour l'analyse des composés étudiés 3 semaines après le dernier apport d'eau. Le sédiment est ainsi prélevé à deux profondeurs : une couche superficielle et une couche en profondeur de 2cm d'épaisseur chacune, associées à un découpage en 2 dans le sens de la longueur. Chaque échantillon est ensuite homogénéisé à l'aide d'une quarteuse (Retsch RT 12.5, Allemagne) triant les particules d'un diamètre maximum de 8mm.

L'eau est prélevée, stockée et analysée comme précédemment.

# PARTIE III
# CHAPITRE 1
# -
# TESTS de SORPTION

# RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 1

## Tests de matériaux de sorption

Comme cela a été évoqué dans la synthèse bibliographique, le peu de temps alloué à la rétention des polluants, au regard de celui exigé par les processus de bioremédiation et de phytoremédiation, explique entre autres le manque d'efficacité de l'épuration des ZHA. Afin de pallier cet inconvénient, la démarche adoptée consiste à augmenter dans notre système ce temps de rétention. Pour cela, des matériaux de sorption spécifiques à chaque molécule ont été sélectionnés parmi des produits simples (tels que des déchets agricoles) et donc peu coûteux en raison de la rusticité souhaitée de notre système de traitement, en plus de performances de sorption déjà remarquées dans la littérature. Ces matériaux ont été testés dans des conditions idéales classiquement utilisées (l'eau ultra pure) et complétées dans des conditions plus proches de celles qui prévalent dans ces systèmes afin d'estimer au plus juste leurs performances futures.

### 1.1. Cinétiques de sorption

#### *1.1.1. Performances de sorption*

Pour chaque polluant pris séparément, les performances de sorption dans l'**eau ultrapure** (EUP) des différents matériaux sont indiquées dans le tableau III.1.

Le pourcentage de sorption le plus élevé pour le glyphosate est de 74%, obtenu avec les cendres de rafles de maïs. Les autres sorbants sont significativement moins efficaces, avec des taux de sorption décroissants de 54 à 27%, dans l'ordre suivant : sable = maïs = vermiculite = betterave = perlite > sédiment (Tableau III.1). Le temps requis pour atteindre ces maxima varie de 0,2 à 24h. Mis à part les cendres et le sédiment, la sorption du glyphosate est similaire pour tous les sorbants et ne semble donc pas influencée par les différentes CEC des matériaux (tableau II. 5), ce qui est en accord avec les résultats de Morillo et coll. (2000). Elle semblerait plus influencée par le contenu en $SiO_2$ des sorbants minéraux (sédiment, sable, perlite et vermiculite)

**Tableau III.1 : Sorption des polluants, exprimée en pourcentage de la concentration initiale.**
Les performances maximales de sorption sont exprimées en pourcentage de la concentration initiale. Le temps nécessaire pour atteindre le maximum de sorption figure sous le maximum correspondant. Les groupes homogènes (déterminés par ANOVA P < 0,05) par polluant et type de matrice sont signalés par les lettres entre parenthèses.

| | | Betterave | Maïs | Perlite | Vermiculite | Sédiment | Sable | Cendres |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **glyphosate** | **seul (EUP)** | 49 ± 1 (b) | 50 ± 2 (b) | 47 ± 1 (b) | 50 ± 8 (b) | 27 ± 9 (c) | 54 ± 9 (b) | 74 ± 7 (a) |
| | **temps (h)** | 1 | 5 | 1 | 1 | 0,2 | 4 | 24 |
| | **mélange (ES)** | 65 ± 2 (ab) | 65 ± 3 (ab) | 65 ± 2 (ab) | 71 ± 3 (a) | **76 ± 7 (a)** | 54 ± 14 (b) | 79 ± 1 (a) |
| | **temps (h)** | 6 | 6 | 24 | 48 | **24** | 48 | 48 |
| **diuron** | **seul (EUP)** | 74 ± 4 (bc) | 73 ± 16 (bc) | 77 ± 1 (abc) | 79 ± 13 (abc) | 63 ± 3 (c) | 94 ± 1 (ab) | 98 ± 1 (a) |
| | **temps (h)** | 1 | 5 | 5 | 0,5 | 0,5 | 6 | 6 |
| | **mélange (ES)** | 57 ± 1 (cd) | 57 ± 1 (cd) | 8 ± 6 (e) | 47 ± 12 (d) | 61 ± 4 (c) | **76 ± 1 (b)** | 94 ± 2 (a) |
| | **temps (h)** | 8 | 48 | 48 | 6 | 2 | **24** | 48 |
| **3,4-DCA** | **seul (EUP)** | 80 ± 4 (b) | 56 ± 2 (c) | 54 ± 10 (c) | 34 ± 3 (d) | 54 ± 3 (c) | 86 ± 2 (b) | 99 ± 1 (a) |
| | **temps (h)** | 2 | 6 | 4 | 1 | 4 | 0,5 | 2 |
| | **mélange (ES)** | **86 ± 2 (ab)** | **86 ± 1 (ab)** | 30 ± 19 (d) | 74 ± 9 (b) | 49 ± 4 (c) | **82 ± 3 (ab)** | 97 ± 2 (a) |
| | **temps (h)** | **8** | **8** | 2 | 8 | 2 | **1** | 48 |

probablement en raison des liaisons hydrogène avec le groupement phosphonate du glyphosate, et par la surface spécifique des sorbants organiques (betterave, maïs et cendres). La faible sorption du glyphosate sur le sédiment est inattendue puisque les minéraux de charge variable présents dans le sédiment (oxydes d'aluminium et de fer par exemple) améliorent d'ordinaire sa sorption (Borggaard et Gimsing 2008).

Le diuron (tableau III.1) est plus fortement sorbé par les cendres et le sable, avec respectivement 98% et 94% de sorption, ce qui est conforme aux résultats de Yang et Shen (2003) pour les cendres et à ceux de Rae et coll. (1998) et Albers et coll. (2008) pour le sable. Les pourcentages de sorption des autres matériaux s'échelonnent entre 63% et 79%, sans différences significatives. Les durées nécessaires pour atteindre les maxima varient entre 0,5 à 6h pour tous les matériaux.

Le 3,4-DCA (Tableau III.1) est également fortement sorbé par les cendres, puis par le sable, avec des pourcentages maximaux de 99% et 86% respectivement. Pour les autres sorbants, les pourcentages diminuent de 80% à 34%, dans l'ordre suivant : betterave > maïs = sédiment = perlite > vermiculite. Les temps nécessaires pour atteindre le maximum de sorption varient de 0,5 à 6h. On aurait pu s'attendre à ce que la sorption du diuron et du 3,4-DCA soit positivement liée à la teneur en carbone des sorbants (Ahangar et coll. 2008). Ce phénomène n'apparaît pas dans nos résultats, sans doute en raison du rôle qu'exerce également la surface spécifique, variable selon le matériau, sur la sorption. Le fait que le 3,4-DCA se sorbe plus que le diuron (pour la betterave) tout en présentant le même noyau structural pourrait venir de sa plus petite taille : 3Å (Causserand et coll. 2005) pour le 3,4-DCA contre 9,2Å pour le diuron (Chen et coll. 2004).

La sorption du glyphosate sur les différents matériaux est globalement plus faible que celle du diuron et du 3,4-DCA, alors que le glyphosate semblait avoir une forte tendance à la sorption (Goldsborough et Brown 1993, Wang et coll. 1994, Vereecken 2005). Ceci peut être dû à la plus grande affinité du glyphosate pour l'eau (Tableaux I.4 et I.6), d'où une partition liquide/solide moins marquée que celle du diuron et du 3,4-DCA. Par contre quel que soit le polluant, les cendres de maïs constituent le matériau le plus efficace, ce qui est en accord avec les résultats existant (Koelmans et coll. 2006), les cendres pouvant être jusqu'à 400 fois plus efficaces que le produit non brûlé pour le diuron (Yang et Shen 2003). Dans nos expériences, le pourcentage

maximum de sorption est ainsi multiplié par 1,5 pour le glyphosate, 1,3 pour le diuron et 1,8 pour le 3,4-DCA, en raison probablement d'une forte augmentation de la surface spécifique (tableau II.5).

Le matériau sorbant le plus efficace à l'issue de ce premier test est donc la cendre de rafles de maïs et la suite de l'étude devrait donc se porter naturellement sur ce matériau. Cependant, l'exigence d'un procédé rustique incite à choisir un matériau ne nécessitant pas de traitement (en l'occurrence ici une combustion). Par ailleurs, le temps requis pour atteindre le pourcentage maximal de sorption est élevé (jusqu'à 24h pour le glyphosate). L'utilisation de sable, deuxième meilleur sorbant pour tous les polluants se justifierait d'autant plus qu'il sert de matériau de base dans le filtre biologique du bassin d'orage de Rouffach. On remarquera que le sédiment, qui s'accumule dans le bassin d'orage au cours des épisodes érosifs successifs, présente aussi des capacités non négligeables de sorption, notamment pour le diuron et le 3,4-DCA.

### *1.1.2. Modifications de sorption selon la matrice liquide*

Afin de tester les matériaux dans des conditions plus proches de celles rencontrées sur le terrain, des expériences de sorption ont été réalisées selon un protocole analogue à celui utilisé précédemment (EUP), où seules les matrices liquides changent. Les matrices utilisées sont l'eau de ruissellement prélevée à l'entrée secondaire du BO (EBO) après un épisode pluvieux, et le milieu à l'extrait de sédiment (ES) se rapprochant sans doute le plus des conditions régnant dans le sédiment humide, voire inondé du BO. En effet, les matrices liquides environnementales contiennent des cations ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$) et de la matière organique susceptibles d'influencer fortement la sorption des polluants.

La sorption de chaque polluant est affectée par le changement de matrice (Fig. III.1), ce qui concorde avec des résultats déjà établis pour d'autres pesticides (Li et coll. 2005, Flores-Cespedes et coll. 2006). Mais si la sorption du glyphosate sur les rafles de maïs et la pulpe de betterave n'est que légèrement diminuée dans l'EBO et l'ES (figure III.1.a), l'effet du changement de matrice est plus marqué pour les autres matériaux. Ainsi dans le cas de la

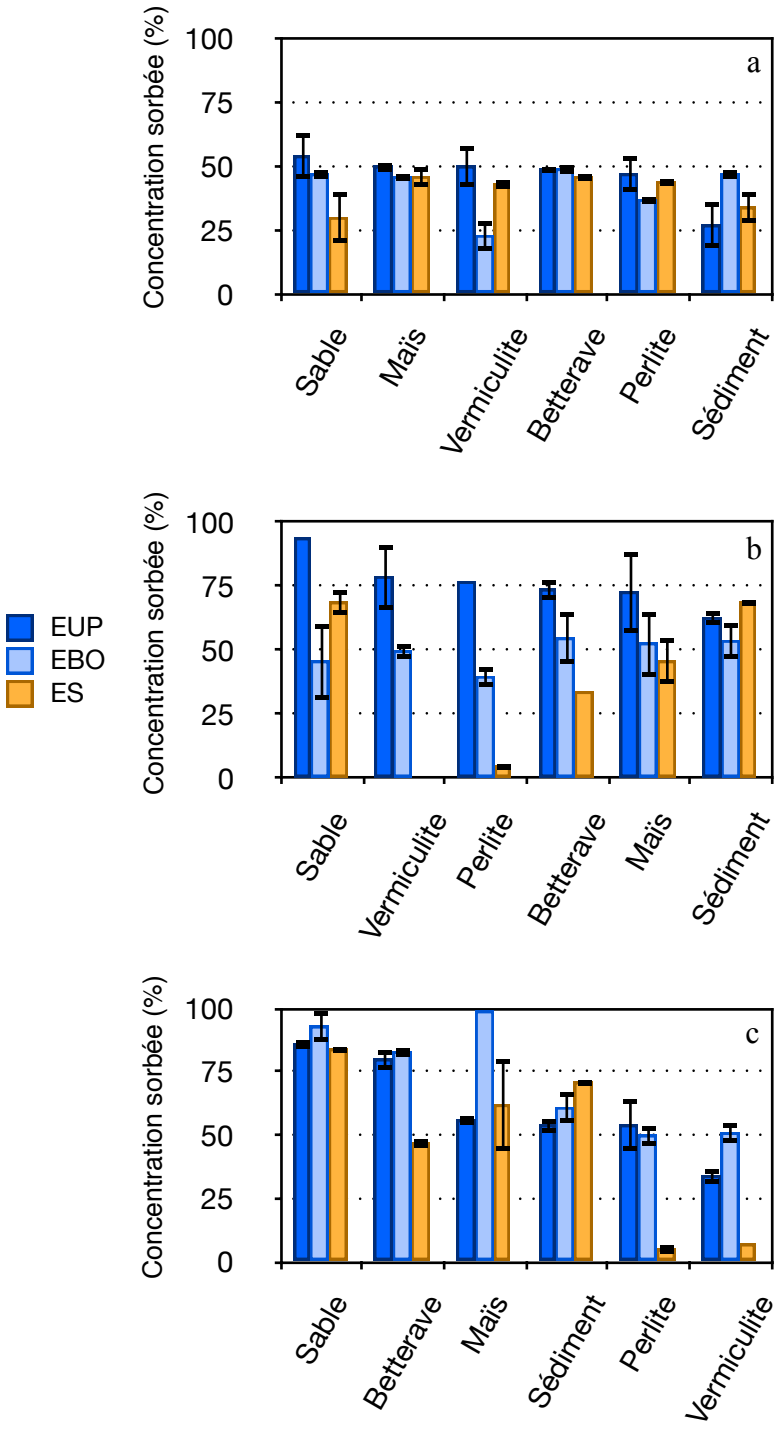



**Figure III.1 : Performances de sorption dans les différentes matrices liquides.**
a : glyphosate, b : diuron, c : 3,4-DCA. Chaque polluant est étudié séparément. Les performances sont représentées pour chaque polluant. EUP : eau ultrapure, EBO : eau de ruissellement, ES : extrait de sédiment. Les écarts-types figurent sous forme de barres (elles ne sont pas visibles lorsque l'écart-type est nul).

vermiculite et de la perlite, la sorption du glyphosate diminue dans l'EBO et faiblement dans l'ES. En revanche, elle diminue significativement dans l'ES pour le sable, probablement en raison de la compétition avec Al, Fe et/ou la matière organique (Morillo et coll. 2000). La baisse de sorption du glyphosate peut être attribuée à la sorption préférentielle de ce dernier sur la matière organique dissoute contenue dans l'ES, phénomène déjà observé par Madhun et coll. en 1986 et Piccolo et Celano en 1994. Enfin pour le sédiment, la sorption augmente significativement dans l'EBO et faiblement dans l'ES, peut-être en raison de la présence de cations compétiteurs en plus grande concentration dans l'ES (tableau II.4), et de la présence de phosphates (Borggaard et Gimsing 2008). Notons cependant que l'impact du phosphate sur la sorption du glyphosate est sujet à caution. De Jonge et coll. (2001) ont ainsi rapporté que le phosphate jouait un rôle important dans la sorption du glyphosate alors que Barrett et McBride (2007) ont conclu que la compétition des deux espèces pour la sorption est limitée. Au vu de ces résultats, la cendre considérée précédemment comme la plus performante pour la sorption du glyphosate (74% de sorption dans l'EUP) n'est pas le matériau le plus performant dans l'ES (30%) (résultats non montrés), matrice la plus proche de celle rencontrée *in situ*. La betterave ou le maïs qui permettent d'obtenir 46% de sorption semblent plus adaptés.

La sorption du diuron dans l'EBO, comparée à celle dans l'EUP, diminue pour tous les sorbants (figure III.1.b). Cette diminution pourrait être attribuée à une sorption préférentielle sur la fraction colloïdale de l'EBO, ainsi que l'ont montré Irace-Guigand et Aaron (2003). Une diminution supplémentaire de la sorption apparaît avec l'ES pour la vermiculite, la perlite, la betterave et le maïs. Cette diminution pourrait s'expliquer par deux hypothèses : la première est la sorption compétitive entre diuron et matière organique dissoute, démontrée par Song et coll. (2008) pour le chlorotoluron, une molécule proche du diuron, la seconde étant la formation de complexes stables ente le diuron et la matière organique dissoute (Thévenot et coll. 2008, 2009). Le sable reste dans le cas du diuron le meilleur sorbant dans l'ES avec 69% de sorption contre 94% dans l'EUP, rejoint par le sédiment (69% dans l'ES contre 63% dans l'EUP).

Pour la betterave, la perlite et la vermiculite, une diminution similaire à celle du diuron est observée dans l'ES pour la sorption du 3,4-DCA (figure III.1.c). Au contraire la sorption sur le sédiment augmente, ce qui est en accord avec les résultats de Flores-Cespedes et coll. (2006), qui

montrent que la présence de matière organique dissoute améliore la sorption du 3,4-DCA sur un sol calcaire. Le sable reste donc également le meilleur sorbant pour le 3,4-DCA dans l'ES avec 84% de sorption. Au contraire du diuron, la sorption du 3,4-DCA est améliorée dans l'EBO, sans qu'une explication des mécanismes impliqués puisse être proposée.

**Conclusion** : la sorption du glyphosate sur la betterave, le maïs et la perlite est faiblement influencée par la matrice, contrairement à ce qui est observé pour le sédiment, le sable ou les cendres. Des résultats contraires ont été mis en évidence pour le diuron et le 3,4-DCA. Le caractère ionique du glyphosate contrairement à l'électroneutralité du diuron sont probablement responsables de ces différences. Si l'on utilise l'EUP comme référence, la modification des performances de sorption est plus importante avec l'ES qu'avec l'EBO. Or le milieu ES contient 100 fois plus de carbone organique et entre 3 et 30 fois plus de cations compétiteurs que le milieu EBO (tableau II.4), ce qui explique probablement les variations plus ou moins fortes de sorption observées dans ces matrices par rapport à l'EUP. Cependant le rôle de la matière organique sur la sorption du glyphosate reste sujet à caution (Mamy et Barriuso 2005, Yu et Zhou 2005).

Si l'effet de la matrice liquide se révèle important dans le choix du matériau sorbant à utiliser *in situ*, ce n'est pas suffisant. Il est notamment très rare d'être en présence d'un seul xénobiotique mais plutôt de mélanges. L'étape suivante consiste donc à s'assurer que les matériaux choisis dans une matrice complexe avec des polluants ajoutés individuellement (betterave ou maïs pour le glyphosate, sable ou sédiment pour le diuron et le 3,4-DCA) conserveront de bonnes performances de sorption si ces mêmes polluants sont mélangés.

### *1.1.3. Modifications des sorptions individuelles en présence d'autres composés*

Glyphosate et cuivre

En raison de données existantes sur les interactions cuivre-glyphosate et leurs effets sur la sorption du glyphosate, il semblait intéressant d'évaluer ces effets dans le cas des matériaux et des matrices étudiés (Fig. III.2), d'autant plus que le milieu d'origine (sédiment du BO) est susceptible de contenir du cuivre en concentration non négligeable.

Dans l'EUP, la sorption du glyphosate est en moyenne plus importante en présence de cuivre en solution pour tous les matériaux, l'effet n'étant significatif que pour le sédiment (+68%), le sable (+27%) et les cendres (+12%). Ceci est en accord avec les résultats d'études sur certains sorbants naturels tels que le sol, où les complexes glyphosate-cuivre montrent des capacités de sorption plus élevées que la molécule de glyphosate libre (Morillo et coll. 2000, Mamy et Barriuso 2005, Barrett et Bride 2006). Le cuivre présent en solution se complexe avec le glyphosate, le complexe pouvant se sorber sur les sites éligibles pour la sorption du cuivre par l'intermédiaire de ce dernier ; celui-ci joue donc un rôle de pont pour le glyphosate ce qui améliore sa sorption. Cet effet dépend des caractéristiques du sorbant (telle que la composition du sédiment dans notre cas, notamment sa CEC), du pH de la solution et de la concentration en cuivre (Dousset et coll. 2007).

Dans l'EBO et l'ES, on peut voir que la matrice liquide influe fortement sur le comportement du glyphosate en mélange avec le cuivre, ce qui pourrait venir de la présence de cations en plus grande concentration, dans l'ES notamment (cf. tableau II.4). L'interaction constatée entre glyphosate et cuivre dans l'EUP est dans la majorité des cas modifiée dans l'EBO et l'ES. Ainsi dans l'EBO, une sorption significativement plus faible du glyphosate en présence de cuivre est observée pour le maïs et les cendres, la différence étant quasi-nulle pour la betterave. En revanche, on constate une augmentation significative de la sorption plus marquée pour la perlite et la vermiculite que pour le sédiment et le sable. Dans l'ES, l'ajout de cuivre augmente significativement la sorption du glyphosate sur tous les matériaux sauf la perlite et la vermiculite, même si l'amélioration est moins sensible que dans l'EUP pour le sédiment.

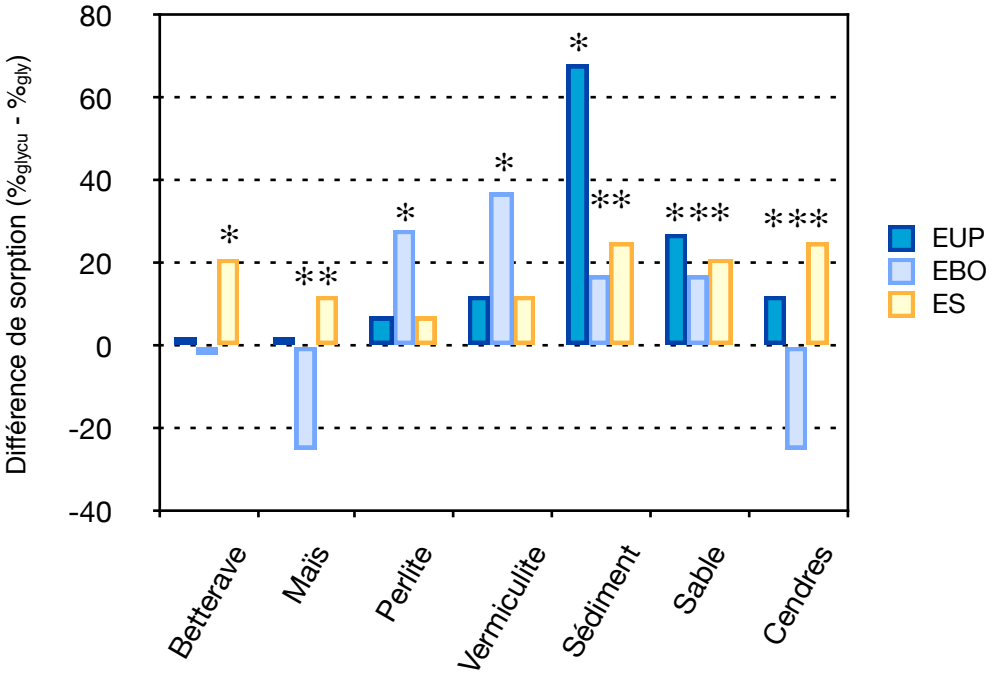



**Figure III.2 : Evolution de la sorption du glyphosate en mélange avec du cuivre.**
Les variations de pourcentage de sorption entre les modalités glyphosate en présence de cuivre et glyphosate seul (%glycu - %gly) sont représentées. Les astérisques signalent les cas où les pourcentages %glycu et %gly sont significativement différents ($P < 0,05$).

L'interaction du glyphosate avec le cuivre apparaît clairement au vu de ces résultats. Le cuivre joue sur la sorption du glyphosate, l'effet variant selon la matrice liquide et le matériau.

Glyphosate, diuron et 3,4-DCA en mélange

Dans l'EUP, la sorption des polluants est modifiée par la présence des autres polluants (glyphosate, diuron, 3,4-DCA et cuivre). Le type de modification dépend à la fois du polluant et du matériau. Pour le glyphosate (fig. III.3.a), la sorption sur la betterave, le maïs, la vermiculite et les cendres n'est pas significativement modifiée et elle est meilleure pour le sédiment (+37%), le sable (+29%) et la perlite (+28%). Pour le diuron (fig. III.3.b), la sorption sur le sédiment n'est pas modifiée significativement, elle est moins bonne pour la betterave (-59%), le maïs (-55%), la perlite (-17%) et la vermiculite (-19%) et elle est améliorée pour le sédiment (+29%). Pour le 3,4-DCA (fig. III.3.c), la sorption sur la perlite n'est pas modifiée significativement, elle est moins bonne pour la betterave (-25%), la vermiculite (-14%), le sable (-6%) et les cendres (-4%) et elle est améliorée pour le maïs (+13%). La sorption du glyphosate est la moins modifiée, tandis que celle du diuron et du 3,4-DCA diminue dans de nombreux cas. Les résultats qui montrent la diminution de sorption d'un pesticide en présence d'autres pesticides en solution rejoignent ceux de Leistra et Matser (1994) sur deux fongicides, le carbendazim et l'iprodione. Ainsi la sorption du carbendazim sur le sol diminue de 30% lors de l'ajout d'iprodione, et la sorption d'iprodione sur le sol diminue de 70% lors de l'ajout de carbendazim. De plus, cette sorption compétitive dépend de la structure du matériau sorbant étudié (Pelekani et coll. 2000), ce qui peut expliquer les différences de variation de sorption obtenues pour les différents matériaux de notre étude testés pour chaque polluant. L'amélioration de la sorption lorsque les polluants sont en mélange pourrait être expliquée par la présence du cuivre (cf. effet observé pour le glyphosate) ou des molécules organiques, mais l'absence de littérature sur ce dernier point ne permet pas de comparer nos résultats. Les différences de sorption observées entre le mélange glyphosate-cuivre et le mélange des 4 molécules nous permettent cependant de penser qu'il y a interaction entre ces molécules. Une absence de modification de la sorption a également été observée dans certains cas (De Wilde et coll. 2009). Les auteurs l'expliquent en partie par la concentration massique de pesticides ajoutés qui, si elle est égale entre les produits, correspond à des concentrations

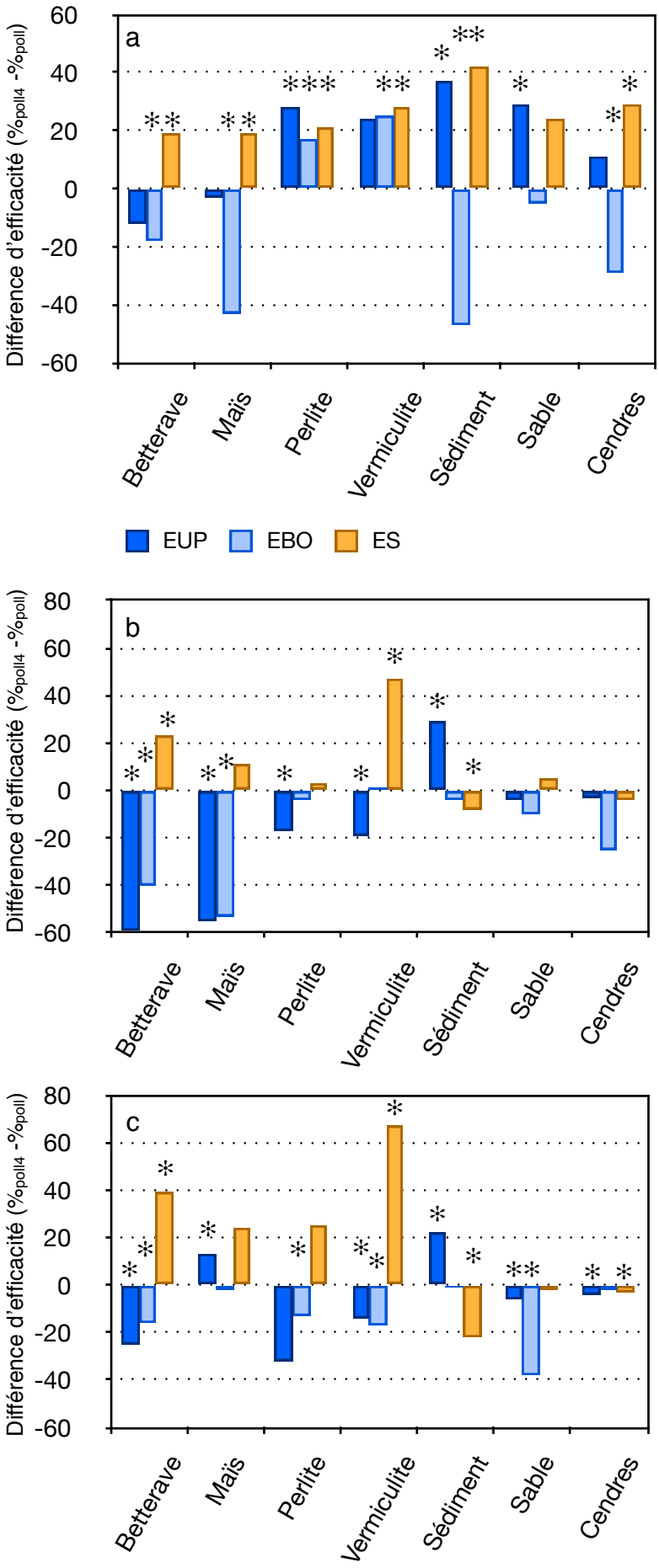



**Figure III.3 : Evolution de la sorption du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA en milieu complexe (mélange de polluants).**
a : glyphosate ; b : diuron ; c : 3,4-DCA. Les valeurs représentées sont les différences de pourcentage de sorption entre la modalité polluant en mélange (poll4) et polluant seul (poll) : $\%ads_{poll4}$ - $\%ads_{poll}$. Les astérisques signalent les cas où les pourcentages $\%ads_{poll4}$ et $\%ads_{poll}$ sont significativement différents ($P < 0,05$).

molaires différentes, et donc à un nombre de compétiteurs différents suivant le pesticide, qui peut être négligeable suivant la concentration. Ce n'est cependant pas complètement le cas dans notre étude, les concentrations molaires des polluants ajoutés étant certes différentes (1,2mmol.$L^{-1}$ de glyphosate, 0,43mmol.$L^{-1}$ de diuron et 0,62mmol.$L^{-1}$ de 3,4-DCA) mais du même ordre de grandeur. Les affinités chimiques plus ou moins élevées des molécules pour le substrat, des mécanismes de sorption différents ainsi que des tailles différentes (7,3Å pour le glyphosate (Dideriksen et coll. 2003), 3Å pour le 3,4-DCA et 9,2Å pour le diuron) doivent expliquer les différences de sorption observées.

L'influence des autres polluants qui est observée se combine avec l'effet de matrice observé précédemment, ce qui modifie les résultats obtenus pour le mélange de polluants. Dans l'optique d'un fonctionnement de notre procédé dans des matrices plus proches des conditions environnementales qu'une matrice modèle comme l'EUP, nous avons réalisé les mêmes tests dans l'EBO et l'ES, qui se rapprochent des matrices liquides que nous aurons lors des expériences en logettes. L'idée est alors de choisir parmi les matériaux présentant une amélioration de la sorption dans l'ES en mélange avec les autres polluants. Les résultats de sorption du glyphosate en mélange dans l'EUP sont modifiés dans l'EBO et l'ES (Fig. III.3.a). La sorption dans l'EBO est significativement diminuée pour le sédiment (-47%), le maïs (-43%), les cendres (-29%) et la betterave (-18%), significativement augmentée pour la vermiculite (+25%) et la perlite (+17%) et ne varie pas significativement pour le sable. Dans l'ES au contraire, l'amélioration significative de la sorption est constatée pour l'ensemble des matériaux (de +19% pour la betterave à +42% pour le sédiment) sauf le sable. Il y a donc 5 matériaux candidats *a priori* pour le glyphosate (en excluant les cendres).

Pour le diuron (Fig. III.3.b), la sorption ne varie significativement dans aucune des matrices pour le sable et les cendres. La modification de sorption dans l'EBO n'est significative que pour le maïs (-53%) et la betterave (-40%). Dans l'ES, la présence des autres polluants provoque une amélioration significative de la sorption pour la vermiculite (+47%) et la betterave (+23%) et une baisse significative pour le sédiment (-8%).

Pour le 3,4-DCA (Fig. III.3.c), une baisse significative de la sorption dans l'EBO est constatée pour la betterave (-16%), la perlite (-13%), la vermiculite (-17%) et le sable (-38%).

Dans l'ES la sorption est significativement meilleure pour la vermiculite (+67%) et la betterave (+39%) et significativement moins bonne pour le sédiment (-22%) et les cendres (-3%).
A ce stade, l'évolution des performances de sorption pour le diuron et le 3,4-DCA en mélange avec les autres polluants est la meilleure pour la vermiculite et la betterave. On constate au final une forte variabilité de la modification de sorption entre les différents matériaux et matrices testés, pour chaque polluant. L'amélioration de la sorption est un paramètre à prendre en compte mais il faudra le mettre en balance avec la performance «absolue» constatée.

L'interaction du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA avec les autres polluants apparaît variable au vu des résultats obtenus. Globalement l'effet de ce mélange se combine avec celui de la matrice et entraîne une modification de la sorption des composés étudiés. Il est intéressant de remarquer que dans l'ES, la sorption du glyphosate en mélange est favorisée sur le sédiment et celle du diuron et du 3,4-DCA est favorisée sur la vermiculite et la betterave. Les concentrations employées jouent aussi très probablement un rôle dans les phénomènes de compétition observés ; l'amplitude de cet effet de compétition serait très probablement moindre dans le cas où les concentrations des polluants sont plus proches des valeurs relevées dans l'environnement.

Les résultats précédents montrent que la matrice liquide et le type de molécules en solution ont une influence sur les performances de sorption des polluants étudiés par les matériaux présélectionnés. Il parait donc indispensable, lors du développement d'un procédé, de choisir le(s) matériau(x) adsorbant(s) et le mélange de molécules, au plus proche des conditions réelles de mise en œuvre dudit procédé. Dans le cadre de notre étude, ces conditions sont l'utilisation de l'ES et de tous les polluants en mélange en solution. C'est dans ce cadre que s'effectuera le choix du sorbant utilisé pour la suite de l'étude.

Pour chaque polluant, les performances de sorption dans l'extrait de sédiment (ES) des différents matériaux sont indiquées dans le tableau III.1. Les performances indiquées sont obtenues avec les polluants en mélange. En gras et rouge sont indiqués les sorbants choisis pour le procédé : ce sont les plus performants selon des critères d'efficacité de la sorption et de simplicité de mise en place. En gras et vert sont indiqués les sorbants les plus efficaces, s'ils diffèrent des sorbants choisis. Le pourcentage de sorption le plus élevé pour le glyphosate est de

79%, obtenu avec les cendres. Les cendres restent donc le sorbant le plus efficace, mais il ne sera pas retenu *in fine* pour des raisons pratiques (cf. § 1.1.1.) et de durée nécessaire pour atteindre le niveau maximal de sorption. Les autres sorbants sont moins efficaces, avec des taux décroissants variant de 76 à 54%, dans l'ordre suivant : sédiment = vermiculite > perlite = betterave = maïs > sable. Le temps requis pour atteindre le maximum de sorption varie de 6 à 48h, et augmente dans l'ES, comparé à l'EUP avec les polluants seuls (tableau III.1), pour tous les matériaux. A part pour le sable et les cendres, on constate une amélioration de la sorption du glyphosate lorsqu'il est en mélange dans l'ES plutôt que seul dans l'EUP.

Le diuron (Tableau III.1) est plus fortement sorbé par les cendres et le sable, avec respectivement 94% et 76% de sorption. Ils restent donc les meilleurs sorbants dans les deux configurations « polluant seul/EUP » et « polluant en mélange/ES ». Les pourcentages de sorption des autres matériaux décroissent de 61% à 8%, dans l'ordre suivant : sédiment > betterave = maïs > vermiculite > perlite. Globalement - sur l'ensemble des matériaux, pas au cas par cas - la sorption du diuron est moins bonne dans l'ES en mélange que seule dans l'EUP, ce qui justifie *a posteriori* les tests de sorption dans des matrices plus complexes et en présence de plusieurs composés. Les durées nécessaires pour atteindre les pourcentages maximaux de sorption vont de 2h pour le diuron seul dans l'EUP à 48h lorsqu'il est en mélange dans l'ES avec les autres polluants (Tableau III.1).

Le 3,4-DCA (Tableau III.1) est également fortement sorbé par les cendres, puis par la betterave et le maïs avec des pourcentages maximaux dans l'ES de 97%, 86% et 86% respectivement. Pour les autres sorbants, les pourcentages de sorption décroissent de 82% à 30%, dans l'ordre suivant : sable > vermiculite > sédiment > perlite. Les temps nécessaires pour atteindre le maximum de sorption s'échelonnent de 1 à 48h. Contrairement au glyphosate et au diuron, la durée nécessaire pour atteindre les pourcentages maximaux de sorption n'est pas nécessairement plus longue.

Pour les raisons explicitées auparavant, les cendres ne sont pas retenues pour la suite de l'étude. Le sorbant sélectionné pour le glyphosate est donc le sédiment avec 76% de sorption en 24h, celui sélectionné pour le diuron est le sable avec 74% de sorption en 24h. Dans le cas du

3,4-DCA, les données numériques inciteraient à sélectionner la betterave ou le maïs, pour lesquels la sorption est de 86% en 8h pour les deux. Le sable est néanmoins relativement proche avec 82% de sorption en 1h, et fait partie du même groupe homogène d'après les analyses faites par ANOVA (Tableau III.1). Le temps nécessaire pour atteindre la sorption maximale est également un paramètre dont on souhaite tenir compte. En effet, dans l'ancienne configuration du BO, le temps de rétention hydraulique est inférieur à 1h et celui des polluants s'étale de seulement quelques heures à une journée (Grégoire 2007, communication personnelle). Dans l'optique d'un système de traitement où la vitesse de biodégradation est bien supérieure à ces valeurs, permettre la rétention (par sorption) des polluants dans le système pendant une durée compatible avec celle d'un traitement biologique est indispensable.

Au-delà de l'aspect des performances de sorption et de vitesse de sorption, la simplicité requise pour le système de dépollution nous fait donc choisir le sable pour le diuron et le 3,4-DCA et le sédiment pour le glyphosate pour améliorer le temps de sorption des polluants dans notre système. Ces deux éléments présentent en outre l'avantage de constituer une partie du filtre biologique utilisé dans la nouvelle configuration du BO (cf. M&M § 1.2.). On aura ainsi des performances de sorption proches de l'optimum et une mise en place dans le BO simplifiée.

## 1.2. Isothermes de sorption

Dans l'EUP et l'EBO, le meilleur sorbant pour le diuron et le 3,4-DCA lorsqu'ils sont en mélange est le sédiment (données non montrées). Dans l'ES, le meilleur sorbant pour le diuron et le 3,4-DCA lorsqu'ils sont en mélange est le sable (tableau III.1). Dans l'EUP et l'EBO, le meilleur sorbant pour le glyphosate lorsqu'il est en mélange avec les 3 autres polluants est le sable (données non montrées). Dans l'ES, le meilleur sorbant pour le glyphosate lorsqu'il est en mélange est le sédiment (tableau III.1). la détermination des isothermes de sorption correspondantes dans chaque matrice permettait d'obtenir la capacité de sorption maximale pour chacun d'eux et ainsi de prévoir une éventuelle saturation des sorbants lors de l'utilisation en conditions réelles.

Aucun modèle n'a été trouvé pour modéliser correctement les données obtenues pour le glyphosate.

Pour le diuron et le 3,4-DCA, le modèle de Freundlich décrit convenablement les données obtenues. Les paramètres du modèle sont indiqués dans le tableau III.2. L'impossibilité d'atteindre l'équilibre dans l'extrait de sédiment pourrait être due à de la diffusion au sein de la matière organique. Dans l'eau ultrapure, le coefficient K du sédiment est de 24.7 $mg^{1-n}$ $L^n$ $kg^{-1}$ pour le diuron et de 84.9 $mg^{1-n}$ $L^n$ $kg^{-1}$ pour le 3,4-DCA (graphes correspondants dans l'annexe 5). Ces valeurs sont relativement élevées comparées à celles raportées pour certains sols (Gonzalez-Pradas et coll. 2005, Louchart et coll. 2005, Yu et coll. 2006). Ceci montre une affinité forte du sédiment pour le diuron et le 3,4-DCA.

Les matériaux sélectionnés (sédiment pour le glyphosate, sable pour le diuron et le 3,4-DCA) seront utilisés lors des expériences en logettes en combinaison avec un microorganisme dont la sélection à partir du BO d'étude est développée ci-après.

**Tableau III.2 : Paramètres pour les isothermes de sorption.**

| | | | K ($mg^{1-n}$ $L^n$ $kg^{-1}$) | n | $r^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Diuron** | **Sédiment** | **EUP** | 24,7 | 1,37 | 0,992 |
| | | **EBO** | 35,7 | 0,94 | 0,848 |
| | **Sable** | **ES** | - | - | - |
| **3,4 DCA** | **Sédiment** | **EUP** | 84,9 | 1,23 | 0,977 |
| | | **EBO** | 52,3 | 1,38 | 0,816 |
| | **Sable** | **ES** | - | - | - |

Les paramètres ont été calculés d'après le modèle de Freundlich : $q_e = K.C_e^n$ ($r^2$ : coefficient de corrélation).

# PARTIE III
# CHAPITRE 2
# -
# SELECTION de SOUCHES

# RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 2

## Sélection de souches

La mise en oeuvre d'un procédé de dépollution efficace dans le bassin d'orage (BO) auquel nous nous référons – celui de Rouffach – nécessite d'augmenter le temps de résidence des polluants au sein de cet ouvrage afin qu'il soit compatible avec la vitesse du traitement biologique. La sélection de matériaux sorbants adaptés aux polluants (§ III.1) répond à cette préoccupation en favorisant le découplage du temps de séjour hydraulique de celui des polluants. Il faut maintenant améliorer le traitement biologique des polluants organiques et métalliques considérés dans l'étude, bien qu'une atténuation naturelle existe dans le BO mais se révèle insuffisamment performante. Par ailleurs, aucune donnée n'existe sur les mécanismes impliqués : atténuation d'ordre purement physico-chimique et/ou biologique ? L'objectif de cette partie consiste donc à sélectionner la composante bactérienne qui assurera la biodégradation des polluants organiques et augmentera le taux de phytoextraction du cuivre, en vue d'essais de bioaugmentation associée à la phytoextraction (dans le cas du cuivre). Pour cela, un état des lieux de départ de la microflore du BO a été entrepris afin d'avoir quelques données sur l'écologie microbienne de cet écosystème particulier et de les prendre en compte dans le choix de la (des) bactérie(s) retenue(s). Par la suite, à partir d'isolats bactériens cultivables extraits du sédiment du BO, les individus tolérants à des teneurs importantes en glyphosate, diuron, 3,4-DCA et cuivre ont fait l'objet d'une sélection dans la perspective d'utiliser ensuite l'isolat le plus performant lors des essais de bioaugmentation. Un témoin sans bactéries a été réalisé pour chaque polluant afin de mettre en évidence une éventuelle sorption du glyphosate, diuron et 3,4-DCA sur les contenants employés mais ce témoin n'a pas pris en compte de possibles phénomènes de biosorption. Aksu (2005) rapporte de tels phénomènes pour les pesticides, mais la littérature reste pauvre sur le sujet et contradictoire. Par prudence, nous parlerons donc de dissipation pour désigner le phénomène responsable de la baisse des concentrations en polluants dans notre étude bien qu'au regard des quantités dissipées, la plupart du temps importantes, la part de la biosorption soit minoritaire par rapport à celle de la biodégradation.

Mises à part les analyses de structure de la communauté bactérienne réalisées à partir des prélèvements de sédiment brut (§ III.2.1.2.), l'ensemble de l'étude ne concerne que des populations bactériennes cultivables. On ne le rappellera donc pas systématiquement dans la suite du manuscrit, pour des raisons de lourdeur stylistique, bien que cela soit sous-entendu.

Lors de ce travail, un attachement particulier a été accordé à la distinction entre les isolats de stratégie de croissance dite r et ceux de stratégie K : cette distinction a surtout été faite dans le cas de souches pures (Hashimoto et Hattori 1989, De Leij et coll. 1993) alors que cette distinction se révèle plus délicate lorsqu'il s'agit de consortia bactériens. Néanmoins nous continuerons à employer la terminologie r/K en étendant le sens de ce terme à notre étude, l'objectif étant de distinguer plus globalement les populations ou communautés bactériennes à croissance rapide ou lente.

## 2.1. Caractérisation préliminaire du sédiment

Le sédiment du bassin d'orage étudié a été caractérisé à la fois de manière quantitative, par dénombrement de la microflore totale en fonction de la stratégie de croissance et des points de prélèvement étudiés et qualitative, par analyse de la structure de la communauté bactérienne. Les caractéristiques microbiologiques ont été reliées à certaines caractéristiques physico-chimiques.

### *2.1.1. Physico-chimie*

Quatre points de prélèvement ont été définis (cf. § II.1.2. et § II.2.1.1., figure II.3 de la partie Matériel et Méthodes). Les points 1, 2 et 3 sont peu différenciés (Hunault 2005, observations de terrain) avec de l'eau présente par intermittence mais se démarquent en revanche du point 4 inondé de manière quasi-permanente. Le point 3 a un statut particulier puisqu'il se situe à la confluence des deux entrées d'eau, délimitant les zones d'influence des deux arrivées d'eau. De ce fait la qualité de l'eau est supposée être une moyenne de celle des points 1 et 2. Les différences de caractéristiques physico-chimiques entre le sol viticole du bassin versant situé en amont du BO et le sédiment du BO (tableau II.1.) s'expliquent à la fois par la nature des particules accumulées préférentiellement dans le BO et l'hydromorphie de ce dernier. Le sédiment contient plus d'argile (433g.kg$^{-1}$ contre 229g.kg$^{-1}$) et de limons fins (327g.kg$^{-1}$ contre 289g.kg$^{-1}$) et donc moins de limons grossiers (92g.kg$^{-1}$ contre 268g.kg$^{-1}$) et de sable fin (51g.kg$^{-1}$ contre 94g.kg$^{-1}$). Ainsi la CEC du sédiment est plus élevée d'environ 50% malgré un plus faible taux de matière organique. De manière analogue, certains éléments (tel le phosphore et les carbonates) sont moins présents dans le sédiment. Le pH du sol et du sédiment sont proches malgré les différences de composition indiquées ci-dessus probablement à cause de l'hydromorphie du BO. Globalement, ces données montrent une différence notable entre les propriétés physico-chimiques du sol et du sédiment, de même que des différences au sein du BO (P2 et P4).

A la lumière de ces quelques différences dans les caractéristiques physico-chimiques, on peut fortement supposer que les caractéristiques de la composante biotique, dont microbiologique, sont également très différentes. Par conséquent, si le procédé de dépollution doit êre mis en place dans le BO, il peut être préférable de partir du sédiment que du sol viticole pour la sélection de souches. En effet les différences qualitatives des caractéristiques hydrologiques et de certains paramètres physico-chimiques constatées d'une part entre le sol viticole et le sédiment et d'autre part entre les quatre points de prélèvement sont susceptibles de modifier les paramètres structurels et fonctionnels des communautés microbiennes comme cela a déjà été rapporté à plusieurs reprises (Drenovsky et coll. 2004, Gutknecht et coll. 2006, Mentzer et coll. 2006, Truu et coll. 2009). L'étude de Mentzer et coll. (2006) montre par exemple que l'abondance des différentes communautés (Gram+, Gram-, anaérobies, champignons mycorhiziens et champignons saprotrophes) varie suivant le régime hydrologique (inondation une fois en début de saison, inondation régulière, inondation constante). L'étude de Truu et coll. (2009) rapporte quant à elle un effet du type de zone humide artificielle (flux de surface ou de subsurface) sur la biomasse microbienne et le nombre de colonies. Notons enfin que dans le cas d'une ZHA à flux horizontal subsurfacique construite et étudiée en laboratoire et alimentée par des effluents brassicoles, une étude menée par Baptista et coll. (2008) a montré que la répartition de la diversité bactérienne n'était pas corrélée à l'emplacement des points de prélèvement. Nous avons décidé dans la suite de cette partie d'étudier la population bactérienne totale sur l'ensemble des points de prélèvement et la structure de la communauté bactérienne des points 2 et 4 uniquement, les analyses TTGE étant lourdes à mettre en place. Les points 2 et 4 ont été choisis car ce sont les points dont les caractéristiques physico-chimiques diffèrent le plus entre les quatre points de prélèvement, ce qui se reflète probablement dans la structure de la communauté bactérienne.

### *2.1.2. Analyse microbiologique*

**Population totale** : sur la figure III.4 est représentée la population cultivable totale, comparant les horizons pour chaque point (figure III.4.a) et les points pour chaque horizon (figure III.4.b). Lorsque l'on compare les concentrations bactériennes des différents horizons pour un point de prélèvement donné, aucune différence significative n'apparaît ($P < 0,05$, figure III.6.a). De même, la population ($10^{10}$-$10^{11}$UFC.kg$^{-1}_{\text{sédiment frais}}$) n'est pas significativement différente selon le point de prélèvement ; le nombre de colonies est en moyenne légèrement plus élevé au point 4 sans que cela soit significatif (figure III.4.b.). Globalement, le nombre total de microorganismes suivant le point de prélèvement ou l'horizon est proche. Ceci est en désaccord avec les observations de Truu et coll. (2009) et celles de Mentzer et coll. (2006) mais rejoint celle faite par Krasnits et coll. (2009) sur la population microbienne d'une ZHA à flux horizontal subsurfacique (donc de même configuration que le BO d'étude). Dans leur étude, la répartition des populations est uniforme dans le bassin et donc peu influencée par les paramètres spatiaux. Ils observent par contre une variation, bien que faible, de la population totale avec la profondeur, pour les prélèvements aux profondeurs de 0,1-0,2m, 0,3-0,4m et 0,5-0,6m. Dans notre cas, l'absence de différence selon la profondeur s'explique sans doute par le peu de différence de profondeur des deux horizons prélevés (0-0,05m et 0,05-0,1m). Ce premier résultat sert de base à la suite de notre étude, puisque le développement de notre procédé par bioaugmentation se base sur l'utilisation de bactéries cultivables et donc obtenues par des protocoles d'extraction et de culture similaires. Ces données de population à elles seules ne nous permettent certes pas de tirer de conclusion sur la dynamique des communautés bactériennes dans le BO pour l'instant, mais nous renseignent au moins sur l'existence de bactéries cultivables également répartie dans le sédiment du BO. Les valeurs obtenues sont cohérentes avec des résultats déjà obtenues pour des ZHA, de l'ordre de $10^{9}$-$10^{12}$ UFC.kg$^{-1}$ (Calheiros et coll. 2009).

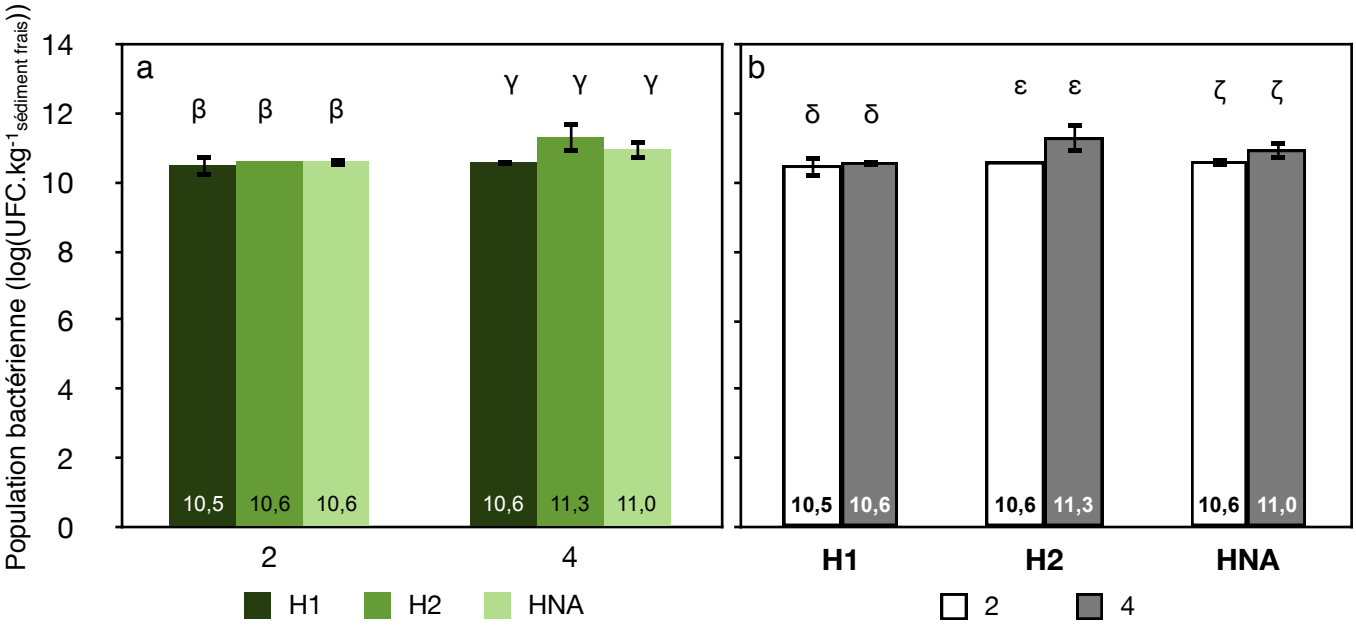



**Figure III.4 : Population bactérienne cultivable initiale selon les points de prélèvement.**
Les valeurs de population sont indiquées au pied des barres. 2 : point de prélèvement n°2 ; 4 : point de prélèvement n°4. H1 : horizon 0-5cm ; H2 : horizon 5-10cm rhizosphérique ; HNA : horizon 5-10cm non rhizosphérique. Les écarts-types sont représentés par des barres verticales et n'apparaissent pas en cas de nullité. Les symboles situés au-dessus des barres indiquent les groupes de similitude déterminés par ANOVA ($P < 0,05$).

**Stratégies de croissance** : la répartition de la population bactérienne entre stratégie de croissance de type r et stratégie de croissance de type K est indiquée sur la figure III.5. On note peu de différences entre les deux points de prélèvement, ainsi que la prédominance des bactéries à stratégie de croissance de type K, dont la proportion est comprise entre 54 et 81%. Ceci peut s'expliquer par le fait que le sédiment dans le BO est relativement oligotrophe ce qui favorise ce type de population (Stesnström et coll. 2001, Van Elsas et coll. 2005). On remarque enfin que le pourcentage de stratégies K est toujours le plus élevé, en moyenne, dans l'horizon H2. On peut expliquer ceci par sa localisation plus en profondeur par rapport à l'horizon H1 et par son caractère rhizosphérique comparé à l'horizon HNA, ce qui le rend donc moins sujet à des variations physico-chimiques (contact avec les pesticides qui transitent périodiquement par le BO et apport en continu d'exsudats racinaires). La stabilité (relative) des conditions physico-chimiques dans l'horizon H2 favoriserait donc plutôt les populations à stratégie de croissance lente.

**Analyse de diversité bactérienne** : les échantillons de sédiment prélevés à l'automne 2006 ont été analysés par PCR-TTGE dont les résultats ont été soumis à une analyse en composantes principales (ACP).

Les deux premiers axes totalisent 91% de la variance (Figure III.6) donc la représentation des points dans le plan constitué par ces deux axes exprime en quasi-totalité les distances-corrélations entre les points. Au sein de chaque point de prélèvement, les ellipses sont disjointes, ce qui indique que les différents horizons présentent des structure de la communauté bactérienne significativement différentes. On voit aussi un effet dû à la présence de la rhizosphère, puisque les horizons H2 et HNA sont distincts sur l'ACP. Cette variation de la structure de la communauté bactérienne due à la rhizosphère, partie intégrante de l'effet rhizosphère, est bien connue (Cunningham et coll. 2005, Berg et coll. 2009, Buée et coll. 2009, Wang et coll. 2009c). Les résultats de notre étude rejoignent ceux obtenus à partir de ZHA par Calheiros et coll. (2009) et Sleytr et coll. (2009) qui ont montré que la diversité microbienne était influencée par les plantes.

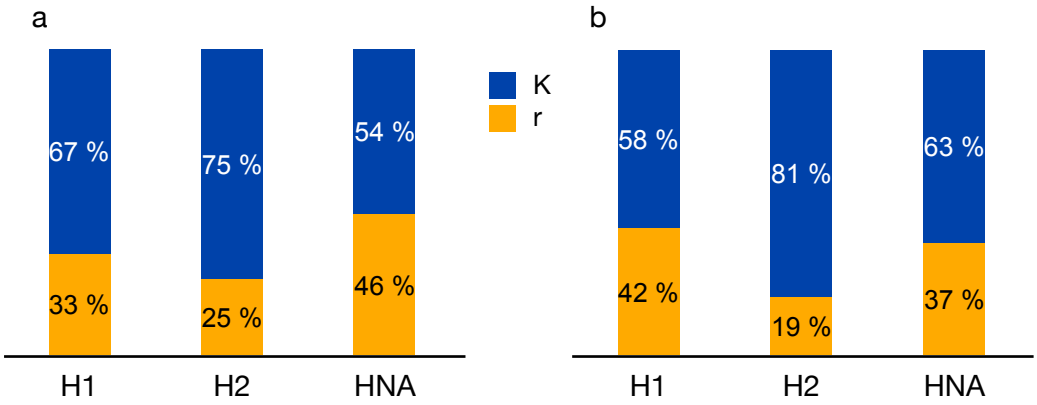



**Figure III.5 : Répartition de la population bactérienne selon les points de prélèvement en fonction de la stratégie de croissance.**
a : point de prélèvement 2 ; b : point de prélèvement 4.

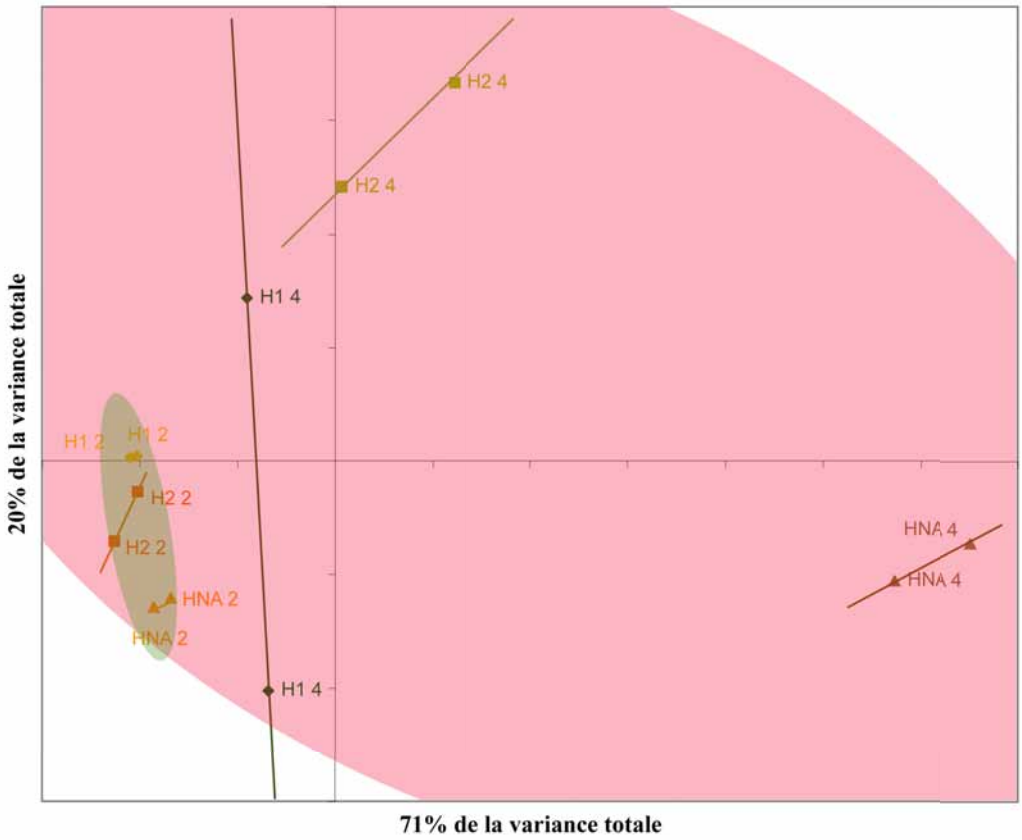



**Figure III.6 : Diversité microbienne au sein du bassin d'orage.**
Les différentes origines de prélèvement sont indiquées et associées à un code couleur. Les segments représentent les ellipses de corrélation associées à chaque origine de prélèvement et sont ici plates. Les points annotés de la même façon correspondent aux duplicats. Les axes représentés sont les deux premiers axes obtenus lors du calcul.

Si l'on s'intéresse à une analyse à l'échelle du point de prélèvement, on constate par contre des structures non significativement différentes. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Truu et ses collaborateurs en 2005 : ils ont constaté que la diversité microbienne au sein d'une ZHA à flux horizontal de subsurface variait plus suivant l'horizon de prélèvement que suivant le point de prélèvement. L'étude de Krasnits et coll. (2009) montre également une variation de la diversité microbienne selon la profondeur. La décision de n'analyser que les points 2 et 4 se trouve donc confortée a posteriori par cette absence de différence entre les structures de la communauté bactériennes selon le point de prélèvement. En revanche les différences observées en fonction de la profondeur pourraient avoir des conséquences sur le fonctionnement du BO d'étude, notamment d'un point de vue fonctionnel. Ainsi une étude de Jackson et coll. (2009) montre que la variation de diversité microbienne selon la profondeur observée dans une forêt inondée s'accompagne d'un déclin d'activité de certaines enzymes microbiennes extracellulaires impliquées dans le cycle du carbone, de l'azote et du phosphore. Une autre étude menée par Van Dijk et coll. (2009) a montré que la restauration d'une tourbière entraînait des modifications de diversité microbienne dans le sol, selon la profondeur, et que cette modification se traduisait par une modification du taux de minéralisation du carbone. On peut donc penser que les variations de structure de la communauté bactérienne observées dans le BO s'accompagnent d'une variation fonctionnelle avec des répercussions sur le niveau de dissipation des composés étudiés, qui peuvent être mises à profit dans le cadre de notre étude (capacités de dissipation), ainsi que le rapportent Kaksonen et ses collaborateurs (2006).

**Conclusion** : il apparaît à l'issue de cette étape que la biomasse totale, la répartition entre stratégies de croissance et la structure de la communauté bactérienne sont semblables quel que soit le point de prélèvement du BO considéré. Il existe néanmoins au sein des points une variation de la structure de la communauté bactérienne selon l'horizon de prélèvement, fort probablement en raison du rôle de la rhizosphère, qui laisse à penser que des différences fonctionnelles suivant les horizons de prélèvement peuvent exister. Il convient donc maintenant de tester ces éventuelles différences par des cultures d'enrichissement polluées.

## 2.2. Tri des populations

### *2.2.1. Sélection de populations bactériennes tolérantes*

Le critère de tolérance spécifique à notre étude a été défini par rapport à la présence dans le BO de quatre contaminants spécifiquement ciblés : le glyphosate, le diuron, le 3,4-DCA (métabolite de dégradation du diuron) et le cuivre, dont les teneurs dans le sédiment sont comprises entre 0,002 et 0,07mg.kg$^{-1}$ en 2009 tous polluants confondus (cf. tableau II.1). Le premier critère de sélection consiste à trier les bactéries cultivables extraites du sédiment du BO en fonction de leur tolérance à des concentrations de ces produits largement supérieures à celles rencontrées dans l'environnement, en l'occurrence quelques mg.kg$^{-1}$ au lieu de quelques dixièmes de mg.kg$^{-1}$. Ce choix d'une concentration élevée répond à la volonté de limiter le nombre de bactéries à étudier par la suite et de pouvoir les utiliser aussi bien pour traiter des pollutions peu que très concentrées (traitement des « fonds de cuves » par exemple).

**Population totale** : les concentrations bactériennes obtenues sont comprises entre 7,9.10$^{6}$ et 1,6.10$^{8}$UFC.mL$^{-1}$ pour les cultures en milieu MM non pollué et entre 2,0.10$^{6}$ et 1,6.10$^{9}$UFC.mL$^{-1}$ pour les cultures en milieu MM pollué (40mg.L$^{-1}$ de glyphosate, 10mg.L$^{-1}$ de diuron et 3,4-DCA et 130mg.L$^{-1}$ de cuivre) (figure III.7). L'ajout de polluants entraîne des variations de population inférieures à 1 log, que l'on pourrait donc qualifier de non significatives, sur presque tous les points de prélèvement. Il peut paraître surprenant que les polluants à ces concentrations n'ait pas réduit significativement la taille des populations des différents points de prélèvement. En effet une étude de Cycon et coll. (2009) a montré un effet significatif du diuron à 7,5mg.kg$^{-1}$ de sol sur la population totale d'un sol où les polluants sont censés être moins disponibles que dans un milieu liquide. Une explication pourrait venir de la quantité de carbone dans le milieu de culture rapportée à celle des polluants. Dans notre cas, le milieu utilisé pour la culture liquide contient 11,5mM de gluconate de sodium et 22,7mM de pyruvate de sodium. L'ajout de polluants à des concentrations de 237µM pour le glyphosate, 42,9µM pour le diuron et 61,7µM pour le 3,4-DCA ne constitue donc pas un apport significatif de carbone (< 2%) dans le milieu, ce qui expliquerait le peu de modification de la population totale. Les seules variations de

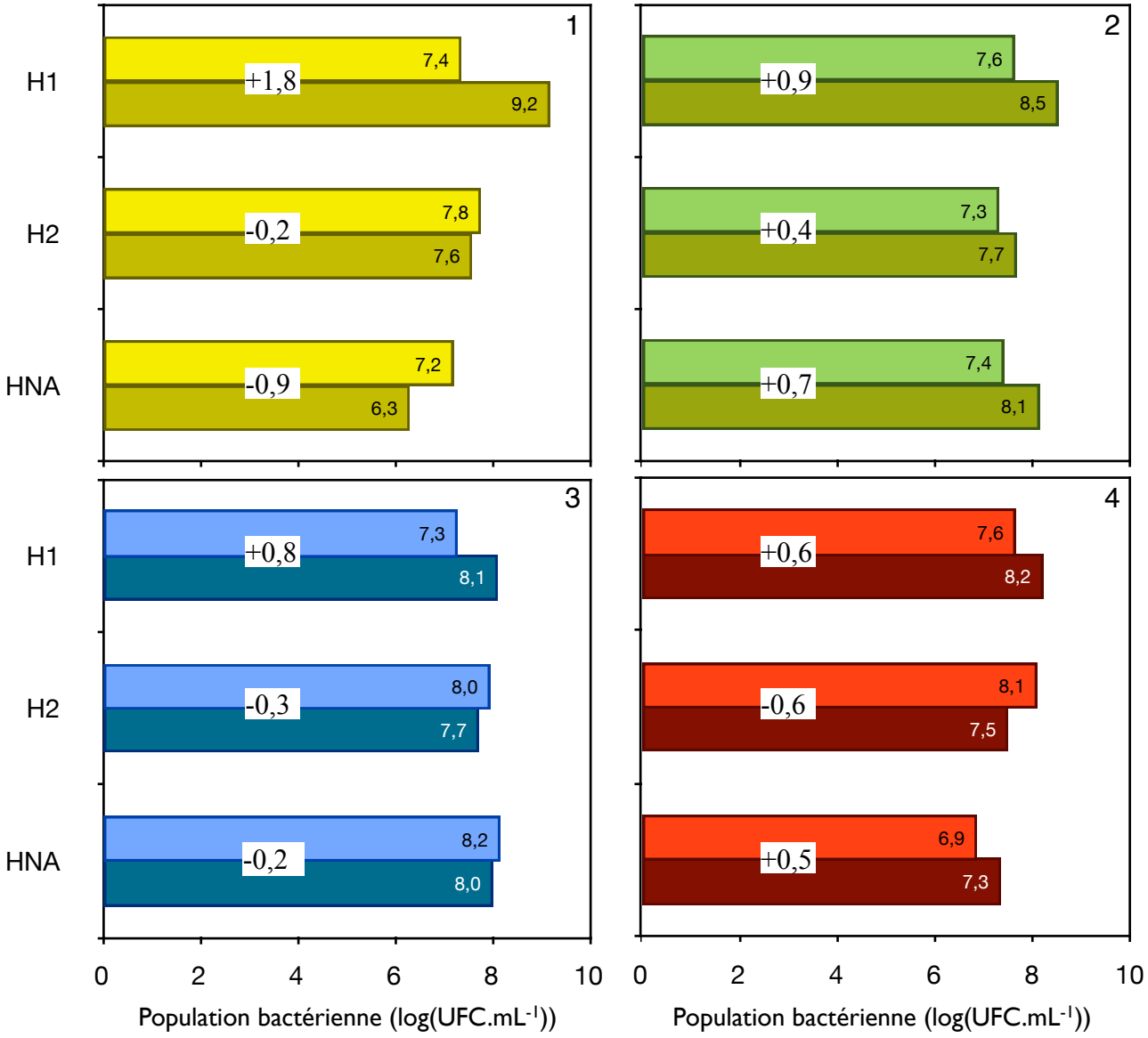



**Figure III.7 : Evolution quantitative de la population bactérienne cultivable du sédiment suite à la pression de pollution.**
En ordonnées, l'horizon de prélèvement. Les points de prélèvement sont indiquées en haut à droite de chaque graphe. En couleur claire : culture non polluée, en couleur foncée : culture polluée ([glyphosate] = 40mg.L$^{-1}$, [diuron] = 10mg.L$^{-1}$, [3,4-DCA] = 10mg.L$^{-1}$). Les chiffres dans les étiquettes blanches indiquent la variation de population lors du passage de la culture non-polluée à la culture polluée.

concentration bactérienne proches de 1 log sont observées pour les horizons H1 des points 1, 2 et 3 (augmentation) ainsi que l'horizon HNA du point 1 (diminution).

En moyenne, on constate que dans l'horizon supérieur ce sont les populations bactériennes les plus exposées à l'arrivée directe des polluants qui réagissent positivement à l'ajout de polluants dans la culture liquide ; on peut donc supposer que les populations présentes dans ces zones se sont adaptées à la présence récurrente de polluants. Ce phénomène est connu depuis longtemps, puisque des applications répétées d'herbicides à la fin des années 40 se sont soldées par la dégradation accélérée de ces produits dans les sols dans les années 60 (Arbeli et Fuentes 2007). D'autres études ont également mis en évidence ce phénomène d'acclimatation dans les sols, pour divers herbicides tels que la simazine (Moran et coll. 2006) ou l'isoproturon (Sorensen et coll. 2001). Ce phénomène peut être particulièrement profitable pour nous puisqu'il permet de diviser le temps de demi-vie dans le sol de certains herbicides comme le diuron, le chlorotoluron et la simazine d'un facteur compris entre 1,5 et 6 suivant le produit (Rouchaud et coll. 2000).

**Stratégies de croissance** : l'ajout de polluants se traduit dans les prélèvements issus de l'horizon 1 par l'augmentation de la proportion de bactéries à stratégie de croissance de type r pour tous les points de prélèvement (figure III.8). Sur l'horizon superficiel - qui reçoit les polluants en premier dans le BO - les populations à stratégie r sont favorisées quel que soit le point de prélèvement. Il est ainsi probable que l'arrivée massive et intermittente de polluants dans le BO ait sélectionné des populations aptes à gérer ces apports discontinus, d'où la prédominance de populations à stratégie r en cas de pollution. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kotsou et coll. (2004) qui, dans une étude sur la réaction d'un sol à l'apport d'un effluent pollué, ont montré que la proportion de populations à stratégie r augmentait à chaque apport. En fait, ce déséquilibre en faveur des populations à stratégie r se produit lorsque le milieu est enrichi en nutriments pas obligatoirement toxiques, tel que le glucose (Stenström et coll. 2001, Hu et coll. 1999). L'horizon H2 est comparativement moins en contact avec les polluants que l'horizon H1, ce qui défavorise les populations à stratégie r, au profit de celles à stratégie K, mieux adaptées à

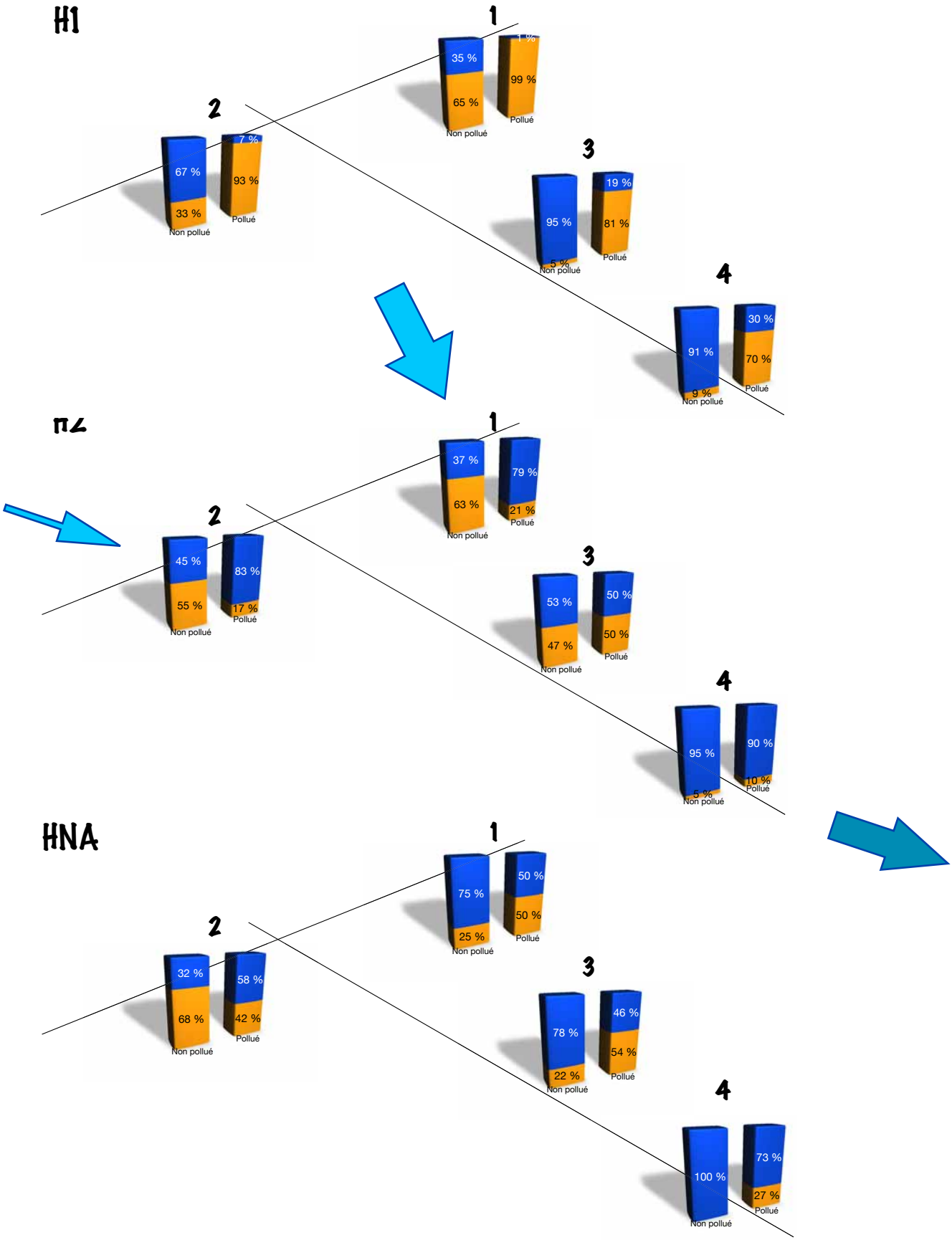
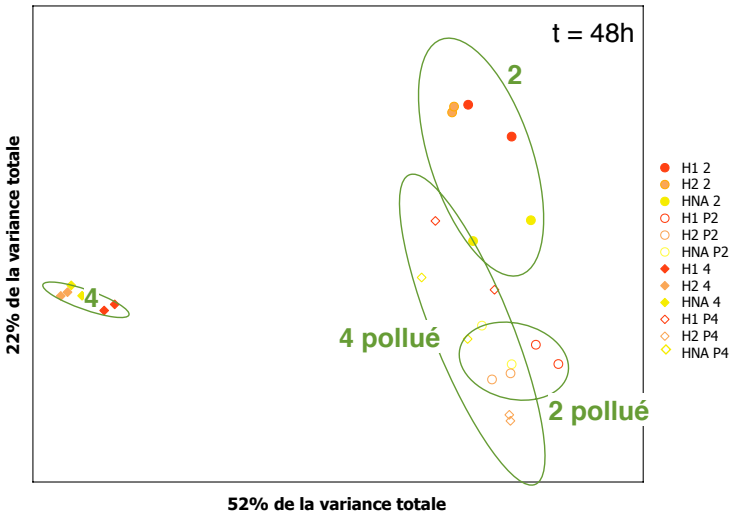



**Figure III.8 : Evolution de la répartition quantitative entre stratégies r et stratégies K en fonction de la pression sélective.**

Pour chaque horizon, les 4 points représentent les points de prélèvement du BO. Les entrées et sorties d'eau sont indiquées par des flèches (graphe de l'horizon H2). La disposition des points reproduit schématiquement la disposition des points de prélèvement dans le BO. En bleu : populations à stratégie K ; en orange : populations à stratégie r. Pour chaque point, l'histogramme de gauche représente la proportion r/K lors de la culture en milieu MM liquide non pollué, l'histogramme de droite représente la proportion r/K lors de la culture en milieu liquide MM pollué ([glyphosate] = 40mg.L$^{-1}$, [diuron] = 10mg.L$^{-1}$, [3,4-DCA] = 10mg.L$^{-1}$).

un milieu de composition plus constante (cf. § III.2.1.2.). Les résultats que nous obtenons montrent donc que certaines populations dans notre culture ont la capacité d'utiliser les polluants comme source de nutriments (cas où les concentrations microbiennes sont supérieures lorsque le milieu de culture est additionné de polluants). A ce stade, il est cependant impossible de savoir si la prédominance des populations de l'une ou l'autre stratégie reflète un plus grand nombre d'individus ou une plus grande diversité bactérienne.

**Analyse de la structure de la communauté bactérienne** : on observe une modification de la structure de la communauté bactérienne issue des prélèvements de sédiment du BO à la suite d'une culture en milieu liquide pollué (figure III.9). L'effet est plus prononcé pour les populations à stratégie de croissance rapide que pour celles à stratégie de croissance lente. On constate, pour les populations à stratégie r, que l'effet traitement est plus visible pour le point 4 que le point 2, probablement en raison de l'adaptation plus ancienne aux polluants des populations issues du point 2. La pollution a pour effet de « niveler » la structure de la communauté bactérienne, cette dernière étant alors similaire quel que soit le point de prélèvement, même si elle différait initialement en l'absence de polluants. On remarque également un nivellement de la structure lorsqu'on compare les horizons. Le résultat obtenu pour les populations à stratégie K est un peu différent, les points 2 et 4 présentant une structure initiale analogue. L'effet de la pollution sur les populations à stratégie K n'apparaît pas explicitement. Les résultats obtenus diffèrent de ceux obtenus par Lupwayi et coll. en 2004 pour qui l'application d'herbicides dans un sol n'a pas provoqué de changement significatif de la diversité microbienne du sol, mais en employant des doses homologuées. Ce n'est qu'à des doses supérieures à ces dernières que des changements significatifs de diversité microbienne ont été observées par Cycon et coll. (2009), pour 200mg.kg$^{-1}_{sol}$ de fenitrothion et 150mg.kg$^{-1}_{sol}$ de diuron. Nos résultats confirment donc ces études puisque nous avons utilisé des doses élevées de polluants et avons travaillé en milieu liquide, dans lequel la disponibilité des polluants est largement supérieure à celle dans le sol.



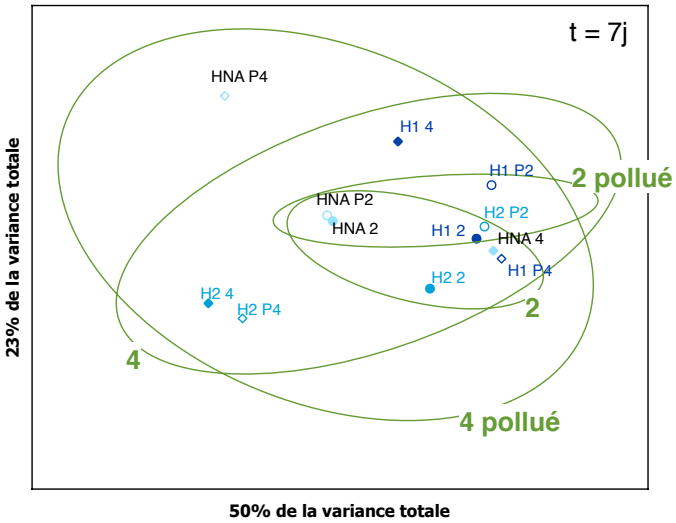




**Figure III.9 : Evolution de la diversité microbienne du bassin d'orage avant/après pression de pollution.**

Les cultures ont été faites dans un milieu MM liquide pollué ([glyphosate] = 40mg.L$^{-1}$, [diuron] = [3,4-DCA] = 10mg.L$^{-1}$) (symboles creux) ou non (symboles pleins). L'ACP de gauche est obtenue en comparant les colonies à stratégie de croissance rapide, chaque point ayant été analysé en duplicat. Celle de droite est obtenue en comparant les colonies à stratégie de croissance lente, chaque point a été analysé une seule fois. Les axes représentés sont pour chaque graphe les deux premiers axes obtenus lors du calcul. Les ellipses de corrélation par point de prélèvement et modalité polluée/non polluée ont été ajoutées. La légende est indiquée à droite de la figure pour les populations à stratégie de croissance rapide et directement à côté des points pour les colonies à stratégie de croissance lente.

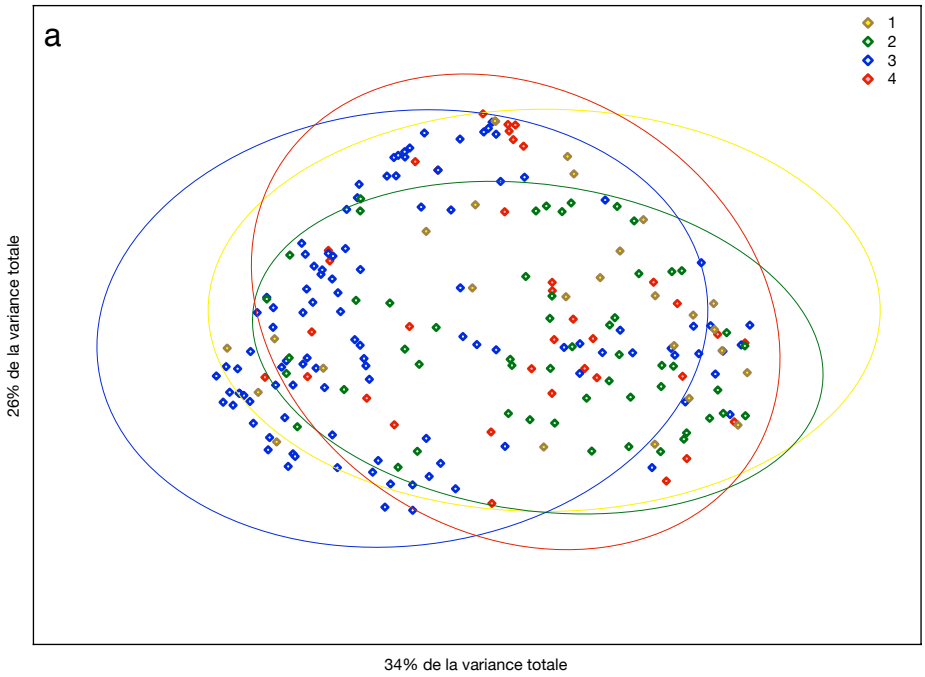
**Conclusion** : la population bactérienne totale cultivable n'est pas significativement modifiée par l'ajout de polluants dans le milieu de culture, excepté pour les cultures issues de l'horizon superficiel. C'est également dans cet horizon que la modification de répartition entre les populations à stratégie de croissance rapide (r) et celles à stratégie de croissance lente (K) est la plus visible : les populations à stratégie r deviennent prédominantes après l'ajout de polluants. Concernant la structure de la communauté bactérienne, l'effet de la pollution est surtout visible chez les populations à stratégie de croissance rapide, pour lesquelles la diversité initiale était plus grande que celle des populations à stratégie de croissance lente ; on observe alors un « nivellement » de la structure qui devient indépendante du point de prélèvement et de l'horizon. Ces résultats nous renforcent dans l'idée que l'on peut trouver des isolats adaptés à la dégradation de nos polluants au sein du BO. A l'issue de cette étape 564 isolats tolérants au mélange de polluants ont été obtenus (tableau III.3). Il reste donc à préciser si certains se retrouvent à différents points de prélèvement, ou si un même isolat peut être présent, pour un point de prélèvement donné, en plusieurs exemplaires. Pour éliminer les colonies redondantes, deux techniques de différenciation génétique sont utilisées séquentiellement, la RISA puis la RFLP.

### *2.2.2. Différenciation génétique*

**RISA-RFLP** : à partir des 564 isolats obtenus uniquement sur la base de leur tolérance au mélange de glyphosate, diuron, 3,4-DCA et cuivre, l'analyse de leur diversité génétique par RISA puis RFLP a permis de distinguer 209 isolats distincts génétiquement. A chaque étape une ACP a été réalisée sur les proximités génétiques des isolats. L'ACP effectuée sur la matrice de similarité obtenue en fin de RISA (Figure III.10.a) permet de voir que la diversité génétique bactérienne des populations tolérantes n'est pas liée au point de prélèvement, ce qui confirme le nivellement de la structure de la communautée observé précédemment. Celles-ci sont en effet toutes équivalentes puisque les ellipses de corrélation déterminées pour chaque point de prélèvement se chevauchent. Cette conclusion est confirmée par l'ACP effectuée sur la matrice de similarité obtenue en fin de RFLP (Figure III.10.b). Le tracé des ellipses de corrélation par horizon de prélèvement (Annexe 6) aboutit à la même conclusion, en RISA comme en RFLP.

**Tableau III.3 : Récapitulatif du nombre de colonies isolées pour chaque point de prélèvement à partir de la culture de sédiment dans un milieu MM enrichi en Glyphosate, Diuron, 3,4-DCA et Cu.**
Le protocole de l'expérience est détaillé dans le paragraphe § 2.2.4. de la partie matériel et méthodes. Le chiffre encadré en rouge correspond au nombre total de colonies isolées.

| Point de prélèvement | 1 | 2 | 3 | 4 | Sous-total par stratégie |
|---|---|---|---|---|---|
| Colonies à stratégie r | 8 | 106 | 121 | 27 | **262** |
| Colonies à stratégie K | 38 | 68 | 107 | 89 | **302** |
| Sous-total par point de prélèvement | **46** | **174** | **228** | **116** | **564** |



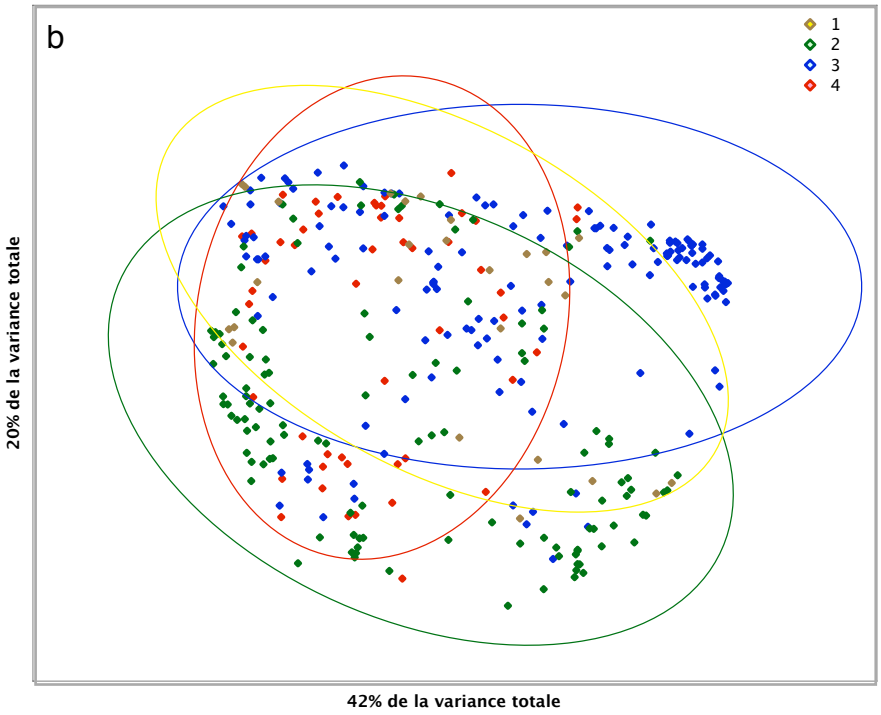




**Figure III.10 : Proximité génétique des différents isolats obtenus.**
Les ACP ont été réalisées sur les corrélations entre les profils génétiques obtenus par RISA (a) et RFLP (b). Chaque ellipse de corrélation correspond à l'ensemble des données associées à un point de prélèvement. Les axes représentés sont pour chaque graphe les deux premiers axes obtenus lors du calcul. Les couleurs des ellipses correspondent aux couleurs des points de prélèvement.

Dans le cas du BO étudié, l'absence de différence de structure de la communauté bactérienne entre les points de prélèvement choisis (cf. §2.1.1.) pourrait être rapprochée de l'absence de différence fonctionnelle des individus isolés constatée par les analyses de RISA et RFLP.

**Caractéristiques des isolats** : les caractéristiques de provenance des isolats tolérants et distincts génétiquement sont récapitulées sur la figure III.11.a : une majorité d'isolats (41%) provient du point 3, suivi du point 2 (29%), du point 4 (18%) et enfin du point 1 (12%). La répartition en termes d'horizons de prélèvement est homogène : 38% des isolats proviennent de l'horizon 5-10cm rhizosphérique, 35% de l'horizon 0-5cm et 27% de l'horizon 5-10cm non rhizosphérique. Ces chiffres reflètent ceux des isolements faits avant tri génétique (figure III. 11.b). Ils correspondent donc au nombre de colonies isolées suite à la culture liquide, moins les doublons, qui étaient donc à peu près en même proportion pour tous les points de prélèvement. Une ACM sur les différentes caractéristiques (point, horizon de prélèvement et stratégie de croissance) de ces isolats génétiquement distincts a mis en évidence une absence de relation entre ces paramètres (données non montrées). On peut néanmoins remarquer (au moins qualitativement) que les horizons rhizosphériques fournissent 73% des colonies isolées, (35% issues de l'horizon H1 et 38% de l'horizon H2).

**Conclusion** : le tri génétique des colonies isolées a permis de restreindre le nombre d'isolats de 564 indifférenciés à 209 génétiquement différents, dont la diversité génétique est semblable selon le point ou l'horizon de prélèvement. 37% des isolats sont à stratégie de croissance rapide, 63% sont à stratégie de croissance lente. Pour certaines origines de prélèvement, l'augmentation forte des populations à stratégie de croissance rapide observée lors de la culture en milieu pollué permet de penser que des individus intéressants pourraient être détectés lors du tri fonctionnel.

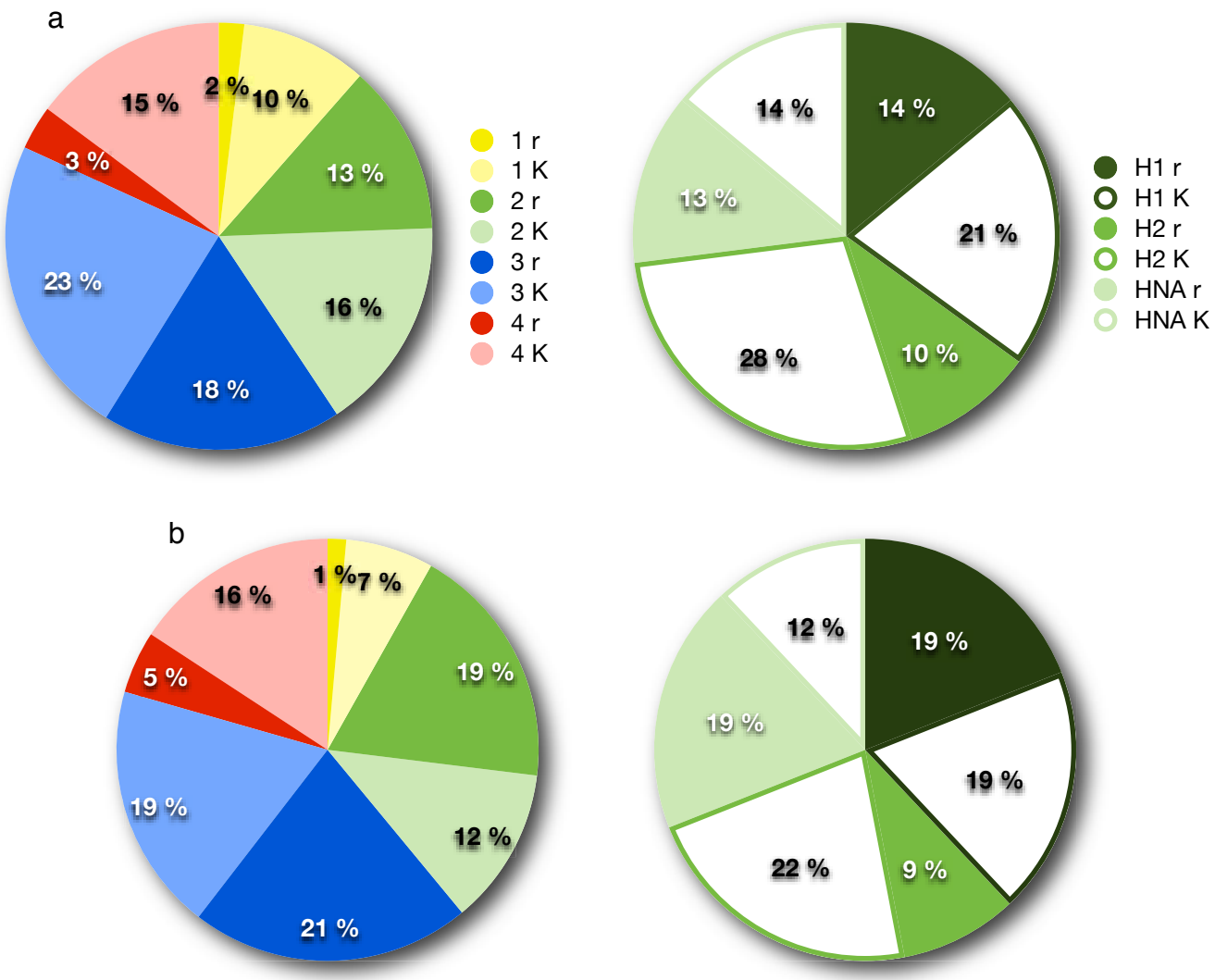



**Figure III.11 : Caractéristiques des isolats tolérants distincts génétiquement.**
Les pourcentages indiqués sur les graphes sont calculés à partir des informations sur les 209 isolats discriminés en fin de RISA-RFLP (a) et à partir des informations sur les 564 colonies isolées après les tests de résistance aux polluants (glyphosate, 40mg.L$^{-1}$, diuron, 10mg.L$^{-1}$, 3,4-DCA, 10mg.L$^{-1}$, cuivre, 130mg.L$^{-1}$) (b). La légende est commune au a et au b.

## 2.3. Tri fonctionnel

### *2.3.1. Performances de dissipation*

L'analyse globale des performances de dissipation des isolats (figure III.12) permet de constater que cette répartition varie selon les polluants. Les trois-quarts des individus dissipent moins de 45% du glyphosate et seuls quelques individus en dissipent 85%. Il y a plus d'individus présentant de bonnes performances de dissipation du diuron qu'il n'y a d'individus présentant de bonnes performances de dissipation du glyphosate (figure III.12). La dissipation est moyenne pour le reste des isolats (les trois-quarts des colonies en dissipent moins de 38%, et la moitié moins de 25%). Pour le 3,4-DCA en revanche, 25% des isolats en dissipent 100% et la moitié le dissipe au-delà de 90%. On voit que le polluant le plus toxique (cf. tableau I.10) est finalement le mieux dissipé par le plus grand nombre d'isolats. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : le glyphosate fait partie d'une famille chimique dont il existe des représentants naturels (composants membranaires, antibiotiques telle la phosphomycine), les microorganismes ont donc déjà évolué pour pouvoir les assimiler en cas de besoin (Huang et coll. 2005, Pelmont 1995). La présence du glyphosate n'exigera donc pas d'adaptation particulière de la microflore et pas de dégradation spécifique (ibid.). Sa dégradation se fait d'ailleurs la plupart du temps par cométabolisme puisqu'il sert quasi exclusivement de source de phosphore, souvent déjà largement présent sous forme inorganique dans le milieu. Une étude de McGrath et coll. (1997) réalisée sur une centaine de souches bactériennes montre que sur 19 organophosphonates, 15 ne pouvaient qu'être utilisés comme source de phosphore ; l'apport d'une source carbonée alternative était alors indispensable pour obtenir une croissance bactérienne, ce qui aurait tendance à prouver que la dégradation constatée était due à un métabolisme fortuit. Au contraire, un polluant tel que le 3,4-DCA qui nécessite d'être dégradé en raison de sa toxicité entraînera une adaptation spécifique et efficace, par métabolisme actif (Dejonghe et coll. 2002). La répartition obtenue pour le diuron laisse à penser que sa dégradation est moins simple que celle du 3,4-DCA ; une observation qui étayerait cette hypothèse est que le nombre d'enzymes à mettre en œuvre pour dégrader le diuron est plus grand que pour dégrader le 3,4-DCA (Sorensen et coll.

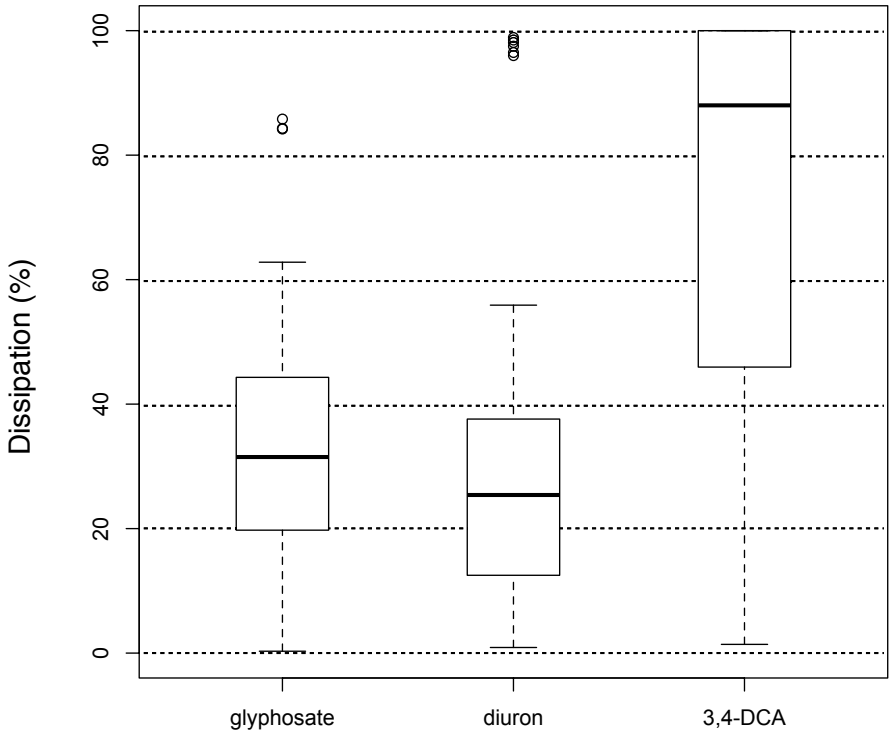



**Figure III.12 : Performances de dissipation des isolats (vue globale).**
Le diagramme en boîtes et moustaches représente la répartition des performances de dissipation des 209 colonies isolées en RISA-RFLP en termes de quartiles, pour chaque polluant. Le trait en gras représente la médiane.

2003), ce qui peut être une source de persistance pour le diuron si elles ne sont pas synthétisées par un seul organisme.

La répartition relative des colonies non dissipantes suivant le point, l'horizon de prélèvement ou la stratégie de croissance (tableau III.4) suit sensiblement la répartition de la population tolérante au mélange de polluants (figure III.11). En revanche, le nombre d'isolats ne présentant aucune capacité de dissipation vis-à-vis d'un polluant augmente avec la toxicité du polluant : 3,9% des isolats pour le glyphosate, 19,5% pour le diuron et 36,1% pour le 3,4-DCA (tableau III.4). On peut enfin noter que les pourcentages de dissipation relevés ont été obtenus dans le milieu ES qui peut être considéré comme défavorable car à la fois riche et pauvre : défavorable car il contient suffisamment de carbone qui pourrait, s'il est plus facilement métabolisable, limiter la dégradation active de polluants tel que le 3,4-DCA ; défavorable car il ne contient pas suffisamment de carbone pour assurer la dégradation par cométabolisme de polluants tel que le glyphosate. Cependant l'objectif de mise au point du procédé implique l'utilisation d'un tel milieu, car la dégradation *in situ* se fera dans des conditions nutritives qui seront loin d'être idéales.

La figure III.13 présente la répartition des performances de dissipation de manière détaillée pour chaque polluant. Ces diagrammes ne prennent en compte que les isolats qui dissipent.

**Glyphosate** (figure III.13.a) : les points 1 et 4 présentent des distributions analogues et comprennent les isolats qui dissipent le plus (un chacun). Les populations issues du point 3 n'ont qu'un représentant performant pour la dissipation et les populations issues du point 2 sont les moins performantes. Les populations les plus performantes pour la dissipation du glyphosate sont issues des horizons rhizosphériques, même si la moyenne des populations est quasiment au même niveau de dissipation pour tous les horizons de prélèvement (légèrement plus faible pour H1). On a donc ici confirmation que la rhizosphère permet l'établissement de populations particulièrement intéressantes du point de vue fonctionnel pour notre étude. On voit par contre que ce sont préférentiellement les populations à stratégie de croissance lente qui dissipent le glyphosate : les trois isolats capables de dissiper le glyphosate à plus de 80% sont en effet à stratégie K. Par

**Tableau III.4 : Nombre, origine et stratégie de croissance des colonies distinctes non dissipantes pour chaque polluant.**

| | *Point de prélèvement* | | | | *Horizon* | | | *Stratégie* | | *Total (% des colonies isolées)* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *1* | *2* | *3* | *4* | *H1* | *H2* | *HNA* | *r* | *K* | |
| ***glyphosate*** | 0 | 3 | 3 | 2 | 5 | 3 | 0 | 3 | 5 | 8 (3,9%) |
| ***diuron*** | 6 | 12 | 13 | 9 | 15 | 15 | 10 | 8 | 32 | 40 (19,5%) |
| ***3,4-DCA*** | 9 | 28 | 24 | 13 | 34 | 23 | 17 | 8 | 66 | 74 (36,1%) |

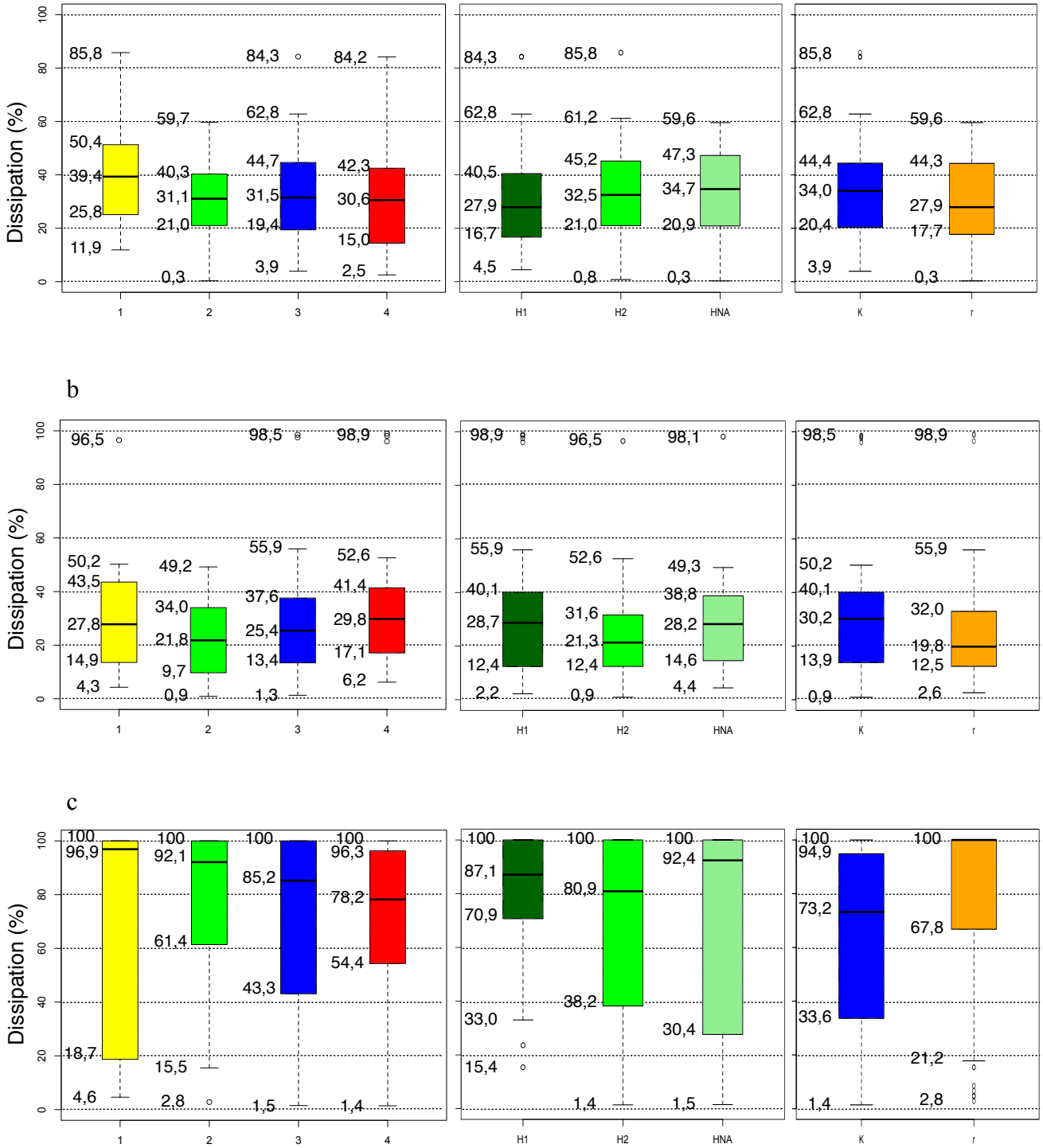



**Figure III.13 : Performances de dissipation des isolats (vue détaillée).**
Les diagrammes en boîtes et moustaches représentent la répartition des performances de dissipation des 209 colonies isolées en RISA-RFLP en termes de quartiles. Le trait en gras représente la médiane. Les valeurs particulières sont reportées sur les diagrammes. Les diagrammes situés dans la colonne de gauche indiquent les performances par point de prélèvement, ceux situés dans la colonne du milieu indiquent les performances par horizon de prélèvement et ceux situés dans la colonne de droite indiquent les performances par stratégie de croissance. a : glyphosate, b : diuron et c : 3,4-DCA.

contre, la dissipation atteint 60% au mieux pour les populations à stratégie de croissance rapide. Cette dissipation préférentielle par les populations à stratégie de croissance lente confirme les observations d'études antérieures sur la dégradation du glyphosate par cométabolisme. De nombreuses études rapportent ainsi la dégradation du glyphosate comme seule source de P ou de N (Pipke et coll. 1988, Jacob et coll. 1988, Liu et coll. 1991, Dick et coll. 1995, Penaloza-Vasquez et coll. 1995, Bujacz et coll. 1995, Krzysko-Lupicka et coll. 1997, Obojska et coll. 1999, 2002, Lipok et coll. 2007). Les vitesses de dissipation obtenues pour les isolats de notre étude sont inférieures à celles obtenues dans la littérature (tableau III.5), mais elles ont été obtenues dans un milieu défavorable car contenant du phosphore et de l'azote.

**Diuron** (figure III.13.b) : les populations issues des points 1, 3 et 4 ont quelques représentants qui dissipent le diuron à hauteur de 96% et plus, contrairement aux populations issues du point 2 pour lesquelles la dissipation atteint 49% au maximum. Le gros de la population présente sensiblement les mêmes performances de dissipation quels que soient les points de prélèvement, les populations issues du point 2 étant légèrement en retrait. On trouve des isolats performants pour la dissipation dans chaque horizon de prélèvement, mais c'est dans l'horizon superficiel qu'on en recense le plus et qu'ils sont les plus performants. On voit également des différences de dissipation suivant la stratégie de croissance des isolats, la moitié de la population à stratégie r dissipant moins de 20% de diuron, la moitié de la population à stratégie K dissipant moins de 30% de diuron. Les vitesses de dissipation obtenues pour les isolats de notre étude sont inférieures à celles obtenues dans la littérature (tableau III.6), mais elles ont été obtenues dans des conditions où le diuron n'est pas la seule source de C, ce qui semble défavorable à sa dégradation. Ceci pourrait indiquer une dégradation du diuron par métabolisme actif.

**3,4-DCA** (Figure III.13.c) : les performances de dissipation sont très bonnes pour tous les points de prélèvement avec un maximum de 100%, le minimum étant de 1,4%. Le point 1 est le plus contrasté, où les isolats sont soit très bons soit très mauvais. Chaque horizon comprend des isolats qui dissipent 100% du 3,4-DCA, mais ceux issus de l'horizon 1 sont les plus performants, puisque trois quarts de la population dissipe plus de 70% du 3,4-DCA et que le taux de

**Tableau III.5 : Performances de dégradation aérobie du glyphosate.**

| *Microorganisme* | *Vitesse de dégradation* ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)* | *Conditions de culture* | *Référence* |
|---|---|---|---|
| *Pseudomonas* | 1,7 | seule source de P | Kent Moore et coll. 1983 |
| *Pseudomonas* | 1,1 | seule source de P | Dick et Quinn 1995a |
| *Penicillium* | 0,34 | seule source de P | Krzysko-Lupicka et coll. 1997 |
| *Streptomyces* | 4,3 | seule source de P et N | Obojska et coll. 1999 |
| bactéries | $0 < V < 0,36$ | milieu de culture ES | présente étude |

* Vitesse de dissipation pour la présente étude.

**Tableau III.6 : Performances de dégradation du diuron.**

| *Microorganisme* | *Vitesse de dégradation* ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)* | *Conditions de culture* | *Référence* |
|---|---|---|---|
| non identifié | 0,07 - 0,1 | anaérobie | Attaway et coll. 1982 |
| non identifié (bactérie) | 0,28 | aérobie | Cullington et Walker 1999 |
| *Beauvaria bassiana* | 0,24 | aérobie - seule source de C | Tixier et coll. 2000 |
| *Pseudomonas* | 2,1 | aérobie - seule source de C | El-Deeb et coll. 2000 |
| bactéries | $0 < V < 0,1$ | aérobie - milieu de culture ES | présente étude |

* Vitesse de dissipation pour la présente étude.

dissipation le plus bas est de 15%, contre 2% pour les horizons 2 et HNA. Enfin on note une nette prédominance des isolats à stratégie de croissance rapide dans la catégorie des forts dissipants du 3,4-DCA. Pour les isolats à stratégie de croissance lente, le minimum de dissipation est de 1,4%, le maximum de 100% (peu d'individus) . Les vitesses de dissipation obtenues pour les isolats de notre étude sont inférieures à celles obtenues dans la littérature (tableau III.7), mais elles ont été obtenues dans des conditions où le 3,4-DCA n'est pas la seule source de carbone.

**Comparaison** : Les meilleures performances de dissipation, en considérant la stratégie de croissance, semblent être liées à la nature du polluant : alors que les meilleurs dissipants du glyphosate sont à stratégie K, ceux du diuron se répartissent dans les deux stratégies et les meilleurs dissipants du 3,4-DCA sont à stratégie r. Une analyse en composantes multiples (ACM) des liens entre différents paramètres qualitatifs concernant les bactéries et leurs capacités de dissipation (Fig. III.14) permet également de relever certaines correspondances. Les capacités de dissipation ou au contraire l'absence de capacités de dissipation du diuron et du 3,4-DCA apparaissent ainsi être liées. Les isolats incapables de dissiper le diuron sont en effet incapables de dissiper le 3,4-DCA. Ceci peut s'expliquer car une bactérie qui ne dégrade pas le 3,4-DCA ne pourra pas dégrader complètement le diuron, puisque la dégradation de ce dernier passe par la dégradation du 3,4-DCA. Inversement la capacité à dissiper le diuron s'accompagne de la capacité à dissiper le 3,4-DCA, le pool enzymatique nécessaire pour dégrader le 3,4-DCA étant inclus dans celui nécessaire pour dégrader le diuron. Ce résultat est encourageant puisque des études sur la biodégradation bactérienne du diuron ont constaté que le métabolite obtenu était le 3,4-DCA mais que celui-ci n'était pas dégradé plus avant (Ellis et Camper 1982, Cullington et Walker 1999, Turnbull et coll. 2001a, b, Widehem et coll. 2002). Ici il semblerait que la dissipation du diuron et celle du 3,4-DCA aillent de pair, donc la dissipation du diuron va au-delà du 3,4-DCA. Enfin, l'ACM (figure III.14) fait ressortir le fait que la dissipation du diuron et du 3,4-DCA est liée à la rapidité de croissance des microorganismes : les paramètres « dissipation du diuron » et « dissipation du 3,4-DCA » sont proches du paramètre « r », tandis que les paramètres « non dissipation du diuron » et « non dissipation du 3,4-DCA » sont proches du paramètre « K ».

**Tableau III.7 : Performances de dégradation du 3,4-DCA.**

| *Microorganisme* | *Vitesse de dégradation* (mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$)* | *Conditions de culture* | *Référence* |
|---|---|---|---|
| non identifié | 0,004 | anaérobie | Travkin et coll. 2002 |
| *Aspergillus niger* | 0,33 | aérobie | Tixier et coll. 2002 |
| *Pseudomonas* | 1,5 | aérobie | Travkin et coll. 2003 |
| *Variovorax* | 0,25 | aérobie - seule source de C | Dejonghe et coll. 2003 |
| bactéries | 0 < V < 0,1 | aérobie - milieu de culture ES | présente étude |

* Vitesse de dissipation pour la présente étude.

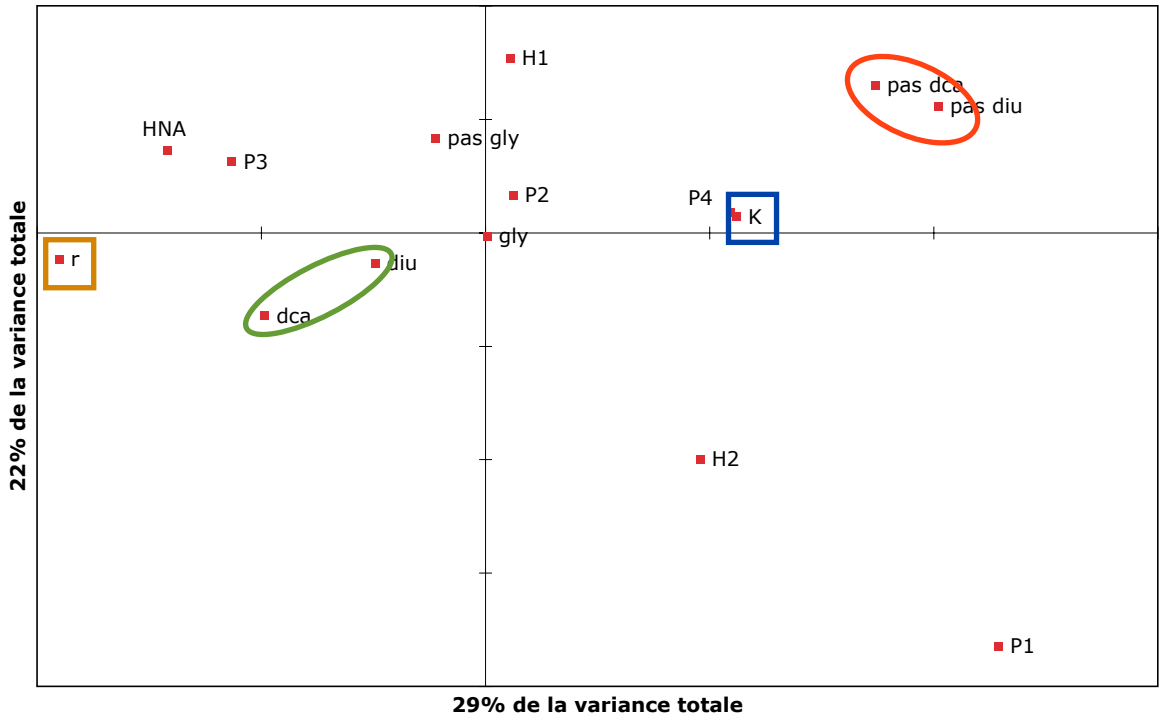



**Figure III.14 : Corrélations entre caractéristiques géographiques et fonctionnelles des isolats.**
L'ACM a été réalisée sur les paramètres point de prélèvement («P1», «P2», «P3» et «P4»), horizon de prélèvement («H1», «H2» et «HNA»), stratégie de croissance («r» et «K»), dissipation du glyphosate («gly», «pas gly»), dissipation du diuron («diu», «pas diu») et dissipation du 3,4-DCA («dca», «pas dca»). Les axes représentés sont les deux premiers axes obtenus lors du calcul.

Ceci semblerait indiquer que la dissipation du diuron et du 3,4-DCA par les isolats obtenus dans notre étude procède d'un métabolisme actif.

**Conclusion** : les différences entre points de prélèvement s'avèrent être plus d'ordre fonctionnel que d'ordre génétique, ce qui pourrait s'expliquer par des processus évolutifs différents de souches génétiquement proches à l'origine. Chez les bactéries les plus en contact avec les polluants, les gènes impliqués dans leur dissipation s'expriment ; pas chez les autres. Les différences entre polluants se reflètent alors dans les capacités de dissipation ou de non-dissipation et dans la stratégie de croissance des bactéries pour lesquelle les performances de dissipation sont les plus élevées. La dernière étape de cette partie de l'étude est maintenant de sélectionner la population bactérienne remplissant au mieux les conditions imposées, à savoir une bonne dissipation des trois polluants et la capacité à complexer le cuivre.

### *2.3.2. Choix d'un consortium*

**Critères** : Nous avons jusqu'à présent évoqué uniquement les capacités de dissipation des polluants sélectionnés pour nous guider dans notre choix de l'individu le plus performant pour notre procédé de dépollution. Cependant un autre volet de l'étude, qui n'est pas l'objet de ce travail, est de réaliser la phytoextraction du cuivre conjointement à la dissipation des polluants organiques (travail de thèse de David Huguenot). Ainsi des tests de complexation du cuivre ont-ils été réalisés parallèlement à l'étude sur les molécules organiques pour déterminer les performances des 209 isolats dans ce domaine. Les résultats obtenus sont binaires, du type complexation / non complexation du cuivre. La synthèse de ces différents résultats a été faite à l'aide d'une ACP réalisée sur les performances de dissipation des polluants organiques à laquelle on a superposé le résultat du test cuivre (figure III.15). On note sur cette figure une ligne dans le quart supérieur droit, qui correspond aux isolats ne dissipant ni le diuron ni le 3,4-DCA. Les meilleurs isolats sont situés dans le quart inférieur gauche de la figure, dans lequel on ne trouve finalement qu'un isolat, le n°106, qui réunit l'ensemble des critères. Il complexe le cuivre, dissipe le glyphosate à 57,2%, le diuron à 98,9% et le 3,4-DCA à 92%. Il est issu de l'horizon superficiel

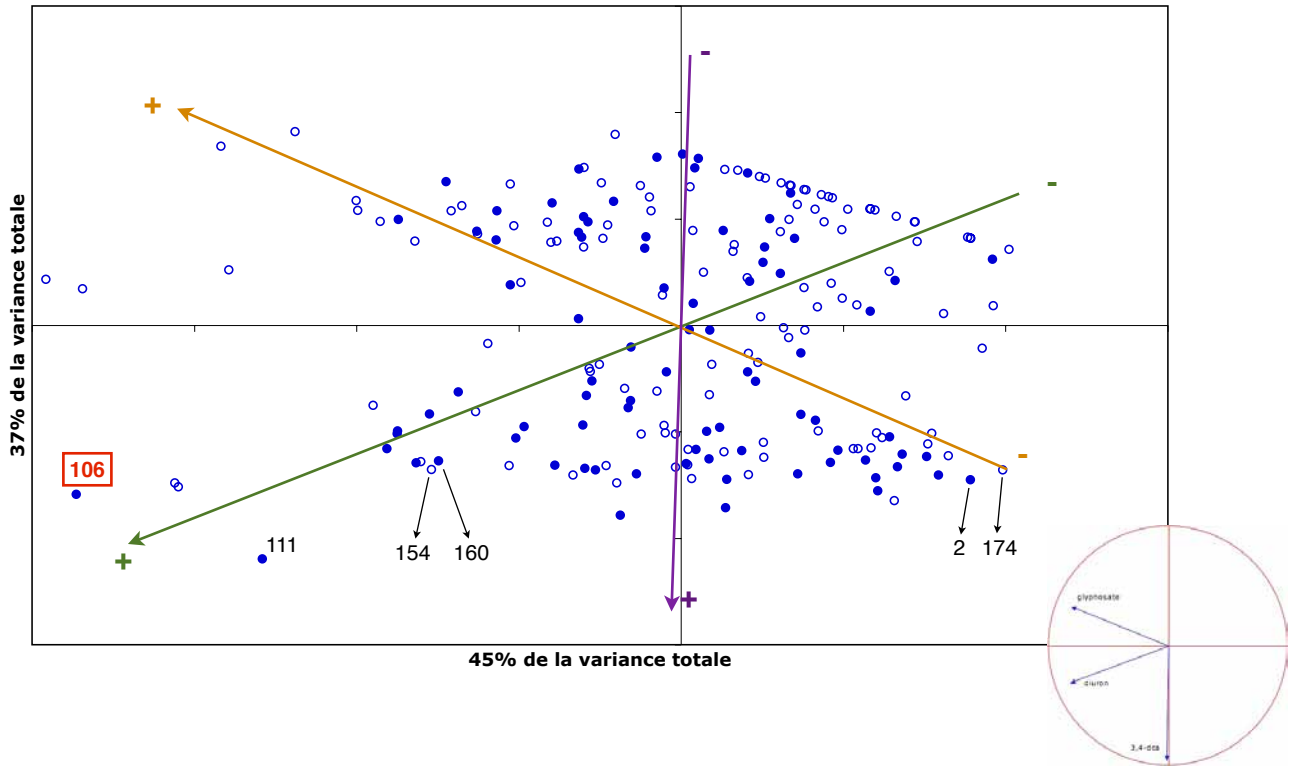



**Figure III.15 : Choix du consortium pour la bioaugmentation.**
L'ACP a été réalisée sur l'ensemble des consortia distincts isolés. Symboles pleins : consortia capables de complexer le cuivre. Symboles vides : consortia incapables de complexer le cuivre. Les axes du repère sont les deux premiers axes obtenus lors du calcul. En légende en bas à droite, le cercle des corrélations. L'axe orange indique la répartition des performances de dissipation pour le glyphosate (+ : forte dissipation, - : faible dissipation), l'axe vert pour le diuron (+ : forte dissipation, - : faible dissipation) et l'axe violet pour le 3,4-DCA (+ : forte dissipation, - : faible dissipation). Les numéros indiquent des isolats bactériens (voir § 2.3.2. pour plus de précisions).

(H1) du point 4 et présente une croissance rapide, de type r. Le plus proche voisin de l'isolat 106 capable de complexer le cuivre est l'isolat n°111 (également de stratégie r) qui dissipe le glyphosate à 30,9%, le diuron à 96,5% et le 3,4-DCA à 100%. L'isolat 106 est donc retenu pour la suite de la mise au point du procédé de dépollution. Des études complémentaires sur le consortium 106 démontrent le métabolisme actif en jeu lors de la dégradation du diuron et du 3,4-DCA, puisque ces deux molécules ont été dégradées en tant que seule source de carbone par le consortium dans un milieu minimum (Farhan 2009).

**Séquençage - stabilité des isolats** : L'idée était ensuite de poursuivre la caractérisation de certains isolats particuliers par un séquençage de fragments d'ADN obtenus par TTGE. Pour certains isolats, les profils obtenus en TTGE se sont révélés être constitués de plusieurs bandes, en particulier le 106. Ce ne sont donc pas des souches pures mais des consortia bactériens. Ceci pourrait expliquer que cet isolat présente de bonnes capacités de dissipation pour trois polluants organiques différents, sachant que jusqu'à présent seuls des consortia semblent capable de minéraliser le diuron (Bazot et coll. 2007, Sorensen et coll. 2008). De plus le fait d'être en consortium peut permettre aux bactéries le composant de dégrader plus efficacement les polluants par effet de syntrophisme : ainsi la dégradation d'hydrocarbures dans une culture atteint 90% pour un consortium isolé d'un sol contaminé mais lorsque les membres isolés du consortium sont testés dans les mêmes conditions de culture, ils ne dégradent plus que 10 à 60% du même mélange de polluants (Richard et Vogel 1999). Cependant l'inconvénient de tout consortium est que l'on ne contrôle pas sa composition (nombre et abondance des espèces présentes), particulièrement au fil des repiquages, des étapes de conservation et de tout changement des conditions de culture. Pour autant, les performances de dégradation observées chez nos consortia - à la différence de consortia créés artificiellement - sont probablement le fruit d'interactions stables entre les différentes souches les composant, à la suite de processus naturels de sélection qui se sont opérés dans le milieu naturel au fil du temps. On ne peut toutefois pas exclure de modifications qualitatives (modification du nombre de souches) en cas de modifications telles qu'évoquées plus haut. Tout en étant conscient que l'analyse par TTGE ne révèle pas les populations minoritaires inférieures à 1% de la population totale (Ogier et coll. 2002, Tailliez et

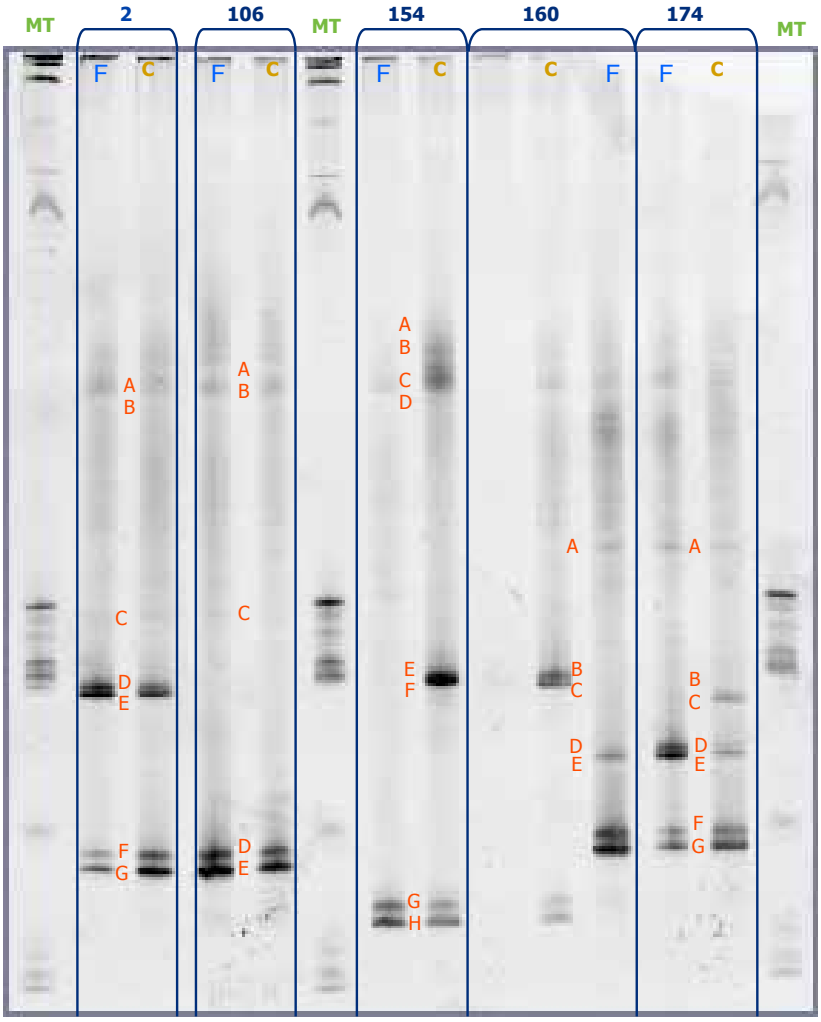



**Figure III.16 : Stabilité des consortia après cryogénisation.**
La TTGE a été réalisée sur des extraits d'ADN issus de cellules fraîches (F) ou cryogénisées (C). Les marqueurs de taille utilisés lors du gel d'électrophorèse sont indiqués par la mention « MT ». Les bandes détectées par le logiciel sont indiquées par les lettres rouges.

coll. 2002) (figure III.16), des analyses par cette technique de la biomasse issue de repiquages successifs et de celle issue d'échantillons cryogénisés ont été réalisées sur les isolats les plus performants pour évaluer cette stabilité : nous en présentons ici quelques exemples (isolats n°106, n°154 et n°160 (capables de dissiper les trois polluants) et isolats n°2 et n°174 (100% de dissipation du 3,4-DCA)). On constate que certains consortia ne sont pas stables (154 et 160) mais que le 106 (tout comme le 2) est quant à lui stable, ce qui est un avantage pour son utilisation dans notre procédé. Afin de déterminer l'identité des souches composant le consortium 106, le séquençage du gène 16S de chaque souche du consortium a été réalisé (Farhan 2009). Les résultats de ce séquençage (Annexe 7) montrent que le consortium est constitué de 6 souches différentes : *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Delftia acidovorans*, *Brevudimonas* sp. et deux souches non identifiées (tableau III.8). Ces souches sont considérées comme étant des PGPR : ainsi en est-il de représentants d'*Arthrobacter* sp. (Egamberdiyeva 2005, Barriuso et coll. 2008), de *P. putida* (Meziane et coll. 2005, Kruijt et coll. 2009), *D. acidovorans* (Tian et coll. 2009) *Brevundimonas* sp. (Barretti et coll. 2008) et *Brevundimonas aurantiaca* (Prakamhang et coll. 2009). Cet effet bénéfique des microorganismes sur la croissance des plantes est intéressant pour notre étude puisque l'on souhaite associer ce consortium à des plantes pour la mise au point du procédé. De plus il est à noter que certaines de ces souches ont déjà été répertoriées comme dégradant des pesticides. *Arthrobacter* sp. peut ainsi dégrader le diuron (Turnbull et coll. 2001, Widehem et coll. 2002, Bazot et al. 2006), *P. putida* (You et Bartha 1982) et *D. acidovorans* (Dejonghe et coll. 2003, Bazot et al. 2007) sont capables de dégrader le 3,4-DCA, et certaines souches du genre *Pseudomonas* sont capables de dégrader le glyphosate (Dick et Quinn 1995, Bazot et Lebeau 2009).

**Conclusion** : Au cours de cette étape de sélection de souches, plusieurs aspects ont été abordés : la structure de la communauté bactérienne dépend des horizons de prélèvement avec un effet marqué de la rhizosphère (H2 vs. HNA) mais pas des points de prélèvement des microorganismes dans le BO. L'utilisation d'une culture en milieu liquide pollué, suivie d'un isolement sur milieu solide et conclue par un tri génétique (enchaînement RISA-RFLP) a permis de sélectionner les populations d'intérêt pour la dissipation du glyphosate, diuron et 3,4-DCA et

**Tableau III.8 : Identité des souches composant le consortium 106.**
d'après Farhan 2009. Le nombre de différences exprime le nombre de nucléotides différents par rapport à la séquence de référence, renseignée sous le numéro d'accession indiqué.

| | Plus proche voisin | Nombre de différences | n° d'accession* |
|---|---|---|---|
| **1** | *Arthrobacter sp.* | 0 | AB496410 |
| **2** | *Pseudomonas putida* | 0 | AM411059 |
| **3** | *Delftia acidovorans* | 0 | CP000884 |
| **4** | *Brevundimonas sp.* | 3 | DQ177489 |
| **5** | Non identifiée n°1 | 86 | EU535504 |
| **6** | Non identifiée n°2 | 83 | EU535504 |

* Le numéro d'accession a été obtenu à l'aide du protocole indiqué dans l'annexe 6

pour la complexation du cuivre. Cette pollution artificielle a notamment eu pour effet de niveler la diversité des populations à stratégie de croissance rapide. La réactivité des populations vis-à-vis des polluants a été observée sur la variation de composition r/K mais pas sur la population totale en culture liquide, les polluants n'étant pas en assez grande concentration pour modifier ce dernier paramètre. Cette variation de l'abondance relative des stratégies de croissance donne une indication sur l'affinité de certaines populations vis-à-vis des polluants. Enfin des tests de dissipation en milieu liquide potentiellement défavorable pour le diuron et le 3,4-DCA autant que pour le glyphosate ont permis de sélectionner des consortia bactériens dont les performances de dissipation sont intéressantes au vu du milieu de culture (ES) qui a servi pour la sélection et des données existantes dans la littérature. L'étape suivante consiste à mettre en oeuvre les différents éléments du système de traitement (matériaux sorbants, plantes et consortium 106) dans des expériences en logettes pour confirmer ou non si l'efficacité prometteuse observée en laboratoire se confirme dans des conditions plus contraignantes et complexes.

# PARTIE III
# CHAPITRE 3
# -
# EXPERIENCES en LOGETTES

# RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 3

## Expériences en logettes

Pour développer un procédé de dépollution répondant aux contraintes de notre système d'étude – bassin d'orage (BO) recueillant des eaux de ruissellement issues d'un bassin versant viticole, en quantités très variables et plus ou moins contaminées – nous avons choisi d'une part de mettre l'accent sur la rétention des polluants dans le BO. Celle-ci apparaît en effet comme une première étape fondamentale afin que le temps de rétention des produits phytopharmaceutiques dans le BO soit compatible avec celui de l'activité biologique dégradante. Le plus souvent, cette condition n'est pas remplie sur site, qui plus est lors de certains épisodes orageux. D'autre part, nous avons mis en œuvre les techniques de bioaugmentation associées à la phytoremédiation permettant de traiter les polluants retenus dans le BO. Pour cela, la sélection d'un inoculum bactérien issu des sédiments du BO d'étude a pour but de pallier l'inadaptation fréquente des bactéries au milieu qu'elles sont censées dépolluer ou une biomasse insuffisante de la (des) population(s) dégradante(s).

Ainsi, le procédé testé dans les expériences en logette est la résultante des deux étapes précédentes et utilise les éléments qui ont fait l'objet de la sélection : i) matériaux sorbants adaptés à chaque polluant dans des conditions défavorables, le sédiment et le sable étant retenus respectivement pour le glyphosate et le diuron/3,4-DCA (cf. § II.2.3.1.) ; ii) consortium bactérien – le « 106 » – dissipant le mélange de polluants organiques, complexant le cuivre dans des conditions nutritives non optimales et possédant une capacité de croissance rapide (stratégie r). A cette sélection s'ajoute le choix de la plante : le macrophyte *Phragmites australis* a été choisi en raison de sa capacité de tolérance à de fortes concentrations en cuivre (données non montrées) et pour sa rusticité, dans l'optique d'un traitement *in situ*.

Les conditions environnementales difficiles peuvent être la cause de l'échec d'un procédé de bioremédiation ; cette dernière étape de notre étude se focalise donc sur l'optimisation du procédé dans des conditions expérimentales intermédiaires entre le laboratoire et le terrain (microcosmes en conditions semi-contrôlées). On espère ainsi s'éloigner des conditions optimales

et contrôlées du laboratoire pour se rapprocher de celles qui régiraient *in situ* le fonctionnement d'un tel procédé, tout en gardant une configuration permettant d'étudier l'efficacité du procédé et son fonctionnement plus simplement que sur le terrain. La matrice solide utilisée dans les bacs est un mélange de sable-sédiment dans les proportions 80/20 (m/m) correspondant à la composition supposée du filtre biologique du BO de Rouffach à l'équilibre.

Nous présenterons dans un premier temps les résultats obtenus chronologiquement. Dans un second temps, une synthèse des résultats de toutes les expériences est présentée paramètre par paramètre. Dans un troisième temps, le rôle des paramètres imposés et de leurs interrelations dans l'efficacité du procédé est évalué, afin de déterminer la viabilité du procédé mis en place dans notre étude.

## 3.1. Résultats

### *3.1.1. Récapitulatif des expériences et des analyses associées*

Par souci de clarté et en guise de guide de lecture nous proposons un tableau récapitulatif des expériences (tableau III.9) ainsi qu'un tableau détaillant les conditions expérimentales (tableau III.10) et les paramètres analysés (tableau III.11) à chaque étape. Les matériaux sélectionnés lors des tests de sorption, c'est-à-dire le sable et le sédiment, sont utilisés dans la composition de la matrice solide présente dans les bacs (cf. § II.2.3.1.). De façon globale, une expérience en logettes consiste en un jeu de paramètres fixés par l'expérimentateur et susceptibles de varier d'une expérience à l'autre (tableau III.9 & 10) en fonction des résultats : volume d'eau apporté et régime hydrique associé, concentration en polluants, fréquence des évènements pluvieux, temps de stockage de l'eau, inoculation ou non, présence de plantes ou non, nombre de plantes. Les grandeurs analysées (tableau III.11) peuvent être de nature physico-chimique (pH, Eh, humidité, concentrations en polluants) ou biologique (population bactérienne, biomasse végétale).

**Tableau III.9 : Tableau synoptique des expériences menées en logettes climatisées.**
SC : semi-continu ; I : inoculé ; NI : non-inoculé ; P : planté ; NP : non-planté.

| | Régime hydrique | Inoculation | Plantes | Concentration |
|---|---|---|---|---|
| **I** | batch | 6 I / 6 NI | 6 P / 6 NP | - |
| **II** | batch | 3 I / 3 NI | - | ≈ µg.L$^{-1}$ |
| **III** | 3x à 15j d'intervalle (SC) | 6 I / 6 NI | - | ≈ 0,1-1mg.L$^{-1}$ |
| **IV** | 3x à 15j d'intervalle (SC) | 6 I / 6 NI | 6 P / 6 NP | ≈ 10mg.L$^{-1}$ |
| **V** | 3x à 7j d'intervalle (6 SC) batch (6) | 6 I / 6 NI | 12 P | ≈ 10mg.L$^{-1}$ |
| **VI** | 2x à 15j d'intervalle (SC) | 6 I / 6 NI | 6 P / 6 NP | ≈ 10mg.L$^{-1}$ |

**Tableau III.10 : Détail des conditions expérimentales.**
La taille de l'inoculum est de 1,1.10$^{11}$ CUF.kg$^{-1}_{\text{sable-sédiment}}$ pour chaque expérience. SC : régime hydrique semi-continu ; B : régime hydrique batch ; Cu : cuivre ; gly : glyphosate ; d34d : diuron et 3,4-DCA. Les concentrations indiquées sont les concentrations initiales théoriques

| | Inoculation | Plantes | Régime hydrique (SC) | Régime hydrique (B) | Concentrations |
|---|---|---|---|---|---|
| **I** | une fois au début | 3, avec tourbe | - | 3L | - |
| **II** | idem | - | - | idem | - Cu : 300µg.L$^{-1}$<br>- gly : 50µg.L$^{-1}$<br>- d34d : 25µg.L$^{-1}$ |
| **III** | idem | - | 1,6L en 12h, vidange immédiate | - | - Cu : 1,5mg.L$^{-1}$<br>- gly : 2mg.L$^{-1}$<br>- d34d : 400µg.L$^{-1}$ |
| **IV** | idem | 3, avec tourbe | ajout de 1,6L en 1h30, 4h de stockage, 2h de vidange | - | - Cu : 37,5mg.L$^{-1}$<br>- gly : 50mg.L$^{-1}$<br>- d34d : 10mg.L$^{-1}$ |
| **V** | après chaque évènement | 4, sans tourbe | idem | 1,6L | idem |
| **VI** | une fois par semaine | 5, sans tourbe | ajout de 1,6L en 1h30, 6h de stockage, 2h de vidange | - | - Cu : 56,5mg.L$^{-1}$<br>- gly : 50mg.L$^{-1}$<br>- d34d : 10mg.L$^{-1}$ |

**Tableau III.11 : Tableau synoptique des paramètres mesurés lors des expériences.**

| | pH | Eh | Humidité | Population | Plantes | Volumétrie | [polluant] eau | [polluant] sédiment |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I** | ✘ | ✘ | ✘ | ✔ | ✘ | ✘ | ✘ | ✘ |
| **II** | ✔ | ✔ | ✘ | ✘ | ✘ | ✘ | ✔ | ✔ |
| **III** | ✔ | ✔ | ✔ | ✘ | ✘ | ✔ | ✔ | ✔ |
| **IV** | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ |
| **V** | ✘ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ |
| **VI** | ✘ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ | ✔ |

### *3.1.2. Survie de l'inoculum dans le sol (Expérience I)*

L'expérience I avait pour but d'évaluer l'effet de l'inoculation du consortium 106 dans le mélange sable-sédiment en présence d'eau (tableau III.9). La technique d'évaluation employée (comptage sur boites) ne permet pas d'identifier avec certitude la part de population imputable à l'inoculum, puisqu'elle ne permet pas de distinguer les différentes espèces présentes. L'effet étudié est donc plus l'installation d'une surpopulation durable qui pourrait être celle du consortium 106 ou d'une ou plusieurs autres populations microbiennes ayant utilisé comme source de substrat le consortium 106. Au début de l'expérience le consortium est inoculé à une concentration de $1{,}1.10^{11}$UFC.kg$^{-1}$. La **population cultivable** dans les modalités inoculées est significativement plus importante au bout de 7 jours ($10^8$-$10^9$UFC.kg$^{-1}$) que dans les modalités non inoculées, où la population initiale du mélange sable-sédiment (stable au cours de l'expérience) est de l'ordre de $10^7$UFC.kg$^{-1}$ ; la modalité inoculée-plantée donne la population la plus importante (figure III.17). On peut noter une tendance (non significative) à la décroissance au cours du temps. L'inoculation du consortium à la concentration testée permet donc d'augmenter significativement la population bactérienne cultivable du mélange sable-sédiment, sur une durée au moins égale à une semaine. Le maintien de la surpopulation par rapport aux modalités non inoculées est amélioré en présence de plantes, ce qui peut être expliqué de deux manières : d'une part par l'effet rhizosphère (Anderson et coll. 1993, Arshad et coll. 2007), d'autre part par la présence de tourbe autour des racines des plantes. Les plantes étaient livrées le chevelu racinaire enchevêtré dans cette matrice, qui peut fournir une niche écologique et des nutriments aux microorganismes et ainsi permettre d'entretenir une biomasse conséquente (Golovchenko et coll. 2007), bien qu'une décroissance de la biomasse microbienne après ajout de tourbe ait déjà été observé (Niemi et coll. 2008). La différence de population entre les modalités PI et NPI à $t_0$ est surprenante et pourrait s'expliquer par une plus grande homogénéisation du sol en l'absence de plantes, ce qui provoquerait une plus grande dilution de l'inoculum. Cependant à $t_0$+7j, l'effet d'homogénéisation différentielle s'est estompé alors que celui lié à la bioaugmentation reste significatif.

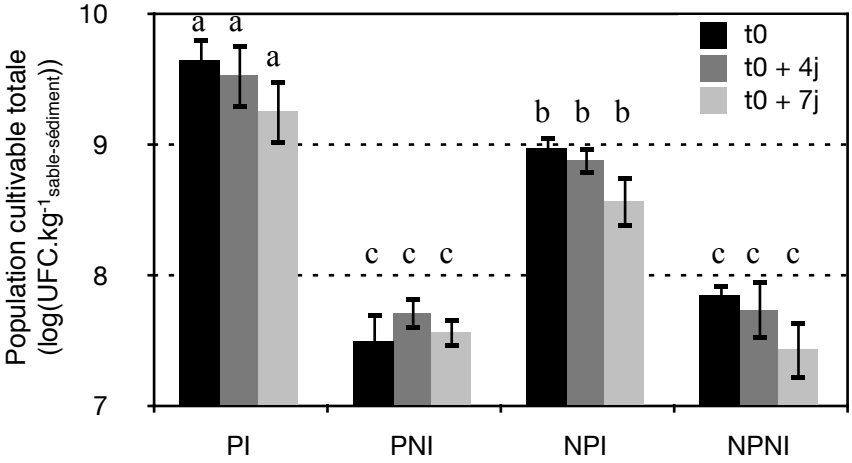



**Figure III.17 : Population cultivable totale dans le sol (Expérience I).**
PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée non inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les lettres correspondent aux groupes de similitude déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

### *3.1.3. Expériences à faibles concentrations en polluants*

Expérience II

Cette expérience avait pour objectif d'évaluer l'abattement des concentrations en polluants dans l'eau et le sol d'un système de type batch, c'est-à-dire sans entrée ni sortie d'eau. L'effet de l'inoculation est étudié avec la mise en place d'une modalité inoculée (une seule fois au début de l'expérience) et d'une autre non-inoculée. Les concentrations en jeu dans l'eau introduite dans les microcosmes sont de l'ordre de la dizaine de $\mu g.L^{-1}$. Les concentrations dans le mélange sable-sédiment se sont révélées inférieures à la limite de quantification ($10\mu g.kg^{-1}$) pour le laboratoire d'analyses ; aucune évolution n'a donc pu y être mise en évidence. Ces concentrations qui étaient au départ pensées pour être légèrement plus élevées que celles rencontrées réellement dans l'eau du BO, de l'ordre de $1\text{-}10\mu g.L^{-1}$ pour le glyphosate et le diuron (Imfeld 2009, communication personnelle), se sont avérées trop faibles pour être détectées dans le mélange sable-sédiment à l'aide de la technique analytique employée (ASE suivie d'une analyse par UPLC/MS-MS). Dans la suite du travail, nous avons donc employé des concentrations plus élevées pour repasser au-dessus de cette limite de quantification.

Le **pH** à l'eau du mélange sable-sédiment est resté relativement stable (8 initialement, tableau II.1) avec des variations entre 8,1 et 8,6 pendant les 3 semaines de l'expérience (données non montrées). Aucune différence significative n'est observée entre les modalités inoculées et non-inoculées. L'apport des polluants, les microorganismes et la lame d'eau n'entraînent donc pas de variations de pH.

Le **potentiel redox** diminue lors de l'expérience, passant d'une valeur initiale de 520mV pour la modalité inoculée et 550mV pour celle non-inoculée, témoignant d'un milieu oxydant, à 0mV après environ 5 jours pour se stabiliser à -280mV en une semaine au plus (figure III.18) pour les deux modalités. Aucune différence significative entre les modalités inoculées et non-inoculées n'est observée au cours de l'évolution du potentiel redox. Le milieu devient réducteur à cause de la lame d'eau présente en permanence dans les bacs. De telles modifications de potentiel redox ont déjà été observées au sein de ZHA en quelques jours par Dusek et coll. (2008).

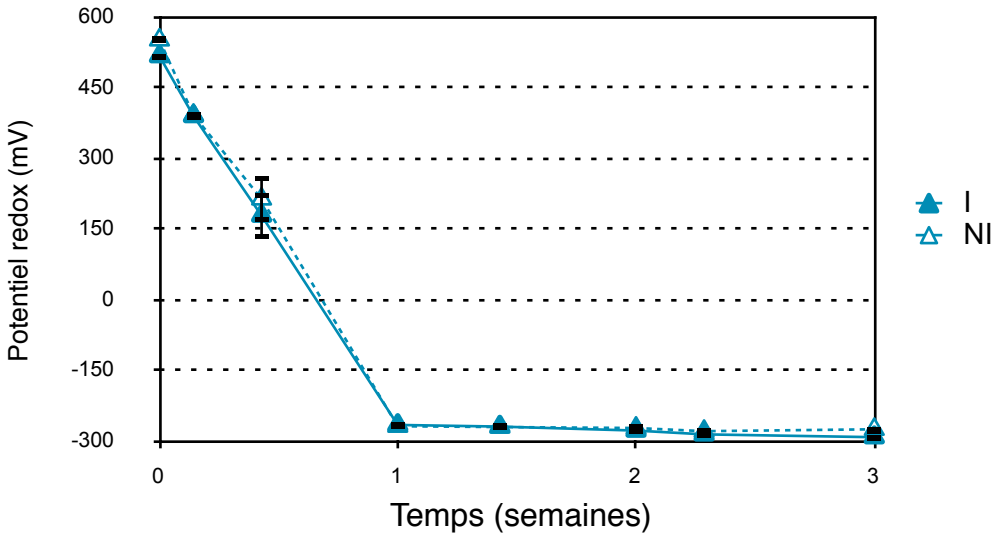



**Figure III.18 : Evolution du potentiel redox (Expérience II).**
I : modalité inoculée, NI : modalité non inoculée. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

Une diminution de la **concentration** dans l'eau est observée pour tous les polluants au bout d'une semaine, la diminution étant la plus importante pour le glyphosate et le 3,4-DCA (tableau III.12). L'abattement de la concentration est satisfaisant pour tous les polluants. Comprise entre 99,2 et 99,5% pour le glyphosate et le 3,4-DCA, elle varie de 90,1 à 93,5% pour le diuron. Les polluants sont donc bien dissipés (sorption très probablement majoritaire et dégradation sans doute minoritaire pour un temps d'action aussi court : une semaine). Bien que les différences de concentrations en polluants entre modalités inoculée et non-inoculée soient considérées comme significatives pour le diuron ($[diuron]_{NI} < [diuron]_{I}$) et le 3,4-DCA ($[3,4\text{-}DCA]_{I} < [3,4\text{-}DCA]_{NI}$), elle sont quantitativement faibles, laissant supposer que l'abattement observé est essentiellement dû aux propriétés de sorption des molécules, la composante biologique ayant peu d'impact. Les concentrations obtenues dans l'eau à la fin de l'expérience (environ 2µg.L$^{-1}$ pour le diuron, 0,2µg.L$^{-1}$ pour le glyphosate, 0,15µg.L$^{-1}$ pour le 3,4-DCA) restent au-dessus de la valeur légale pour l'eau potable qui est de 0,1µg.L$^{-1}$ par polluant ; 0,5µg.L$^{-1}$ pour un mélange.

Dans cette expérience, la faible variation de pH observée dans le sol tient probablement au caractère non-ionique des certains polluants (diuron, 3,4-DCA et cuivre) et à la faible concentration du seul composé ionique (glyphosate). Le caractère fortement réducteur du milieu au bout de quelques jours influencera probablement le comportement du cuivre. La dissipation dans l'eau au bout d'une semaine est très bonne pour tous les polluants et aucun effet patent de l'inoculation sur cette dernière n'est observé. On peut donc penser qu'il est possible d'obtenir un tel abattement dans le BO, pour peu que le temps de rétention qui atteint parfois quelques heures (données ENGEES 2007, communication personnelle) soit largement augmenté.

<u>Expérience III</u>

Cette expérience avait pour objectif d'évaluer l'abattement des polluants dans l'eau d'un système de type continu, l'eau entrant ressortant directement après passage au travers de la matrice solide. La configuration est donc *a priori* moins favorable que celle de l'expérience précédente, le temps de passage dans le mélange sable-sédiment étant de 4h environ, mais elle reproduit plus fidèlement le régime hydraulique sans rétention du bassin d'orage. L'effet de

**Tableau III.12 : Concentrations en polluants dans l'eau au bout d'une semaine (Expérience II).**
Les concentrations sont exprimées en µg.L$^{-1}$. Les groupes de similitude indiqués entre parenthèses sont déterminés pour chaque polluant, par ANOVA ($P < 0,05$). L'intervalle est celui donné par les erreurs-types.

| | **glyphosate** | | **diuron** | | **3,4-DCA** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **$t_0$** | **$t_0$ + 1 semaine** | **$t_0$** | **$t_0$ + 1 semaine** | **$t_0$** | **$t_0$ + 1 semaine** |
| **I** | 37 | 0,18 ± 0,00 (a) | 25 | 2,47 ± 0,19 (a) | 21 | 0,11 ± 0,01 (b) |
| **NI** | 37 | 0,28 ± 0,05 (a) | 25 | 1,63 ± 0,09 (b) | 21 | 0,17 ± 0,01 (a) |

l'inoculation est étudié en employant la même concentration que précédemment. Les concentrations en polluants ont été augmentées par rapport à l'expérience II pour atteindre 0,1 à 1mg.L$^{-1}$ en sortie de bac selon le composé. Les évènements pluvieux sont espacés de deux semaines.

Le **pH** de la solution de sol, initialement de 8 pour toutes les modalités, diminue jusqu'à 7,4 après une semaine d'expérience puis varie peu (figure III.19) ; il reste ainsi compris entre 7,4 et 7,8 pour toutes les modalités. L'ajout de polluants, la présence ou non de microorganismes et d'eau n'influent pas significativement sur le pH de la solution de sol. Il semble donc que ce paramètre ne puisse jouer aucun rôle dans les résultats de bioremédiation du système.

Contrairement au pH, le **potentiel redox** subit de fortes variations au cours de l'expérience (figure III.20) : l'Eh vaut 170mV pour la modalité inoculée (210mV pour la modalité non-inoculée, la différence entre les modalités n'étant pas significative) au début de l'expérience, ce qui correspond à un milieu modérément réducteur ; il varie ensuite entre 0 et 550mV. La valeur initiale du potentiel redox est très inférieure à celle dans les bacs lors de l'expérience II, la mesure ayant été faite juste après l'évènement pluvieux dans cette expérience. Aucune différence significative n'est observée entre les modalités inoculées et non-inoculées. La présence d'eau dans les bacs lors des évènements pluvieux entraîne une diminution du potentiel redox ; on passe alors d'un milieu oxydant à un milieu réducteur. La présence d'eau étant temporaire, le potentiel redox revient à des valeurs oxydantes après l'évènement pluvieux en 3 jours au maximum, ce qui est en accord avec les résultats de Nikolausz et coll. (2008), qui rapportent des variations d'Eh de plusieurs centaines de mV sur une journée. L'intervalle de temps choisi entre les évènements pluvieux laisse ainsi le temps au système de redevenir aérobie.

L'**humidité** du mélange est initialement de 7,6% et décroît jusqu'à 0,8% à la fin de l'expérience (tableau III.13). Aucune différence significative n'est observée entre les modalités inoculées et non-inoculées.

L'**abattement** de la pollution dans l'eau lors du 3$^{ème}$ évènement (tableau III.14, voir page suivante) atteint 45% (resp 54%) pour le diuron pour la modalité inoculée (resp non inoculée), 77% (resp 83%) pour le 3,4-DCA pour la modalité inoculée (resp non inoculée) et 46% (resp 61%) pour le glyphosate pour la modalité inoculée (resp non inoculée). Avec un temps de passage

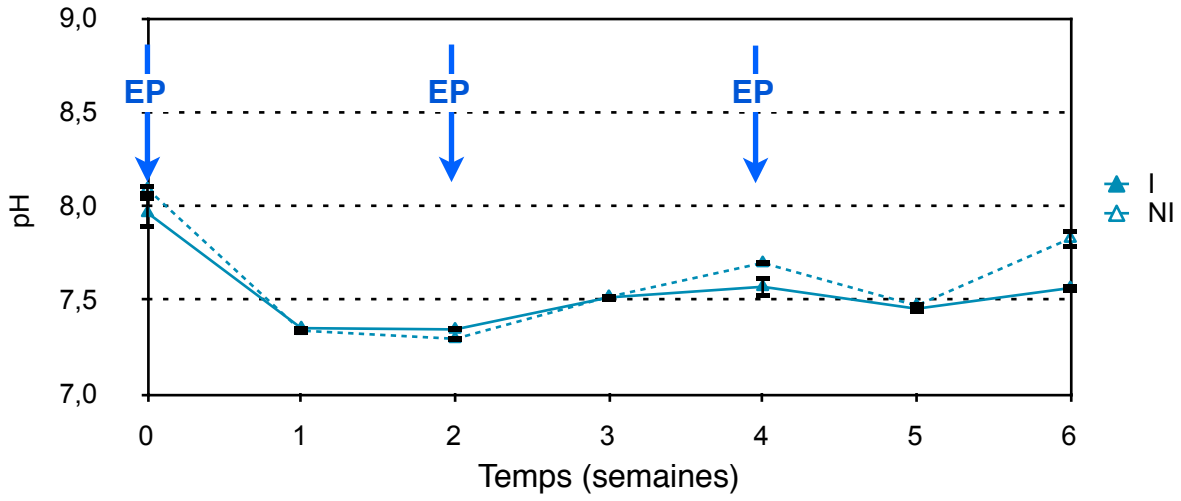



**Figure III.19 : Evolution du pH de la solution de sol (Expérience III).**
I : modalité inoculée, NI : modalité non-inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

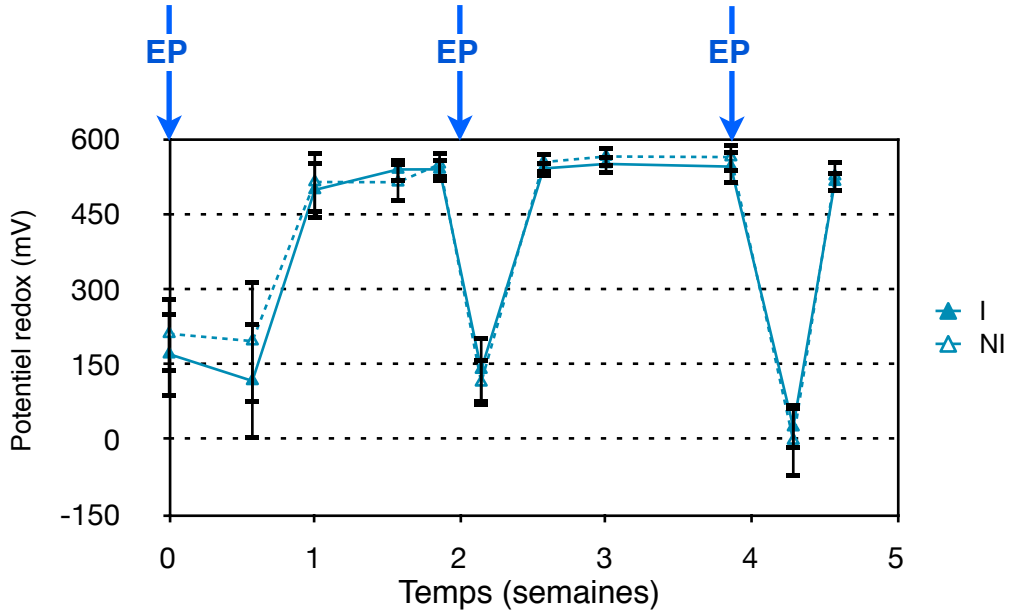



**Figure III.20 : Evolution du potentiel redox (Expérience III).**
I : modalité inoculée, NI : modalité non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

**Tableau III.13 : Humidité du mélange sable-sédiment (Expérience III).**
L'humidité est exprimée en %. Les groupes de similitude indiqués entre parenthèses sont déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). L'intervalle est celui donné par les erreurs-types.

| | $t_0$ | $t_0$ + 1 semaine | $t_0$ + 3 semaines | $t_0$ + 5 semaines |
|---|---|---|---|---|
| **I** | 7,6 ± 0,3 (a) | 6,4 ± 0,5 (b) | 1,8 ± 0,5 (c) | 0,8 ± 0,0 (d) |
| **NI** | 7,6 ± 0,3 (a) | 6,9 ± 0,3 (b) | 2,3 ± 0,2 (c) | 0,8 ± 0,1 (d) |

dans le mélange sable-sédiment réduit, on obtient des performances de sorption moins bonnes que lors de l'expérience précédente et qui ne sont bonnes que pour un polluant avec un fort potentiel d'adsorption tel que le 3,4-DCA. Les abattements sont légèrement plus élevés pour les modalités non inoculées mais les différences relevées ne sont pas significatives.

Cette expérience permet de montrer que l'apport de polluants aux concentrations employées, la quantité d'eau variable et la bioaugmentation en début d'expérience ne provoquent pas de variation significative du pH de la solution de sol. Au contraire le potentiel redox varie fortement en raison de la présence d'une lame d'eau intermittente, mais pas à cause de la bioaugmentation, la différence entre les modalités inoculées et non inoculées n'étant pas significative. Le temps de contact plus court entre les polluants et le sol se traduit par une moins bonne rétention des polluants lors du passage de ces derniers dans le mélange sable-sédiment et par l'absence d'effet de la bioaugmentation.

### *3.1.4. Expériences à fortes concentrations en polluants*

Expérience IV

Cette expérience avait pour objectif d'évaluer l'abattement de la concentration en polluants dans l'eau et le mélange sable-sédiment d'un système de type semi-continu, en se plaçant dans des conditions hydrauliques plus favorables que celles de l'expérience précédente, l'eau entrant restant stockée 4h dans le système avant de ressortir (tableau III.10), ceci afin d'évaluer entre autres l'influence d'un temps de stockage plus long sur la quantité de polluants dans l'effluent. L'effet de l'inoculation est étudié avec la mise en place d'une modalité inoculée et non inoculée, à la même concentration que précédemment. L'influence des plantes est étudiée avec la mise en place d'une modalité plantée et d'une non plantée, la tourbe enveloppant les racines n'étant pas otée dans cette expérience. Les concentrations en polluants sont de l'ordre de $10 mg.L^{-1}$, ce qui correspond à une multiplication par un facteur 25 par rapport à l'expérience précédente.

Le **pH de la solution de sol**, initialement autour de 7,7-7,8, diminue puis reste stable, compris entre 7,4 et 7,6 au cours de l'expérience, sans différence significative entre les modalités

(figure III.21). On retrouve la baisse de pH déjà constatée lors de l'expérience III. On constate que l'ensemble des conditions expérimentales (présence/absence de microorganismes ou de plantes, présence/absence d'eau) ne modifie que faiblement le pH alors que la quantité de glyphosate potentiellement présente dans le mélange sable-sédiment (13mg.kg$^{-1}$) est environ 1000 fois plus élevée que lors de l'expérience II : la seule espèce susceptible de faire varier notablement le pH n'a donc pas d'influence significative.

Le milieu, initialement réducteur ($Eh_{PI}$ = -225mV, $Eh_{PNI}$ = -159mV, $Eh_{NPI}$ = -47mV, $Eh_{NPNI}$ = -65mV, sans différence significative) en raison de l'eau ajoutée dans les bacs, devient oxydant en quelques jours (figure III.22). L'évolution sur la première semaine pour les modalités plantées est une hausse constante, alors que le **potentiel redox** passe par un minimum avant d'augmenter pour les modalités non plantées. Les variations observées ensuite dépendent des modalités : $\Delta Eh_{PI}$ = 100mV (valeurs extrêmes 285-385mV), $\Delta Eh_{PNI}$ = 195mV (valeurs extrêmes 270-465mV), $\Delta Eh_{NPNI}$ = 300mV (valeurs extrêmes 225-525mV), $\Delta Eh_{NPI}$ = 390mV (valeurs extrêmes 145-535mV). On constate que la variation d'Eh au cours de l'expérience est significativement plus importante ($P < 0,01$) pour les modalités non plantées que pour les modalités plantées : ainsi les modalités non plantées redeviennent réductrices au moment des évènements pluvieux alors que les modalités plantées restent oxydantes. Cette stabilité de potentiel redox peut s'expliquer par la présence des macrophytes, connus pour libérer de l'oxygène *via* l'aérenchyme, qui permettent de stabiliser le milieu à des valeurs oxydantes au cours de l'expérience. Ceci rejoint les résultats d'études déjà réalisées sur la génération d'une zone oxydante à proximité des racines de *Phragmites australis* (Armstrong et coll. 2000, Engloner et coll. 2008). Au sein de chaque modalité P et NP, le potentiel redox des modalités inoculées et non-inoculées ne présente pas de différence significative : comme précédemment, on n'observe aucun effet de la bioaugmentation sur le potentiel redox.

L'**humidité** est significativement plus élevée dans les modalités plantées après 4 semaines, puis devient similaire pour toutes les modalités après 6 semaines, le sable-sédiment étant très sec pour l'ensemble des modalités (tableau III.15). La présence des plantes permet de maintenir l'humidité dans les bacs pendant un certain temps. Ces résultats rejoignent ceux de Kröger et coll. (2009) qui ont observé une augmentation de la quantité d'eau dans des fossés de

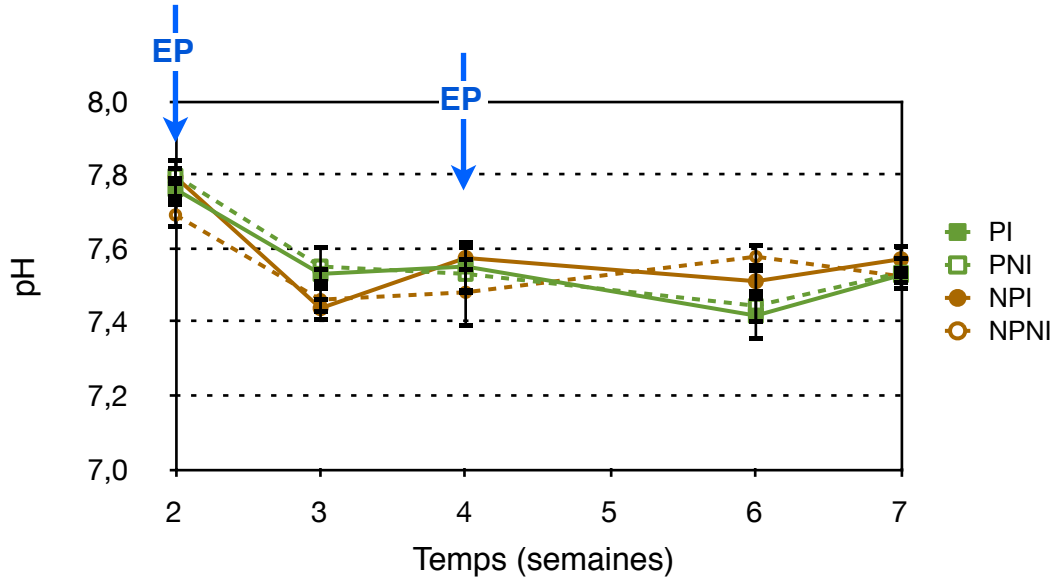



**Figure III.21 : Evolution du pH de la solution de sol (Expérience IV).**
En abscisses figure le temps en semaines, en ordonnées les valeurs de pH. PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

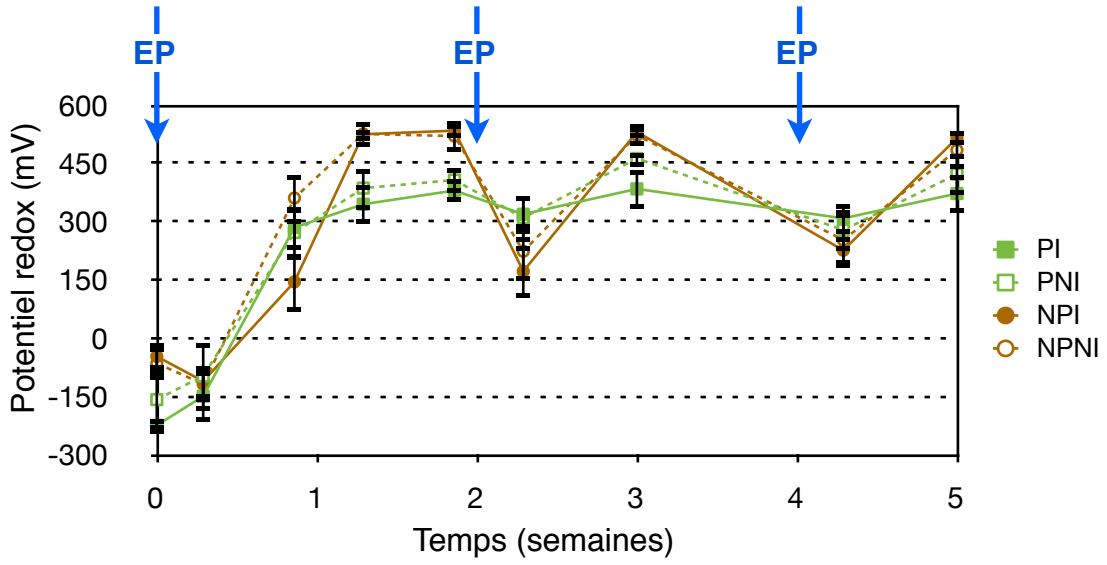



**Figure III.22 : Evolution du potentiel redox (Expérience IV).**
PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

**Tableau III.15 : Humidité du mélange sable-sédiment (Expérience IV).**
L'humidité est exprimée en %. Les groupes de similitude indiqués entre parenthèses sont déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). L'intervalle est celui donné par les erreurs-types.

| | $t_0$ + 4 semaines | $t_0$ + 6 semaines |
|---|---|---|
| **PI** | 5,8 ± 0,4 (a) | 2,0 ± 0,5 (a) |
| **PNI** | 7,1 ± 0,9 (a) | 1,1 ± 1,1 (a) |
| **NPI** | 2,6 ± 0,2 (b) | 1,9 ± 1,5 (a) |
| **NPNI** | 2,4 ± 0,7 (b) | 0,7 ± 0,4 (a) |

drainage végétalisés comparés à ceux non végétalisés, même si cette correspondance doit être nuancée en raison d'échelles de travail différentes.

Aucune différence significative de **biomasse végétale fraîche** n'est observée entre les modalités de traitement et le témoin (figure III.23). Le témoin n'ayant reçu aucun polluant, il semble donc que la croissance des plantes est peu affectée par la présence de polluants. Ce résultat a déjà été constaté avec une autre espèce de macrophyte, *Schoenoplectus californicus* (Miglioranza et coll. 2004). On ne note enfin aucun effet significatif de l'inoculation sur la biomasse végétale.

Aucune différence significative de **population cultivable** n'est relevée dans le milieu sable-sédiment sur l'ensemble de l'expérience (figure III.24). L'effet de l'inoculation n'est pas significatif, que le mélange sable-sédiment soit planté ou non. Le consortium 106 a été inoculé une fois au début de l'expérience ; une seule inoculation ne permet donc pas de voir d'effet significatif de la bioaugmentation sur la biomasse microbienne au cours du temps, bien qu'une tendance à l'augmentation apparaisse pour la modalité planté-inoculé entre la 2$^{ème}$ et 3$^{ème}$ semaine..

La concentration en **glyphosate dans l'eau de sortie** est comprise entre 1,0 et 12mg.L$^{-1}$. On observe des différences significatives entre les évènements mais pas entre les différentes modalités (figure III.25.a). Ainsi, au fil des évènements pluvieux, une augmentation de la quantité de polluant dans l'effluent (différente selon les modalités) est observée. La hausse de concentration entre le premier et le troisième évènement est de 30% pour la modalité PI, 81% pour la modalité NPNI, 84% pour la modalité PNI et 88% pour la modalité NPI. Bien que la concentration initiale dans l'eau soit élevée (50mg.L$^{-1}$), l'abattement pour chaque évènement reste élevé avec des valeurs comprises entre 75 et 99%. La concentration en **diuron** dans l'eau de sortie est comprise entre 5,6 et 14mg.L$^{-1}$, les deux premiers évènements étant significativement différents du troisième, sans différence significative entre les modalités au sein d'un même évènement (figure III.25.b). On constate comme pour le glyphosate une hausse de concentration en diuron dans l'effluent entre le premier et le dernier évènement, de 40% pour la modalité PNI, 46% pour la modalité NPNI, 49% pour la modalité NPI et 51% pour la modalité PI. Mais à la différence du glyphosate, cette hausse se traduit par des concentrations dans l'effluent supérieures

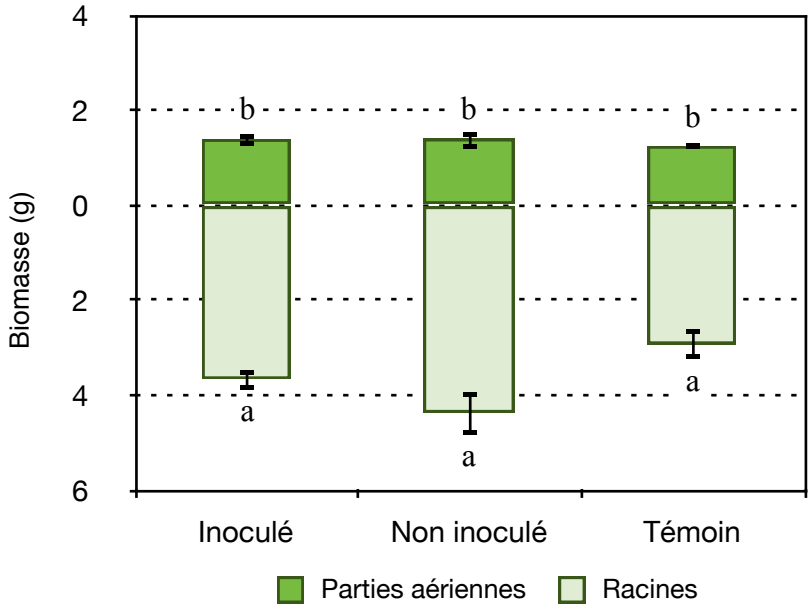



**Figure III.23 : Biomasse totale récoltée à la fin de l'expérience (Expérience IV).**
En ordonnées figure la biomasse en g. Les groupes de similitude sont déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

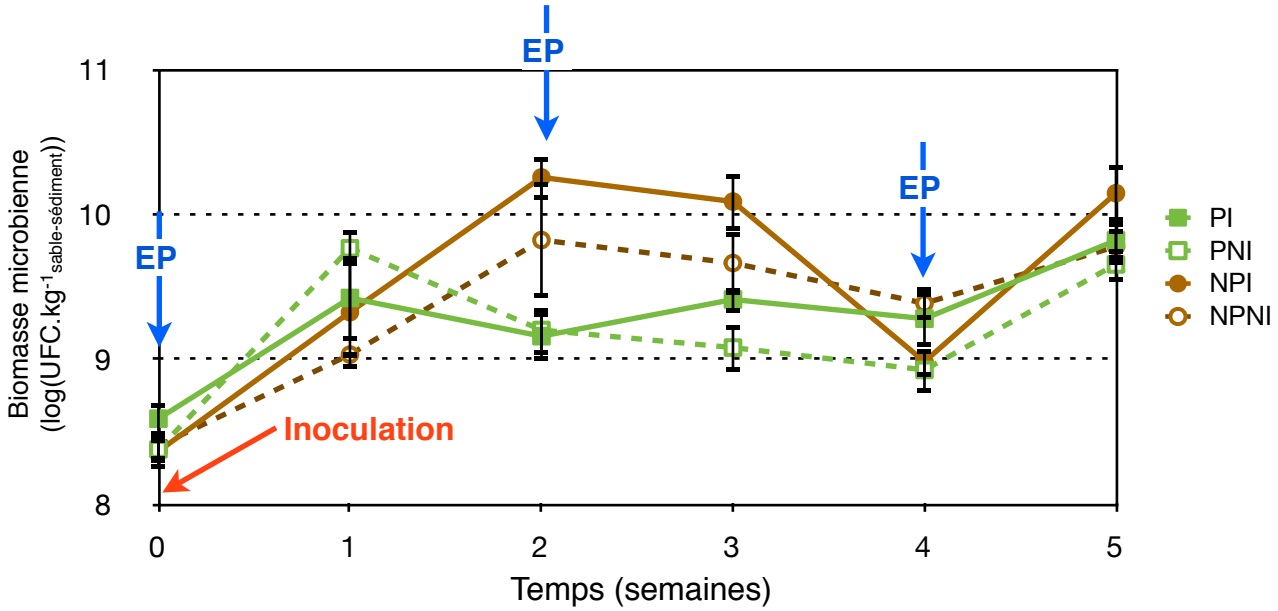



**Figure III.24 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience IV).**
PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. La population en t = 0 a été évaluée après l'évènement pluvieux. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

à la concentration apportée dans l'influent (10mg.L$^{-1}$) pour toutes les modalités lors du 3$^{ème}$ évènement. Ceci est probablement dû à la mauvaise sorption du diuron apporté et à un volume en sortie de bac inférieur au volume en entrée, ce qui provoque une reconcentration du produit (phénomène valable de fait pour tous les polluants) par combinaison de la mauvaise sorption du diuron et de concentrations plus élevées que celles des autres polluants dans le mélange sable-sédiment. La concentration en **3,4-DCA** dans l'eau de sortie reste entre 1 et 2mg.L$^{-1}$, sans différence significative entre les modalités ou les évènements (figure III.25.c). La concentration initiale dans l'eau était de 10mg.L$^{-1}$, l'abattement pour chaque évènement est donc compris entre 80 et 99% pour cette expérience. L'abattement en concentration dans l'eau de sortie est élevé pour le glyphosate et le 3,4-DCA alors qu'il est nettement moins élevé (voire négatif) pour le diuron. On retrouve, au moins pour le premier évènement (avant que les phénomènes biologiques n'aient le temps d'agir), le lien entre concentration dans l'effluent et capacité de sorption du polluant. La tourbe joue un rôle non négligeable dans la rétention des polluants (De Wilde et coll. 2009) et ne nous permet donc pas de conclure sur les réelles capacités de rétention du système, qui s'entendent sans intervention de la tourbe, au demeurant absente du BO.

Concernant la **concentration en polluant dans le mélange sable-sédiment**, aucune différence significative n'apparaît entre les modalités. La diminution de la concentration en **glyphosate** dans le mélange sable-sédiment est importante après le 1$^{er}$ évènement (cf. valeurs de concentration à «1er ev + 1s» sur la figure), avec une concentration résiduelle quasi-nulle, tandis que la concentration augmente une semaine après le 2$^{ème}$ apport, avec une concentration résiduelle comprise entre 1,5 et 4mg.kg$^{-1}$ (figure III.25.a'). L'abattement, calculé sur l'ensemble des deux évènements, est donc compris entre 80 et 100% suivant les modalités. L'abattement moins élevé une semaine après le 2$^{ème}$ évènement pourrait être dû à une efficacité moindre de l'inoculum au cours du temps, ou à une capacité de sorption plus faible due à l'occupation d'une partie des sites de sorption par le pglyphosate du premier évènement. La concentration en **diuron** dans le mélange sable-sédiment est sensiblement la même une semaine après chaque évènement (figure III.25.b'). La dissipation associée doit donc être due à l'effet d'un autre phénomène que la bioaugmentation, tel que la sorption ou l'action des microorganismes en place. La concentration dans le mélange est proche de 250µg.kg$^{-1}$ une semaine après le 1$^{er}$ évènement et varie entre 250 et

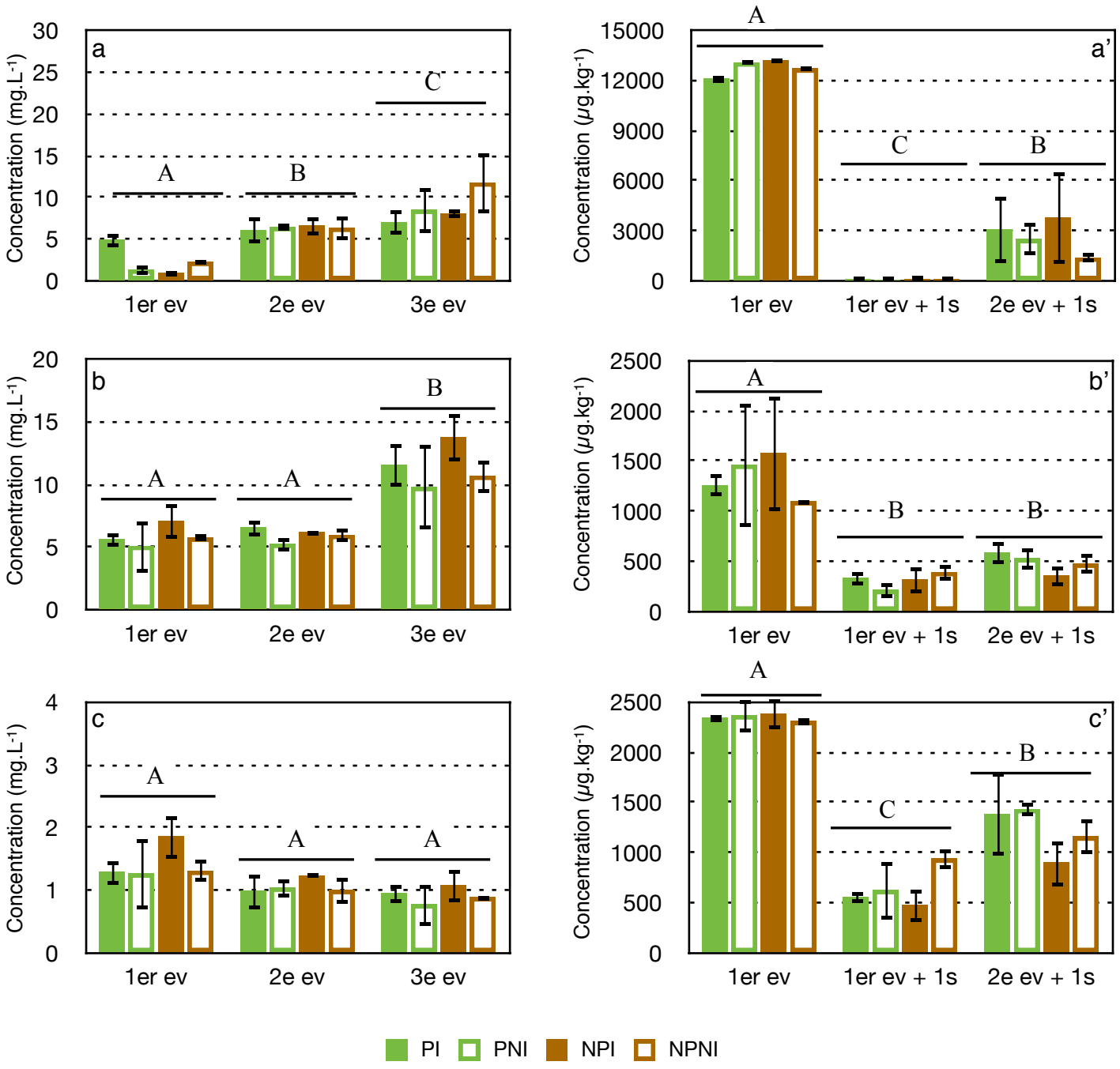



**Figure III.25 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience IV).**

A gauche figure l'évolution des concentrations dans l'eau en mg.L$^{-1}$, à droite la concentration dans le mélange sable-sédiment en µg.kg$^{-1}$. a, a' : glyphosate ; b, b' : diuron ; c, c' : 3,4-DCA. PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les groupes de similitude ont été déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

500µg.kg$^{-1}$ une semaine après le 2ème évènement. L'abattement entre le début de l'expérience et une semaine après le 2ème évènement est donc compris entre 60 et 90%. La concentration du **3,4-DCA** dans le mélange sable-sédiment une semaine après évènement pluvieux est variable : comme pour le glyphosate, elle est plus importante une semaine après le 2ème évènement (figure III.25.c'). La concentration dans le mélange est proche de 500µg.kg$^{-1}$ une semaine après le 1er évènement et varie entre 900 et 1500µg.kg$^{-1}$ une semaine après le 2ème évènement. L'abattement, calculé sur l'ensemble des deux évènements, est donc compris entre 60 et 80%. Une semaine après le 1er évènement, la différence d'abattement entre le témoin (NPNI) et les modalités inoculées (PI et NPI) est significative ($P < 0,05$). Elle correspond probablement à l'effet traitement, hypothèse renforcée par le fait que cette différence s'estompe après le 2ème évènement, probablement en raison d'une perte d'efficacité de l'inoculum. On note pour tous les polluants et toutes les modalités une diminution de la quantité dissipée une semaine après le 2e évènement, ce qui peut être dû à une baisse d'efficacité de l'inoculum ou une accumulation des polluants, présents en grande quantité. L'absence d'effet de l'inoculum pour le glyphosate pourrait s'expliquer par la présence en nombre suffisant de populations dégradantes dans le milieu sable-sédiment, qui fait que l'ajout d'une population supplémentaire spécifique n'exacerbe pas l'activité dégradante. Les enzymes responsables de la dégradation de cette molécule sont en effet largement représentées dans le règne bactérien (Huang et coll. 2005). Comme pour l'eau, la quantité de polluants retrouvée dans le mélange sable-sédiment est peut-être faussée par la présence de la tourbe ; là encore on ne peut complètement conclure sur l'efficacité du système au sens où nous l'entendons.

Pour résumer, si on compare l'évolution des concentrations en polluants dans l'eau à celles dans le sable-sédiment, on constate :

- pour le glyphosate et le 3,4-DCA dans l'eau, des concentrations proches au 2ème et 3ème évènement alors que dans le sable-sédiment, elles augmentent entre le 1er évènement + 1semaine et le 2e évènement + 1semaine ;
- pour le diuron, dans l'eau, les concentrations au 3ème événement augmentent comparé au 2ème tandis que dans le sédiment les concentrations au 1er évènement + 1semaine et au 2e évènement + 1semaine restent constantes.

A la lueur des résultats, on pourrait dire que le sédiment « amortit » les apports successifs de glyphosate et 3,4-DCA en les accumulant comme une éponge ce qui n'est pas le cas en revanche pour le diuron d'où l'augmentation de sa concentration dans l'eau lors du 3ème événement. Ceci est probablement à relier aux capacités de sorption de chaque polluant, fortes pour le glyphosate et le 3,4-DCA et plus faible pour le diuron (tableaux I.5 et I.7).

On note donc à l'issue de cette expérience que le pH ne fluctue pas significativement quels que soient les paramètres physico-chimiques et biologiques du système. Les plantes permettent de stabiliser le milieu en tamponnant les variations de potentiel redox dues aux évènements pluvieux, et permettent de garder le milieu plus humide. Par contre, l'effet de la bioaugmentation en début d'expérience sur la population totale n'est pas patent. Ceci explique peut-être l'absence d'effet de ce traitement observé dans le mélange sable-sédiment. Enfin les concentrations en polluants observées dans l'effluent semblent plus influencées par les caractéristiques physico-chimiques des molécules que par les modalités de traitement. Excepté pour le 3e évènement et le diuron, le pourcentage de diminution dans l'eau est améliorée par rapport à l'expérience III.

Expérience V

Cette expérience a pour objectif d'évaluer l'abattement des polluants dans l'eau et le mélange sable-sédiment d'un système de type semi-continu (SC) ou batch (B) en conservant le même régime hydrique que précédemment pour les modalités semi-continues, la diminution en polluants dans l'eau étant globalement satisfaisante. La même gamme de concentration qu'à l'expérience IV est conservée puisqu'elle permet d'être au-dessus de la limite de détection. La concentration de l'inoculum est la même que précédemment et l'inoculation est maintenant renouvelée à chaque évènement pluvieux, pour aider à maintenir une population plus élevée que dans le témoin. L'intervalle de temps entre deux évènements pluvieux est ramené à une semaine pour évaluer la performance du système avec des intervalles de temps plus courts. Nous avons choisi de ne conserver que les modalités plantées, les plus proches de la configuration du BO d'origine. La stabilisation des conditions physico-chimiques, en présence de plantes, montrée lors de l'expérience précédente, milite par ailleurs en faveur d'un système planté. On a donc

finalement 4 modalités : semi-continu inoculée (SCI) semi-continu non inoculée (SCNI), batch inoculée (BI) et batch non inoculée (BNI).

Des différences significatives de **potentiel redox** sont observées (figure III.26) entre les deux régimes hydriques ($P < 0,001$) avec $Eh_{(SC)} > Eh_{(B)}$ et entre les modalités inoculées et non inoculées au sein de chaque régime hydrique ($P < 0,001$) avec $Eh_{(I)} > Eh_{(NI)}$ pour les deux régimes. La bioaugmentation répétée après chaque évènement augmente plus fortement le potentiel redox du milieu que dans le cas du témoin non bioaugmenté ; en effet la variation de potentiel ne peut être expliquée par une homogénéisation différentielle entre modalités inoculées et non-inoculées, tous les bacs (inoculés ou non) ayant été homogénéisés de la même manière à chaque inoculation. Celui-ci retrouve son niveau de départ avant l'inoculation suivante. Dans les modalités batch, le milieu devient très réducteur au bout de 5 jours, de manière plus marquée pour la modalité non-inoculée que pour celle inoculée. Dans les modalités semi-continues en revanche, le milieu subit une alternance d'états oxydants et réducteurs dus à la présence intermittente d'eau. La différence de potentiel redox entre la modalité inoculée et non inoculée est significative, celui de la modalité inoculée étant le plus élevé : globalement la modalité inoculée est plus oxydante que la modalité non inoculée. On pourrait supposer que cette différence est due à l'inoculation qui favoriserait la libération d'oxygène par les racines, cet élément faisant partie des exsudats racinaires au sens large (Bais et coll. 2006), dont la sécrétion est modifiée par les microorganismes (Zhuang et coll. 2007). La rapidité de la décroissance de Eh dans les modalités semi-continues est similaire à celle observée dans l'expérience II. Le potentiel redox augmente au fur et à mesure des événements, ce qui est probablement corrélé avec l'assèchement du milieu, comme dans les expériences précédentes, malgré l'apport d'eau périodique. L'**humidité** oscille entre 15 et 30% pour la modalité semi-continue et entre 20 et 50% pour la modalité batch, la différence entre les régimes hydriques étant significative ; au sein de chaque régime hydrique, il n'y a pas de différence significative entre les modalités inoculées et non inoculées (figure III.27).

La **biomasse végétale** est significativement plus faible en régime batch qu'en régime semi-continu (figure III.28). La différence est également significative entre les modalités polluées

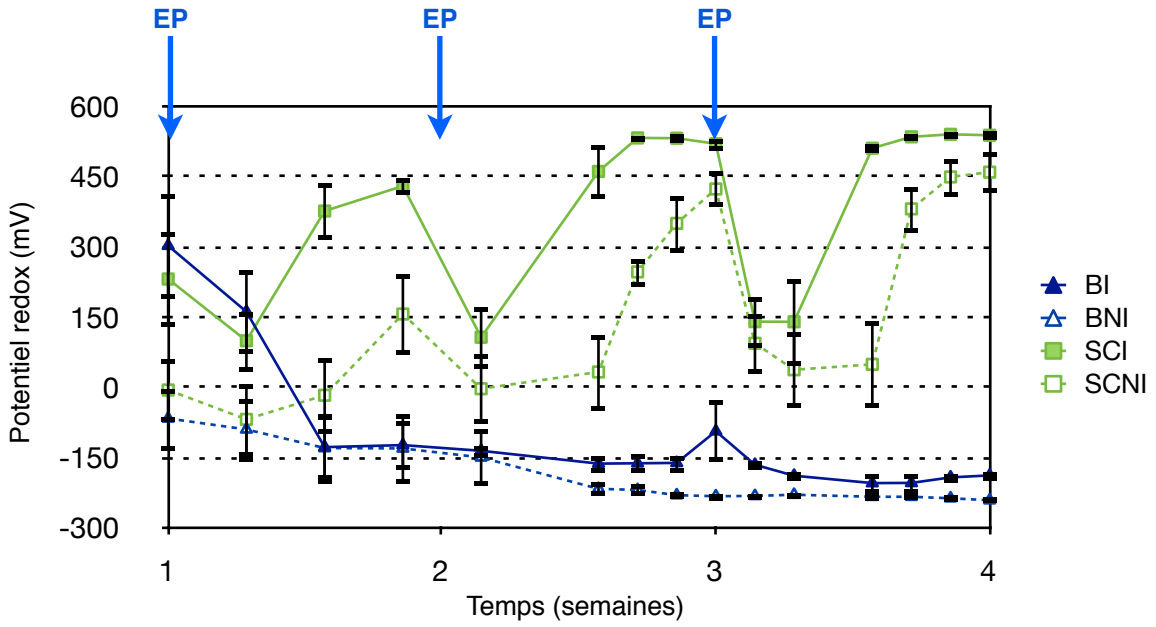



**Figure III.26 : Evolution du potentiel redox (Expérience V).**
Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1, t = 2 et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

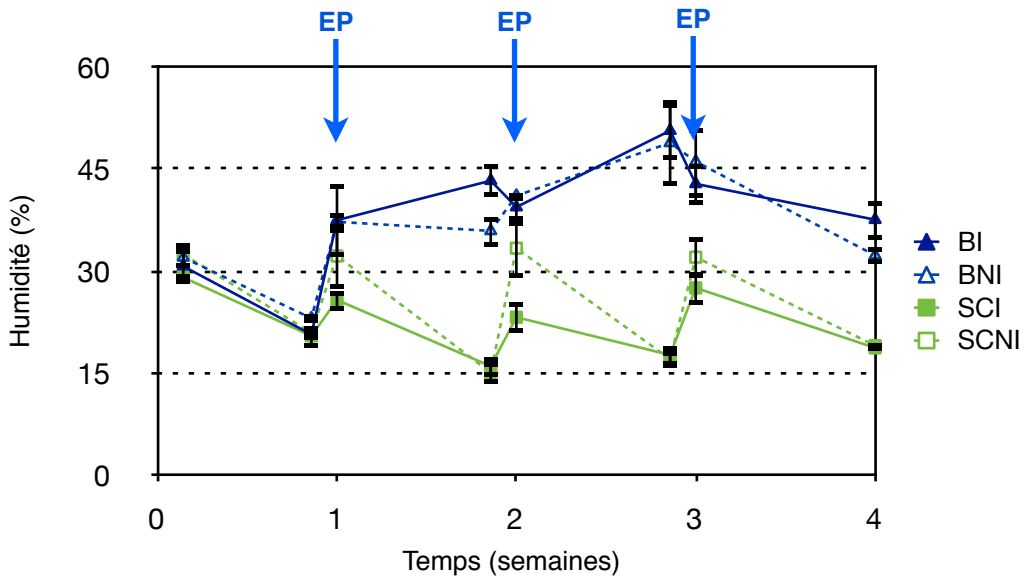



**Figure III.27 : Evolution de l'humidité (Expérience V).**
B : modalité batch, SC : modalité semi-continue ; I : modalité inoculée, NI : modalité non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1, t = 2 et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

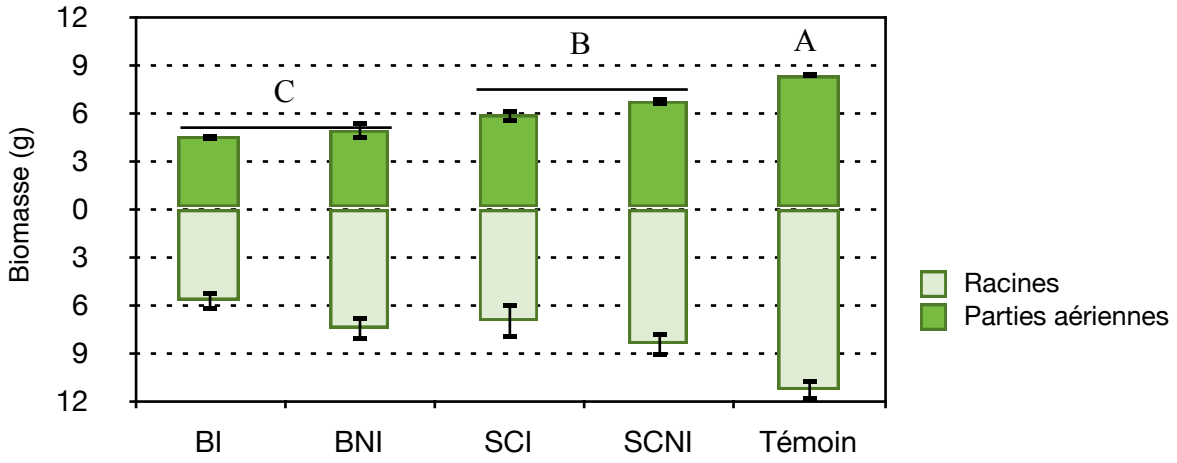



**Figure III.28 : Biomasse végétale fraîche récoltée à la fin de l'expérience (Expérience V).**
BI : modalité batch inoculée, BNI : modalité batch non-inoculée, SCI : modalité semi-continue inoculée, SCNI : modalité semi-continue non-inoculée. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

(BI, BNI, CI et CNI) et le témoin (plante dans du mélange sable-sédiment dans un régime batch), indiquant un effet des polluants.

La **population totale cultivable** est plus élevée en moyenne dans les modalités inoculées autant dans la modalité semi-continue que dans la modalité batch. La population initiale est moins élevée pour la modalité BNI probablement en raison d'un biais expérimental, les bacs étant tous équivalents du point de vue biologique à ce moment là de l'expérience. Pour chacun des régimes hydriques, la population de la modalité inoculée est significativement supérieure à celle de la modalité non inoculée, dans les deux cas à partir de la première semaine (figure III.29). L'augmentation significative de la population cultivable immédiatement après l'évènement pluvieux est due à l'inoculation. A $t_0$, pour les deux régimes hydriques, la première inoculation se traduit, comparée au témoin (8,4log{UFC.kg$^{-1}$}), par une hausse de population ($log_{pop}$ = 10,6log {UFC.kg$^{-1}$} pour le régime batch ; 10,4log{UFC.kg$^{-1}$} pour le régime semi-continu) qui se maintient jusqu'au premier évènement pluvieux pollué ($log_{pop}$ = 10,3log{UFC.kg$^{-1}$} pour le régime batch, 10,0log{UFC.kg$^{-1}$} pour le régime semi-continu). La surpopulation après évènement pollué ne se maintient qu'après le 3$^{e}$ et dernier évènement pour la modalité en semi-continu. Dans la modalité batch, la surpopulation de la modalité inoculée est visible à partir du 2$^{e}$ évènement mais ne se maintient pas à la fin de l'expérience.

La concentration en **glyphosate dans les eaux de sortie** est comprise entre 5,6 et 23mg.L$^{-1}$ (figure III.30.a), la concentration étant significativement plus faible dans le cas de la modalité inoculée. La concentration en **diuron** dans les eaux de sortie est comprise entre 2,3 et 6mg.L$^{-1}$, sans différence significative entre la modalité inoculée et la modalité non inoculée (figure III.30.b). La concentration en **3,4-DCA** dans les eaux de sortie est comprise entre 1,2 et 1,6mg.L$^{-1}$, sans différence significative entre la modalité inoculée et la modalité non inoculée (figure III.30.c). L'abattement en concentration du **glyphosate** dans l'effluent est compris entre 70 et 89% (respectivement 53 et 87%) pour la modalité inoculée (respectivement non inoculée), les différences étant significatives entre les modalités inoculées et non inoculées ; pour le **diuron**, il est compris entre 53 et 77% (respectivement 40 et 77%) pour la modalité inoculée (respectivement non inoculée) sans différence significative entre les modalités ; enfin pour le **3,4-DCA**, il est compris entre 86 et 88% (respectivement 85 et 86%) pour la modalité inoculée

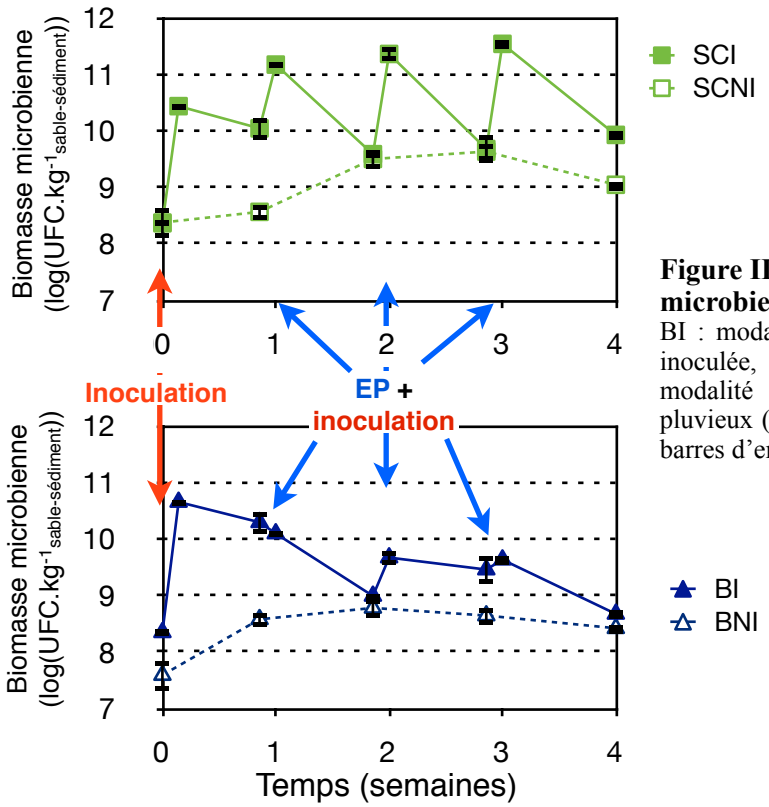



**Figure III.29 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience V).**
BI : modalité batch inoculée, BNI : modalité batch non inoculée, CI : modalité semi-continue inoculée, CNI : modalité semi-continue non inoculée. Les évènements pluvieux (EP)ont lieu aux temps t = 1, t = 1 et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

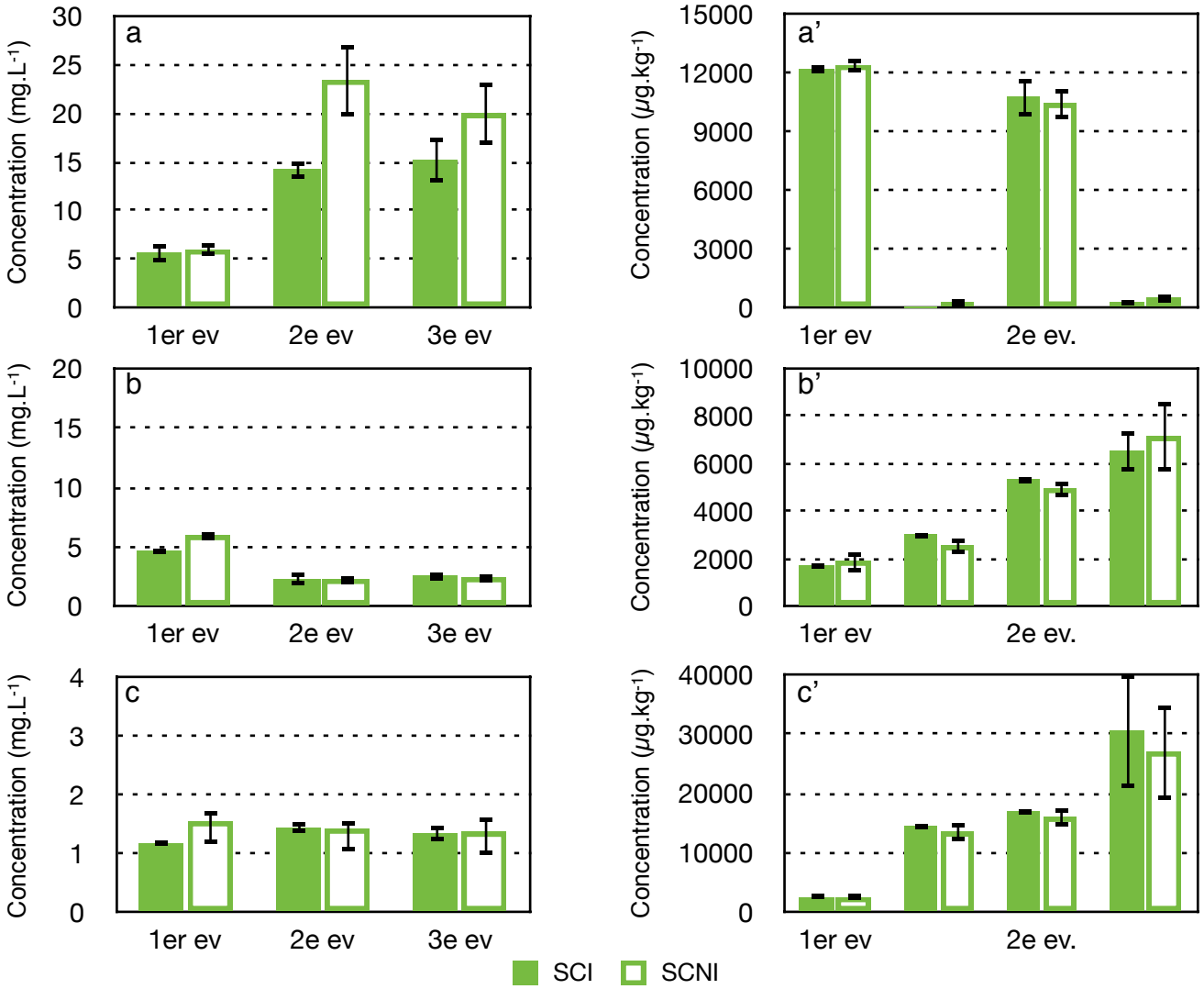



**Figure III.30 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience V).**
A gauche figure l'évolution des concentrations dans l'eau, à droite la concentration dans le mélange sable-sédiment. a, a' : glyphosate ; b, b' : diuron ; c, c' : 3,4-DCA. SCI : modalité semi-continue inoculée, SCNI : modalité semi-continue non inoculée. Le tf est prélevé une semaine après le dernier évènement pluvieux. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

(respectivement non inoculée) sans différence significative entre les modalités. Ces abattements sont calculés pour chaque évènement.

Il y a accumulation de **diuron** et de **3,4-DCA** dans le mélange sable-sédiment au cours de l'expérience, sans différence significative entre les modalités inoculées et non inoculées (figure III.30.b' et c'). Le temps d'une semaine entre chaque évènement ne semble donc pas suffisant pour qu'il y ait dissipation de ces polluants ; par contre pour le **glyphosate** la concentration diminue fortement une semaine après chaque évènement pluvieux (figure III.30.a'). Les concentrations mesurées pour le 3,4-DCA posent problème car elles dépassent le maximum apporté théorique (8000µg.kg$^{-1}$). Cette quantité correspond à celle que l'on devrait avoir dans le milieu sable-sédiment si la totalité du diuron était dégradé en 3,4-DCA, que la totalité du 3,4-DCA apporté restait intacte et que tout cela se sorbait complètement et de manière homogène sur la matrice. Il apparaît toutefois clairement que le diuron et le 3,4-DCA s'accumulent dans le mélange sable-sédiment, ce qui est probablement dû au temps trop court pour qu'il y ait une activité dégradante suffisante. En effet la quantité de consortium 106 présente dans le mélange sable-sédiment ne peut être mise en cause puisqu'une réinoculation est effectuée après chaque évènement pluvieux. On observe donc bien dans cet exemple que la quantité de biomasse n'est pas obligatoirement liée à l'activité dégradante. Il y a également accumulation du diuron et du 3,4-DCA dans la modalité batch (données non montrées).

La différence de régime hydrique s'accompagne d'une différence significative d'évolution du potentiel redox, la bioaugmentation répétée ayant en outre un effet significatif sur ce paramètre. La croissance des plantes est diminuée par la présence des polluants, quels que soit le régime hydrique ou la stratégie d'inoculation. La décroissance de la population totale même après des réinoculations multiples semble montrer que le milieu est limitant du point de vue des nutriments. Cela étant, l'effet du temps d'action semble être primordial pour le diuron et le 3,4-DCA puisque les polluants s'accumulent dans le mélange sable-sédiment malgré les réinoculations juste après chaque évènement pluvieux.

Expérience VI

Dans cette expérience, la réinoculation hebdomadaire est maintenue puisque l'on a observé lors de l'expérience précédente que cela était nécessaire pour maintenir le niveau de biomasse après bioaugmentation. Le temps d'action jouant *a priori* un rôle prépondérant dans la dégradation, un seul apport de polluants organiques a été effectué en début d'expérience et cinq semaines de temps d'action ont été allouées au système. De plus le temps de stockage dans les microcosmes passe de 4h à 6h afin d'améliorer les capacités de rétention du système et 100g de betterave ont été ajoutés à la sortie des bacs des modalités PI, NPI et PNI pour évaluer l'impact sur la rétention du cuivre en sortie de système {microcosme + betterave}, comparé avec la présence de 8g de pulpe en surface du mélange sable-sédiment lors des expériences précédentes. Dans la modalité témoin (NPNI) il n'y a de pulpe ni dans le bac, ni en sortie de bac. Enfin, le prélèvement final de sédiment s'est fait en distinguant un horizon supérieur et un horizon inférieur afin de mettre en évidence une éventuelle stratification verticale des polluants.

Le **potentiel redox** est influencé par les évènements pluvieux (figure III.31). Les différences entre modalités plantées et non-plantées ne sont pas significatives. Le milieu devient modérément réducteur à oxydant au bout de quelques jours, ce qui rejoint les résultats obtenus lors de l'expérience IV. L'**humidité** est réglée périodiquement à la même valeur, environ 12%, pour tous les bacs ce qui explique probablement le fait que le potentiel redox présente peu de différence d'une modalité à l'autre.

Aucune différence significative de **biomasse végétale** n'est observée entre les modalitées inoculées et celles non-inoculées (données non montrées), au niveau des parties aériennes comme des racines, ce qui rejoint les résultats de l'expérience IV. Ces résultats contredisent ceux de l'expérience V, cela étant probablement dû aux trois apports de polluants en trois semaines dans l'expérience V à comparer à un seul apport de polluants organiques lors de cette expérience.

**Population totale cultivable** (figure III.32) : les analyses menées entre le 21$^{ème}$ et le 35$^{ème}$ jour n'ont pas abouti en raison d'un problème de milieu utilisé dans la méthode NPP. Quelques observations peuvent néanmoins être faites : la biomasse microbienne est significativement supérieure dans la modalité inoculée mais aucune différence n'apparaît entre modalitées plantées et non plantées. Chaque augmentation de population consécutive à une inoculation est suivie par

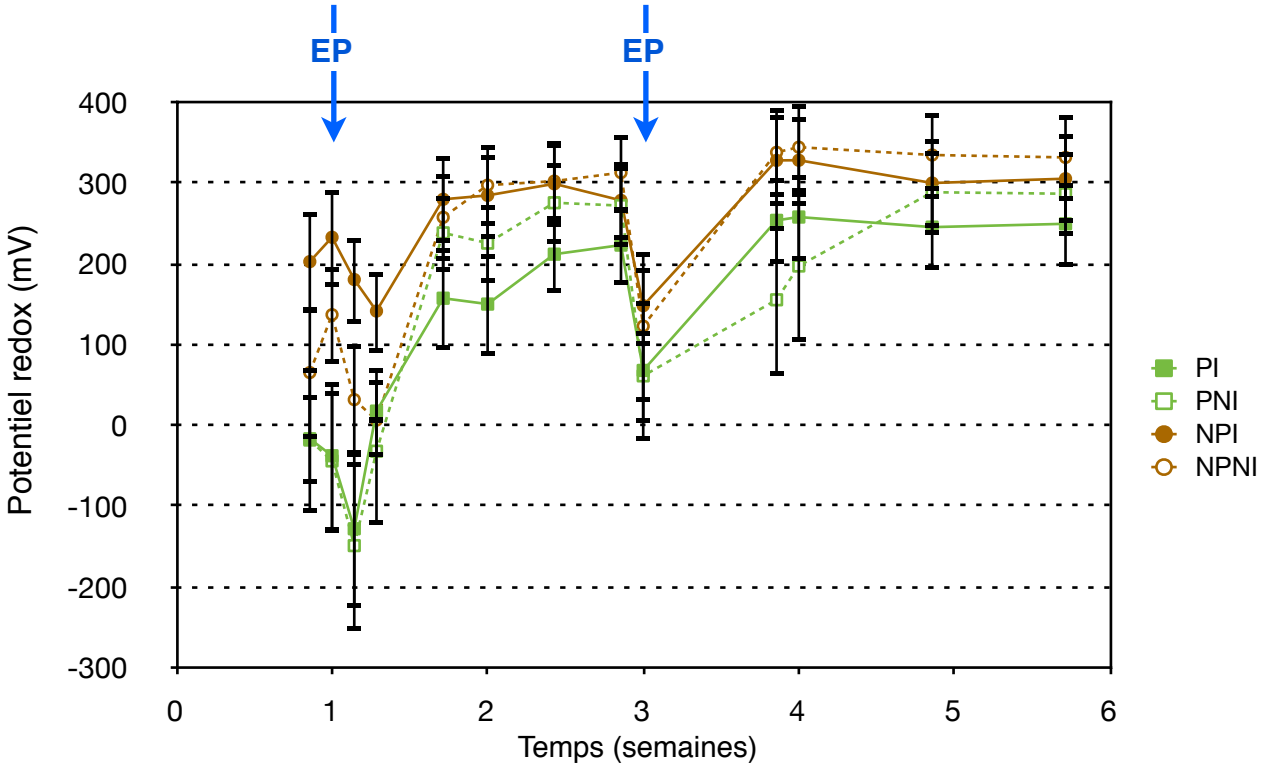



**Figure III.31 : Evolution du potentiel redox (Expérience VI).**
Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1 et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

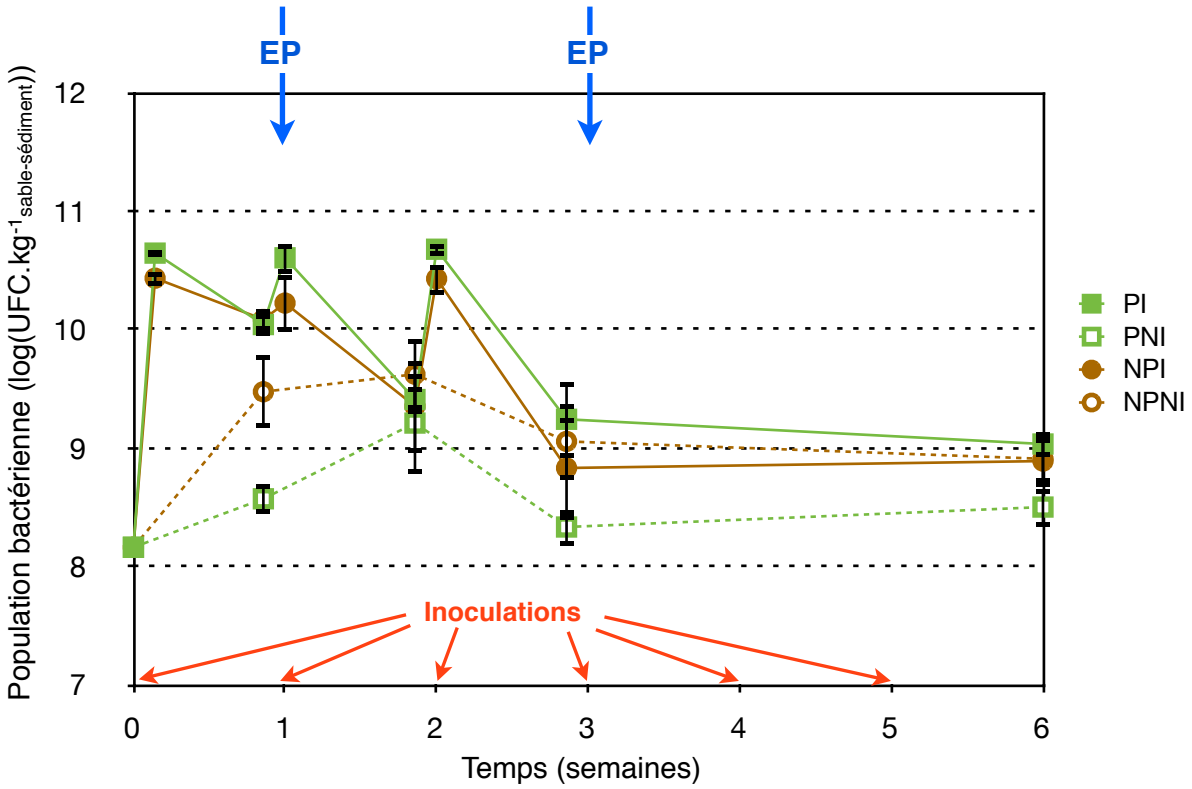



**Figure III.32 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience VI).**
PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1, et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

un déclin d'une amplitude comparable (-1log{UFC.kg$^{-1}$}) à celui observé dans l'expérience V pour les modalités semi-continues. A $t_0$, pour les deux régimes hydriques, la première inoculation se traduit, comparée au témoin, par une hausse de population ($log_{pop}$ = 10,6log{UFC.kg$^{-1}$} pour la modalité plantée, 10,4log{UFC.kg$^{-1}$} pour la modalité non-plantée) qui se maintient jusqu'au premier évènement pluvieux pollué ($log_{pop}$ = 10log{UFC.kg$^{-1}$} pour la modalité plantée, 10,1log {UFC.kg$^{-1}$} pour la modalité non-plantée). La population à la fin de l'expérience est comparable quelles que soient les modalités, de l'ordre de 8,8log{UFC.kg$^{-1}$}.

La concentration en **glyphosate dans les eaux de sortie** est comprise entre 14,8 et 17,3mg.L$^{-1}$ pour le 1$^{er}$ évènement et entre 0 et 0,7mg.L$^{-1}$ pour le 2$^{ème}$ évènement, dans chaque cas sans différence significative entre les modalités (figure III.33.a). Pour le diuron (figure III.33.b), la concentration dans l'eau de sortie est comprise entre 1,20 et 4mg.L$^{-1}$ pour le 1$^{er}$ évènement et entre 0,07 et 0,23mg.L$^{-1}$ pour le 2$^{ème}$ évènement. La concentration pour la modalité NPNI est significativement plus élevée que pour les autres modalités pour le 1$^{er}$ évènement et il n'y a pas de différence significative entre les modalités lors du 2$^{ème}$ évènement. Le résultat est le même pour le 3,4-DCA (figure III.33.c), la concentration dans l'eau de sortie est comprise entre 0,39 et 1,71mg.L$^{-1}$ pour le 1$^{er}$ évènement et entre 0 et 0,02mg.L$^{-1}$ pour le 2$^{ème}$ évènement. La concentration pour la modalité NPNI est significativement plus élevée que pour les autres modalités pour le 1$^{er}$ évènement et il n'y a pas de différence significative entre les modalités lors du 2$^{ème}$ évènement. La concentration plus élevée dans les eaux de sortie pour le témoin (modalité NPNI) par rapport aux autres modalités s'explique par l'absence de pulpe de betterave en sortie de bac pour cette modalité. On constate que la concentration en polluants lors du 2$^{ème}$ évènement est très faible pour tous les polluants, ce qui témoigne d'une absence de relargage, puisque l'eau apportée lors de cet évènement ne contenait pas de polluants organiques. Pour le glyphosate, les abattements correspondants pour le 1$^{er}$ évènement sont de 68,1% pour les modalités avec pulpe de betterave en sortie (PI, NPI et PNI) et de 67% pour la modalité sans betterave en sortie (NPNI). Pour le diuron, ils sont de 83,7% pour les modalités PI, NPI etPNI et de 63,6% pour la modalité NPNI. Enfin, pour le 3,4-DCA, ils sont de 95,2% pour les modalités PI, NPI etPNI et de 84,2% pour la modalité NPNI. On peut calculer un abattement moyen en prenant les concentrations apportées en entrée à l'événement 1 et celles en sortie à l'événement 2. On obtient

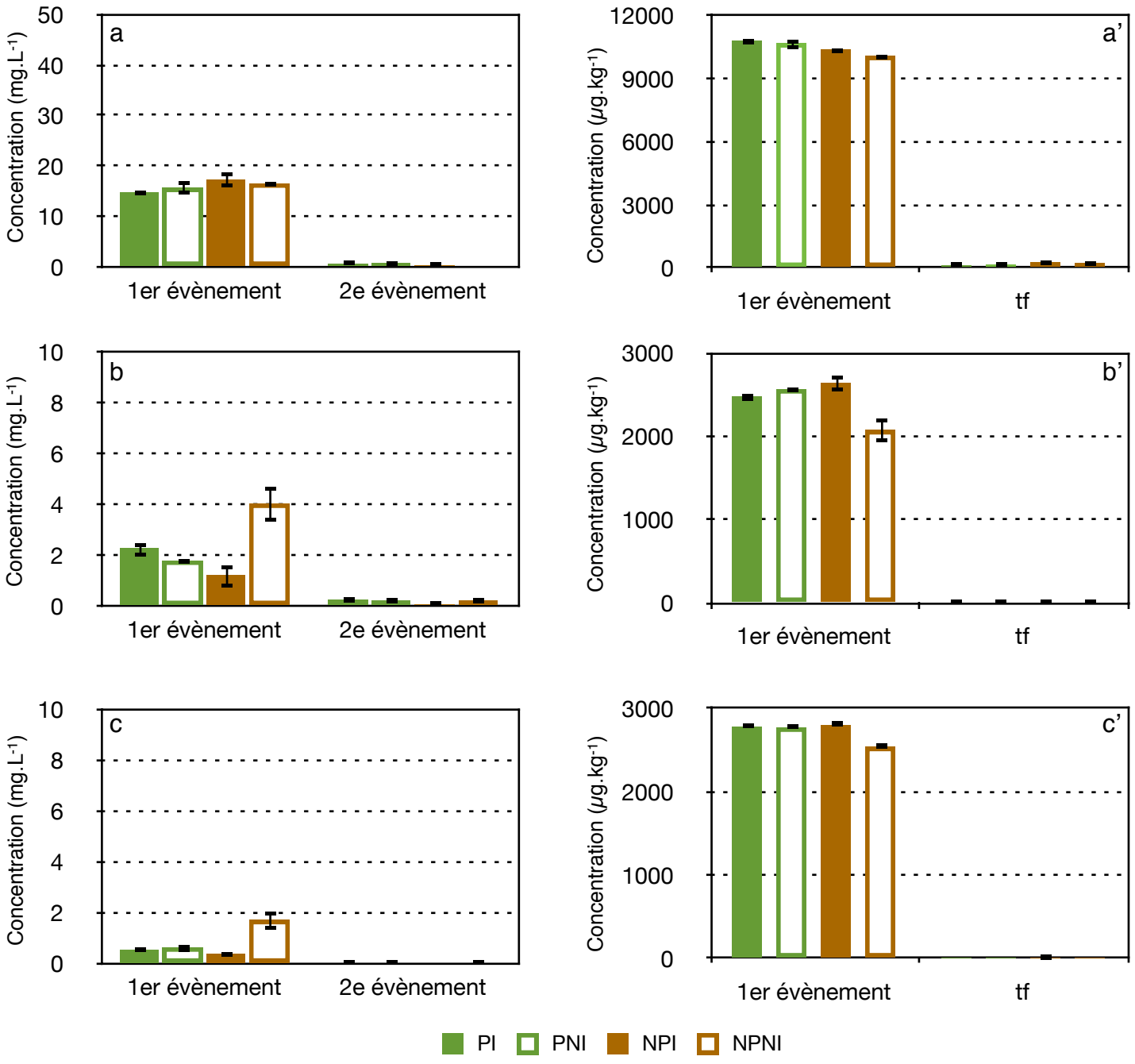



**Figure III.33 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience VI).**

a, a' : glyphosate ; b, b' : diuron ; c, c' : 3,4-DCA. PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Le $t_f$ est prélevé 5 semaines après le 1er évènement pluvieux. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

alors un abattement moyen sur une durée de 2 événements, qui est très élevé pour les 3 polluants (tableau III.18, voir page 151). On en conclut que si l'eau de sortie contient des polluants à la suite du premier événement, un nouvel apport d'eau (sans polluants) n'impliquera pas forcément la contamination de l'eau en sortie par phénomène de désorption, ou faiblement. En revanche la sorption s'est poursuivi entre le 1$^{er}$ et le 2$^{ème}$ événement, ce qui signifie que la rétention est stable.

La concentration moyenne en glyphosate dans le mélange sable-sédiment est comprise entre 0,05 et 0,18mg.kg$^{-1}$ sans différence significative entre les modalités (figure III.33.a'), ce qui correspond à un abattement supérieur à 99%. La concentration moyenne en diuron dans le mélange sable-sédiment est comprise entre 0,63 et 0,72mg.kg$^{-1}$ sans différence significative entre les modalités (figure III.33.b'). On remarque par contre une stratification verticale significative pour toutes les modalités, la concentration étant plus élevée dans l'horizon supérieur (données non montrées). La concentration du 3,4-DCA était inférieure à la limite de quantification de l'analyse pour tous les prélèvements (figure III.33.c'), nous prendrons donc cette limite (0,4mg.kg$^{-1}$) pour calculer la valeur de l'abattement (tableau III.16). Pour le calcul de l'abattement, nous appliquerons à tous les bacs la rétention calculée à partir du témoin, représentative de la quantité effectivement présente dans les microcosmes et disponible pour la dissipation. Le calcul est donc fait en supposant que la quantité de polluant retenue dans le mélange pour chaque modalité est la même que celle observée pour la modalité témoin (NPNI). On atteint alors environ 63% de dissipation pour le diuron et 84% pour le 3,4-DCA, sans différence significative entre les modalités.

## 3.2. Fonctionnement du système

Lors des étapes de sélection des matériaux sorbants et de l'inoculum bactérien, les systèmes d'étude étaient relativement simples, et les conditions expérimentales peu fluctuantes. Dans cette dernière étape de l'étude le système devient plus complexe et génère de la variabilité réduisant les possibilités d'apercevoir des différences entre les traitements ; les causes des évolutions constatées expérimentalement sont donc plus nombreuses et moins évidentes à

**Tableau III.16 : Abattement du diuron et du 3,4-DCA dans le mélange sable-sédiment (Expérience VI).**
Les abattements sont calculés entre le temps initial et le temps final. Les écarts indiqués sont les écarts-types. PI : planté inoculé ; NPI : non planté inoculé ; PNI : planté non inoculé ; NPNI : non planté non inoculé. Les lettres entre parenthèses indiquent les groupes de similitude ($P < 0,05$) déterminés par ANOVA.

| | PI | PNI | NPI | NPNI |
|---|---|---|---|---|
| **glyphosate** | 99,8 ± 0,0 (a) | 99,8 ± 0,0 (a) | 9962 ± 0,2 (a) | 99,6 ± 0,1 (a) |
| **diuron** | 65,8 ± 6,7 (a) | 63,0 ± 8,8 (a) | 64,5 ± 4,4 (a) | 63,2 ± 7,7 (a) |
| **3,4-DCA** | 84,2 ± 0,0 (a) | 84,2 ± 0,0 (a) | 83,7 ± 0,9 (a) | 84,2 ± 0,0 (a) |

discerner. Nous allons essayer d'apporter quelques éléments d'explication sur le fonctionnement du système, l'évolution des différents paramètres mesurés et les éventuels liens entre eux.

### *3.2.1. Paramètres physico-chimiques*

pH

Le **pH** du mélange sable-sédiment varie faiblement sur les expériences II, III et IV et des conditions hydriques (régime batch ou semi-continu) et biologiques (bioaugmentation ou non). Cependant la dynamique de ce paramètre diffère légèrement (expériences II, III et IV) sur la première semaine : une augmentation de 0,4 unités avant stabilisation se produit dans le mélange contrairement à une baisse (0,4-0,6 unités) dans la solution du mélange, correspondant probablement à l'équilibre entre les deux phases. La variation de pH est ensuite comprise dans l'intervalle [7,4 ; 7,6] pour la solution du mélange et dans l'intervalle [8,4 ; 8,6] pour le mélange. Ce résultat est partiellement surprenant au vu des espèces présentes en solution. En effet le diuron et le 3,4-DCA étant isoélectroniques (tableau I.6), ils ne peuvent participer de manière significative à la modification du pH. De même pour le cuivre, qui subit les effets du pH sans participer à sa modification (Du et coll. 1997, Alkan et Dogan 2001, Weng et coll. 2007). Par contre, le glyphosate possède plusieurs pKa ($pK_{a1}$ = 2, $pK_{a2}$ = 2,6, $pK_{a3}$ = 5,6 et $pK_{a4}$ = 10,6 ; SERA 2003) et serait susceptible de modifier le pH d'une solution ou d'une matrice solide de par sa présence dans l'une ou l'autre de ces matrices. On aurait pu penser que l'ajout de glyphosate à des concentrations croissantes, de $3.10^{-4}$mM dans l'expérience II à 0,3mM dans l'expérience IV, provoquerait une plus grande modification de pH au cours de l'expérience, malgré l'effet tampon dû au sol. Une étude de Morillo et coll. (2002) montre en effet que l'équilibrage d'une solution de cuivre et glyphosate avec un sol peut faire varier le pH de la solution de quelques dixièmes à 2 unités. Les concentrations en glyphosate et en cuivre dans cette dernière étude varient respectivement entre 0,5 et 2mM et entre 10 et 60mg.$L^{-1}$, soit des valeurs proches de celles que nous utilisons. La plus faible proportion de glyphosate dans nos expériences permettrait sans doute d'expliquer les faibles variations de pH observées, en plus du fait que le sol est un milieu très tamponné. Cette stabilité du pH est intéressante pour notre procédé ; en effet comme l'ont

montré De Jonge et De Jonge (1999) ou Farenhorst et ses collaborateurs dans une étude réalisée en 2009, la sorption du glyphosate dans un sol dépend fortement du pH. L'étude de Farenhorst et coll. (2009) montre que le $K_d$ du glyphosate peut varier d'un facteur 25 sur une amplitude de 2 unités pH pour le sol. Ainsi la stabilité du pH dans nos expériences explique très probablement la stabilité de la sorption du glyphosate. La sorption du diuron dépend moins des variations de pH : ainsi Yang et coll. (2004) ont observé une diminution de 5,5% de sa sorption sur du charbon pour un pH passant de 2,4 à 5,4. De plus Weber et coll. (2004) ont modélisé, à partir de 120 valeurs de $K_d$ et des caractéristiques des sols associés, la variation du $K_d$ du diuron par une équation, qui ne fait intervenir que la teneur en matière organique des sols, bien que le pH ait été pris en compte dans la modélisation. Mais la stabilité du pH revêt néanmoins une certaine importance, car elle peut modifier la protonation des sols, qui peut en retour modifier fortement la sorption des pesticides, même du diuron (Sheng et coll. 2005). La sorption du diuron dans un sol diminue en effet de 30% pour une augmentation de pH de 3 à 6, ce que les auteurs attribuent à la dissociation des groupements acides du sol. La stabilité du pH dans les phases liquide et solide est donc facteur direct ou indirect de stabilité de la sorption pour toutes les molécules étudiées.

Si le pH joue sur la sorption, il peut également affecter la dégradation des polluants par les microorganismes de deux façons différentes. Le premier effet concerne la biodisponibilité des polluants, qui peut être affectée par le pH en raison d'une sorption modifiée. Le second effet est physiologique : ainsi Bending et ses collaborateurs (2003) ont observé un optimum de pH à 7,5 pour la dégradation de l'isoproturon par des souches bactériennes dans un sol et en culture liquide. Pour Singh et coll. (2003), l'optimum de pH pour la dégradation du fenamiphos dans le sol est 7,5. Un pH de l'ordre de 7 est en effet considéré classiquement comme optimal pour la plupart des bactéries. Il est fort probable qu'il existe également pour le consortium 106 un optimum de pH pour la dégradation. En effet, dans un essai de culture du consortium 106 en milieu liquide à différents pH, la croissance est observée à pH 7 mais pas à pH 5 (Norini et Kremer 2009, communication personnelle). Il paraît clair qu'il ne peut y avoir dégradation s'il n'y a pas au moins croissance ; les valeurs de pH relevées dans les microcosmes laissent donc à penser au vu des données que le mélange sable-sédiment est propice, du point de vue de ce

paramètre, à la dégradation des polluants par les bactéries dont le consortium sélectionné est composé.

Eh

Le **potentiel redox** du système étudié peut varier fortement suivant les modalités en raison de l'apport continu ou discontinu d'eau, phénomène déjà mentionné dans des études sur l'évolution du caractère oxydo-réducteur d'une ZHA (Dusek et coll. 2008, Nikolausz et coll. 2008). Dans les cas de régime hydrique de type batch (lame d'eau permanente, expériences II et V), le système devient réducteur en quelques jours (< 5j), ce qui corrobore les résultats de Dusek et ses collaborateurs (2008) qui observent des évolutions de ce type en 1 à 2 jours et avec ceux de Nikolausz et ses collaborateurs (2008) qui les observent même en moins d'un jour. Les valeurs de potentiel redox atteignent dans notre étude des valeurs minimales autour de -250mV ce qui témoigne d'un milieu très réducteur et est légèrement plus élevé que dans les études citées ci-dessus, dans lesquelles l'Eh atteint -320/-420 mV, probablement en raison d'un emplacement différent des sondes ou d'une valeur initiale différente. Dans les cas de régime hydrique de type continu ou semi-continu (expériences III, IV, V et VI), les modifications du potentiel redox coïncident avec les évènements pluvieux et s'étalent sur des durées de l'ordre de 2 jours, ce qui est là encore en accord avec les études citées ci-dessus. La présence de plantes atténue significativement les variations d'Eh dues aux évènements pluvieux. Cet effet est probablement dû aux racines, qui retiennent l'eau après les évènements ce qui expliquerait une valeur maximale d'Eh inférieure dans les modalités plantées (figures III.22 et III.26), et à l'oxygène libéré dans la rhizosphère, *via* l'aérenchyme, ce qui permet de conserver un milieu moins réducteur (Armstrong et coll. 2000, Engloner et coll. 2008) lors des évènements pluvieux. La zone aérobie autour des racines de *P. australis* serait de 1cm selon certaines études (Armstrong et coll. 2000), de 1 à 4mm pour d'autres (Stottmeister et coll. 2003). Vu la précision spatiale ($\varnothing_{capteur}$ ~ 1cm) et l'emplacement de nos capteurs de mesure du potentiel redox (en deux endroits du bac), on peut en déduire que l'influence des plantes se fait sentir sur tout le bac ; ceci tendrait à indiquer une bonne colonisation du mélange sable-sédiment par les plantes. Le potentiel redox augmente significativement dans les modalités bioaugmentées lorsque l'inoculation est répétée après

chaque évènement pluvieux. Peut-être cet effet est-il dû à la population microbienne inoculée, qui peut dans certains cas influencer l'état redox d'un système (Thullner et coll. 2005). La concentration en polluants, elle, ne semble pas avoir d'effet sur le potentiel redox. Mais la variation de potentiel redox observée pourrait jouer un rôle important pour le cuivre, celui-ci précipitant en conditions réductrices (il est alors indisponible pour les plantes) et pouvant être remobilisé en conditions oxydantes ce qui entraîne des variations de rétention importantes de ce métal (Banas et coll. 2009).

L'alternance de conditions oxydantes et réductrices favorise l'installation de populations aérobies et anaérobies (Nikolausz et coll. 2008). Pour favoriser l'installation du consortium 106, sélectionné en conditions aérobies, on a donc tout intérêt à ce que les conditions soient le plus souvent possible oxydantes, d'autant plus que la dégradation est plus intense en milieu aérobie qu'en milieu anaérobie (Diels et Lookman 2007). En outre, une adaptation fonctionnelle de souches bactériennes à des conditions de potentiel redox variables a déjà été constatée (Pett-Ridge et coll. 2005) ; le consortium 106 ayant été lui-même isolé à partir de sédiment de ZHA sujet à de telles variations, il est donc susceptible de s'adapter. Cependant, même s'il survit en conditions microaérobies, voire anaérobies, il serait préférable de se placer en conditions aérobies, les voies de dégradation les plus efficaces pour les polluants étudiés étant aérobies (figure I.10). Une étude menée par Celis et coll. (2008) sur la dégradation d'un herbicide utilisé en agriculture (2,4-D) par de la biomasse habituée à ces produits rapporte à ce sujet que le temps de dégradation augmente de 30 à 70 jours entre la modalité aérobie et anaérobie. De plus la quantité maximale dégradée est plus importante en conditions aérobies avec 500mg.L$^{-1}$ dégradés contre 140mg.L$^{-1}$ en conditions anaérobies. Lors des évènements pluvieux, le système met environ trois jours à revenir à des valeurs de Eh pré-évènement, plus propices à une dégradation aérobie. Si l'évènement suivant a lieu une semaine après, les microorganismes n'auront que 4 jours pour dégrader efficacement les polluants. Le fait d'espacer les évènements pluvieux permet donc d'augmenter le temps de dégradation en conditions aérobies, ce qui devrait être bénéfique pour l'efficacité du système. A cet égard le rôle tampon de *P. australis* évoqué plus haut peut être intéressant, car il permettrait de garder des conditions physico-chimiques plus stables (cf. figure III.22, expérience IV) et de rester plus proche de conditions oxydantes lorsque le temps laissé

entre deux évènements pluvieux est suffisamment long – le mélange sable-sédiment de la modalité non-inoculée de l'expérience V ne peut être considéré comme oxydant que 2 jours sur 7 environ – ou qu'il y a inoculation (figure III.26). Si cela améliore en outre la survie des microorganismes par effet rhizosphère (Cunningham et coll. 2005, Wang et coll. 2009c), on comprend l'intérêt des plantes pour la bioremédiation.

Humidité

Lors des premières expériences, l'**humidité** est peu élevée et diminue durant l'expérience (expériences III et IV). La présence de plantes permet de maintenir une certaine humidité dans le mélange sable-sédiment, bien que l'effet ne soit plus significatif au bout de 6 semaines (expérience IV). La présence d'un évènement pluvieux initial sans polluant pour mettre tous les bacs à la même humidité (expériences IV et V) permet également de partir d'un mélange sable-sédiment plus humide ce qui assure de garder une certaine humidité. Enfin rapprocher les évènements pluvieux permet de limiter la diminution d'humidité : ainsi dans les expériences IV et V la seule différence au niveau hydrique est le temps entre les évènements pluvieux (2 semaines pour l'expérience IV, 1 pour la V), qui se reflète dans les valeurs d'humidité relevées : entre 2 et 5% au bout de 4 semaines (IV) et environ 20% au bout de 4 semaines (V). Or il peut être intéressant de garder une certaine humidité dans le sol (Fierer et Schimel 2002), comme le montre une étude de Iovieno et coll. réalisée en 2008. La croissance bactérienne dans le sol étudié est ainsi multipliée par 10 lorsque l'humidité dudit sol passe de 2 à 40%. Ainsi une certaine humidité dans notre mélange sable-sédiment ne doit pas générer de limitation à la croissance du consortium inoculé, surtout que l'on n'observe pas de changement significatif de la biomasse alors que l'humidité diminue (expérience IV). Le manque d'humidité peut également nuire à la dégradation des pesticides dans le sol (Shelton et Parkin 1991). Ainsi les temps de dégradation du fongicide metalaxyl-M et de l'insecticide lufenuron sont augmentés d'un facteur 1,5 à 5,4 suite à un cycle de séchage-réhumidification au cours duquel le sol a été maintenu à 1% d'humidité pendant 14 jours et a ensuite été réhumidifié jusqu'à 40% d'humidité (Pesaro et coll. 2004). La valeur d'humidité atteinte dans l'expérience V ne devrait donc pas poser de souci ; celle atteinte dans les modalités NP de l'expérience IV pourrait par contre avoir exercé un effet négatif sur la

dégradation des polluants. Cependant, cet assèchement important du sol pourrait avoir été amplifié en raison de la petite taille des microcosmes et du volume réduit de mélange sable-sédiment, augmentant artificiellement les pertes en eau et diminuant les performances de notre système. Au cours de l'expérience VI, l'humidité a été maintenue à une valeur d'environ 12%, ce qui semblerait donc propice à la croissance et à la dégradation des polluants. On remarque enfin que l'effet obtenu sur le potentiel redox sera inversé si l'on décide de maintenir plus d'humidité : il faut donc trouver un compromis permettant d'avoir un milieu suffisamment oxydant pour permettre des phénomènes de dégradation aérobie et humide à la fois, pour assurer la croissance des microorganismes.

### *3.2.2. Paramètres biologiques*

Végétation

La croissance des *P. australis* est plus faible lorsque le régime hydrique est de type batch, indépendamment de la bioaugmentation (cf. figure III.28). Ces plantes étant des macrophytes, la diminution de croissance observée pourrait être due aux polluants et à leur plus grande disponibilité pour la plante lorsqu'ils sont en solution dans la lame d'eau. Les plantes ne sont pas significativement affectées par la bioaugmentation, mais sont significativement affectées par la présence de polluants, lorsque l'intervalle de temps entre les évènements pluvieux diminue de deux à une semaine, et par le type de régime hydrique. Il est étonnant que l'inoculation n'ait pas d'effet positif sur la croissance des plantes. Le consortium inoculé est en effet constitué de différentes souches bactériennes (cf. § III.2.3.2.) répertoriées dans la littérature comme ayant un effet positif sur la croissance des plantes : *Arthrobacter* sp. (Egamberdiyeva 2005, Barriuso et coll. 2008), *Brevundimonas* (Barretti et coll. 2008, Prakamhang et coll. 2009), *Delftia acidovorans* (Tian et coll. 2009) et *Pseudomonas putida* (Meziane et coll. 2005, Kruijt et coll. 2009).

Microorganismes

Lorsqu'une lame d'eau est présente, l'effet de la **bioaugmentation** sur la microflore totale est significatif pendant au moins une semaine en l'absence de polluants, de même que l'amélioration apportée par la présence des plantes (expérience I). En revanche lorsque l'expérience est menée sur une durée plus longue (expérience IV), l'effet significatif de la bioaugmentation disparaît lorsqu'il n'y a qu'une seule inoculation. La réinoculation régulière (expériences V, VI) entraîne immédiatement après inoculation une surpopulation de l'ordre de 2log dans les modalités en régime semi-continu ; l'écart de population décroît ensuite vers 0 sauf au bout de 4 semaines, où la population dans les modalités inoculées est supérieure de 1log à celle dans les modalités non-inoculées, peut-être en raison de l'accumulation de nutriments que représente la biomasse inoculée. En l'absence d'analyses suffisamment fines pour nous permettre de distinguer le consortium 106 des autres populations du mélange sable-sédiment, nous ne pouvons affirmer que la surpopulation observée correspond à l'inoculum du consortium 106. Cela étant, il peut être intéressant de se demander quel paramètre est susceptible dans notre étude de contrôler le maintien de cette surpopulation.

Le pH, stable au cours de l'expérience à des valeurs compatibles avec la croissance de notre inoculum bactérien (cf. § III.3.2.1.), ne semble pas pouvoir jouer sur la pérennité de l'effet de surpopulation. L'humidité ne doit pas non plus influencer outre mesure l'effet d'augmentation de la population puisque sa variation dans l'expérience IV, qui caractérise un assèchement des bacs (tableau III.15), n'est pas suivie d'un effet particulier sur la population (figure III.24). Son effet dans les expériences V et VI n'est pas discernable puisque chaque modification de l'humidité par un évènement pluvieux s'accompagne d'une inoculation du consortium 106. De plus lors de ces expériences l'humidité se situe à des valeurs comprises entre 15 et 30% (respectivement 9 et 15%) pour l'expérience V (respectivement VI) qui ne sont pas problématiques pour des microorganismes (Iovieno et coll. 2008), d'autant plus que le potentiel hydrique doit être élevé et donc l'eau disponible en raison des 80% de sable constituant le mélange utilisé. De même que pour l'humidité, le potentiel redox ne semble pas pouvoir expliquer la variation de population cultivable totale observée dans l'expérience IV,

puisqu'aucune évolution significative de la population n'est constatée au cours de l'expérience (figure III.24) alors que le potentiel redox varie (figure III.22).

Les plantes ont un effet significatif sur la population totale lors de l'expérience I, probablement dû à l'effet rhizosphère qui permet d'augmenter la libération de nutriments par les racines de la plante (cf. § III.3.1.2.). Cette hypothèse ne se confirme cependant pas, puisqu'aucun effet significatif des plantes sur la population n'est observé lors de l'expérience IV. Ceci peut être dû à la mort de l'inoculum (van Veen et coll. 1997, Moran et coll. 2006, Fu et coll. 2009b).

L'effet de la tourbe n'est pas clairement établi : on constate en effet lors de l'expérience V (figure III.29) que la décroissance observée dans le régime batch après la première inoculation et avant le premier évènement pollué ($\Delta\log_{pop}$ = 0,3log{UFC.kg$^{-1}$}) est sensiblement la même que dans l'expérience I ($\Delta\log_{pop}$ = 0,4log{UFC.kg$^{-1}$}) (figure III.17). La tourbe avait été conservée lors de l'expérience I mais pas lors de l'expérience V : il semblerait donc que la tourbe n'ait pas d'effet significatif sur le déclin de la population dans les modalités batch.

De même, l'effet des polluants n'est pas clair : dans les modalités semi-continues de l'expérience V, l'arrivée de polluants au bout de 7 jours (1$^{er}$ évènement) se traduit par une plus grande diminution de la surpopulation comparée à la première semaine d'expérience (figure III. 29) avec une variation de population de 1,6log une semaine après chaque évènement pluvieux. On pourrait donc penser que les polluants, en forte concentration lors de ces évènements pluvieux (50mg.L$^{-1}$ de glyphosate, 37,5mg.L$^{-1}$ de cuivre et 10mg.L$^{-1}$ de diuron et 3,4-DCA), ont un effet négatif durable sur la surpopulation induite par la bioaugmentation. Les valeurs de population totale obtenues lors de l'expérience VI infirment pourtant cette hypothèse, puisqu'il n'y a qu'un apport de polluants organiques et que la décroissance de population totale est comparable (figure III.32) à celle de l'expérience V, avant le second apport de cuivre.

On peut donc distinguer globalement deux raisons de non-survie de l'inoculum : celles dues à la présence de polluants en quantités toxiques pour les microorganismes et celles dues au milieu. Ainsi une étude de Widada et coll. (2009) montre que la survie d'un inoculum dans un sol pollué à 100mg.kg$^{-1}$ de carbazole peut varier de 5 jours à 3 semaines suivant le type de sol. Parmi les raisons liées au milieu, la compétition interspécifique peut avoir une grande influence. Dans une étude de Blumenroth et coll. (1998), la survie d'un inoculum diminue ainsi de 10 semaines

dans un sédiment stérilisé à 1-5 semaines suivant le type de sédiment, non stérilisé. Cette compétition peut aussi être liée à la prédation par les protozoaires ou les phages. Une étude de Bouchez et coll. (2000) menée sur des boues activées en réacteur montre la disparition d'une proportion élevé de l'inoculum en 2 jours suite à la prédation par des protozoaires ; Fu et coll. (2009b) rapportent la diminution de l'inoculum en 3 jours suite à l'action de phages. La survie de l'inoculum pendant un certain temps est d'autant plus importante que son effet sur la dissipation peut ne se faire sentir qu'au bout d'un certain temps. Boon et coll. (2000) signalent notamment une période d'adaptation de l'inoculum de 6 jours avant la dégradation de 3-chloroaniline en 2 semaines dans des boues activées. Pour pallier la décroissance observée, la bioaugmentation répétée peut donner des résultats positifs (Newcombe et Crowley 1999, Lima et coll. 2009). Enfin un autre paramètre du milieu à prendre en compte est la quantité de nutriments présents et l'équilibre nutritionnel : dans notre cas, le mélange sable-sédiment présente un rapport C/N de 13,8, considéré comme convenable pour des microorganismes. Le fait que la hausse de population ne se maintienne pas lors de nos expériences n'est donc pas dû à un déséquilibre C/N mais plutôt à une quantité insuffisante de nutriments pour supporter une biomasse microbienne plus importante. Même l'apport de nutriments constitué par le consortium 106 en cas de mort de celui-ci lors des différentes réinoculations ne semble pas suffisant pour assurer l'établissement d'une surpopulation bactérienne cultivable. La combinaison des différents résultats obtenus lors de nos expériences tend à montrer que la décroissance de population observée n'est pas due aux paramètres physico-chimiques du système ou à la présence de polluants mais plutôt à la quantité de nutriments présents ou à une compétition interspécifique avec des bactéries non-cultivables ou d'autres types de microorganismes.

Conclusion : il ressort des résultats des différentes expériences que le pH varie très peu, en raison d'un milieu tamponné et de la présence en faible concentration d'espèces susceptibles de modifier le pH (glyphosate). Les variations observées du potentiel redox, dues aux évènements pluvieux, peuvent être importantes et sont tamponnées par la présence des plantes dans les microcosmes. Ces plantes permettent de conserver l'humidité du sol et sont plus affectées par le régime hydraulique appliqué que par la présence de polluants, quoique l'ajout de ces derniers à

intervalles de temps rapprochés influe négativement sur leur croissance. L'effet de surpopulation microbienne consécutif aux réinoculations successives ne se maintient pas dans le temps, probablement en raison d'une compétition interspécifique.

### *3.3. Efficacité du procédé*

L'objectif de notre procédé de dépollution est double : limiter les rejets de polluants en sortie du système d'une part et les dégrader une fois retenus dans le mélange sable-sédiment d'autre part. Afin d'évaluer au mieux l'efficacité du procédé il convient donc de l'analyser de ces deux points de vue. On analysera donc l'évolution des teneurs en polluants dans l'effluent, ce qui correspond au premier objectif, et dans le mélange sable-sédiment, ce qui correspond au second objectif. Pour quantifier ces évolutions, nous utiliserons les abattements, calculés en pourcentage de la concentration initiale en polluant. Ce calcul (cf. § II.2.3.2.) correspond aux valeurs en masse autant qu'en concentration. Nous choisissons d'utiliser les abattements et leur évolution plutôt que les concentrations car le calcul des abattements nous permet de normaliser les résultats obtenus et de s'affranchir des concentrations différentes sur certaines expériences. Précisons enfin que les diminutions de polluants observées sont dues soit à de la sorption soit à de la dégradation, puisque les polluants étudiés sont peu sujets à la volatilisation, que le glyphosate et le 3,4-DCA sont stables quel que soit le pH et que celui-ci, autour de 7,5, correspond au minimum de la constante de dégradation chimique du diuron ($0{,}02 j^{-1}$) (Salvestrini et coll. 2002).

#### *3.3.1. Évolution des teneurs en polluants dans les effluents*

Le phénomène de sorption s'opère en quelques heures alors que la biodégradation prend une semaine ou plus au vu des différentes expériences. L'efficacité de la rétention des polluants ne peut donc être évaluée en toute rigueur qu'à l'issue du premier événement pluvieux, c'est à dire après 4h ou 6h de présence des polluants dans le mélange sable-sédiment. Le seul phénomène contrôlant la quantité de polluants dans l'effluent est alors la capacité de sorption du système. Lors des évènements suivants, la quantité de polluants dans l'effluent dépend à la fois de

la capacité et de la vitesse de sorption du mélange sable-sédiment à la suite des différents apports de polluants lors des événements successifs, tout en déduisant les autres phénomènes inclus dans le terme générique de dissipation. Le terme d'abattement, prenant en compte des phénomènes physiques et biologiques, sera alors employé.

De très bons abattements sont observés au bout d'une semaine (tableau III.17) dans le système batch à des concentrations de l'ordre de la dizaine de $\mu g.L^{-1}$, sans différence significative pour le glyphosate entre les modalités inoculées ou non. Les différences obtenues ne permettent cependant pas de conclure à un effet marqué de la bioaugmentation car les différences restent ténues, qu'elles soient significatives ou non. Aux fortes concentrations (tableau III.18), l'efficacité moyenne du filtre lors des expériences IV et V est de (90,8 ± 4,5)% pour le glyphosate, (47,8 ± 5,7)% pour le diuron et (86,8 ± 1,6)% pour le 3,4-DCA (moyenne effectuée sur toutes les modalités et sur les deux expériences). L'efficacité augmente avec la capacité de sorption des molécules, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors de la sélection de matériaux sorbants. Les résultats pour le diuron sont comparables à ceux obtenus par Gonzales-Pradas et coll. (1998). En ajoutant de la tourbe à un sol calcaire, l'efficacité de sorption passe de 14,3% à 64,3%, pour une concentration intiale de $14mg.L^{-1}$. Landry et coll. (2004) après application d'une dose de $3,6kg.ha^{-1}$ de diuron ont eux trouvé une capacité de rétention de 96,8%, 88,2% et 81,2% sur 3 sols viticoles après 845mm de pluie en 5 jours. Enfin Margoum et coll. (2006) indiquent un abattement de l'ordre de 30% pour un sédiment. L'efficacité du système pour la rétention du diuron est donc bonne sans être excellente. Une efficacité de 99,9% a été atteinte pour le glyphosate par Landry et coll. (2005) dans un sol. Une autre étude réalisée par Mamy et coll. (2005) montre une efficacité de sorption de 80% pour du glyphosate dans trois sols à une concentration initiale de $5mg.L^{-1}$. L'efficacité du système pour le glyphosate est donc en accord avec les valeurs de la littérature. Pour le 3,4-DCA, une étude de Flores-Cespedes et coll. (2006) mentionne une efficacité de sorption de 85% sur un sol calcaire pour une concentration initiale de $10mg.L^{-1}$. Les valeurs que nous avons trouvées sont donc en accord avec la littérature. L'abattement du glyphosate et du 3,4-DCA reste important au cours des 3 évènements lors de l'expérience IV mais diminue pour le glyphosate lors de l'expérience V. Au contraire

**Tableau III.17 : Récapitulatif des abattements dans l'eau (Expérience II).**
Les abattements sont calculés au bout d'une semaine. Les encadrements indiqués sont les écarts-types. Les lettres entre parenthèses indiquent les groupes de similitude (P < 0,05) déterminés par ANOVA.

| | inoculé | non inoculé |
|---|---|---|
| **glyphosate** | 99,6 ± 0,0 % (a) | 99,2 ± 0,2 % (a) |
| **diuron** | 90,1 ± 1,3 % (b) | 93,5 ± 0,6 % (a) |
| **3,4-DCA** | 99,5 ± 0,1 % (a) | 99,2 ± 0,1% (b) |

**Tableau III.18 : Récapitulatif des abattements dans l'eau (Expériences IV, V et VI).**
Seuls les abattements des modalités plantées en régime semi-continu sont indiqués. Pour les expériences IV, V et le 1er évènement de l'expérience VI, les abattements sont calculés pour chaque évènement. Pour l'expérience VI, l'abattement pour le 2ème évènement est calculé en prenant en compte la quantité apportée au premier évènement. PI : planté inoculé ; NPI : non planté inoculé ; PNI : planté non inoculé ; NPNI : non planté non inoculé. Les encadrements indiqués sont les écarts-types. Les valeurs en gras correspondant à l'efficacité de sorption du filtre (cf. texte pour plus de précisions).

| | | IV | | V | | VI | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | I | NI | I | NI | PI, NPI, PNI | NPNI |
| **glyphosate** | **1er évènement** | **90,1 ± 3,0%** | **97,3 ± 2,1%** | **88,8 ± 3,1%** | **87,2 ± 2,1%** | **68,1 ± 4,3%** | **67,0 ± 1,4%** |
| | **2e évènement** | 90,9 ± 5,1% | 91,8 ± 3,4% | 71,4 ± 3,5% | 53,1 ± 12,9% | 98,9 ± 0,7% | 100,0 ± 0,0% |
| | **3e évènement** | 85,9 ± 4,9% | 83,0 ± 9,4% | 69,7 ± 7,9% | 60,0 ± 10,9% | - | - |
| **diuron** | **1er évènement** | **46,3 ± 9,5%** | **51,3 ± 34,6%** | **53,3 ± 3,2%** | **40,4 ± 6,5%** | **83,7 ± 6,1%** | **63,6 ± 10,9%** |
| | **2e évènement** | 69,2 ± 4,9% | 74,5 ± 16,0% | 77,2 ± 9,0% | 77,3 ± 6,4% | 98,5 ± 0,8% | 98,0 ± 1,4% |
| | **3e évènement** | -8,3 ± 27,6% | 8,1 ± 54,7% | 74,2 ± 7,0% | 75,9 ± 6,7% | - | - |
| **3,4-DCA** | **1er évènement** | **87,1 ± 3,5%** | **87,3 ± 9,8%** | **88,3 ± 0,3%** | **84,6 ± 3,0%** | **95,2 ± 1,7%** | **84,2 ± 5,8%** |
| | **2e évènement** | 95,6 ± 1,1% | 96,2 ± 0,8% | 85,6 ± 1,5% | 85,9 ± 2,7% | 99,9 ± 0,1% | 99,8 ± 0,2% |
| | **3e évènement** | 90,5 ± 2,5% | 92,2 ± 5,8% | 86,6 ± 2,3% | 86,4 ± 4,7% | - | - |

l'abattement du diuron ne se maintient pas dans le temps. C'est le polluant le plus problématique quant à l'efficacité du filtre physique, en raison du risque de désorption. On constate cependant que l'augmentation du temps de rétention (de 4h pour l'expérience V à 6h pour l'expérience VI) permet d'améliorer sensiblement l'efficacité de rétention du système, dans le cas du diuron notamment (tableau III.18), ce qui est d'autant plus intéressant que ce dernier était le moins retenu par le système lors des expériences précédentes. On note de plus que l'abattement reste satisfaisant pour les trois polluants, tout en ayant oté la tourbe. On remarque cependant, toujours dans l'expérience VI, un léger relargage des polluants lors du second évènement pluvieux, chargé en cuivre uniquement (< 0,5mg.$L^{-1}$ pour le glyphosate, < 0,3mg.$L^{-1}$ pour le diuron et < 0,04mg.$L^{-1}$ pour le 3,4-DCA). En outre l'augmentation du temps de rétention entre l'expérience III (circulation en continu) et l'expérience IV (1h30 de remplissage, 4h de stockage et 2h de vidange) a permis d'atteindre des abattements similaires (50% pour le diuron, 80% pour le 3,4-DCA) alors que les concentrations initiales en polluants ont été multipliées par 25. L'ajout de betterave en aval des bacs, pour les modalités PNI, NPI et PNI de l'expérience VI, permet également d'améliorer l'abattement pour le diuron et le 3,4-DCA (tableau III.18), ce qui est logique puisque l'on rajoute une étape de filtration. En revanche la betterave n'a pas d'effet sur l'abattement du glyphosate, dont le niveau est inférieur à celui obtenu lors des expériences IV et V. Ceci s'explique par la présence du cuivre en plus grande quantité dans la solution de départ comparée aux expériences IV et V (56mg.$L^{-1}$ contre 37,5mg.$L^{-1}$) : le cuivre et le glyphosate sont en effet en compétition pour la sorption et la complexation sur certains sols (Maqueda et coll. 1998). Ces résultats ne concordent pas avec les tests de sorption que nous avons menés en milieu liquide mais les concentrations employées étant différentes, il est difficile de conclure. Il paraît en tout cas plus pertinent de retenir pour le glyphosate la configuration de l'expérience V, qui témoigne d'un bon fonctionnement du filtre physique, pour l'évaluation de la capacité de dissipation du système.

En combinant un temps de stockage de 6h et les matériaux sorbants sélectionnés lors de la première étape, on arrive donc à un abattement d'environ 91% pour le glyphosate, 64% pour le diuron et 87% pour le 3,4-DCA. Une fois que les polluants sont ainsi retenus dans le système, on peut s'intéresser à leur dissipation.

### *3.3.2. Évolution des teneurs en polluants dans le mélange sable-sédiment*

Lors de l'expérience IV on observe une diminution de la **concentration** de tous les polluants une semaine après le premier évènement pluvieux (figure III.28), puis une augmentation significative du glyphosate et du 3,4-DCA une semaine après le second évènement. La présence de la tourbe nous empêchant de conclure, nous avons renouvelé l'expérience sans tourbe autour des plantes et avec un temps d'action réduit (une semaine) pour évaluer l'efficacité du procédé dans un temps relativement court. Les résultats sont contrastés, avec une concentration en glyphosate faible en fin d'expérience (figure III.30) et des concentrations en diuron et 3,4-DCA au contraire très élevées, qui témoignent sans doute à la fois d'un problème d'échantillonnage – probablement dû à une répartition non homogène de la molécule dans le mélange sable-sédiment ce qui peut engendrer des erreurs si l'échantillonnage n'est pas fait sur le mélange homogénéisé – et de l'accumulation des polluants dans la matrice solide. Ces concentrations n'en restent pas moins très élevées, représentant ainsi la quasi-totalité du diuron apporté et environ trois fois la quantité de 3,4-DCA. Ce résultat montre qu'une semaine est un temps trop court pour que les microorganismes puissent agir même si on réinocule régulièrement, toutes les semaines dans cette expérience, contre une fois au début de l'expérience IV. Ce phénomène de temps de traitement nécessaire dans les ZHA est déjà connu : ainsi après 11 semaines de traitement, Newcombe et Crowley (1999) obtiennent 72% de dégradation de 100mg.kg$^{-1}$ d'atrazine en faisant 8 inoculations, et 38% en en faisant 4. Dans une étude d'Haarstad et Braskerud (2005), 96% de dégradation des herbicides propachlor, linuron et metamitron, et des fongicides propiconazole, fenpropimorph, metribuzin et metalaxyl est obtenu au bout d'un an de traitement. Pour Anderson et coll. (2002), 70-80% de dégradation est obtenu en un mois pour de l'atrazine. Enfin, Runes et coll. (2001) obtiennent 100% de dégradation de l'atrazine en 30 jours. Il semble donc impossible d'obtenir la dégradation d'une telle dose de pesticides en si peu de temps, même avec l'aide d'un inoculum massif. Lors de l'expérience VI la tourbe a été otée mais 5 semaines ont été laissées au système pour agir. Après vidange, la concentration initiale en glyphosate (≈ 10mg.kg$^{-1}$) est inférieure à celles observées lors des expériences précédentes (≈ 12,5mg.kg$^{-1}$ pour l'expérience IV et ≈ 12mg.kg$^{-1}$ pour l'expérience

V), cela étant dû à la présence du cuivre en plus grande quantité (cf. ci-dessus). Pour le diuron, cette concentration est de 2mg.kg$^{-1}$ ce qui est supérieur aux expériences précédentes (≈ 1,3mg.kg$^{-1}$ pour l'expérience IV et ≈ 1,8mg.kg$^{-1}$ pour l'expérience V) tandis que pour le 3,4-DCA, cette concentration est de 2,5mg.kg$^{-1}$ ce qui est légèrement supérieur aux expériences précédentes (≈ 2,3mg.kg$^{-1}$ pour l'expérience IV et ≈ 2,4mg.kg$^{-1}$ pour l'expérience V). Pour les trois polluants on observe une baisse sensible de la concentration en fin d'expérience (figure III. 33), on peut donc en conclure qu'il y a dissipation de ces polluants dans notre système, sans toutefois que l'effet de la bioaugmentation soit significatif.

**Dissipation des polluants** : le récapitulatif des abattements dans le mélange sable-sédiment est présenté dans le tableau III.19. Pour l'expérience IV, il est calculé à partir de la concentration dans le mélange sable-sédiment une semaine après le second évènement pluvieux. Pour les expériences V et VI, il est calculé à partir de la valeur finale de la concentration dans le mélange sable-sédiment (1 semaine après le dernier apport d'eau dans le cas de l'expérience V, 3 semaines après le dernier apport d'eau dans le cas de l'expérience VI). La dissipation obtenue dans l'expérience IV est bonne pour tous les polluants, mais l'effet de la tourbe pourrait influer sur le résultat, de manière marginale probablement puisque la quantité de tourbe rapportée à la quantité du mélange sable-sédiment est très faible et que les polluants n'ont pas été plus en contact avec ce matériau qu'avec le sable-sédiment. Dans l'expérience V, l'emploi d'un temps d'action très court se traduit par des effets contrastés : très bonne dissipation du glyphosate mais résultats médiocres pour le diuron et le 3,4-DCA. Les valeurs de dissipation pour ces deux polluants redeviennent acceptables dans l'expérience VI. L'effet traitement est peu visible : la bioaugmentation, qu'elle soit faite uniquement en début d'expérience (expérience IV) ou renouvelée toutes les semaines (expériences V et VI) ne produit donc pas d'effet significatif. Ceci peut s'expliquer par le fait que la microflore du mélange sable-sédiment est probablement bien adaptée aux polluants ; en effet le sédiment du mélange étant issu du BO, il a été exposé aux polluants. C'est également le matériau dont nous sommes partis pour la sélection de souches : il contient donc les espèces bactériennes composant le consortium 106 bien qu'elles y soient en plus faible proportion. La diminution de la quantité dissipée après le 2$^{ème}$ évènement pour tous les polluants pourrait être due à l'accumulation des polluants et à l'absence d'une dissipation

**Tableau III.19 : Récapitulatif des abattements dans le mélange sable-sédiment (Expériences IV, V et VI).**

Seuls les abattements des modalités en régime semi-continu sont indiqués. Pour l'expérience IV, l'abattement est calculé entre le temps initial et une semaine après le 2ème évènement. Pour les expériences V et VI, l'abattement est calculé entre le temps initial et le temps final. PI : planté inoculé ; NPI : non planté inoculé ; PNI : planté non inoculé ; NPNI : non planté non inoculé. Les encadrements indiqués sont les écarts-types. La manière de les calculer est indiquée dans le texte.

| | Expérience / Modalité | IV | V | VI |
|---|---|---|---|---|
| **glyphosate** | **PI** | 87,7 ± 13,6% | 99,3 ± 0,5% | 99,8 ± 0,0% |
| | **NPI** | 85,1 ± 18,9% | - | 99,6 ± 0,2% |
| | **PNI** | 90,2 ± 6,5% | 98,6 ± 1,0% | 99,8 ± 0,0% |
| | **NPNI** | 94,4 ± 1,7% | - | 99,6 ± 0,1% |
| **diuron** | **PI** | 81,4 ± 6,3% | 2,2 ± 23% | 65,8 ± 6,7% |
| | **NPI** | 88,2 ± 9,5% | - | 64,5 ± 4,4% |
| | **PNI** | 83,3 ± 6,1% | -1,0 ± 38% | 63,0 ± 8,8% |
| | **NPNI** | 84,0 ± 4,6% | - | 63,2 ± 7,7% |
| **3,4-DCA** | **PI** | 71,5 ± 14,8% | -305 ± 180% | 84,2 ± 0,0% |
| | **NPI** | 81,5 ± 9,0% | - | 83,7 ± 0,9% |
| | **PNI** | 70,7 ± 0,6% | -252 ± 155% | 84,2 ± 0,0% |
| | **NPNI** | 76,1 ± 5,6% | - | 84,2 ± 0,0% |

suffisante (expériences IV et V). En revanche l'influence du temps d'action sur la dissipation est indéniable, ce qui se voit notamment sur la dissipation du 3,4-DCA, supérieure dans l'expérience VI à celle obtenue dans l'expérience IV, pour laquelle le temps d'action maximum était de 3 semaines. Notons que ce temps d'action permet au système d'être plus longtemps oxydant et qu'il donne ainsi plus de temps à une dissipation efficace de la part des microorganismes présents dans le mélange sable-sédiment.

**Synthèse** : d'un point de vue physico-chimique, la stabilité du pH observée dans le système fait que ce paramètre n'a pas d'influence sur le système. La forte variation du potentiel redox qui est observée est due aux divers évènements pluvieux reproduisant en cela les ZHA réelles. L'effet stabilisateur de *P. australis* sur le potentiel d'oxydoréduction est également confirmé dans cette étude mais entraîne curieusement une baisse du potentiel redox, comparé aux modalités non plantées, probablement en raison d'un maintien de l'humidité au niveau des racines dont l'effet sur la baisse d'Eh n'est pas contrebalancé par l'apport d'oxygène racinaire ; ceci pourrait être dû à la non-saturation du milieu qui rend négligeable l'effet de l'oxygène dégagé par les racines. D'un point de vue biologique, les plantes n'ont pas d'effet significatif sur la population bactérienne cultivable totale au sein des microcosmes. De plus, la hausse de population entraînée par les inoculations successives ne se maintient pas, en général, dans les différentes expériences : la diminution de population totale constatée pourrait provenir d'une compétition interspécifique (sans que cela ait été prouvé), ou d'une quantité limité de nutriment, le rapport C/N du mélange étant adapté à la croissance microbienne. Le temps de stockage est un paramètre important pour le rôle de filtre physique des microcosmes, le passage de ce temps de 4 à 6 h permettant d'augmenter l'abattement du diuron dans les eaux de sortie de 10%. La dissipation des polluants constatée dans les microcosmes n'est pas due à la bioaugmentation (amélioration non significative de la dissipation dans le cas de modalités inoculées) mais est significativement influencée par le temps d'action dans le cas du diuron et du 3,4-DCA. On constate dans le meilleur des cas une dissipation dans le mélange du sable-sédiment de 99% pour le glyphosate, 84% pour le 3,4-DCA et 65% pour le diuron.

# CONCLUSION & PERSPECTIVES

# CONCLUSION - PERSPECTIVES

Le traitement des sédiments des bassins versants viticoles stockés dans les bassins d'orage (BO) et des eaux qui y transitent devrait être une obligation règlementaire. En effet, l'atténuation naturelle variable qui s'opère au sein de ces ouvrages hydrauliques se traduit par des valeurs de concentration dans les eaux de sortie régulièrement au-dessus des seuils règlementaires. Le temps de rétention des contaminants dans le BO, souvent inférieur au temps nécessaire aux organismes vivants, dont la composante microbienne, pour traiter la pollution explique le manque d'efficacité souvent observée. Par ailleurs, les organismes présents ne sont pas toujours très efficaces face à la pollution rencontrée. Différentes techniques de traitement existent, dont des techniques biologiques telle que la bioaugmentation qui, associée à la présence de plantes, pourrait contribuer à stimuler et entretenir l'action des microorganismes introduits dans des environnements en constante évolution. La bioaugmentation repose sur l'utilisation de microorganismes compétents parfois absents des milieux à traiter, ou dont l'abondance est trop faible.

Dans le cas du bassin versant viticole auquel nous faisons référence (Rouffach, Haut-Rhin), la pollution est multiple car constituée à la fois de produits organiques et de produits contenant des éléments traces métalliques, en particulier du sulfate de cuivre, épandus lors des traitements phytopharmaceutiques. De plus la diversité physico-chimique des produits employés est grande, ce qui augmente la difficulté du traitement, un seul microorganisme pouvant rarement dégrader plusieurs classes de produits organiques et de surcroît contribuer à faciliter la phytoextraction des métaux du sol. Enfin, l'environnement dans lequel doit être réalisée la dépollution n'est pas idéal (milieu plutôt oligotrophe, conditions physico-chimiques variables). Les verrous que ce travail avait pour ambition de lever étaient donc multiples :

- d'une part assurer un temps de rétention des contaminants dans le le BO compatible avec un traitement biologique de la pollution ;

- d'autre part traiter une pollution multiple, à base de deux herbicides de propriétés physico-chimiques différentes (le glyphosate et le diuron), d'un de leur métabolite de dégradation (3,4-DCA) et d'un métal (le cuivre) ;
- enfin de tester en microcosmes un système de traitement par bioaugmentation en présence ou non de macrophytes (*Phragmites australis*) dans un milieu aux conditions proches de celles du BO. Une contrainte annexe était de proposer un système de traitement plutôt rustique, pour des raisons de coût, de facilité de mise en œuvre et de gestion lorsqu'un tel système serait mis en œuvre en conditions réelles.

Afin d'assurer un temps de rétention suffisant, des matériaux sorbants ont été testés parmi une série de matériaux simples : la pulpe de betterave, les rafles de maïs brutes et les cendres de rafles de maïs, la perlite, la vermiculite, le sable et le sédiment. Les cendres de rafles de maïs appartiennent à la large famille des charbons actifs, dont l'efficacité de sorption pour les différents polluants s'est avérée être la meilleure dans notre étude. Cependant la volonté de mettre au point un procédé aussi rustique que possible nous a conduit à considérer les autres matériaux d'autant plus que la vitesse se sorption n'était pas la plus élevée. Un test « classique » de sorption réalisé avec matériau sorbant dans de l'EUP en présence d'un polluant seul aurait alors conduit à choisir le sable pour les trois molécules étudiées. Cependant des tests réalisés dans des matrices de complexité croissante (EUP, EBO et enfin ES) avec des polluants seuls ou en mélange montrent que les capacités de sorption des différents matériaux dépendent à la fois de la matrice considérée et du nombre de polluants en présence dans la solution, tout en sachant que les fortes concentrations employées exacerbent probablement les phénomènes de sorption compétitive. Le même test réalisé en milieu complexe, l'ES, avec les 4 polluants en mélange nous a fait choisir le sédiment pour le glyphosate, le sable pour le diuron et la betterave ou les rafles de maïs pour le 3,4-DCA. Pour ce dernier, le sable donne des performances de sorption similaires et présente l'avantage d'être présent dans le BO auquel fait référence cette étude, dont le filtre a été réalisé dans ce matériau lors d'un réaménagement récent. La simplicité voulue pour le procédé nous a donc conduit à choisir ce matériau pour le 3,4-DCA.

Pour pouvoir traiter la polycontamination, une sélection de souches bactériennes performantes pour la dégradation a été réalisée par des techniques classiques de cultures d'enrichissement en milieu pollué, l'idée étant de faire de la bioaugmentation avec la souche sélectionnée. Afin d'éviter une cause classique d'échec de cette technique, à savoir la sélection de souches inadaptées à l'environnement dans lequel elles sont inoculées, nous avons sélectionné des isolats issus du sédiment du BO dans lequel ils étaient destinés à être réintroduits. Par ailleurs, notre sélection s'est basée certes sur les capacités de tolérance et de dissipation des polluants mais aussi sur quelques critères écologiques, notamment la stratégie de croissance et l'origine rhizosphérique ou non des isolats. Les capacités de tolérance aux polluants et de dissipation ne semblent pas être liées à l'origine géographique des prélèvements réalisés à partir du sédiment du BO, mais se sont avérées être fortement variables selon le polluant. Le milieu dans lequel l'isolat devait être réintroduit étant par définition changeant et sujet à des arrivées ponctuelles de grandes quantités de polluants, nous avons décidé de conserver un isolat à stratégie de croissance rapide, qui présente de bonnes capacités de dissipation des polluants organiques et complexe par ailleurs le cuivre. Cet isolat est en fait un consortium de plusieurs bactéries, ce qui n'est finalement pas surprenant au regard de la diversité des capacités métaboliques requises. Ceci pose néanmoins plusieurs questions, notamment sur la stabilité de ce dernier et sur les possibilités de son suivi une fois inoculé dans le milieu.

La mise au point du procédé de dépollution en conditions semi-contrôlées, dans des microcosmes reproduisant à l'échelle le BO auquel se réfère l'étude, a permis de mettre en évidence l'importance de certains paramètres dans la réussite d'un tel procédé de dépollution. Ainsi l'adaptation du temps de stockage de l'eau lors d'un évènement pluvieux simulé (passage de 4 à 6h) permet-il de trouver relativement facilement des performances de rétention analogues à celles obtenues lors des tests de sorption (91% pour le glyphosate, 87% pour le 3,4-DCA et 64% pour le diuron). De plus le temps laissé au procédé une fois la rétention effectuée est un paramètre d'importance. L'allongement du temps d'action de une à 5 semaines permet d'obtenir de bonnes performances de dissipation qui varient cependant entre les polluants (99% du glyphosate, 84% du 3,4-DCA et 65% du diuron dissipé). De fortes variations de potentiel redox

ont été observées ce qui est intéressant pour comparer le fonctionnement des microcosmes avec celui du BO d'étude, dans lequel ce paramètre est également fortement variable. De manière assez surprenante, l'inoculation régulière et massive du consortium sélectionné ne s'est traduite par aucun effet significatif sur la dissipation des polluants, au mieux une tendance à l'amélioration pour le diuron. Sachant que les caractéristiques physico-chimiques du mélange sable-sédiment, notamment son rapport C/N (13,8) sont compatibles avec la croissance microbienne, ceci amène à se demander si la quantité globale de substrats ne serait pas insuffisante pour supporter l'entretien d'une biomasse microbienne supplémentaire.

Ce travail a permis d'obtenir un certain nombre de résultats et ainsi d'apporter des éléments de compréhension sur la dépollution par bioaugmentation en présence ou non de plantes dans une ZHA modèle. Un certain nombre de points soulevés lors de ce travail pourraient être le point de départ de travaux ultérieurs, dont par exemple :

- faire des expériences en logettes avec un temps d'action plus long et un seul apport de polluants organiques pour voir si la tendance à une meilleure dissipation du diuron qui a été observée lorsque la bioaugmentation devient significative ;
- mettre au point un suivi des populations du consortium (FISH pour la visualisation de populations particulières, qPCR pour la quantification de ces populations) pour déterminer s'il y a survie ou pas et la dynamique des populations au sein du consortium ;
- si la non-survie est avérée, en déterminer les causes (carence en nutriments, compétition interspécifique ?). Si une carence nutritionnelle est avérée, il pourrait être intéressant d'apporter des nutriments afin de maintenir la biomasse supplémentaire apportée par bioaugmentation ;
- mener une étude de bioaugmentation dans les mêmes conditions avec des souches à stratégie de croissance lente, pour voir si le paramètre-clé de l'efficacité du procédé est l'adaptation au système oligotrophe ou la capacité métabolique ponctuelle ;
- faire des expériences en microcosmes à différentes températures pour évaluer la variation saisonnière des performances de dépollution, et anticiper ainsi sur le comportement du procédé en ZHA ;

- faire des expériences en microcosmes à des concentrations en polluants plus faibles pour évaluer l'effet de la diminution des interactions entre polluants sur la sorption ;
- réaliser des expériences de bioaugmentation du consortium 106 dans un sol sans historique de pollution au glyphosate, diuron et 3,4-DCA ; on pourrait ainsi évaluer l'effet des populations indigènes sur la dissipation observée en logettes, étude qui pourrait être affinée par la recherche des gènes de dégradation des polluants et/ou par l'étude de leur expression dans le sédiment. Cette expérience permettrait d'expliquer pourquoi les témoins non bioaugmentés dans l'expérience en logettes présentent également de bonnes performances de dissipation et peut-être mettre alors en évidence dans ce cas l'intérêt de la bioaugmentation;
- mettre au point un suivi du fractionnement isotopique des polluants (13C) dans des matrices complexes pour déterminer des signatures isotopiques spécifiques de chaque phénomène (sorption, dégradation) et affiner ainsi le suivi de la dégradation.

# ANNEXES

# ANNEXES

## Annexe 1 : NORMES DE QUALITÉ ENVIRONNEMENTALE POUR LES SUBSTANCES PRIORITAIRES ET CERTAINS AUTRES POLLUANTS (Annexe 1 à la DIRECTIVE 2008/105/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2008)

L 348/92 FR Journal officiel de l'Union européenne 24.12.2008

*ANNEXE I*

**NORMES DE QUALITÉ ENVIRONNEMENTALE POUR LES SUBSTANCES PRIORITAIRES ET CERTAINS AUTRES POLLUANTS**

PARTIE A: NORMES DE QUALITÉ ENVIRONNEMENTALE (NQE)

MA: moyenne annuelle.

CMA: concentration maximale admissible.

Unité: [µg/l].

| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N° | Nom de la substance | Numéro CAS (1) | NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (3) | NQE-MA (2) Autres eaux de surface | NQE CMA (4) Eaux de surface intérieures (3) | NQE CMA (4) Autres eaux de surface |
| (1) | Alachlore | 15972-60-8 | 0,3 | 0,3 | 0,7 | 0,7 |
| (2) | Anthracène | 120-12-7 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,4 |
| (3) | Atrazine | 1912-24-9 | 0,6 | 0,6 | 2,0 | 2,0 |
| (4) | Benzène | 71-43-2 | 10 | 8 | 50 | 50 |
| (5) | Diphényléthers bromés (5) | 32534-81-9 | 0,0005 | 0,0002 | sans objet | sans objet |
| (6) | Cadmium et ses composés (suivant les classes de dureté de l'eau) (6) | 7440-43-9 | ≤ 0,08 (classe 1)<br>0,08 (classe 2)<br>0,09 (classe 3)<br>0,15 (classe 4)<br>0,25 (classe 5) | 0,2 | ≤ 0,45 (classe 1)<br>0,45 (classe 2)<br>0,6 (classe 3)<br>0,9 (classe 4)<br>1,5 (classe 5) | ≤ 0,45 (classe 1)<br>0,45 (classe 2)<br>0,6 (classe 3)<br>0,9 (classe 4)<br>1,5 (classe 5) |
| (6 *bis*) | Tétrachlorure de carbone (7) | 56-23-5 | 12 | 12 | sans objet | sans objet |
| (7) | Chloroalcanes C10-13 | 85535-84-8 | 0,4 | 0,4 | 1,4 | 1,4 |
| (8) | Chlorfenvinphos | 470-90-6 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 |
| (9) | Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos) | 2921-88-2 | 0,03 | 0,03 | 0,1 | 0,1 |
| (9 *bis*) | Pesticides cyclodiènes:<br>Aldrine (7)<br>Dieldrine (7)<br>Endrine (7)<br>Isodrine (7) | <br>309-00-2<br>60-57-1<br>72-20-8<br>465-73-6 | Σ = 0,01 | Σ = 0,005 | sans objet | sans objet |
| (9 ter) | DDT total (7) (8) | sans objet | 0,025 | 0,025 | sans objet | sans objet |
| | para-para-DDT (7) | 50-29-3 | 0,01 | 0,01 | sans objet | sans objet |
| (10) | 1,2-Dichloroéthane | 107-06-2 | 10 | 10 | sans objet | sans objet |
| (11) | Dichlorométhane | 75-09-2 | 20 | 20 | sans objet | sans objet |
| (12) | Di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP) | 117-81-7 | 1,3 | 1,3 | sans objet | sans objet |
| (13) | Diuron | 330-54-1 | 0,2 | 0,2 | 1,8 | 1,8 |
| (14) | Endosulfan | 115-29-7 | 0,005 | 0,0005 | 0,01 | 0,004 |
| (15) | Fluoranthène | 206-44-0 | 0,1 | 0,1 | 1 | 1 |
| (16) | Hexachlorobenzène | 118-74-1 | 0,01 (9) | 0,01 (9) | 0,05 | 0,05 |
| (17) | Hexachlorobutadiène | 87-68-3 | 0,1 (9) | 0,1 (9) | 0,6 | 0,6 |
| (18) | Hexachlorocyclohexane | 608-73-1 | 0,02 | 0,002 | 0,04 | 0,02 |

| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N° | Nom de la substance | Numéro CAS (1) | NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (3) | NQE-MA (2) Autres eaux de surface | NQE CMA (4) Eaux de surface intérieures (3) | NQE CMA (4) Autres eaux de surface |
| (19) | Isoproturon | 34123-59-6 | 0,3 | 0,3 | 1,0 | 1,0 |
| (20) | Plomb et ses composés | 7439-92-1 | 7,2 | 7,2 | sans objet | sans objet |
| (21) | Mercure et ses composés | 7439-97-6 | 0,05 (9) | 0,05 (9) | 0,07 | 0,07 |
| (22) | Naphthalène | 91-20-3 | 2,4 | 1,2 | sans objet | sans objet |
| (23) | Nickel et ses composés | 7440-02-0 | 20 | 20 | sans objet | sans objet |
| (24) | Nonylphénol (4-nonylphénol) | 104-40-5 | 0,3 | 0,3 | 2,0 | 2,0 |
| (25) | Octylphénol (4-(1,1', 3,3' - tétraméthylbutyl)-phénol)) | 140-66-9 | 0,1 | 0,01 | sans objet | sans objet |
| (26) | Pentachlorobenzène | 608-93-5 | 0,007 | 0,0007 | sans objet | sans objet |
| (27) | Pentachlorophénol | 87-86-5 | 0,4 | 0,4 | 1 | 1 |
| (28) | Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (10) | sans objet | sans objet | sans objet | sans objet | sans objet |
| | Benzo(a)pyrène | 50-32-8 | 0,05 | 0,05 | 0,1 | 0,1 |
| | Benzo(b)fluoranthène | 205-99-2 | Σ = 0,03 | Σ = 0,03 | sans objet | sans objet |
| | Benzo(k)fluoranthène | 207-08-9 | | | | |
| | Benzo(g,h,i)perylène | 191-24-2 | Σ = 0,002 | Σ = 0,002 | sans objet | sans objet |
| | Indeno(1,2,3-cd)pyrène | 193-39-5 | | | | |
| (29) | Simazine | 122-34-9 | 1 | 1 | 4 | 4 |
| (29 *bis*) | Tétrachloroéthylène (7) | 127-18-4 | 10 | 10 | sans objet | sans objet |
| (29 *ter*) | Trichloroéthylène (7) | 79-01-6 | 10 | 10 | sans objet | sans objet |
| (30) | Composés du tributylétain (tributylétain-cation) | 36643-28-4 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0015 | 0,0015 |
| (31) | Trichlorobenzènes | 12002-48-1 | 0,4 | 0,4 | sans objet | sans objet |
| (32) | Trichlorométhane | 67-66-3 | 2,5 | 2,5 | sans objet | sans objet |
| (33) | Trifluraline | 1582-09-8 | 0,03 | 0,03 | sans objet | sans objet |

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.

(2) Ce paramètre est la NQE exprimée en valeur moyenne annuelle (NQE-MA). Sauf indication contraire, il s'applique à la concentration totale de tous les isomères.

(3) Les eaux de surface intérieures comprennent les rivières et les lacs et les masses d'eau artificielles ou sérieusement modifiées qui y sont reliées.

(4) Ce paramètre est la norme de qualité environnementale exprimée en concentration maximale admissible (NQE-CMA). Lorsque les NQE-CMA sont indiquées comme étant «sans objet», les valeurs retenues pour les NQE-MA sont considérées comme assurant une protection contre les pics de pollution à court terme dans les rejets continus, dans la mesure où elles sont nettement inférieures à celles définies sur la base de la toxicité aiguë.

(5) Pour le groupe de substances prioritaires «diphényléthers bromés» (n° 5) retenu dans la décision n° 2455/2001/CE, une NQE n'est établie que pour les numéros des congénères 28, 47, 99, 100, 153 et 154.

(6) Pour le cadmium et ses composés (n° 6), les valeurs retenues pour les NQE varient en fonction de la dureté de l'eau telle que définie suivant les cinq classes suivantes: classe 1: < 40 mg $CaCO_3$/l, classe 2: 40 à < 50 mg $CaCO_3$/l, classe 3: 50 à < 100 mg $CaCO_3$/l, classe 4: 100 à < 200 mg $CaCO_3$/l et classe 5: ≥ 200 mg $CaCO_3$/l.

(7) Cette substance n'est pas une substance prioritaire mais un des autres polluants pour lesquels les NQE sont identiques à celles définies dans la législation qui s'appliquait avant le 13 janvier 2009.

(8) Le DDT total comprend la somme des isomères suivants: 1,1,1-trichloro-2,2 bis (p chlorophényl) éthane (numéro CAS 50-29-3; numéro UE 200-024-3); 1,1,1-trichloro-2 (o chlorophényl)-2-(p-chlorophényl) éthane (numéro CAS 789-02-6; numéro UE 212 332 5); 1,1 dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl) éthylène (numéro CAS 72 55-9; numéro UE 200-784 6); et 1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl) éthane (numéro CAS 72 54-8; numéro UE 200-783-0).

(9) Si les États membres n'appliquent pas les NQE pour le biote, ils instaurent des NQE plus strictes pour l'eau afin de garantir un niveau de protection identique à celui assuré par les NQE applicables au biote fixées à l'article 3, paragraphe 2 de la présente directive. Ils notifient à la Commission et aux autres États membres, par l'intermédiaire du comité visé à l'article 21 de la directive 2000/60/CE, les raisons motivant le recours à cette approche et les fondements de ce recours, les autres NQE établies pour l'eau, y compris les données et la méthode sur la base desquelles les autres NQE ont été définies, et les catégories d'eau de surface auxquelles elles s'appliqueraient.

(10) Pour le groupe de substances prioritaires «hydrocarbures aromatiques polycycliques» (HAP) (n° 28), chacune des différentes NQE est applicable, c'est-à-dire que la NQE pour le benzo(a)pyrène, la NQE pour la somme du benzo(b)fluoranthène et du benzo(k)fluoranthène et la NQE pour la somme du benzo(g,h,i)perylène et de l'indéno(1,2,3-cd)pyrène doivent être respectées.

## Annexe 2 : Liste des produits épandus sur le BV en 2004 (Domange 2005)

| | | | |
|---|---|---|---|
| alkyl polysacharrides | simazine | flufenoxuron | oryzalin |
| myclobutanil | huile de pétrole | diuron | Kresoxim-methyl |
| sulfosate | dimethomorphe | methidathion | mancozebe |
| flusilazol | fenoxycarbe | pyraclostrobine | thyocyanate d'ammonium |
| tetraconazole | hexaconazole | glufosinate | aminotriazole |
| diquat | azoxystrobine | spiroxamine | cymoxanil |
| famoxadone | dinocap | vinchlozoline | metirame-zinc |
| lufenuron | flumioxazine | quinoxyfen | glyphosate |
| tebuconazole | terbuthylazine | fenhexamid | folpel |
| paraquat | thiodicarbe | pyrimethanil | Fosétyl-Al |

# Annexe 3 : Données complémentaires RISA

## *Composition du mix PCR pour un échantillon*

| | |
|---|---|
| Tampon (×10) | 2,5µL |
| MgCl2 (25mM) | 2,5µL |
| dNTP (25mM) | 0,25µL |
| ITSF (20µM) | 0,25µL |
| ITSR (20µM) | 0,25µL |
| Taq (5U.µL$^{-1}$) | 0,3µL |
| $H_2O$ qsp | 25µL |
| ADN | 25 à 50ng |

## *Programme du thermocycleur*

| Température | Durée | Nombre de cycles |
|---|---|---|
| 94°C | 3 minutes | 1 |
| 94°C | 45 secondes | |
| 55°C | 1 minute | 30 |
| 72°C | 2 minutes | |
| 72°C | 7 minutes | 1 |

## *Amorces utilisées*

| Nom | Séquence (5' → 3') | $T_m$ |
|---|---|---|
| ITSF | GTCGTAACAAGGTAGCCGTA | 60°C |
| ITSR | GCCAAGGCATCCACC | 50°C |

**Annexe 4 : Protocole TTGE et séquençage**

# 1. Amplification par Polymerase Chaine Reaction (PCR) de l'ADN ribosomique bactérien

Les amorces universelles utilisées 1401r et 968f amplifient un fragment de la région (V6-V8) 16S de l'ADN ribosomique bactérien (475 paires de bases) (Felske et coll. 1998 ; Heuer et coll. 1999).

Une séquence de 40 paires de bases riche en guanine et cytosine (riche en GC) (GC-968f) est ajoutée à l'amorce 968f afin d'éviter la dénaturation complète de la molécule lors de l'utilisation des fragments amplifiés en TTGE. L'amplification de l'ADN ribosomique bactérien avec les amorces 1401r et GC-968f donne alors un fragment de 475 paires de bases.

**Amorces :**
**GC-968f (968-984) :** 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'.
**1401r (1385-1401) :** 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'.

N.B. : Toutes les manipulations doivent être réalisées dans la glace. Tous les produits sont aliquotés et conservés à -20°C (sauf le DMSO). Tout le matériel en contact avec les échantillons doit être stérile.

## 1.1. Composition du milieu réactionnel d'amplification par PCR

| | Molarité | Volume (µL) |
|---|---|---|
| Tampon 10x | TRIS-HCl 50mM<br>KCl 10mM<br>$(NH_4)SO_4$ 5mM | 5 |
| $MgCl_2$ | 25mM | 3 |
| dNTP | 10mM | 1 |
| Amorce 1401r | 20µM | 0,5 |
| Amorce GC-968f | 20µM | 0,5 |
| BSA 3% | $3mg.mL^{-1}$ | 2 |
| DMSO | | 1,5 |
| Taq polymerase (Faststart Roche) | $5U.\mu L^{-1}$ | 0,4 |
| Echantillon | | 1 |
| Eau stérile | qsp | 35,1 |
| **Volume réactionnel final** | | **50** |

## 1.2. Programme d'amplification par PCR

Thermocycleur utilisé : Mycycler Thermalcycler, Biorad

| Etape | Température | Durée | Nombre de cycles |
|---|---|---|---|
| Dénaturation | 94°C | 5 minutes | 1 |
| Amplification | 94°C | 40 secondes | 38 |
| | 56°C | 30 secondes | |
| | 72°C | 1 minute | |
| Elongation finale | 72°C | 5 minutes | 1 |

## 1.3. Préparation des gels d'agarose

La qualité et la quantité de l'ADN obtenu après extraction ou après amplification par PCR sont analysées par électrophorèse sur gel d'agarose.

### *1.3.1. Préparation du gel*

- Les gels d'agarose 1% w/v sont préparés avec 1g d'agarose dans 100mL de tampon TAE 1×
- La dissolution de l'agarose dans le TAE se réalise en chauffant le mélange quelques minutes au four micro-ondes (ne pas utiliser la puissance maximale)
- Placer le mélange d'agarose dissout dans le tampon TAE 1× préalablement refroidi (sinon le dispositif en plastique se dilate) dans le dispositif contenant du bromure d'éthidium (BET) 0,5mg.$l^{-1}$
- La polymérisation du gel prend de 20 à 40min.

### *1.3.2. Dépôt des échantillons d'ADN amplifiés par PCR*

- Les puits sont remplis avec 5-10µL d'échantillon en mélange avec 2µL de tampon de charge 6× (Ce tampon de charge permet à l'échantillon de tomber au fond des puits du gel, la densité de ce tampon est moins importante que celui utilisé en TTGE)
- Au moins un puits contient 1µL de marqueur de taille, 2µL de tampon de charge 6× et 4-9µL d'eau distillée (pour avoir le même volume final dans chacun des puits, cela évite la distorsion de la migration)

### *1.3.3. Conditions de migration des échantillons sur gel d'agarose*

- Bain de TAE 1X
- Courant constant : 120-130V
- Durée : 20-30min

*1.3.4. Révélation des gels d'agarose*

Observer et numériser sous lumière UV (Geldoc, BIORAD).

# 2. Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE)

Le système d'électrophorèse par TTGE utilisé est le Dcode (Universel Mutation Detection System, Biorad).

Le gradient de température permettant la séparation des doubles brins d'ADN est déterminé à l'aide du logiciel DNA Melting Profil analysis Software (version 2.0, Biorad).

Les concentrations du gel de polyacrylamide ainsi que les conditions de migration ont été adaptées d'après les instructions trouvées dans « The Dcode universal mutation detection system ».

## 2.1. Préparation du dispositif d'électrophorèse

Au préalable :
- Nettoyer l'ensemble du matériel à l'eau savonneuse ou au détergent
- Rincer à l'eau claire
- Rincer à l'eau distillée
- Rincer à l'éthanol 70% (pour aider le séchage et éviter les traces)
- Nettoyer avec un papier qui ne fait pas de trace avec de l'isopropanol

Les plaques en verre doivent absolument être propres et lisses.
L'ensemble du matériel doit être sec avant le montage du dispositif.

## 2.2. Préparation du gel d'acrylamide partiellement dénaturant

*2.2.1. Préparation du gel*

- Peser 14,4g d'urée (8M) dans un tube plastique de type Falcon de 50mL
- Ajuster à 20mL avec de l'eau distillée
- Placer le tube dans un Becher contenant de l'eau bouillante pour faciliter la dissolution (eau distillée + urée = réaction endothermique)
- Agiter au Vortex régulièrement pour faciliter la dissolution
- Ajouter 0,6mL de glycérol
- Ajouter 0,75mL de tampon TAE 50×
- Ajouter 6mL de la solution d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5:1) (6% acrylamide)
- Ajuster le volume final à 30mL avec de l'eau distillée
- Filtrer la solution à 0,45µm (pas forcément nécessaire, à voir selon usage)

- Laisser refroidir la solution en l'incubant dans de la glace (l'étape suivante va permettre la polymérisation du gel qui se fera d'autant plus vite que la préparation est chaude)
- Ajouter les catalyseurs de polymérisation : en premier 300µL de persulfate d'ammonium (APS) puis 30µL de TEMED
- Placer le peigne, en éliminant les bulles (sinon le fond des puits ne sera pas linéaire et la migration se fera mal)
- Mettre des morceaux de scotch pour tenir le peigne afin qui se trouve correctement placé contre la grande plaque de verre
- Laisser polymériser le gel 1 heure à température ambiante
- Enlever le peigne et rincer les puits trois fois à avec du tampon TAE 1,25× pour éliminer tous les résidus d'urée
- Placer le dispositif contenant le gel polymérisé dans la cuve d'électrophorèse contenant un bain de TAE 1,25× à la température de début de migration

*2.2.2. Dépôt des échantillons d'ADN amplifiés par PCR*

Selon la quantité d'ADN obtenu par amplification par PCR on peut déposer de 5 à 10µL d'extrait dans chacun des puits en mélange avec du tampon de charge 2× (la quantité sera déterminé lors de l'analyse des produits de PCR sur gel d'agarose). L'ensemble des mélanges se fait au préalable, avant de les placer dans les puits du gel. Le chargement des échantillons dans le gel se fait de préférence lorsque le gel est déjà dans la cuve qui contient 7L de TAE 1,25× (le gel peut s'acclimater à la température, pas de risque de faire sortir les échantillons des puits en immergeant le dispositif dans la cuve).

Un gel d'acrylamide pour la TTGE comporte 20 puits.

- Les deux pistes des extrémités contiennent un mélange contenant autant d'eau distillée que de tampon de charge 2× (v/v) pour éviter un effet de bord (on remplit ces puits quand même pour qu'il n'y ait pas distorsion du gel) (1$^{er}$, 2$^{ème}$, 19$^{ème}$ et 20$^{ème}$ puits)
- Le 3ème, 10ème et 18ème puits contiennent 1-3µL de marqueur de taille (selon la quantité d'ADN des extraits et la quantité d'extrait), de l'eau distillée et du tampon de charge 2×. La quantité de tampon de charge est égale à la quantité de marqueur de taille plus la quantité d'eau distillée. La présence de marqueur de taille permettra de redresser les photographies de gel lors de l'analyse de ce dernier (le marqueur de taille sert de marqueur de redressement)
- Les autres puits contiennent un mélange contenant autant d'extrait de PCR que de tampon de charge 2× (v/v)
- Il est important d'avoir la même quantité de tampon de charge dans chacun des puits : en effet, comme ce dernier a une densité plus importante que l'eau ou les échantillons (c'est grâce et cette densité que les échantillons peuvent tomber au fond des puits) sa présence en quantité égale permet d'éviter les distorsions lors de la migration de l'ADN. Ainsi, quelle que soit la quantité d'extrait utilisé il faut adapter le volume du tampon de charge et, dans le cas des marqueurs de taille, jouer sur la quantité d'eau afin que tout les puits du gel contiennent le même volume final

*2.2.3. Conditions de migrations des échantillons*

- Tension constante : 100V
- Température initiale : 57°C
- Température finale : 64°C
- Incrément de température : selon le degré de séparation souhaitée donc soit 0,5°C par heure (soit 14h) soit 1°C par heure (bandes moins discriminées)

*2.2.4. Révélation des gels d'acrylamide*

- Placer les gels dans un bain de SybrGold (Invitrogen, Molecular Probes) (25µL dans 250mL eau) pendant 30min
- Observer et numériser sous lumière UV (Geldoc, BIORAD)
- Si les gels doivent être utilisés par la suite (découpe des bandes pour le séquençage), il est indispensable de les placer 30min dans un bain d'eau distillée pour rinçage

# 3. Analyse des gels obtenus par TTGE

Les résultats obtenus pourront faire l'objet d'analyses statistique par dendrogramme (StatBox) ou ACP (ADE4) (Thioulouse et coll. 1997).

## 3.1. Séquençage

Les bandes majoritaires obtenues par TTGE ont été découpées du gel d'acrylamide et placées dans 25µL d'eau distillée stérile.

Les échantillons subissent une série de congélation/décongélation (pour rompre le maillage d'acrylamide)

L'ADN est amplifié avec le couple d'amorces 1401r et 968f (cette fois il ne faut pas de queue GC, qui empêcherait le séquençage).

**Amorces :**
**GC-968f (968-984) :** 5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'.
**1401r (1385-1401) :** 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'.

La composition du mélange réactionnel et les conditions d'amplification sont les même que pour la PCR réalisée pour la TTGE (voir plus haut).

L'ADN obtenu est purifié grâce au kit commercial High PureTM PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostic) selon le protocole fourni par le fabriquant.

Le séquençage a été réalisé par MWG Biotech (Courtaboeuf, France) à partir de 75ng d'ADN obtenu par ré-amplification.

### 3.2.Analyse des séquences

Les séquences identifiées sont comparées aux banques de données (National Center for Biotechnology Informatic, NCBI) à l'aide du logiciel BLAST-N (Basic Local Alignment Search Tool).

L'analyse phylogénétique est réalisée par alignement des séquences d'ADN avec programme d'alignements multiples CLUSTAL W (Thompson et coll. 1994) du logiciel BioEdit Sequence alignment Editor.

Le dendrogramme est construit grâce aux programmes DNADIST-NEIGHBOR-SEQBOOT-CONSENSE du logiciel PHYLIP 3.65 (Feselstein 1989).

La matrice des distances obtenue a été ensuite utilisée pour réaliser des arbres des plus proches voisins (neigbor-joining trees) qui ont été traités avec le logiciel TREE VIEW.

## 4. **Solutions utilisées**

- Tampon TAE 1,25× : 25mL TAE 50× pour 1L d'eau distillée
- Persulfate d'ammonium 10% : 100mg d'APS dans 1mL d'eau distillée (2jours 4°C)
- Tampon de charge 6× : (Sambrook et coll. 1989) : Bleu de Bromophenol 0,25%, Cyanol de Xylene 0,25% et Glycerol 30%
- Tampon de charge 2× : 2% Bleu de bromophénol (0,05%), 2% Cyanol de xylène (0,05%) et 100% Glycérol (70%)
- Bain de Sybr Gold : 25µL Sybr Gold pour 250mL d'eau distillée

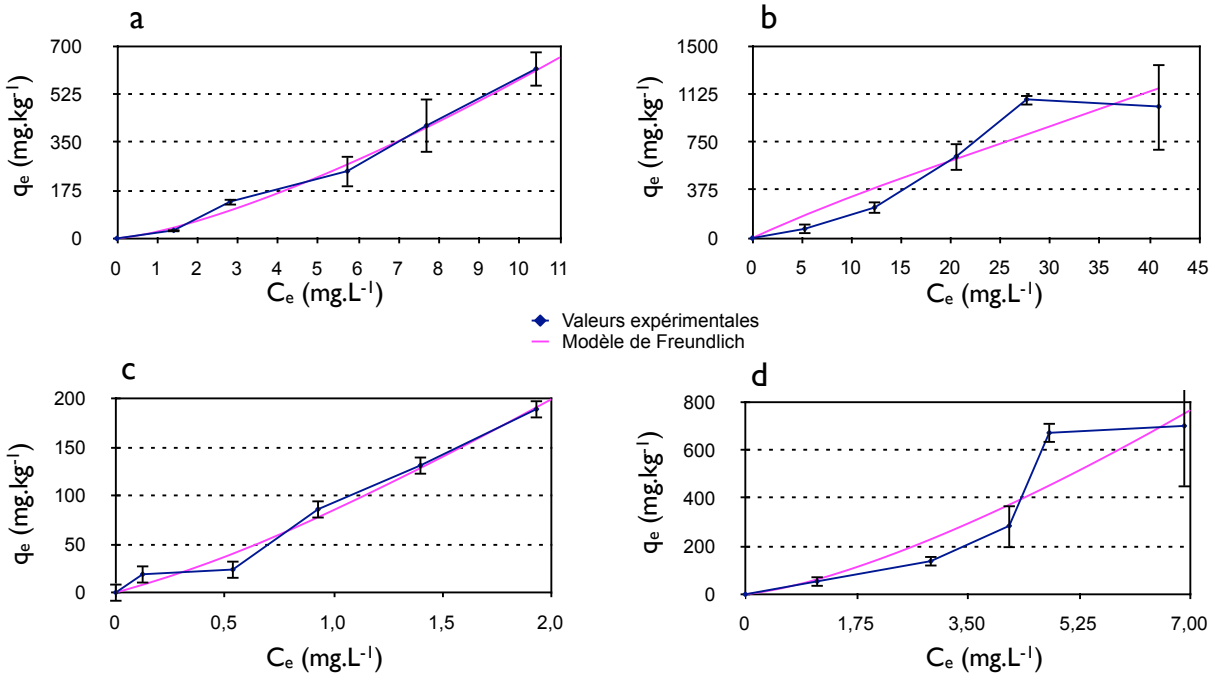
## 5. Abréviations

**ADN** : **A**cide **D**esoxyribo**N**ucleique
**ADNr** : **A**cide **D**esoxyribo**N**ucleique **r**ibosomique
**APS : A**mmonium **P**er**S**ulfate
**BET : B**romure d'**Et**hidium
**BLAST** : **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool
**Bp : B**ase **P**air
**BSA : S**érum d'**A**lbumine **B**ovine
**CTAB : C**etyl**T**rimethyl**A**mmonium **B**romide
**DMSO** : **D**i**M**ethyl**S**ulf**O**xide
**dNTP** : **D**esoxy**N**ucleoside **T**ri**P**hosphate
**EDTA** : **: E**thylene **D**iamine **T**etraacetic **A**cid
**PCR : P**olymerase **C**hain **R**eaction
**PVPP: P**oly**v**inyl**p**oly**p**yrrolidone
**SDS: S**odium **D**odecyl **S**ulphate
**TAE : T**ris base 2 M, **A**cide acétique glacial 1 M, **E**DTA pH = 8,50 mM
**Taq polymerase :** ***T****hermophilus* ***aq****uaticus* polymerase
**TEMED :** N, N, N, N, **TE**tra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine

**Tm :** Température de dénaturation
**TTGE : T**emporal **T**emperature **G**radient **E**lectrophoresis
**UV : U**ltra **V**iolet

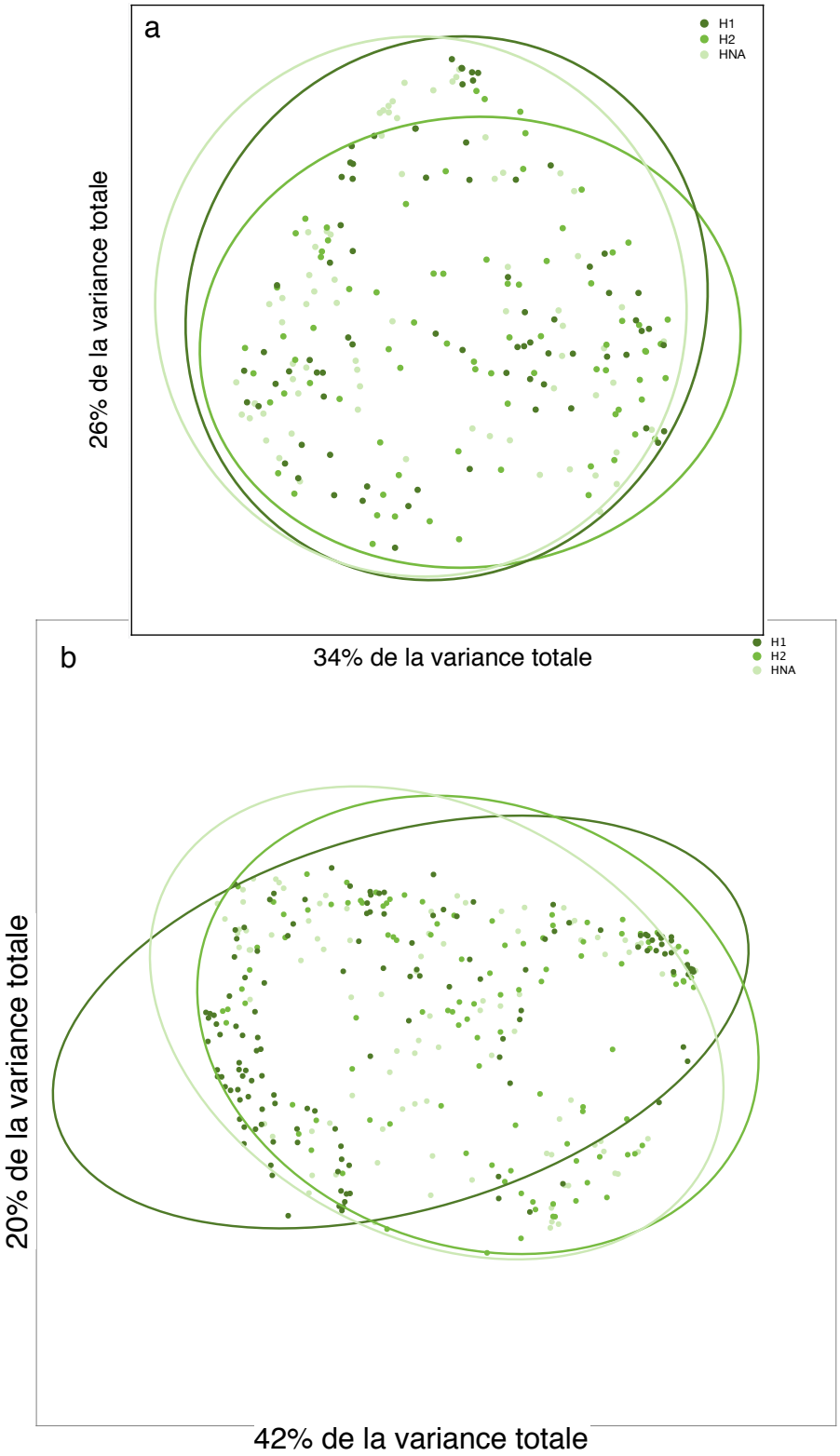
## Annexe 5 : Isothermes de sorption

Les isothermes de sorption sont représentées pour : le diuron dans l'EUP (a), le diuron dans l'EBO (b), le 3,4-DCA dans l'EUP (c) et le 3,4-DCA dans l'EBO (d). Les barres d'erreur représentent les écats-types. La modélisation est faite à l'aide du modèle de Freundlich : $q_e = K*Ce^n$. Pour les coefficients K et n, voir le tableau III.2.



## Annexe 6 : ACP sur la RISA-RFLP

L'ACP est celle utilisée dans la partie Résultats et Discussion, § 2.2.2. Le tracé des ellipses de corrélation par horizon de prélèvement montre que la diversité génétique des isolats n'est pas non plus liée à ce paramètre, en RISA (a) comme en RFLP (b).



## Annexe 7 : Identification des isolats

Les séquences obtenues ont été tout d'abord analysées sur le site internet Ribosomal Project Database website (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch) à l'aide du programme Seqmatch. Les séquences (bonne qualité, de longueur >1200) issues de la base de données présentant les scores S_ab les plus élevés et le plus grand nombre d'oligos uniques (Olis) ont été ensuite déterminées. Les alignements sur les meilleures correspondances ont été réalisés à l'aide du programme Blast2seq disponible sur le site NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) et les alignements multiples ont été réalisés par la plateferome Mobyle (http://mobyle.pasteur.fr) en utilisant le programme ClustalW avec les paramètres par défaut. Les alignements ont été optimisés sur la plateforme Myhits (http://hits.isb-sib.ch) avec une visualisation sur Jalview tel qu'implémenté sur la plateforme MSA et le réalignement de séquences a été réalisé avec RCOFFEE. L'analyse phylogénétique a été menée en utilisant ces alignements, l'algorithme des plus proches voisins et la suite logicielle Phylip (DNADIST et NEIGHBOR avec les paramètres par défaut), tel qu'implémenté sur la plateforme Mobyle. Les résutats ont été visualisés àl'aide du logiciel NJPLOT (http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html).

# LISTE des ABREVIATIONS

# INDEX DES ABREVIATIONS

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

3,4-DCA : 3,4-dichloroaniline

ACM : Analyse des Correspondances Multiples

ACN : ACétoNitrile

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFPP : Association Française de Protection des Plantes

AMPA : Acide Amino-Méthyl Phosphonique

APRONA : Association pour la PROtection de la Nappe phréatique de la plaine d'Alsace

ARN : Acide RiboNucléique

ASE : Accelerated Solvent Extraction

BO : Bassin d'Orage

BTEX : Benzène Toluène Ethyl-benzène et Xylène

CAS : Chemical Abstract Service

CE : Communauté Européenne

$CE_{50}$ : Concentration d'Effet 50

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CEE : Communauté Economique Européenne

$CL_{50}$ : Concentration Létale 50

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CPDMU : ChloroPhénylDiMéthylUrée

CSEO : Concentration Sans Effet Observé

DCPU : DiChloroPhénylUrée

DCPMU : DiChloroPhénylMéthylUrée

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DO : Densité Optique

EBO : Eau de Ruissellement du BO

EDTA : acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

ENGEES : Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg

EPA : Environmental Protection Agency

ES : Extrait de Sédiment

ETM : Elément Trace Métallique

EUP : Eau Ultra Pure

FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization

GFP : Green Fluorescent Protein

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

IEE : Institut Ecologie Environnement

IFEN : Institut Français de l'Environnement

IHCP : Institute for Health and Customer Protection

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IPL : Institut Pasteur de Lille

ISPB : Institut de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

LB : Luria Bertani broth

MCPA : Acide 2-Méthyl-4-ChloroPhénoxyacétique

MM : Milieu Minimum

MS : Mass Spectrometer

MTBE : Methyl Tert -Butyl Ether

NPP : Nombre le Plus Probable

ORP : Observatoire des Résidus de Pesticides

PCB : PolyChloroBiphényls

PCP : PentaChloroPhénol

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEHD : PolyEthylène Haute Densité

PGPR : Plant-Growth Promoting Rhizobacteria

RISA : Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SAU : Surface Agricole Utile

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

TCE : Trichloréthylène

TTGE : Temperature Temporal Gradient Electrophoresis

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

UE : Union Européenne

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

ZHA : Zone Humide Artificielle

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Articles

### A

Abate G., Masini J.C. Sorption of Atrazine, Propazine, Deethylatrazine, Deisopropylatrazine and Hydroxyatrazine onto Organovermiculite. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 16 (5) : 936-943 (2005)

Abollino O., Giacomino A., Malandrino M., Menstati E. Interaction of metal ions with montmorillonite and vermiculite. *Applied Clay Science* 38 (3-4) : 227-236 (2008)

Accinelli C., Koskinen W.C., Seebinger J.D., Vicari a., Sadowsky M.J. Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10) : 4110-4117 (2005)

Ahangar A.G., Smernik R.J., Kookana R.S., Chittleborough D.J. Clear effects of soil organic matter chemistry, as determined by NMR spectroscopy, on the sorption of diuron. *Chemosphere* 70 : 1153-1160 (2008)

Ahmaruzzaman M, 2008, Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 143 (1) : 48-67 (2008)

Ahn C., Gillevet P.M., Sikaroodi M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecological Indicators* 7 : 852-863 (2007)

Akhtar M., Iqbal S., Bhanger M.I., Zia-Ul-Haq M., Moazzam M., Low cost sorbents for the removal of methyl parathion pesticide from aqueous solutions. *Chemosphere* 66 (10) : 1829-1838 (2007)

Aksu Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40 : 997-1026 (2005)

Albers C.N., Banta G.T., Hansen P.E., Jacobsen O.S. Effect of different humic substances on the fate of diuron and its main metabolite 3,4-dichloroaniline in soil. *Environmental Science and Technology* 42 : 8687-8691 (2008)

Albers C.N., Banta G.T., Hansen P.E., Jacobsen O.S. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil – Comparing different soils and humic substances. *Environmental Pollution* 157 (10) : 2865-2870 (2009)

Alisi C., Musella R., Tasso F., Ubaldi C., Manzo S., Cremisini C., Sprocati A.R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment* 407 : 3024-3032 (2009)

Alkan M., Dogan M., Adsorption of Copper(II) onto Perlite. *Journal of Colloid and Interface Science* 243 (2) : 280-291 (2001)

Alkorta I., Garbisu C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* 79 : 273-276 (2001)

Altundogan H.S., Arslan N.E., Tumen F. Copper removal from aqueous solutions by sugar beet pulp treated by NaOH and citric acid. *Journal of Hazardous Materials* 149 (2) : 432-439 (2007)

Alva A.K., Singh M. Sorption of bromacil, diuron, norflurazon, and simazine at various horizons in two soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45 : 365-374 (1990)

Alva A.K., Singh M. Sorption-desorption of herbicides in soil as influenced by electrolyte cations and ionic strength . Journal of Environmental Science and Health Part B 26 (2) : 147-163 (1991)

Amaya-Chavez A., Martinez-Tabche L., Lopez-Lopez E., Galar-Martinez M. Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha latifolia* in water and artificial sediments. *Chemosphere* 63 : 1124-1129 (2006)

Amon J.P., Agrawal A., Shelley M.L., Opperman B.C., Enright M.P., Clemmer N.D., Slusser T., Lach J., Sobolewski T., Gruner W., Entingh A.C. Development of a wetland constructed for the treatment of groundwater contaminated by chlorinated ethenes. *Ecological Engineering* 30 : 51-66 (2007)

Amrhein N., Johännig D., Schab J., Schulz A. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. *FEBS Letters* 157 (1) : 191-196 (1983)

Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology* 27 (13) : 2630-2636 (1993)

Anderson K.L., Wheeler K.A., Robinson J.B., Tuovinen O.H. Atrazine mineralization potential in two wetlands. *Water Research* 36 : 4785-4794 (2002)

Araujo A.S.F., Monteiro R.T.R., Abarkeli R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52 : 799-804 (2003)

Arbeli Z., Fuentes C.L. Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection* 26 : 1733-1746 (2007)

Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C., Luis García-Río L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems and Environment* 123 (4) : 247-260 (2008)

Arshad M., Saleem M., Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology* 25 (8) : 356-362 (2007)

Armstrong W., Cousins J., Armstrong J., Turner D.W., Beckett P.M. Oxygen Distribution in Wetland Plant Roots and Permeability Barriers to Gas-exchange with the Rhizosphere: a Microelectrode and Modelling Study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* 86 : 687-703 (2000)

Attaway H.H., Camper N.D., Paynter M.J.B., Anaerobic microbial degradation of diuron by pond sediment. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 17 (1) : 96-101 (1982)

Ayotamuno J.M., Kogbara R.B., Agoro O.S. Biostimulation supplemented with phytoremediation in the reclamation of a petroleum contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 : 1567-1572 (2009)

# B

Badawi N., Rønhede S., Olsson S., Kragelund B.B., Johnsen A.H., Jacobsen O.S., Aamand J. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. *Environmental Pollution* 157 (10) : 2806-2812 (2009)

Bailey S.E., Olin T.J., Bricka R.M., Adrian D.D. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research* 33 (11) : 2469-2479 (1999)

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The Role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57 : 233-266 (2006)

Bakhaeva L.P., Vasilyeva G.K., Surovtseva E.G., Mukhin V.M. Microbial degradation of 3,4-dichloroaniline sorbed by activated carbon. *Microbiology* 70 (3) : 277-284 (2001)

Baldwin B.R., Nakatsu C.H., Nies L. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. *Water Research* 42 : 723-731 (2008)

Balthazor T.M., Hallas L. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (2) : 432-434 (1986)

Banas D., Marin B., Skraber S., Chopin E.I.B., Zanella A. Copper mobilization affected by weather conditions in a stormwater detention system receiving runoff waters from vineyard soils (Champagne, France). *Environmental Pollution* 158 (2) : 476-482 (2010)

Bankston J.L., Sola D.L., Komor A.T., Dwyer D.F. Degradation of trichloroethylene in wetland microcosms containing broad-leaved cattail and eastern cottonwood. *Water Research* 36 : 1539-1546 (2002)

Baptista J.C., Davenport R.J., Donnelly T., Curtis T.P. The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Research* 42 : 3182-3190 (2008)

Barr D.B., Bishop A., Needham L.L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reproductive Toxicology* 23 : 260-266 (2007)

Barra Caracciolo A., Giuliano G., Grenni P., Guzzella L., Pozzoni F., Bottoni P., Fava L., Crobe A., Orru M., Funari E. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environmental Pollution* 134 : 525-534 (2005)

Barrett K.A., McBride M.B. Trace element mobilization in soils by glyphosate. *Soil Science Society of America Journal* 70 : 1882-1888 (2006)

Barrett K.A., McBride M.B. Phosphate and glyphosate mobility in soil columns amended with roundup. *Soil Science* 172 (1) : 17-26 (2007)

Barretti P.B., de Souza R.M., Pozza A.A.A., Pozza E.A., de Carvalho J.G., de Souza J.T. Increased nutritional efficiency of tomato plants with growth-promoting endophytic bacteria. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 32 (4) 1541-1548 (2008)

Barriuso J., Solano B.R., Manero F.J.G. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus sp* on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 98 (6) : 666-672 (2008)

Batisson I., Pesce S., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Bohatier J. Isolation and characterization of diuron-degrading Bacteria from lotic surface water. *Microbial Ecology* 54 : 761-770 (2007)

Bauer C., Römbke J. Factors influencing the toxicity of two pesticides on three lumbricid species in laboratory tests. *Soil Biology and Biochemistry* 29 (3/4) : 705-708 (1997)

Bazot S., Bois P., Joyeux C., Lebeau T. Mineralization of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] by co-immobilized *Arthrobacter* sp. and *Delftia acidovorans*. *Biotechnology Letters* 29 : 749-754 (2007)

Bazot S., Lebeau T. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free- and/or immobilized-cells formulations. *Applied Microbial and Cell Physiology* 77 : 1351-1358 (2009)

Behrens S., Rühland C., Inacio J., Huber H., Fonseca A., Spencer-Martins I., Fuchs B.M., Amann R. *In Situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains bacteria, archaea, and eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3) : 1748-1758 (2003)

Bejat L., Perfect E., Quisenberry V.L., Coyne M.S., Haszler G.R. Solute transport as related to soil structure in unsaturated intact soil blocks. *Soil Science Society Of America Journal* 64 : 818-826 (2000)

Belmonte Vega A., Garrido Frenich A., Martinez Vidal J.L. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 538 :

117-127 (2005)

Beltran J., Gerritse R.G., Hernandez F. Effect of flow rate on the adsorption and desorption of glyphosate, simazine and atrazine in columns of sandy soils. European Journal of Soil Science 49 : 149-156 (1998)

Benachour N., Séralini G.-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology* 22 : 97-105 (2009)

Bending G.D., Lincoln S.D., Sørensen S.R., Morgan J.A.W., Aamand J., Walker A. In-Field Spatial Variability in the Degradation of the Phenyl-Urea Herbicide Isoproturon Is the Result of Interactions between Degradative *Sphingomonas* spp. and Soil pH. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2) : 827-834 (2003)

Benoît P., Barriuso E., Calvet R. Biosorption characterization of herbicides, 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium. *Chemosphere* 31 (7) : 1271-1282 (1998)

Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.C., Frankenberger W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96 : 1049-1055 (2005)

Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68 : 1-13 (2009)

Berry K.A.T., Burton D.L. Natural attenuation of diesel fuel in heavy clay soil. *Canadian Journal of Soil Science* 77 (3) : 469-477 (1997)

Beuret C.J., Zirulnik F., Gimenez M.S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology* 19 : 501-504 (2005)

Bhatnagar A., Sillanpää M. Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment: A review. *Chemical Engineering Journal* in press (2010)

Bishop C.A., Struger J., Shirose L.J., Dunn L., Campbell G.D. Contamination and wildlife communities in stormwater detention ponds in Guelph and the Greater Toronto Area, Ontario, 1997 and 1998. Part II - Contamination and biological effects of contamination. *Water Quality Research Journal of Canada* 35 (3) : 437-474 (2000)

Blankenberg A.-G. B., Braskerud B., Haarstad K. Pesticide retention in two small constructed wetlands: treating non-point source pollution from agriculture runoff. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 86 (3-4) : 225-231 (2006)

Blessing M., Jochmann M.A., Schmidt T.C. Pitfalls in compound-specific isotope analysis of environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 : 591-603 (2008)

Blumenroth P., Wagner-Döbler I. Survival of inoculants in polluted sediments: effect of strain origin and carbon source competition. *Microbial Ecology* 35 : 279-288 (1998)

Bonnet J.-L., Bonnemoy F., Dusser M., Bohatier J. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology* 22 : 78-91 (2007)

Bony S., Gillet C., Bouchez A., Margoum C., Devaux A. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology* 89 : 197-203 (2008)

Boon N., Goris J., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-Chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. Applied and Environmental Microbiology 66 (7) : 2906-2913 (2000)

Boon N., Top E.M., Verstraete W., Siciliano S.D. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3) : 1511-1520 (2003)

Borggaard O.K., Gimsing A.L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* 64 (4) : 441-456 (2008)

Botta F., Lavison G., Couturier G., Alliot F., Moreau-Guigon E., Fauchon N., Guery B., Chevreuil M., Blanchoud H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77 (1) : 133-139 (2009)

Bouchez T., Patureau D., Dabert B.P., Juretschko S., Doré J., Delgenès P., Moletta R., Wagner M. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology* 2 (2) : 179-190 (2000)

Bouldin, J.L., Farris, J.L., Moore M.T., Smith Jr. S., Stephens W.W., Cooper C.M. Evaluated fate and effects of atrazine and lambda-cyhalothrin in vegetated and unvegetated microcosms. *Environmental Toxicology* 20 (5) : 487-498 (2005)

Bouldin J.L., Farris J.L., Moore M.T., Smith Jr. S., Cooper C.M. Hydroponic uptake of atrazine and lambda-cyhalothrin in *Juncus effusus* and *Ludwigia peploides*. *Chemosphere* 65 : 1049-1057 (2006)

Boutin C., Elmegaard N., Kjaer C. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology* 13 : 349-369 (2004)

Boving T.B., Neary K. Attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban stormwater runoff by wood filters. *Journal of Contaminant Hydrology* 91 : 43-57 (2007)

Braeckevelt M., Rokadia H., Imfeld G., Stelzer N., Paschke H., Kuschk P., Kästner M., Richnow H.-H., Weber S. Assessment of *in situ* biodegradation of monochlorobenzene in contaminated groundwater treated in a constructed wetland. *Environmental Pollution* 148 : 428-437 (2007)

Braeckevelt M., Mirschel G., Wiessner A., Rueckert M., Reiche N., Vogt C., Schultz A., Paschke H., Kuschk P., Kaestner M. Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecological Engineering* 33 : 45-53 (2008)

Braskerud B.C., Haarstad K. Screening the retention of thirteen pesticides in a small constructed wetland. *Water Science and Technology* 48 (5) : 267-274 (2003)

Braud A., Jezequel K., Bazot S., Lebeau T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74 (2) : 280-286 (2009)

Breguet V., Boucher J., Pesquet F., Vojinovic V., vonStockar U., Marison I.W. Immobilization of rapeseed press-cake in an alginate matrix for the sorption of atrazine. Water Research 42 : 1606-1612 (2008)

Brigmon R.L., Bell N.C., Freedman D.L., Berry C.J. Natural attenuation of trichloroethylene in rhizosphere soils at the Savannah River Site. *Journal of soil Contamination* 7 (4) : 433-453 (1998)

Briones Jr A.M., Reichardt W. Estimating microbial population counts by 'most probable number' using Microsoft Excel®. *Journal of Microbiological Methods* 35 : 157-161 (1999)

Brix H. Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants - the root-zone method. *Water Science and Technology* 19 : 107-118 (1987)

Buée M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321 : 189-212 (2009)

Bujacz B., Wieczorek P., Krzysko-Lupicka T., Gola Z., Lejczak B., Kavfarski P. Organophosphonate Utilization by the wild-type strain of *Penicillium notatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8) : 2905-2910 (1995)

Bullock A, Acreman M. The role of wetlands in the hydrological cycle. *Hydrology and Earth System Sciences* 7 (3) : 358-389 (2003)

Busse M.D., Ratcliff A.W., Shestak C.J., Powers R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 33 : 1777-1789 (2001)

# C

Calheiros C.S.C., Duque A.F., Moura A., Henriques I.S., Correia A., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. Changes in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology* 100 : 3228-3235 (2009)

Capelli S.M., Busalmen J.P., de Sanchez S.R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 47 : 233-238 (2001)

Carafa R., Wollgast J., Canuti E., Ligthart J., Dueri S., Hanke G., Eisenreich S.J., Viaroli P., Zaldívar J.M. Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69 : 1625-1637 (2007)

Cardone A., Comitato R., Angelini F. Spermatogenesis, epididymis morphology and plasma sex steroid secretion in the male lizard *Podarcis sicula* exposed to diuron. *Environmental Research* 108 : 214-223 (2008)

Carlsen S.C.K., Spliida N.H., Svensmark B. Drift of 10 herbicides after tractor spray application. 2. Primary drift (droplet drift). *Chemosphere* 64 (5) : 778-786 (2006)

Carter A. How pesticides get into water – and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook* 11 : 149-156 (2000)

Casida J.E. Pest toxicology : the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research in Toxicology* 22 : 609-619 (2009)

Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. Journal of Industrial Microbiology 16 (2) : 79-101 (1996)

Castillo M.A., Felisa N., Aragon P., Cuesta G., Sabater C. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. International Biodeterioration and Biodegradation 58 (3-4) : 196-202 (2006)

Causserand C., Aimar P., Cravedi J.P., Singland E. Dichloroaniline retention by nanofiltration membranes. *Water Research* 39 : 1594-1600 (2005)

Cavalca L., Colombo M., Larcher S., Gigliotti C., Collina E., Andreoni V. Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus* sp. strain 1BN in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology* 92 : 1058-1065 (2002)

Cederlund H., Börjesson E., Onneby K., Stenström J. Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast. *Soil Biology and Biochemistry* 39 : 473-484 (2007)

Celis E., Elefsiniotis P., Singhal N. Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. *Water Research* 42 : 3218-3224 (2008)

Chaplain V., Barriuso E., Dur J.C., Vergnet C. Influence of the formulation on the sorption and the mobility of diuron in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66 : 664-670 (2001)

Chen S.-S., Taylor J.S., Mulford L.A., Norris C.D. Influences of molecular weight, molecular size, flux, and recovery for aromatic pesticide removal by nanofiltration membranes. *Desalination* 160 : 103-111 (2004)

Chen C.Y., Wang Y.J., Yang C.F. Estimating low-toxic-effect concentrations in closed-system algal toxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (5) : 1514-1522 (2009)

Cheng S., Vidakovic-Cifrek Z., Grosse W., Karrenbrock F. Xenobiotics removal from polluted water by a multifunctional constructed wetland. *Chemosphere* 48 : 415-418 (2002)

Chernyak S.M., Rice C.P., McConnell L.L. Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. *Marine Pollution Bulletin* 32 (5) : 410-419 (1996)

Ciglasch H., Amelung W., Totrakool S., Kaupenjohann M. Water flow patterns and pesticide fluxes in an upland soil in northern Thailand. *European Journal of Soil Science* 56 : 765-777 (2005)

Cirja M., Hommes G., Ivashechkin P., Prell J., Schäffer A., Corvini P.F.X., Lenz M. Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 : 183-189 (2009)

Claver A., Ormad P., Rodriguez L, Ovelleiro J.L. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64 : 1437-1443 (2006)

Clementi M., Tiboni G.M., Causin R., La Rocca C., Maranghi F., Raffagnato F., Tenconi R. Pesticides and fertility: an epidemiological study in Northeast Italy and review of the literature. *Reproductive Toxicology* 26 : 13-18 (2008)

Coleman J.O.D., Blake-KaJff M.M.A., Emyr Davies T.G. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2 (4) : 144-151 (1997)

Colosio C., Tiramani M., Maroni M. Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. *NeuroToxicology* 24 : 577-591 (2003)

Colten C.E. Groundwater contamination: reconstructing historical knowledge for the courts. *Applied Geography* 18 (3) : 259-273 (1998)

Comoretto L., Arfib B., Talva R., Chauvelon P., Pichaud M., Chiron S., Höhener P. Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): Field study and modeling. *Environmental Pollution* 151 : 486-493 (2008)

Conkle J.L., White J.R., Metcalfe C.D. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere* 73 : 1741-1748 (2008)

Contardo-Jara V., Klingelmann E., Wiegand C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution* 157 : 57-63 (2009)

Corgié S.C., Joner E.J., Leyval C. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil* 257 : 143-150 (2003)

Covelo E.F., Vega F.A., Andrade M.L. Competitive sorption and desorption of heavy metals by individual soil components. *Journal of Hazardous Materials* 140 : 308-315 (2007)

Csutoras C., Kiss A. Efficient method for the characterization of the interaction of pesticides with different soil samples. *Microchemical Journal* 85 (1) : 21-24 (2007)

Cullington J.E., Walker A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 31 : 677-686 (1999)

Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. Phytoremediation of contaminated soils. *Tibtech* 13 : 393-397 (1995)

Cycon M., Piotrowska-Seget Z. Changes in bacterial diversity and community structure following pesticides addition to soil estimated by cultivation technique. *Ecotoxicology* 18 : 632-642 (2009)

# D

Dabrowski J.M., Bollen A., Bennett E.R., Schulz R. Pesticide interception by emergent aquatic macrophytes: Potential to mitigate spray-drift input in agricultural streams. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 111 : 340-348 (2005)

Dadhwal M., Singh A., Prakash O., Gupta S.K., Kumari K., Sharma P., Jit S., Verma M., Holliger C., Lal R. Proposal of biostimulation for hexachlorocyclohexane (HCH)-decontamination and characterization of culturable bacterial community from high-dose point HCH-contaminated soils. *Journal of Applied Microbiology* 106 : 381-392 (2009)

Dams R.I., Paton G., Killham K. Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic systems. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60 : 171-177 (2007a)

Dams R.I., Paton G.I., Killham K. Rhizoremediation of pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Chemosphere* 68 : 864-870 (2007b)

Davis C., Cort T., Dai D., Illangasekare T.H., Munakata-Marr J. Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel. *Biodegradation* 14 : 373-384 (2003)

Davies L.C. , Cabrita G.J.M., Ferreira R.A., Carias C.C., Novais J.M., Martins-Dias S. Integrated study of the role of *Phragmites australis* in azo-dye treatment in a constructed wetland: From pilot to molecular scale. *Ecological Engineering* 35 : 961-970 (2009)

De Jonge H., De Jonge L.W. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere* 39 (5) : 753-763 (1999)

De Jonge H., De Jonge L.W., Jacobsen O.H., Yamaguchi T., Moldrup P. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science* 166 : 230-238 (2001)

Dejonghe W., Goris J., Dierickx A., De Dobbeleer V., Crul K., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. Diversity of 3-chloroaniline and 3,4-dichloroaniline degrading bacteria isolated from three different soils and involvement of their plasmids in chloroaniline degradation. *FEMS Microbiology Ecology* 42 : 315-325 (2002)

Dejonghe W., Berteloot E., Goris J., Boon N., Crul K., Maertens S., Höfte M., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3) : 1532-1541 (2003)

De Leij F.A.A.M., Whipps J.M., Lynch J.M. The Use of Colony Development for the Characterization of Bacterial Communities in Soil and on Roots. *Microbial Ecology* 27 : 81-97 (1993)

Delille D, Pelletier E. Natural attenuation of diesel-oil contamination in a subantarctic soil (Crozet Island). *Polar Biology* 25 (9) : 682-687 (2002)

Dellamatrice P.M., Monteiro R.T.R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47 (6) : 999-1003 (2004)

Delle Site A. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal Of Physical And Chemical Reference Data* 30 (1) : 187-439 (2000)

De Silva P.M.C.S., Pathiratne A., van Gestel C.A.M. Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. *Chemosphere* 76 (10) : 1410-1415 (2009)

Devlin J..F., Katic D., Barker J.F. In situ sequenced bioremediation of mixed contaminants in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology* 69 : 233-261 (2004)

De Wilde T., Spanoghe P., Ryckeboer J., Jaeken P., Springael D. Sorption characteristics of pesticides on matrix substrates used in biopurification systems. *Chemosphere* 75 : 100-108 (2009)

Dick R.E., Quinn J.P. Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiology Letters* 134 : 177-182 (1995a)

Dick R.E., Quinn J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43 : 545-550 (1995)

Dideriksen K., Stipp S.L.S. The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: A molecular-scale atomic force microscopy study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67 (18) : 3313-3327 (2003)

Dion H.M., Harsh J.B., Hill H.H. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 249 (2) : 385-390 (2001)

Domagalski J. Pesticides and pesticide degradation products in stormwater runoff: Sacramento river basin California. *Water Resources Bulletin* 32 (5) : 953-964 (1996)

Domde P., Kapley A., Purohit H.J. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environmental Science Pollution Research* 14 (1) : 7-11 (2007)

Dordio A.V., Teimão J., Ramalho I., Carvalho A.J.P., Candeias A.J.E. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of the Total Environment* 380 : 237-246 (2007)

Dorn P.B., Salanitro J.P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere* 40 : 419-426 (2000)

Dos Santos J.B., Ferreira E.A., Kasuya M.C.M., da Silva A.A., de Oliveira Procopio S. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. *Crop Protection* 24 : 543-547 (2005)

Doublet J., Mamy L., Barriuso E. Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* 77 (4) : 582-589 (2009)

Dousset S., Chauvin C., Durlet P., Thévenot M. Transfer of hexazinone and glyphosate through undisturbed soil columns in soils under Christmas tree cultivation. *Chemosphere* 57 : 265-272 (2004)

Drenovsky R.E., Vo D., Graham K.J., Scow K.M. Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition. *Microbial Ecology* 48 : 424-430 (2004)

Dronnet V.M., Axelos M.A.V., Renard C.M.G.C. and Thibault J.-F. Improvement of the binding capacity of metal cations by sugar-beet pulp. 2. Binding of divalent metal cations by modified sugar-beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 35 : 239-241 (1998)

Duquenne P., Parekh N.R., Catroux G., Fournier J.-C. Effect of inoculant density, formulation, dispersion and soil nutrient amendment on the removal of carbofuran residues from contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (12) : 1805-1811 (1996)

Duquenne P., Chenu C., Richard G., Catroux G. Effect of carbon source supply and its location on competition between inoculated and established bacterial strains in sterile soil microcosm. *FEMS Microbiology Ecology* 29 : 331-339 (1999)

Dusek J., Picek T., Cízková H. Redox potential dynamics in a horizontal subsurface flow constructed wetland for wastewater treatment: Diel, seasonal and spatial fluctuations. *Ecological Engineering* 34 : 223-232 (2008)

Dvorska A., Lammel G., Klanova J., Holoubek I. Kosetice, Czech Republic – ten years of air pollution monitoring and four years of evaluating the origin of persistent organic pollutants *Environmental Pollution* 156 (2) : 403-408

(2008)

# E

Egamberdiyeva D. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168 (1) : 94-99 (2005)

El-Deeb B.A., Soltan S.M., Ali A.M., Ali K.A. Detoxication of the herbicide diuron by *Pseudomonas* sp. *Folia Microbiologica* 45 (3) : 211-216 (2000)

El-Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W., Top E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3) : 982–988 (1999)

El-Fantroussi S. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12) : 5110-5115 (2000)

El-Fantroussi S., Agathos S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation ? *Current Opinion in Microbiology* 8 : 268-275 (2005)

El-Shenawy N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (3) : 379-385 (2009)

Ellis P.A., Camper N.D. Aerobic degradation of diuron by aquatic microorganisms. *Journal of Envionmental Science and Health Part B-Food contaminants and Agricultural Wastes* 17 (3) : 277-289 (1982)

Engloner A.I. Structure, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*) – A review. *Flora* 204 : 331-346 (2009)

Eriksson E., Baun A., Scholes L., Ledin A., Ahlman S., Revitt M., Noutsopoulos C., Mikkelsen P.S. Selected stormwater priority pollutants — a European perspective. *Science of the Total Environment* 383 : 41-51 (2007)

Esposito E., Paulillo S.M., Manfio G.P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomycetes. *Chemosphere* 37 (3) : 541-548 (1998)

Esteve K., Poupot C., Mietton-Peuchot M., Milisic V. Nouveau procédé de bio-élimination combinée des effluents vitivinicoles. (2007)

# F

Farenhorst A. Importance of Soil organic matter fractions in soil-landscape and regional assessments of pesticide sorption and leaching in soil. *Soil Science Society Of America Journal* 70 : 1005-1012 (2006)

Farenhorst A., McQueen D.A.R., Saiyed I., Hilderbrand C., Li S., Lobb D.A., Messing P., Schumacher T.E., Papiernik S.K., Lindstrom M.J. Variations in soil properties and herbicide sorption coefficients with depth in relation to PRZM (pesticide root zone model) calculations. *Geoderma* 150 : 267-277 (2009)

Fauchon N., Branchereau V., Heim V., Guery B. Variabilité intra et pluri-annuelle des concentrations de phytosanitaires dans les rivière d'Ile-de-France. *AFPP* (2007)

Faulwetter J.L., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc F., Burra M.D., Brisson J., Camper A.K., Stein O.R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering* 35 (6) : 987-1004

(2009)

Felske A., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. Quantification of 16S rRNA in complex bacterial communities by multiple competitive revers transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* 64 : 4581-4587 (1998)

Fernandez-Bayo J.D., Nogales R., Romero J. Evaluation of the sorption process for imidacloprid and diuron in eight agricultural soils from southern Europe using various kinetic models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 : 5266-5272 (2008)

Feselstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5 : 164-166 (1989)

Field J.A., Reed R.L., Sawyer T.E., Griffith S.M., Wigington Jr P.J. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *Journal of Environmental Quality* 32 : 171-179 (2003)

Fierer N., Schimel J.P. Effects of drying±rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry* 34 : 777-787 (2002)

Fleeger J.W., Carman K.R., Nisbeta R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* 317 : 207-233 (2003)

Flores-Céspedes F., Fernández-Pérez M., Villafranca-Sánchez M., González-Pradas E. Cosorption study of organic pollutants and dissolved organic matter in a soil. *Environmental Pollution* 142 : 449-456 (2006)

Flury M. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils – A review. *Journal of Environmental Quality* 25 (1) : 25-45 (1996)

Fontecha-Camara M.A., Lopez-Ramon M.V.L., Pastrana-Martinez L.M., Moreno-Castilla C. Kinetics of diuron and amitrole adsorption from aqueous solution on activated carbons. *Journal of Hazardous Materials* 156 : 472-477 (2008)

Forlani G., Mangiagalli A., Nielsen E., Suardi C.M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 31 : 991-997 (1999)

Fratila-Apachitei L.E., Hirst J.A., Siebel M.A., Gijzen H.J. Diuron degradation by Phanerochaete chrysosporium BKM-F-1767 in synthetic and natural media. Biotechnology Letters 21 : 147-154 (1999)

Freemark K., Boutin C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 52 : 67-91 (1995)

Freundlich H.M.F. Uber die adsorption in Lösungen. Zeitschrift für Physikalische Chemie 57 : 385-470 (1906)

Frimmel F.H., Assenmacher M., Sörensen M., Abbt-Braun G., Gräbe G. Removal of hydrophilic pollutants from water with organic adsorption polymers Part I. Adsorption behaviour of selected model compounds. *Chemical Engineering and Processing* 38 : 601-610 (1999)

Fu S., Cheng H.-X., Liu Y.-H., Xu X.-B. Levels and distribution of organochlorine pesticides in various media in a mega-city, China. *Chemosphere* 75 : 588-594 (2009a)

Fu S., Fan H., Liu S., Liu Y., Liu Z. A bioaugmentation failure caused by phage infection and weak biofilm formation ability. *Journal of Environmental Sciences* 21 : 1153-1161 (2009b)

# G

Gao J.P., Maguhn J., Spitzauer P., Kettrup A. Sorption of pesticides in the sediment of the teufelsweiher pond (Southern Germany). II: competitive adsorption, desorption of aged residues and effect of dissolved organic carbon. *Water Research* 32 (7) : 2089-2094 (1998)

Garcinuno R.M., Fernandez Hernando P., Camara C. Removal of carbaryl, linuron, and permethrin by *Lupinus angustifolius* under hydroponic conditions. *Agriculture and Food Chemistry* 54 : 5034-5039 (2006)

Garmouma M., Blanchard M., Chesterikoff A., Ansart P., Chevreuil M. Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin : Mélarchez (France) *Water Research* 31 (6) : 1489-1503 (1997)

Garry V.F. Pesticides and children. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198 : 152-163 (2004)

Gasnier C., Dumont C., Benachour N., Clair E., Chagnon M.-C., Séralini G.-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262 : 184-191 (2009)

Gavrilescu M. Fate of Pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5 (6) : 497-526 (2005)

Gentry T.J., Rensing C., Pepper I.L. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34 : 447-494 (2004a)

Gentry T.J., Josephson K.L., Pepper I.L. Functional establishment of introduced chlorobenzoate degraders following bioaugmentation with newly activated soil. Biodegradation 15 : 67-75 (2004b)

Gerhardt K.E., Huang X.-D., Glick B.R., Greenberg B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges *Plant Science* 176 : 20-30 (2009)

Getenga Z.M., Kengara F.O. Mineralization of glyphosate in compost-amended soil under controlled conditions. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology* 72 : 266-275 (2004)

Gevao B., Semple K.T., Jones K.C. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108 : 3-14 (2000)

Ghanem A., Bados P., Estaun A.B., de Alencastro L.F., Taibi S., Einhorn J., Mougin C. Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69 : 1368-1373 (2007)

Ghodrati M., Jury W.A. A field-study of the effects of soil structure and irrigation method on preferential flow of pesticides in unsaturated soil. *Journal of Contaminant Hydrology* 11 (1-2) : 101-125 (1992)

Giacomazzi S., Cochet N. Environmental impact of diuron transformation - a review. *Chemosphere* 56 : 1021-1032 (2004)

Gianotti V., Benzi M., Croce G., Frascarolo P., Gosetti F., Mazzucco E., Bottaro M., Gennaro M.C. The use of clays to sequestrate organic pollutants. Leaching experiments. *Chemosphere* 73 : 1731-1736 (2008)

Gimsing A.L., Borggaard O.K., Jacobsen O.S., Aamand J., Sørensen J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* 27 : 233-242 (2004)

Gimsing A.L., Borgaard O.K. Phosphate and glyphosate adsorption by hematite and ferrihydrite and comparison with other variable-charge minerals. *Clays and Clay Minerals* 55 (1) : 108-114 (2007)

Goldsborough L.G., Brown D.J. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12 (7) : 1139-1147 (1993)

Golovchenko A.V., Tikhonova E.Y., Zvyagintsev D.G. Abundance, biomass, structure, and activity of the microbial complexes of minerotrophic and ombrotrophic peatlands. *Microbiology* 76 (5) : 630-637 (2007)

Gomez E., Ferreras L., Lovottia L., Fernandez E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45 (2) : 163-167 (2009)

Gonzalez-Pradas E., Villafranca-Sanchez M., Fernandez-Perez M., Socias-Viciana M., Urena-Amate M.D. Sorption and leaching of diuron on natural and peat-amended calcareous soil from Spain. *Water Research* 32 (9) : 2814-2820 (1998)

Gonzalez-Pradas E., Fernandez-Perez M., Flores-Cespedes F., Villafranca-Sanchez M., Urena-Amate M.D., Socias-Viciana M., Garrido-Herrera F. Effects of dissolved organic carbon on sorption of 3,4-dichloroaniline and 4-bromoaniline in a calcareous soil. *Chemosphere* 59 : 721-728 (2005)

Gooddy D.C., Chilton P.J., Harrison I. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *The Science of the Total Environment* 297 : 67-83 (2002)

Gosselin F. Redefining ecological engineering to promote its integration with sustainable development and tighten its links with the whole of ecology *Ecological Engineering* 32 : 199-205 (2008)

Gouy V., Dur J.-C., Calvet R., Belamie R., Chaplain V. Influence of adsorption-desorption phenomena on pesticide run-off from soil using simulated rainfall. *Pesticide Science* 55 : 175-182 (1999)

Gouy V., Gril J.J., Lacas J.-G., Boivin A., Carluer N. Contamination des eaux de surface par les pesticides et rôle des zones tampon pour en limiter le transfert : état des connaissances et conséquences pour l'action. *Ingénieries* n° spécial : 49-63 (2008)

Gregoire C., Elsaesser D., Huguenot D., Lange J., Lebeau T., Merli A., Mose R., Passeport E., Payraudeau S., Schütz T., Schulz R., Tapia-Padilla G., Tournebize J., Trevisan M., Wanko A. Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. *Environmental Chemistry Letters* 7 (3) : 205-231 (2009)

Grenni P., Barra Caracciolo A., Rodriguez-Cruz M.S., Sanchez-Martina M.J. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. *Applied Soil Ecology* 41 : 2-7 (2009)

Grundmann S., Fuß R., Schmid M., Laschinger M., Ruth B., Schulin R., Munch J.-C., Reiner Schroll R. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere* 68 : 511-517 (2007)

Guo S., Li Y., Liu L., Hua X. Adsorption of Pb and Cd on the natural surface coatings (NSCs) in the presence of organochlorine pesticides: A preliminary investigation. *Journal of Environmental Management* 88 : 147-153 (2008)

Gutierrez A., Baran N. Long-term transfer of diffuse pollution at catchment scale: Respective roles of soil, and the unsaturated and saturated zones (Brévilles, France). *Journal of Hydrology* 369 : 381–391 (2009)

Gutknecht J.L.M., Goodman R.M., Balser T.C. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. *Plant Soil* 289 : 17-34 (2006)

Guzzella L., Capri E., Di Corcia A., Barra Carracciolo A., Giuliano G. Fate of diuron and linuron in a field lysimeter experiment. *Journal of Environmental Quality* 35 : 312-323 (2006a)

Guzzella L., Pozzoni F., Giuliano G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environmental Pollution* 142 : 344-353 (2006b)

Gypens N., Lancelot C., Soetaert K. Simple parameterisations for describing N and P diagenetic processes: Application in the North Sea. *Progress in Oceanography* 76 : 89-110 (2008)

# H

Haarstad K., Braskerud B.C. Pesticide retention in the watershed and in a small constructed wetland treating diffuse pollution. Water Science and Technology 51 (3-4) : 143-150 (2005)

Hallas L.E., Hahn M.H., Korndorfer C. Characterization of microbial traits associated with glyphosate degradation in industrial activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology* 3 : 377-385 (1988)

Hartgers E.M., Renaalderink G.H., Van den Brink P.J., Gylstra R., Wiegman J.W.F., Brock T.C.M. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquatic Ecology* 32 : 135-152 (1998)

Hartmann M., Frey B., Kfllliker R., Widmer F. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *Journal of Microbiological Methods* 61 : 349-360 (2005)

Hashimoto T., Hattori T. Grouping of soil bacteria by analysis of colony formation on agar plates. *Biology and Fertility of Soils* 7 : 198-201 (1989)

Hatt B.E., Fletcher T.D., Deletic A. Hydrologic and pollutant removal performance of stormwater biofiltration systems at the field scale. *Journal of Hydrology* 365 : 310-321 (2009)

Henderson K.L.D., Belden J.B., Zhao S., Coatsa J.R. Phytoremediation of pesticide wastes in soil. *Zeitschrift Naturforschung* 61 : 213-221 (2006)

Heuer H., Hartung K., Wieland G., Kramer I., Smalla K. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S-RNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 1045-1049 (1999)

Hofstetter T.B., Schwarzenbach R.P., Bernasconi S.M. Assessing Transformation Processes of Organic Compounds Using Stable Isotope Fractionation. *Environmental Science and Technology* 42 (21) : 7737-7743 (2008)

Höhener P., Hunkeler D., Hess A., Bregnard T., Zeyer J. Methodology for the evaluation of engineered in situ bioremediation: lessons from a case study. *Journal of Microbiological Methods* 32 : 179-192 (1998)

Hollinger E, Cornisha P.S., Baginska B., Mann R., Kuczer G. Farm-scale stormwater losses of sediment and nutrients from a market garden near Sydney, Australia. *Agricultural Water Management* 47 : 227-241 (2001)

Honders A., Maas T., Gadella J.M. *Ex-situ* treatment of contaminated soil - the Dutch experience *Service Centre Grond* (2003)

Hu S.J., van Bruggen A.H.C., Grünwald N.J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Applied Soil Ecology* 13 : 21-30 (1999)

Huang J., Su Z., Xu Y. The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. *Journal of Molecular Evolution* 61 : 682-690 (2005)

Hund-Rinke K., Simon M. Terrestrial ecotoxicity of eight chemicals in a systematic approach. *Journal of Soils and Sediments* 55 (1) : 59-65 (2005)

Hunkeler D., Höhener P., Bernasconi S., Zeyer J. Engineered in situ bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer: assessment of mineralization based on alkalinity, inorganic carbon and stable carbon isotope balances. *Journal of Contaminant Hydrology* 37 : 201-223 (1999)

Hussain S., Siddique T., Arshad M., Saleem M. Bioremediation and Phytoremediation of Pesticides: Recent Advances. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 39 (10) : 843-907 (2009)

# I

Ibañez M., Pozo O.J., Sancho J.V., Lopez F.J., Hernández F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem

mass spectrometry *Journal of Chromatography A* 1081 : 145-155 (2005)

Imfeld G., Estop Aragones C., Zeiger S., Vitzthum von Eckstadt C., Paschke H., Trabitzsch R., Weiss H., Richnow H.-H. Tracking in situ Biodegradation of 1,2-Dichloroethenes in a Model Wetland. *Environmental Science and Technology* 42 (21) : 7924-7930 (2008)

Imfeld G., Braeckevelt M., Kuschk P., Richnow H.H. Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74 : 349-362 (2009)

Iovieno P., Bååth E. Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 65 : 400-407 (2008)

Irace-Guigand S., Aaron J.J. The role of organic colloids in herbicide transfer to rivers: a quantitative study of triazine and phenylurea interactions with colloids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 : 431-435 (2003)

Ivanov V.N., Wang J.-Y., Stabnikova O.V., Tay S.T.-L., Tay J.-H. Microbiological monitoring in the biodegradation of sewage sludge and food waste. *Journal of Applied Microbiology* 96 : 641-647 (2004)

Iwamoto T., Nasu M. Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (1) : 1-8 (2001)

## J

Jackson C.R., Liew K.C., Yule C.M. Structural and functional changes with depth in microbial communities in a tropical Malaysian peat swamp forest. *Microbial Ecology* 57 : 402-412 (2009)

Jacob G.S., Garbow J.R., Hallas L.E., Kimack N.M., Kishore G.M., Schaefer J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12) : 2953-2958 (1988)

Jacobson A.R., Dousset S., Guichard N., Baveye P., Andreux F. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. *Environmental Pollution* 138 : 250-259 (2005)

Jansson J.K., Björklöf K., Elvang A.M., Jorgensen K.S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. *Environmental Pollution* 107 : 217-223 (2000)

Jones K.C., de Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution* 100 : 209-221 (1999)

Jones R. The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. *Marine Pollution Bulletin* 51 : 495-506 (2005)

Joner E.J., Corgié S.C., Amellal N., Leyval C. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 34 : 859-864 (2002)

Jouanneau Y., Willison J.C., Meyer C., Krivobok S., Chevron N., Besombes J.-L., Blake G. Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environmental Science and Technology* 39 (15) : 5729-5735 (2005)

Ju Y.-H., Chen T.-C., Liu J.C. A study on the biosorption of lindane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 9 : 187-196 (1997)

## K

Kadir S., Al-Khatib K. Weed control in grape after fall and spring application of selected herbicides. *Weed*

*Technology* 20 (1) : 74-80 (2006)

Kaksonen A.H., Jussila M.M., Lindstrom K., Suominen L. Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38 : 817-827 (2006)

Kanagawa T. Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (4) : 317-323 (2003)

Kennedy G., Mayer T. Natural and constructed wetlands in Canada: An overview. *Water Quality Research Journal of Canada* 37 (2) : 295-325 (2002)

Kent Moore J., Braymer H.D., Larson A.D. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (2) : 316-320 (1983)

Khadrani A., Seigle-Murandi F., Steiman R., Vroumsia T. Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil. *Chemosphere* 38 (13) : 3041-3050 (1999)

Khan F.I., Husain T., Hejazi R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* 71 : 95-122 (2004)

Khrolenko M.V., Wieczorek P.P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A* 1093 : 111-117 (2005)

Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58 : 169-188 (2004)

Kishore G.M., Jacob G.S. Degradation of glyphosate by Pseudomonas sp. PG1982 via a sarcosine intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (25) : 12164-12168 (1987)

Kitada Y., Kawahata H., Suzuki A., Oomori T. Distribution of pesticides and bisphenol A in sediments collected from rivers adjacent to coral reefs *Chemosphere* 71 : 2082-2090 (2008)

Klimek M., Lejczak B., Kafarski P., Forlani G. Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Management Science* 57 : 815-821 (2001)

Knauert S., Escher B., Singer H., Hollender J., Knauer K. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (Atrazine, Isoproturon, and Diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environmental Science and Technology* 42 : 6424-6430 (2008)

Knauert S., Singer H., Hollender J., Knauer K. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. *Environmental pollution* 158 (1) : 167-174 (2010)

Koelmans A.A., Jonker M.T.O., Cornelissen G., Bucheli T.D., Van Noort P.C.M., Gustafsson O. Black carbon: The reverse of its dark side. *Chemosphere* 63 (3) : 365–377 (2006)

Kolic N.U., Hrsaka D., Kolara A.B., Petrica I., Stipicevic S., Soulas G., Martin-Laurent F. Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60 : 299-307 (2007)

Kools S.A.E., van Roovert M., van Gestel C.A.M., van Straalen N.M. Glyphosate degradation as a soil health indicator for heavy metal polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37 : 1303-1307 (2005)

Kookana R.S., Baskaran S., Naidu R. Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review. *Australian Journal Of Soil Research* 36 (5) : 715-764 (1998)

Kotsou M., Mari I., Lasaridi K., Chatzipavlidis I., Balis C., Kyriacou A. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani. Applied Soil Ecology* 26 : 113-121 (2004)

Kozdroj J., van Elsas J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 32 : 1405-1417 (2000)

Krasnits E., Friedler E., Sabbah I., Beliavski M., Tarre S., Green M. Spatial distribution of major microbial groups in a well established constructed wetland treating municipal wastewater. *Ecological Engineering* 35 (7) : 1085-1089 (2009)

Kreuger J. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *The Science of the Total Environment* 216 : 227-251 (1998)

Kröger R., Moore M.T., Locke M.A., Cullum R.F., Steinriede Jr. R.W., Testa III S., Bryant C.T., Cooper C.M. Evaluating the influence of wetland vegetation on chemical residence time in Mississippi Delta drainage ditches. *Agricultural Water Management* 96 : 1175-1179 (2009)

Krogh K.A., Halling-Sørensen B., Mogensen B.B., Vejrup K.V. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50 : 871-901 (2003)

Kruijt M., Tran H., Raaijmakers J.M. Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of Applied Microbiology* 107 (2) 546-556 (2009)

Krzysko-Lupicka T., Orlik A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* 34 (12) : 2601-2605 (1997a)

Krzysko-Lupicka T., Strof W., Kubs K., Skorupa M., Wieczorek P., Lejczak B., Kafarski P. The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 : 549-552 (1997b)

Kuiper I., Lagnedijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. Rhizoremediation : a beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17 (1) : 6-15 (2004)

Kuklinsky-Sobral J., Araujo W.L., Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (Glycine max) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil* 273 : 91-99 (2005)

Kurniawan, T.A., Chan G.Y.S., Lo W.H., Babel S. Comparisons of low-cost adsorbents for treating wastewaters laden with heavy metals. *Science of The Total Environment* 366 (2-3) : 409-426 (2006)

# L

Landau-Ossondo M., Rabia N., Jos-Pelage J., Marquet L.M., Isidore Y., Saint-Aimé C., Martin M., Irigaray P., Belpomme D. Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 63 : 383-395 (2009)

Landry D., Dousset S., Andreux F. Laboratory leaching studies of oryzalin and diuron through three undisturbed vineyard soil columns. *Chemosphere* 54 : 735-742 (2004)

Landry D., Dousset S., Andreux F. Leaching of oryzalin and diuron through undisturbed vineyard soil columns under outdoor conditions. *Chemosphere* 62 (10) : 1736-1747 (2006)

Langenbach T., Schroll R., Paim S. Fate and distribution of $^{14}$C-atrazine in a tropical oxisol. *Chemosphere* 40 : 449-455 (2000)

Lanyi K. Assessment of the relations between the spectroscopic characteristics of soils and their ability to adsorb organic pollutants. *Microchemical Journal* 79 : 249-256 (2005)

Lao S.-H., Loutre C., Brazier M., Coleman J.O.D., Cole D.J., Edwards R., Theodoulou F.L. 3,4-dichloroaniline is detoxified and exported via different pathways in *Arabidopsis* and soybean *Phytochemistry* 63 : 653-661 (2003)

Lapertot M.E., Pulgarin C. Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: Choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity. *Chemosphere* 65 : 682-690 (2006)

Lapworth D.J., Goody D.C. Source and persistence of pesticides in a semi-confined chalk aquifer of southeast England. *Environmental pollution* 144 : 1031-1044 (2006)

Lear G., Harbottle M.J., Sills G., Knowles C.J., Semple K.T., Thompson I.P. Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil. *Environmental Pollution* 146 : 139-146 (2007)

Lebeau T. Traitement des pesticides dans les zones humides artificielles : de l'atténuation naturelle à la gestion par bioremédiation et phytoremédiation. *Ingénieries* n° spécial : 87-102 (2008)

Lebeau T., Braud A., Jézéquel K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* 153 : 497-522 (2008)

Leglize P., Saada A.,Berthelin J., Leyval C. Adsorption of phenanthrene on activated carbon increases mineralization rate by specific bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 151 : 339–347 (2008)

Lehrfeld J. Conversion of agricultural residues into cation exchange materials. *Journal Of Applied Polymer Science* 61 (12) : 2099-2105 (1996)

Leistra M., Matser A.M. Adsorption, transformation, and bioavailability of the fungicides carbendazim and iprodione in soil, alone and in combination. *Journal of Environmental Science and Health Part B - Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 39 (1) : 1-17 (2004)

Lendvay J.M., Löffler F.E., Dollhopf M., Aiello M.R., Daniels G., Fathepure B.Z., Gebhard M., Heine R., Helton R., Shi J., Krajmanlik-Brown R., Major Jr C.L., Barcelona M.J., Petrovskis E., Hickey R., Tiedje J.M., Adriaens P. Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science and Technology* 37 : 1422-1431 (2003)

Lennartz B., Louchart X., Voltz M., Andrieux P. Diuron and simazine losses to runoff water in Mediterranean vineyards. *Journal of Environmental Quality* 26 : 1493-1502 (1997)

Lennartz B., Louchart X. Effect of drying on the desorption of diuron and terbuthylazine from natural soils. *Environmental Pollution* 146 (1) : 180-187 (2007)

Lerbs W., Stock M., Parthier B. Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes spec*. strain GL. *Archives of Microbiology* 153 (2) : 146-150 (1990)

Li K., Baoshan Xing B., Torello W.A. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environmental Pollution* 134 : 187–194 (2005)

Li K.-B., Cheng J.-T., Wang X.-F., Zhou Y., Liu W.-P. Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. *Pedosphere* 18 (2) : 265-272 (2008)

Li X., Lin X., Li P., Liu W., Wang L., Ma F., Chukwuka K.S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials* 172 (2-3) : 601-605 (2009)

Liao M., Xie X. Effects of combination of plant and microorganism on degradation of simazine in soil. *Journal of Environmental Sciences* 20 : 195-198 (2008)

Lima D., Viana P., André S., Chelinho S., Costa C., Ribeiro R., Sousa J.P., Fialho A.M., Viegas C.A. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches. *Chemosphere* 74 : 187-192 (2009)

Lipok J., Owsiak Y., Młynarz P., Forlani G., Kafarski P. Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme and Microbial Technology* 41 : 286-291 (2007)

Liu C.-M., McLean P.A., Sookdeo C.C., Cannon F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (6) : 1799-1804 (1991)

Liu L., Jiang C.-Y., Liu X.-Y., Wu J.-F., Han J.-G., Liu S.-J. Plant–microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology* 9 (2) : 465-473 (2007)

Liu M., Cheng S., Ou D., Yang Y., Liu H., Hou L., Gao L., Xu S. Organochlorine pesticides in surface sediments and suspended particulate matters from the Yangtze estuary, China. *Environmental Pollution* 156 : 168-173 (2008a)

Liu J., Xie J., Chu Y., Sun C., Chen C., Wang Q. Combined effect of cypermethrin and copper on catalase activity in soil. *Journal of Soils and Sediments* 8 : 327-332 (2008b)

Liu J., Lu X., Xie J., Chu Y., Sun C., Wang Q. Adsorption of lambda-cyhalothrin and cypermethrin on two typical Chinese soils as affected by copper. *Environment Science and Pollution Research* 16 : 414-422 (2009a)

Liu W., Zhang Y.-B., Quan X., Jin Y.-H., Chen S. Effect of perfluorooctane sulfonate on toxicity and cell uptake of other compounds with different hydrophobicity in green alga. *Chemosphere* 75 (3) : 405-409 (2009b)

Lopez-Ramon M.V., Fontecha-Camara M.A., Alvarez-Marino M.A., Moreno-Castilla C. Removal of diuron and amitrole from water under static and dynamic conditions using activated carbons in form of fibers, cloth, and grains. *Water Research* 41 : 2865-2870 (2007)

Lorraine-Colwill D.F., Powles S.B., Hawkes T.R., Hollinshead P.H., Warner S.A.J., Preston C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74 : 62-72 (2003)

Louchart X., Voltz M., Andrieux P. Dynamique de la mobilisation et du transfert du diuron par ruissellement. *Earth and Planetary Sciences* 331 : 475-481 (2000)

Louchart X., Voltz M., Andrieux P., Moussa R. Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. *Journal of Environmental Quality* 30 : 982-991 (2001)

Louchart X., Voltz M. Aging effects on the availability of herbicides to runoff transfer. *Environmental Science and Technology* 41 : 1137-1144 (2007)

Lupwayi N.Z., Harker K.N., Clayton G.W., Turkington T.K., Rice W.A., O'Donovan J.T. Soil microbial biomass and diversity after herbicide application. *Canadian Journal of Plant Science* 84 (2) : 677-685 (2004)

Lupwayi N.Z., Harker K.N., Clayton G.W., O'Donovan J.T., Blackshaw R.E. Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 129 : 171-176 (2009)

# M

Macek T., Macková M., Kás J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18 : 23-34 (2000)

Machate T., Noll H., Behrens H., Kettrup A., Degradation of phenanthrene and hydraulic characteristics in a constructed wetland. *Water Research* 31 (3) : 554-560 (1997)

Madhun Y.A., Young J.L., Freed V.H. Binding of herbicides by water-soluble organic materials from soil. *Journal of Environmental Quality* 15 : 64-68 (1986)

Magnusson M., Heimann K., Negri A.P. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56 : 1545-1552 (2008)

Malandrino M., Abollino O., Giacomino A., Aceto M., Menstati E. Adsorption of heavy metals on vermiculite: Influence of pH and organic ligands. *Journal of Colloid and Interface Science* 299 (2) : 537-546 (2006)

Malik S., Michael Beer M., Megharaj M., Naidu R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* 34 : 265-276 (2008)

Malone R.W., Shipitalo M.J., Wauchope R.D., Sumner H. Residual and contact herbicide transport through field lysimeters via preferential flow. *Journal of Environmental Quality* 33 : 2141-2148 (2004)

Maltais-Landry G., Maranger R., Brisson J. Effect of artificial aeration and macrophyte species on nitrogen cycling and gas flux in constructed wetlands. *Ecological Engineering* 35 : 221-229 (2009)

Mamy L., Barriuso E. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere* 61 : 844-855 (2005)

Mamy L., Barriuso E. Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *European Journal of Soil Science* 58 : 174-187 (2007)

Manas F., Peralta L., Raviolo J., Garcia Ovando H., Weyers A., Ugnia L., Gonzalez Cid M., Larripa I., Gorla N. Genotoxicity of Glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (1) : 37-41 (2009)

Maqueda C., Morillo E., Undabeytia T., Martin F. Sorption of glyphosate and Cu(II) on a natural fulvic acid complex : mutual influence. *Chemosphere* 37 (6) : 1063-1072 (1998)

Margesin R., Schinner F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7) : 3127-3133 (2001)

Margoum C., Malessard C., Gouy V. Investigation of various physicochemical and environmental parameter influence on pesticide sorption to ditch bed substratum by means of experimental design. *Chemosphere* 63 : 1835-1841 (2006)

Maron P.-A., Schimann H., Ranjard L., Brothier E., Domenach A.-M., Lensi R., Nazaret S. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology* 42 : 65-73 (2006)

Marron-Montiel E., Ruiz-Ordaz N., Rubio-Granados C., Juarez-Ramirez C., Galindez-Mayer C.J. 2,4-D-degrading bacterial consortium : Isolation, kinetic characterization in batch and continuous
culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochemistry* 41 : 1521-1528 (2006)

Matamoros V., Jaume Puigagut J., Joan Garcia J., Bayona J.M. Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: A preliminary screening. *Chemosphere* 69 : 1374-1380 (2007)

Matamoros V., Aracelly Caselles-Osorio A., García J., Bayona J.M. Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. *Science of the Total Environment* 394 : 171-176 (2008)

McAuliffe K.S., Hallas, L.E., Kulpa, C.F. 1Glyphosate degradation by *Agrobacterium radiobacter* isolated from activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology* 6 : 219-221 (1990)

McGrath J.W., Ternan N.G., Quinn J.P. Utilization of organophosphonates by environmental micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 24 : 69-73 (1997)

McGrath J.W. , Kulakova A.N., Quinn J.P. A comparison of three bacterial phosphonoacetate hydrolases from different environmental sources. *Journal of Applied Microbiology* 86 : 834-840 (1999)

McKinlay R.G., Kasperek K. Obsevations on decontamination of herbicide-polluted water by marsh plant systems. *Water Research* 33 (2) : 505-511 (1999)

Meckenstock R.U. Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiology Letters* 177 : 67-73 (1999)

Meckenstock R.U., Morasch B., Griebler C., Richnow H.-H. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated acquifers. *Journal of Contaminant Hydrology* 75 : 215-255 (2004)

Menendez-Vega D., Gallego J.L.R., Pelaez A.I., Fernandez de Cordoba G., Moreno J., Munoz D., Sanchez J. Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* 43 : 310-321 (2007)

Mentzer J.L., Goodman R.M., Balser T.C. Microbial response over time to hydrologic and fertilization treatments in a simulated wet prairie. *Plant and Soil* 284 : 85-100 (2006)

Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M., Bakker P.A.H.M. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* (2005) 6 (2) : 177-185 (2005)

Miglioranza K.S.B., de Moreno J.E.A., Moreno V.J. Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina *Water Research* 38 : 1765-1772 (2004)

Mijangos I., Becerril J.M., Albizu I., Epelde L., Garbisu C. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (3) : 505-513 (2009)

Miller C.V., Foster G.D., Majedi B.F. Baseflow and stormflow metal fluxes from two small agricultural catchments in the Coastal Plain of the Chesapeake Bay Basin, United States. *Applied Geochemistry* 18 : 483-501 (2003)

Mitchell C., Brodie J., White I. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday Region, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 51 : 23-36 (2005)

Mo C.-H., Cai Q.-Y., Li H.-Q., Zeng Q.-Y., Tang S.-R., Zhao Y.-C. Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soils. *Chemosphere* 73 : 120-125 (2008)

Monteiro M., Quintaneiro C., M. Pastorinho M., Pereira M.L., Morgado F., Guilhermino L., Soaresa A.M.V.M. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere* 62 : 1333-1339 (2006)

Monteiro A., Lopes C.M. Influence of cover crop on water use and performance of vineyard in Mediterranean Portugal Agriculture. *Ecosystems and Environment* 121 : 336-342 (2007)

Moore M.T., Rodgers Jr. J.H., Cooper C.M., Smith Jr. S. Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. *Environmental Pollution* 110 : 393-399 (2000)

Moore M.T., Rodgers Jr. J.H., Smith Jr. S., Cooper C.M. Mitigation of metolachlor-associated agricultural runoff using constructed wetlands in Mississippi, USA. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 84 : 169-176 (2001)

Moore M.T., Schulz R., Cooper C.M., Smith Jr. S., Rodgers Jr. J.H. Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. *Chemosphere* 46 : 827-835 (2002)

Moran A.C., Müller A., Manzano M., Gonzalez B. Simazine treatment history determines a significant herbicide

degradation potential in soils that is not improved by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. *Journal of Applied Microbiology* 101 : 26-35 (2006)

Morillo E., Undabeytia T., Maqueda C., Ramos A. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. *Chemosphere* 40 : 103-107 (2000)

Morillo E., Undabeytia T., Maqueda C., Ramos A. The effect of dissolved glyphosate upon the sorption of copper by three selected soils. *Chemosphere* 47 : 747-752 (2002)

Muller M., Patureau D., Godon J.-J., Delgenès J.-P., Hernandez-Raquet G. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 : 691-701 (2010)

Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60 : 193-207 (2001)

Mulligan C.N., Yong R.N. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International* 30 : 587-601 (2004)

Munoz R., Alvarez M.T., Munoz A., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B. Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere* 63 : 903-911 (2006)

# N

Nacamulli C., Bevivino A., Dalmastri C., Tabacchioni S., Chiarini L. Perturabtion of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology* 23 : 183-193 (1997)

Nascimento M.G., Cotrim Sartor de Oliveira M.L., Lima A.S., Viana de Camargo J.L. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology* 224 : 66-73 (2006)

Newcombe D.A., Crowley D.E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Applied and Microbiological Biotechnology* 51 : 877-882 (1999)

Newton M., Horner L.M., Cowell J.E., White D.E., Cole E.C. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42 (8) : 1795-1802 (1994)

Nguyen L.M. Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Ecological Engineering* 16 : 199-221 (2000)

Nicorarat D., Dick W.A., Dopson M., Tuovinen O.H. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (2) : 312-321 (2008)

Niemi R.M., Vepsäläinen M., Wallenius K., Erkomaa K., Kukkonen S., Palojärvi A., Vestberg M. Conventional versus organic cropping and peat amendment: Impacts on soil microbiota and their activities. *European Journal of Soil Biology* 44 : 419-428 (2008)

Niemi R.M., Heiskanen I., Ahtiainen J.H., Rahkonen A., Mäntykoski K., Welling L., Laitinen P., Ruuttunen P. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Applied Soil Ecology* 41 (3) : 293-304 (2009)

Nikolausz M., Kappelmeyer U., Szekely A., Rusznyak A., Marialigeti K., Kästner M. Diurnal redox fluctuation and microbial activity in the rhizosphere of wetland plants. *European Journal of Soil Biology* 44 : 324-333 (2008)

Niu G.-L., Zhang J.-J., Zhao S., Liu H., Boon N., Zhou N.-Y. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environmental Pollution* 157 : 763-771 (2009)

Novak S.M., Portal J.-M., Schiavon M. Effects of soil type upon metolachlor losses in subsurface Drainage. *Chemosphere* 42 : 235-244 (2001)

Nurk K., Zaytsev I., Talpsep I., Truu J., Mander Ü. Bioaugmentation in a newly established LECA-based horizontal flow soil filter reduces the adaptation period and enhances denitrification. *Bioresource Technology* 100 (24) : 6284-6289 (2009)

Nyyssönen M., Kapanen A., Piskonen R., Lukkari T., Itävaara M. Functional genes reveal the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following *in situ* biostimulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 : 169-182 (2009)

# O

Obojska A., Lejczak B., Kubrak M. Degradation of phosphonates by streptomycete isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 : 872-876 (1999)

Obojska A., Ternan N.G., Lejczak B., Kafarski P., McMullan G. Organophosphonate Utilization by the Thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4) : 2081-2084 (2002)

Obojska A., Lejczak B. Utilisation of structurally diverse organophosphonates by streptomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 : 557-563 (2003)

Ogier J.C., Son O., Gruss A., Tailliez P., Delacroix-Buchet A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68 : 3691-3701 (2002)

Olette R., Couderchet M., Biagianti S., Eullaffroy P. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. *Chemosphere* 70 : 1414-1421 (2008)

Olsen R.A., Bakken L.R. Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology* 13 : 59-74 (1987)

Orphan V.J. Methods for unveiling cryptic microbial partenerships in nature. *Current Opinion in Microbiology* 12 : 231-237 (2009)

# P

Pang L., Close M.E. A field tracer study of attenuation of atrazine, hexazinone and procymidone in a pumice sand aquifer. *Pest Management Science* 57 : 1142-1150 (2001)

Park J.-H., Feng Y., Ji P., Voice T.C., Boyd S.A. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6) : 3288-3298 (2003)

Pascal-Lorber S., Rathahao E., Cravedi J.-P., Laurent F. Metabolic fate of [14 C]-2,4-dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere* 56 : 275-284 (2004)

Pattanasupong A., Nagase H., Inoue M., Hirata K., Tani K., Nasu M., Miyamoto K. Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20 : 517-522 (2004)

Patureau D., Hernandez-Raquet G., Balaguer P., Delgenes N., Muller M., Dagnino S., Delgenes J. P. Relevant approach to assess performances of wastewater biosolids composting in terms of micropollutants removal. *Water Science and Technology* 58 (1) : 45-52 (2008)

Pei Z.-G., Shan X.-Q., Wen B., Zhang S., Yan L., Khan S.U. Effect of copper on the adsorption of p-nitrophenol onto soils. *Environmental Pollution* 139 : 541-549 (2006)

Peiris-John R.J., Wickremasinghe R. Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 : 239-245 (2008)

Pelekani C., Snoeyink V.L. Competitive adsorption between atrazine and methylene blue on activated carbon: the importance of pore size distribution. *Carbon* 38 : 1423-1436 (2000)

Penaloza-Vazquez A., Mena G.L., Herrera-Estrella L., Bailey A.M. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2) : 538-543 (1995)

Peruzzo P.J., Porta A.A., Roncoa A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina *Environmental Pollution* 156 : 61-66 (2008)

Pesaro M., Nicollier G., Zeyer J., Widmer F. Impact of Soil Drying-Rewetting Stress on Microbial Communities and Activities and on Degradation of Two Crop Protection Products. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5) : 2577-2587 (2004)

Pesce S., Fajon C., Bardot C., Bonnemoy F., Portelli C., Bohatier J. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquatic Toxicology* 78 : 303-314 (2006)

Pesce S., Martin-Laurent F., Rouard N., Montuelle B. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: from treated plots to lotic receiver hydrosystem. *Pest Management Science* 65 (6) : 651-657 (2009)

Pett-Ridge J., Firestone M.K. Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11) : 6998-7007 (2005)

Piccolo A., Celano G. Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13 (11) : 1737-1741 (1994)

Piccolo A., Gatta L., Campanella L. Interactions of glyphosate herbicide with a humic-acid and its iron complex. *Annali Di Chimica* 85 (1-2) : 31-40 (1995)

Piccolo A., Celano G., Conte P. Adsorption of glyphosate by humic substances *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 : 2442-2446 (1996)

Pignatello J.J., Xing B.S. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles *Environmental Science and Technology* 30 (1) : 1-11 (1996)

Pipke R., Schulz A., Amrhein N. Uptake of glyphosate by an Arthrobacter sp. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (5) : 974-978 (1987a)

Pipke R., Amrhein N., Jacob G.S., Schaefer J., Kishore G.M. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. *European Journal of Biochemistry* 165 : 267-273 (1987b)

Pipke R., Amrhein N. Carbon-Phosphorus lyase activity in permeabilized cells of Arthrobacter sp. GLP-1. *FEBS Letters* 236 (1) : 135-138 (1988)

Plangklang P., Reungsang A. Effects of rhizosphere remediation and bioaugmentation on carbofuran removal from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 : 983-989 (2008)

Popov K., Rönkkömäki H., Lajunen L.H.J. : Critical Evaluation of Stability Constants of Phosphonic Acids. *Pure and Applied Chemistry* 73 (10) : 1641-1677 (2001)

Popov V.H., Cornish P.S., Sun H. Vegetated biofilters: The relative importance of infiltration and adsorption in reducing loads of water-soluble herbicides in agricultural runoff. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 114 : 351-359 (2006)

Pozo K., Harner T., Lee S.C., Wania F., Muir D.C.G., Jones K.C. Seasonally Resolved Concentrations of Persistent

Organic Pollutants in the Global Atmosphere from the First Year of the GAPS Study. *Environmental Science and Technology* 43 (3) : 796-803 (2009)

Prado A.G.S., Airoldi C. The effect of the herbicide diuron on soil microbial activity. *Pest Management Science* 57 : 640-644 (2001)

Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N., Teaumroong N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology* 42 : 141-149 (2009)

Prospero J.M., Seba D.B. Some additional measurements of pesticides in lower atmosphere of Northern Equatorial Atlantic ocean. *Atmospheric Environment* 6 (5) : 363-364 (1972)

# Q

Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (5) : 511-516 (1988)

Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Carbon-Phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31 (3) : 283-287 (1989)

# R

Rabiet M., Margoum C., Gouy V., Carluer N., Coquery M. Transfert des pesticides et métaux dans un petit bassin versant viticole - Etude préliminaire de l'influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants. *Ingénieries* n° spécial : 65-75 (2008)

Rae J.L., Cooper C.S., Parker A., Peters A. Pesticide sorption onto aquifer sediments. *Journal of Geochemical Exploration* 64 : 263-276 (1998)

Rahman L., Whitelaw-Weckert M.A., Hutton R.J., Orchard B. Impact of floor vegetation on the abundance of nematode trophic groups in vineyards. *Applied Soil Ecology* 42 : 96-106 (2009)

Ramsburg C.A., Abriola L.M., Pennell K.D., Löffler F., Gamache M., Amos B.K., Petrovskis E.A. Stimulated microbial reductive dechlorination following surfactant treatment at the Bachman Road site. *Environmental Science and Technology* 38 : 5902-5914 (2004)

Ratcliff A.W., Busse M.D., Shestak C.J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* 34 : 114-124 (2006)

Reichenberger S., Bach M., Skitschak A., Frede H.-G. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; A review. *Science of the Total Environment* 384 : 1-35 (2007)

Relyea R., Hoverman J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9 : 1157-1171 (2006)

Richard J.Y., Vogel T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44 : 93-100 (1999)

Rios C., Salvadó V., Hidalgo M. Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane. *Journal of Membrane Science* 203 : 201-208 (2002)

Risebrough R.W., Huggett R.J., Griffin J.J., Goldberg E.D. Pesticides - Transatlantic movements in Northeast trades. *Science* 159 (3820) : 1233-1236 (1968)

Roberts S.J., Walker A., Cox L., Welch S.J. Isolation of isoproturon-degrading bacteria from treated soil via three

different routes. *Journal of Applied Microbiology* 85 : 309-316 (1998)

Roche H., Vollaire Y., Persic A., Buet A., Oliveira-Ribeiro C., Coulet E., Banas D., Ramade F. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France) *Environmental Pollution* 157 (8-9) : 2493-2506 (2009)

Rogers S.W., Ong S.K., Kjartanson B.H., Golchin J., Stenback G.A. Natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites: review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 6 (3) : 141-155 (2002)

Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Haahtela K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. E*nvironmental Pollution* 107 : 179-185 (2000)

Rose M.T., Sanchez-Bayo F., Crossan A.N., Kennedy I.R. Pesticide removal from cotton farm tailwater by a pilot-scale ponded wetland. *Chemosphere* 63 : 1849-1858 (2006)

Rouchaud J., Neus O., Bulcke R., Cools K., Eelen H., Dekkers T. Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide, and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards. *Archives in Environmental and Contaminant Toxicology* 39 : 60-65 (2000)

Roudière L., Lorto S., Tallagrand E., Marchandin H., Jeannot J.-L., Jumas-Bilak E. Molecular fingerprint of bacterial communities and 16S rDNA intra-species heterogeneity: a pitfall that should be considered. *Pathologie Biologie* 55 : 434-440 (2007)

Rousseaux S., Hartmann A., Lagacherie B., Piutti S., F. Andreux F., Soulas G. Inoculation of an atrazine-degrading strain, Chelatobacter heintzii Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere* 51 : 569-576 (2003)

Rüdel H. Volatilisation of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere* 35 (1-2) : 143-152 (1997)

Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J., Marvel J.T. Metabolism and ddegradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 25 (3) : 517-528 (1977)

Runes H.B., Jenkins J.J., Bottomley P.J. Atrazine degradation by bioaugmented sediment from constructed wetlands. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 : 427-432 (2001)

# S

Saison C., Degrange V., Oliver R., Millard P., Commeaux C., Montange D., Le Roux X. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology* 8 (2) : 247:257 (2006)

Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34 : 635-648 (2007)

Salvestrini S., Di Cerbo P., Capasso S. : Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere* 48 : 69-73 (2002)

Sánchez-Camazano M., Arienzo M., Sánchez-Martin M.J., Crisanto T. Effect of different surfactants on the mobility of selected non-ionic pesticides in soil. *Chemosphere* 31 (8) : 3793-3801 (1995)

Sarathchandra S.U., Burch G., Cox N.R. Growth patterns of bacterial communities in the rhizoplane and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. *Applied Soil Ecology* 6 : 293-299 (1997)

Sasikala S., Tanaka N., Wah Wah H.S.Y., Jinadasa K.B.S.N. Effects of water level fluctuation on radial oxygen loss, root porosity, and nitrogen removal in subsurface vertical flow wetland mesocosms. *Ecological Engineering* 35 : 410-417 (2009)

Sathishkumar M., Binupriya A.R., Kavitha D., Selvakumar R., Jayabalan R., Choi J.G., Yun S.E. Adsorption potential of maize cob carbon for 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions: Equilibrium, kinetics and thermodynamics modeling. *Chemical Engineering Journal* 147 (2-3) : 265-271 (2008)

Satsuma K. Complete biodegradation of atrazine by a microbial community isolated from a naturally derived river ecosystem (microcosm). *Chemosphere* 77 (4) 590-596 (2009)

Schäfer R.B., Caquet T., Siimes K., Mueller R., Lagadic L., Liess M. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment* 382 : 272-285 (2007)

Scheyer A., Graeff C., Morville S., Mirabel P., Millet M. Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France) *Chemosphere* 58 : 1517-1524 (2005)

Scheyer A., Morville S., Mirabel P., Millet M. Pesticides analysed in rainwater in Alsace region (Eastern France) : Comparison between urban and rural sites. *Atmospheric Environment* 41 : 7241-7252 (2007)

Schnürer Y., Persson P., Nilsson M., Nordgren A., Giesler R. Effects of Surface Sorption on Microbial Degradation of Glyphosate. *Environmental Science and Technology* 40 (13) : 4145-4150 (2006)

Schowanek D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (4) : 895-903 (1990)

Schröder P., Maier H., Debus R. Detoxification of herbicides in *Phragmites australis*. *Zeitschrift für Naturforschung* 60 (3-4) : 314-324 (2005)

Schröder P., Navarro-Aviñó J., Azaizeh H., Goldhirsh A.G., DiGregorio S., Komives T., Langergraber G., Lenz A., Maestri E., Memon A.R., Ranalli A., Sebastiani L., Smrcek S., Vanek T., Vuilleumier S., Wissing F. Using Phytoremediation Technologies to Upgrade Waste Water Treatment in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 14 (7) : 490-497 (2007)

Schröder P., Daubner D., Maier H., Neustifter J., Debus R. Phytoremediation of organic xenobiotics – Glutathione dependent detoxification in *Phragmites* plants from European treatment sites. *Bioresource Technology* 99 : 7183-7191 (2008)

Schulz R., Peall S.K.C., Hugo C., Krause V. Concentration, load and toxicity of spraydrift-borne azinphos-methyl at the inlet and outlet of a constructed wetland. *Ecological Engineering* 18 : 239-245 (2001)

Schulz R., Peall S.K.C. Effectiveness of a constructed wetland for retention of nonpoint-source pesticide pollution in the Lourens River catchment, South Africa. *Environmental Science and Technology* 35 (2) : 422-426 (2001)

Schwartz E., Trinh S.V., Scow K.M. Measuring growth of a phenanthrene-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative competitive polymerase chain reaction method. FEMS Microbiology Ecology 34 : 1-7 (2000)

Scow K.M., Hicks K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology* 16 : 246-253 (2005)

Screpanti C., Accinelli C., Vicari A., Catizone P. Glyphosate and glufosinate-ammonium runoff from a corn-growing area in Italy. *Agronomy for Sustainable Development* 25 (3) : 407-412 (2005)

Scullion J. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* 93 : 51-65 (2006)

Seba D.B., Prospero J.M. Pesticides in lower atmosphere of Northern Equatorial Atlantic ocean. *Atmospheric Environment* 5 (12) : 1043-1050 (1971)

Semple K.T., Dew N.M., Doick K.J., Rhodes A.H. Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil ? *Environmental Pollution* 140 : 164-172 (2006)

Semple K .T., Doick K.J., Wick L.Y., Harms H.. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* 150 : 166-176 (2007)

Sharma R.K., Kumar A., Joseph P.E. Removal of Atrazine from Water by Low Cost Adsorbents Derived from Agricultural and Industrial Wastes. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology* 80 : 461-464 (2008)

Shawabkeh R.A. Solidification and stabilization of cadmium ions in sand-cement-clay mixture. *Journal Of Hazardous Materials* 125 (1-3) : 237-243 (2005)

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

Shelton D. R., Parkin T.B. Effect of moisture on sorption and biodegradation of carbofuran in soil. *Journal of Agricutural and Food Chemistry* 39 : 2063-2068 (1991)

Sheng G., Yang Y., Huang M., Yang K. Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. *Environmental Pollution* 134 : 457-463 (2005)

Sherrard R.M., Bearr J.S., Murray-Gulde C.L., Rodgers Jr. J.H., Shah Y.T. Feasibility of constructed wetlands for removing chlorothalonil and chlorpyrifos from aqueous mixtures. *Environmental Pollution* 127 : 385-394 (2004)

Shi Y., Meng F., Guo F., Lu Y., Wang T., Zhang H. Residues of organic chlorinated pesticides in agricultural soils of Beijing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49 : 37-44 (2005)

Siczek A., Kotowska U., Lipiec J., Nosalewicz A. Macro-porosity and leaching of atrazine in tilled and orchard loamy soils. *Chemosphere* 70 : 1973-1978 (2008)

Shinabarger D.L., Braymer H.D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG 2982. *Journal of Bacteriology* 168 (2) : 702-707 (1986)

Silva I.S., da Costa dos Santos E., Ragagnin de Menezes C., Fonseca de Faria A., Franciscon E., Grossman M., Durrant L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology* 100 (20) : 4669-4675 (2009)

Singh O.V., Jain R.K. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 : 128-135 (2003)

Singh B., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. Role of Soil pH in the Development of Enhanced Biodegradation of Fenamiphos. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12) : 7035-7043 (2003)

Singh S., Kang S.H., Mulchandani A.,Chen W. Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 19 : 437-444 (2008)

Singh B.K., Dawson L.A., Macdonald C.A., Buckland S.M. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology* 41 : 239-248 (2009)

Siripattanakul S., Wirojanagud W., McEvoy J.M., Casey F.X.M., Khan E. A feasibility study of immobilized and free mixed culture bioaugmentation for treating atrazine in infiltrate. *Journal of Hazardous Materials* 168 : 1373-1379 (2009)

Słaba M., Szewczyk R., Bernat P., Długoński J. Simultaneous toxic action of zinc and alachlor resulted in enhancement of zinc uptake by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii. Science of the Total Environment* 407 : 4127-4133 (2009)

Sleytr K., Tietz A., Langergraber G., Haberl R., Sessitsch A. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. Ecological Engineering 35 : 1021-1025 (2009)

Smith A.E., Aubin A.J. Degradation of C-14 glyphosate in Saskatchewan soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50 (4) : 499-505 (1993)

Smith A.E., Hristova K., Wood I., Mackay D.M., Lory E., Lorenzana D., Scow K.M. Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl-tertiarybutyl ether (MTBE) . *Environmental Health Perspective* 113 : 317-322 (2005)

Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67 : 6-20 (2009)

Song K.-Y., Zoh K.-D., Kang H. Release of phosphate in a wetland by changes in hydrological regime. *Science of the Total Environment* 380 : 13-18 (2007)

Song N.H., Chen L., Yang H. Effect of dissolved organic matter on mobility and activation of chlorotoluron in soil and wheat. *Geoderma* 146 : 344-352 (2008)

Sørensen S.R., Ronen Z., Aamand J. Isolation from agricultural soil and characterization of a Sphingomonas sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12) : 5403-5409 (2001)

Sørensen S.R., Bending G.D., Jacobsen C.S., Walker A., Aamand J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology* 45 : 1-11 (2003)

Sørensen S.R., Schultz A., Jacobsen O .S., Aamand J. Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles *Environmental Pollution* 141 : 184-194 (2006)

Sørensen S.R., Albers C.N., Aamand J. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8) : 2332-2340 (2008)

Spark K.M., Swift R.S. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of the Total Environment* 298 : 147-161 (2002)

Spliid N.H., Helweg A., Heinrichson K. Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed. *Chemosphere* 65 (11) : 2223-2232 (2006)

Stasinakis A.S., Kotsifa S., Gatidou G., Mamais D. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. *Water Research* 43 : 1471-1479 (2009)

Stearman G.K., George D.B., Carlson K., Lansford S. Pesticide removal from container nursery runoff in constructed wetland cells. *Journal of Environmental Quality* 32 : 1548-1556 (2003)

Steenwerth K., Belina K.M. Cover crops enhance soil organic matter, carbon dynamics and microbiological function in a vineyard agroecosystem. *Applied Soil Ecology* 40 : 359-369 (2008)

Steinle P., Thalmann P., Höhener P., Hanselmann K.W. , Stucki G. Effect of Environmental Factors on the Degradation of 2,6-Dichlorophenol in Soil. *Environmental Science and Technology* 34 (5) : 771-775 (2000)

Stenrød M., Eklo O.M., Charnay M.-P., Benoit P. Effect of freezing and thawing on microbial activity and glyphosate degradation in two Norwegian soils. *Pest Management Science* 61 : 887-898 (2005)

Stenström J., Svensson K., Johansson M. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 36 : 93-104 (2001)

Stepp T.D., Camper N.D., Paynter M.J.B., Anaerobis microbial degradation of selected 3,4-dihalogenated aromatic compounds. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 23 (2) : 256-260 (1985)

Stone W.W., Wilson J.T. Preferential flow estimates to an agricultural tile drain with implications for glyphosate transport. *Journal of Environmental Quality* 35 : 1825-1835 (2006)

Stottmeister U., Wießner A., Kuschk P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller R.A., Moormann H. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22 : 93-117 (2003)

Struijs J., Rogers J.E. Reductive dehalogenation of dichloroanilines by anaerobic microorganisms in fresh and dichlorophenol-acclimated pond sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (10) : 2527-2531 (1989)

Sturman P.J., Stewart P.S., Cunningham A.B., Bouwer E.J., Wolfram J.H. Engineering scale-up of *in situ* bioremediation processes: a review. *Journal of Contaminant Hydrology* 19 : 171-203 (1995)

Sud D., Mahajan G., Kaur M.P., Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions - A review. *Bioresource Technology* 99 (14) : 6017-6027 (2008)

Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.V. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18 : 647-658 (2002)

Swami D., Buddhi D. Removal of contaminants from industrial wastewater through various non-conventional technologies: a review. *International Journal Of Environment And Pollution* 27 (4) : 324-346 (2006)

Syversen N., Bechmann M. Vegetative buffer zones as pesticide filters for simulated surface runoff. *Ecological Engineering* 22 : 175-184 (2004)

# T

Tadonléké R.D., Le Berre B., Perreau F., Humbert J.-F. Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquatic Toxicology* 94 : 103-113 (2009)

Tailliez P., Beaud D., Ogier J.C. Le point sur les outils moléculaires de classification et d'écologie microbienne. *Science des Aliments* 22 : 5-21 (2002)

Tao Q.-H., Tang H.-X. Effect of dye compounds on the adsorption of atrazine by natural sediment. *Chemosphere* 56 : 31-38 (2004)

Taok M., Cochet N., Pauss A., Schoefs O. Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. *European Journal of Soil Biology* 43 : 335-340 (2007)

Taylor R.L., Maxwell B.D., Boik R.J. Indirect effects of herbicides on bird food resources and beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 116 : 157-164 (2006)

Teisseire H., Couderchet M., Vernet G. Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Pollution* 106 : 39-45 (1999)

Tejada M. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate +diflufenican herbicides. *Chemosphere* 76 (3) : 365-373 (2009)

Ternan N.G., McGrath J.W., McMullan G., Quinn J.P. Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 : 635-647 (1998)

Tesfamariam T., Bott S., Cakmak I., Römheld V., Neumann G. Glyphosate in the rhizosphere - Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. *European Journal of Agronomy* 31 (3) : 126-132 (2009)

Thévenot M., Dousset S., Rousseaux S., Andreux F. Influence of organic amendments on diuron leaching through an acidic and a calcareous vineyard soil using undisturbed lysimeters. *Environmental Pollution* 153 : 148-156 (2008)

Thévenot M., Dousset S., Hertkorn N., Schmitt-Kopplin P., Andreux F. Interactions of diuron with dissolved organic matter from organic amendments. *Science of the Total Environment* 407 (14) : 4297-4302 (2009)

Thioulouse J., Chessel D., Dolédec S., Olivier J.-M. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7 : 75-83 (1997)

Thomas K.V., Hurst M.R., Matthiessen P., Sheahan D., Williams R.J. Toxicity characterization of organic contaminant in stormwaters from an agricultural headwater stream in South East England Water Research 35 (10) : 2411-2416 (2001)

Thompson J.D., Higgins G.D., Gibson D.T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 : 4673-4680 (1994)

Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., Singer A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology* 7 (7) : 909-915 (2005)

Thullner M., Van Cappellen P., Regnier P. Modeling the impact of microbial activity on redox dynamics in porous media. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69 (21) : 5005-5019 (2005)

Tian F., Ding Y., Zhu H., Yao L., Du B. Genetic Diversity of Siderophore-producing Bcteria of Tobacco Rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 : 276-284 (2009)

Tixier C., Bogaerts P., Sancelme M., Bonnemoy F., Twagilimana L., Cuer A., Bohatier J., Veschambre H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron : structure and toxicity of metabolites. *Pest Management Science* 56 : 455-462 (2000)

Tixier C., Sancelme M., Bonnemoy F., Cuer A., Veschambre H.. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7) : 1381-1389 (2001)

Tixier C., Sancelme M., Aït-Aïssa S., Widehem P., Bonnemoy F., Cuer A., Truffaut N., Veschambre H. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter sp. N2*: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* 46 : 519-526 (2002)

Tominack R.L. Herbicide formulations. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 38 (2) : 129-135 (2000)

Torstensson N.T.L., Aamisepp A. Detoxification of glyphosate in soils. *Weed Research* 17 (3) : 209-212 (1977)

Torsvik V., Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5 : 240-245 (2002)

Toyama T., Yu N., Kumada H., Sei K., Ike M., Fujita M. Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 : 346-353 (2006)

Toyama T., Sato Y., Inoue D., Sei K., Chang Y.-C., Kikuchi S., Ike M. Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 (2) : 147-150 (2009)

Travkin V., Baskunov B.P., Golovlev E.L., Boersma M.G., Boeren S., Vervoort J., van Berkel W.J.H., Rietjens I.M.C.M., Golovleva L.A. Reductive deamination as a new step in the anaerobic microbial degradation of halogenated anilines. *FEMS Microbiology Letters* 209 : 307-312 (2002)

Travkin V.M., Golovleva L.A. The Degradation of 3,4-Dichloroaniline by Pseudomonas fluorescens Strain 26-K. *Microbiology* 72 (2) : 240-243 (2003)

Trémolières M., Barrat-Segretain M.-H., Thiébaut G. Biologie et écophysiologie des macrophytes. *Ingénieries* n°

spécial : 51-62 (2008)

Truhaut R. Eco-toxicology - objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1 (2) : 151-173 (1977)

Truu J., Nurk K., Juhanson J., Mander U. Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 40 (6-7) : 1191-1200 (2005)

Truu M., Juhanson J., Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 407 (13) : 3958-3971 (2009)

Tsui M.T.K., Chu L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52 : 1189-1197 (2003)

Tsui M.T.K., Chu L.M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Archives in Environment and Contaminant Toxicology* 46 : 316-323 (2004)

Tsui M.T.K., Wang W.-X., Chu L.M. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 138 : 59-68 (2005)

Tsui M.T.K., Chu L.M. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. *Chemosphere* 71 : 439-446 (2008)

Turgut C. Uptake and Modeling of Pesticides by Roots and Shoots of Parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *Environmental Science and Pollution Research* 12 (6) 342-346 (2005)

Turnbull G.A., Cullington J.E., Walker A., Morgan J.A.W. Identification and characterisation of a diuron-degrading bacterium. *Biology and Fertility of Soils* 33 : 472-476 (2001a)

Turnbull G.A., Ousley M., Walker A., Shaw E., Morgan J.A.W. 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 (2001b)

## U

Undabeytia T., Cheshire M.V., McPhail D. Interaction of the herbicide glyphosate with copper in humic complexes. *Chemosphere* 32 (7) : 1245-1250 (1996)

## V

Van Dijk J., Didden W.A.M., Kuenen F., van Bodegom P.M., Verhoef H.A., Aerts R. Can differences in soil community composition after peat meadow restoration lead to different decomposition and mineralization rates? *Soil Biology and Biochemistry* 41 : 1717-1725 (2009)

Van den Berg F., Kubiak R., Benjey W.G., Majewski M.S., Yates S.R., Reeves G.L., Smelt J.H., van der Linden A.M.A. Emission of pesticides into the air. *Water Air and Soil Pollution* 115 (1-4) : 195-218 (1999)

Van Hees P.A.W., Elgh-Dalgren K., Engwall M., von Kronhelm T. Re-cycling of remediated soil in Sweden: An environmental advantage ? *Resources, Conservation and Recycling* 52 : 1349-1361 (2008)

Van Veen J.A., van Overbeek L.S., van Elsas J.D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2) : 121-& (1997)

Vereecken H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61 (12) : 1139-1151 (2005)

Verkleij J.A.C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewiszc D.M., Schwitzguébel J.-P., Schröder P. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67 (1) : 10-22 (2009)

Vijayaraghavan K., Yun Y.-S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26 : 266-291 (2008)

Vischetti C., Monaci E., Cardinali A., Casucci C., Perucci P. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* 72 : 1739-1743 (2008)

Vogel J.R., Majewski M.S., Capel P.D. Pesticides in rain in four agricultural watersheds in the United States. *Journal of Environmental Quality* 37 : 1101-1115 (2008)

von Wiren-Lehr S., Glässgen D.W.E.K., Sandermann Jr H., Scheunert I. Mineralization of [14C]Glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems. *Pesticide Science* 51 : 436-442 (1997)

Vroumsia T., Steiman R., Seigle-Murandi F., Benoit-Guyod J.-L., Khadrani A. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, And isoproturon) by soft fungi. A comparative study. *Chemosphere* 33 (10) : 2045-2056 (1996)

Vryzas Z., Vassiliou G., Alexoudis C., Papadopoulou-Mourkidou E. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Research* 43 : 1-10 (2009)

# W

Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., Schleifer K.-H. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (3) : 792-800 (1994)

Wang Y.-S., Yen J.-H., Hsieh Y.-N., Chen Y.-L. Dissipation of 2,4-D, glyphosate and paraquat in river water. *Water, Air, and Soil Pollution* 72 : 1-7 (1994)

Wang Y.-J., Zhou D.-M., Sun R.-J., Cang L., Hao X.-Z. Cosorption of zinc and glyphosate on two soils with different characteristics. *Journal of Hazardous Materials* 137 : 76–82 (2006)

Wang P., Keller A.A. Particle-size dependent sorption and desorption of pesticides within a water-soil-nonionic surfactant system. *Environmental Science and Technology* 42 (9) : 3381-3387 (2008)

Wang P., Keller A.A. Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersible soil primary size fractions. *Water Research* 43 : 1448-1456 (2009a)

Wang P., Keller A.A. Partitioning of hydrophobic pesticides within a soil–water–anionic surfactant system. *Water Research* 43 : 706-714 (2009b)

Wang Y., Oyaizu H. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 168 (2-3) :760-764 (2009c)

Wanko A., Tapia G., Mosé R., Grégoire C. Adsorption distribution impact on preferential transport within horizontal flow constructed wetland (HFCW). *Ecological Modelling* 220 (23) : 3342-3352 (2009)

Watanabe K., Hamamura N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology* : 14 : 289-295 (2003)

Wauchope R.D. The pesticide content of surface water draining from agricultural fields – A review. *Journal of*

*Environmental Quality* 7 : 459-472 (1978)

Weaver M.A., Zablotowicz R.M., Locke M.A. Laboratory assessment of atrazine and fluometuron degradation in soils from a constructed wetland. *Chemosphere* 57 : 853-862 (2004)

Weber J.B., Wilkerson G.G., Reinhardt C.F. Calculating pesticide sorption coefficients (Kd) using selected soil properties. *Chemosphere* 55 : 157-166 (2004)

Welp G., Brümmer G.W. Effects of organic pollutants on soil microbial activity: the influence of sorption, solubility, and speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43 : 83-90 (1999)

Widada J., Nojiri H., Yoshida T., Habe H., Omori T. Enhanced degradation of carbazole and 2,3-dichlorodibenzo-p-dioxin in soils by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Chemosphere* 49 : 485-491 (2009)

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

Widenfalk A., Bertilsson S., Sundh I., Goedkoop W. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes e responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* 152 : 576-584 (2008)

Wiessner A., Kappelmeyer U., Kuschk P., Kästner M. Influence of the redox condition dynamics on the removal efficiency of a laboratory-scale constructed wetland. *Water Research* 39 : 248-256 (2005)

Williams G.M., Kroes R., Munro I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31 : 117-165 (2000)

Williams G.M., Harrison I., Carlick C.A., Crowley O. Changes in enantiomeric fraction as evidence of natural attenuation of mecoprop in a limestone aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology* 64 : 253-267 (2003)

Winiarski T., Bedell J.-P., Delolme C., Perrodin Y. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeology Journal* 14 : 1244-1251 (2006)

Witters H.E. Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41 : 90-95 (1998)

Wolicka D., Suszek A., Borkowski A., Bieleck A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology* 100 : 3221-3227 (2009)

Wu Q., Riise G., Lundekvam H., Mulder J., Haugen L.E. Influences of suspended particles on the runoff of pesticides from an agricultural field at Askim, SE-Norway. *Environmental Geochemistry and Health* 26 : 295-302 (2004)

Wyss A., Boucher J., Montero A., Marison I. Micro-encapsulated organic phase for enhanced bioremediation of hydrophobic organic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 40 : 25-31 (2006)

# X

Xing B., Pignatello J.J., Gigliotti B. Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environmental Science and Technology* 30 : 2433-2440 (1996)

# Y

Yamada T., Kremer R.J., de Camargo e Castro P.R., Wood B.W. Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: Threat to agricultural sustainability ? *European Journal of Agronomy* 31 (3) : 111-113 (2009)

Yang Y., Shen G. Enhanced pesticide sorption by soils containing particulate matter from crop residue burns. *Environmental Science and Technology* 37 : 3635-3639 (2003)

You I.S., Bartha R. Metabolism of 3,4-dichloroaniline by *Pseudomonas putida*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 30 (2) : 274-277 (1982)

Yu Y., Q.X. Zhou Q.X. Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils. *Chemosphere* 58 : 811-816 (2005)

Yu X.Y., Ying G.G, Kookana R.S. Sorption and desorption behaviours of diuron in soils amended with charcoal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 : 8545-8550 (2006)

Yuan C.-I., Chaing M.-Y., Chen Y.-M. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Science* 163 : 543-554 (2002)

# Z

Zabaloy M.C., Gómez M.A. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils* 42 : 83-88 (2005)

Zabaloy M.C., Garland J.L., Gomez M.A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40 : 1-12 (2008)

Zablotowicz R.M., Locke M.A., Krutz L.J., Lerch R.N., Lizotte R.E., Knight S.S., Gordon R.E., Steinriede R.W. *Science of the Total Environment* 370 : 552-560 (2006)

Zeyer J., Kearney P.C. Microbial-metabolism of propanil and 3,4-dichloroaniline. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 17 (3) : 224-231 (1982)

Zhang C., Bennett G.N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 600-618 (2005)

Zhang J.J., Wen B., Shan X.-Q., Zhang S., Khan S.U. Temporal change in the distribution patterns of hexachlorobenzene and dichlorodiphenyltrichloroethane among various soil organic matter fractions. *Environmental Pollution* 150 (2) : 234-242 (2007)

Zhao B., Zhang J., Gong J., Zhang H., Zhang C. Glyphosate mobility in soils by phosphate application : laboratory column experiments. *Geoderma* 149 (3-4) : 290-297 (2009)

Zhou L., Zhou G. Measurement and modelling of evapotranspiration over a reed (Phragmites australis) marsh in Northeast China. *Journal of Hydrology* 372 (1-4) : 41-47 (2009)

Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 33 : 406-413 (2007)

## Thèses

Domange N. Etude des transferts de produits phytosanitaires à l'échelle de la parcelle et du bassin versant viticole (Rouffach, Haut-Rhin) (2005)

Guigon-Moreau E. Transferts des pesticides vers les eaux superficielles et l''atmosphère : caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle (2006)

Norini M.-P. Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization (2007)

## Livres

Alexander M. Biodegradation and Bioremediation - 2nd edition. *Academic Press* (1999)

Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoît P., Charnay M.-P., Coquet Y. Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. *France Agricole* (2005)

Devinny, J., Chang, S.H., Bioaugmentation for soil bioremediation. Bioremediation of Contaminated Soils. *Marcel Dekker* 465–488 (2000)

Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. 3rd Edition. *CRC Press* (2001)

Kamrin M.A. Pesticide Profiles – Toxicity, Environmental Impact and Fate. *CRC Press* (2000)

Lemaire F., Dartigues A., Morel P., Charpentier S., Rivière L-M. Cultures en pots et conteneurs. *INRA Coll. : Du labo au terrain* (2003)

Lewis W.M. Wetlands explained: wetland science, policy, and politics in America. *Oxford University Press* (2001)

Mitch W.J., Gosselink J.G. Wetlands. 3rd ed. *John Wiley & Sons* (2000)

Pelmont J. Biodégradations et métabolismes. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. *EDP Sciences* (2005)

Pernthaler J., GIöckner F.-O., Schönhuber W., Amann R. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes. Methods in Microbiology vol.30. *Academic Press* (2001)

Pochon J., Tardieux P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Collection Techniques de base. *La Tourelle* 111 pp. (1957)

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. Microbiologie. 2nde édition. *De Boeck Université* (2003)

Sambrook J., Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual; 6-12. *CSH Press* (1989)

Tomlin. The Pesticide Manual. 15th edition. *BCPC* (2009)

Van Elsas J.D., Torsvik V., Hartmann A., Øvreås L., Jansson J.K. The bacteria and archaea in soil. Modern soil microbiology, 2nd edition. *CRC Press* (2007)

Waxman M.F. Agrochemical and Pesticide Safety Handbook. *CRC Press* (1998)

## Actes de congrès

Courde L., Reuter S., Chaussod R., Andreux F. La dégradation des herbicides est-elle influencée par le cuivre accumulé dans les sols ? *30e congrès GFP* (2000)

Diels L., Lookman R. Microbial systems for in-situ soil and groundwater remediation Conference Information. In: Marmiroli N, Samotokin B (eds) Advanced science & technology for biological decontamination of sites affected by chemical & radiological nuclear agents, Earth & environmental sciences, vol. 75. NATO Science series IV, pp 61-77 (2007)

Novitski R.P. The effects of lakes and wetlands on flood flows and base flows in selected northern and eastern states. Proceedings of the Conference on Wetlands of the Chesapeake, Easton, Maryland, Environmental Law Institute (1985)

## Rapports

AFPP. Répertoire terminologique en protection des plantes (2007)

APRONA. Inventaire 2003 de la qualité des eaux souterraines dans la vallée du Rhin supérieur (2005)

Atkins WS. Environment. Review of the Methodologies for the Extraction, Detection and Identification of Microorganisms in the Environment - Final Report (2000)

Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I., Voltz M. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref 64pp (2005)

EPA. Guide for Conducting Treatability Studies Under CERCLA Biodegradation Remedy Selection - Interim Guidance. EPA/540/R-93/519a (1993)

Farhan Ul Haque M. Function, structure and population dynamics of two diuron degrading microbial consortia (2009)

Hennebert P. Délivrables 6.2 et 6.3 : Performances des pratiques de protection des eaux de surface contre les transferts diffus de produits phytosanitaires – Relation coûts bénéfices etdomaine de validité – Vigne et Pomme de terre. *Life SWAP-CPP* (2007)

Hunault M. Influence des bassins d'orage sur le transfert de pesticide et possibilités de traitement. Cas du bassin d'orage de Rouffach (68) (2005)

IFEN. Les pesticides dans les eaux - données 2005. *Les dossiers IFEN* n°9 (2007)

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - 3,4-dichloroaniline (2005)

Institute for Health and Consumer Protection (IHCP). 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA) Summary risk assessment report (2006)

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Agreste - statistique annuelle agricole (2006)

Ministère de l'Agriculture, Direction générale de l'alimentation - Sous direction de la qualité et de la protection des végétaux. Guide pour une protection durable de la vigne : Stratégie de Protection pour une Utilisation Raisonnée et Durable des Intrants Phytosanitaires en Viticulture (1995)

Moncada, A. Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation (2005)

Monsanto. Backgrounder; Glyphosate and environmental fate studies (2005)

SERA. Glyphosate - Human Health and Ecological Risk Assessment Final Report (2003)

UIPP : Rapport d'activités 2007-2008 (2009)

Van Cauwenberghe L., Roote D.L. Technology Overview Report - *In Situ* Bioremediation. *Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center* (1998)

Vijgen J. Summary report on technical and legal barriers for the introduction of ex-situ biological soil treatment in the EU member states. EU Commission, Directorate General Research, 35p. (2002)

Zhang J. Etude expérimentale du transport des pesticides au sein des pilotes de dépollution. Optimisation du fonctionnement hydraulique (2008)

## Textes de loi

Arrêté du 08/01/98 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques contenant les substances carbosulfan, carbofuran, diuron, cadusafos, haloxyfop-R. Ministère de l'Agriculture et de la pêche. 4 septembre 2007

Décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles

Décision 2007/417/CE de la Commission concernant la non-inscription du diuron à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations de produits phytopharmaceutiques contenant cette substance. 13 juin 2007

Décision 2008/809/CE de la Commission du 14 octobre 2008 concernant la non-inscription de certaines substances à l'annexe I, I A ou I B de la directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits biocides. 14 octobre 2008

Directive 80/68/CEE du Conseil du 17 décembre 1979 relative à la protection des eaux souterraines contre la pollution causée par certaines substances dangereuses

Directive 80/778/CEE du Conseil du 15 juillet 1980 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Directive 99/31/CE du Conseil du 26 avril 1999 concernant la mise en décharge des déchets

Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau

Directive 2008/105/CE du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE

Loi n°92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau. Définition de la Loi sur l'Eau du 3 janvier 1992 (article 2) (1992)
Proposition COM(2006) 232 final de Directive du Parlement Européen et du Conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE (2006)

Rapport sur la proposition de directive du Parlement européen et du Conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE (COM(2006)0232 – C6-0307/2006 – 2006/0086(COD)) (2007)

Règlement (CEE) n°2092/91 du Conseil du 24 juin 1991 concernant le mode de production biologique de produits agricoles et sa présentation sur les produits agricoles et les denrées alimentaires

## Sites Internet

Ministère de l'Agriculture. Catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France : http://e-phy.agriculture.gouv.fr/ consulté le 12 mars 2009

Site internet de l'Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP) : http://www.observatoire-pesticides.fr/index.php?pageid=61 (historique sur les pesticides) consulté le 12 mars 2009

Site internet de l'Association Française de Protection des Plantes (AFPP) : http://www.afpp.net. Consulté le 12 mars 2009

http://zones-humides.parcs-naturels-regionaux.fr/zones_humides/kbcms.cgi?id=6 consulté le 29 août 2009

Site internet de l'Université de Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (IPSB) ; cours en ligne du laboratoire de mycologie. Page sur le mildiou : http://ispb.univ-lyon1.fr/mycologie/Site_labo_myco/Enseignement/3/Maladievignes02.htm. Consulté le 14 juillet 2009

Site internet de l'International Programme on Chemical Safety (IPCS). Page sur le glyphosate : http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm consultée le 13 mars 2009

## Autres

AFNOR. Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau, méthode gravimétrique, NF ISO 11465 (1994)

Agence de l'eau Seine-Normandie. Document de synthèse sur les pesticides (2008)

CNRS. Programme interdisciplinaire « Ingénierie écologique » Appel d'offres (2008)

# VALORISATION SCIENTIFIQUE

# VALORISATION SCIENTIFIQUE

**Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture**

Bazot S., Bois P., Joyeux C., Lebeau T. Mineralization of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] by co-immobilized *Arthrobacter* sp. and *Delftia acidovorans*. *Biotechnology Letters* 29 : 749-754 (2007)

Article soumis à Journal of Hazardous Materials et en cours de correction :
Huguenot D., Bois P., Jézéquel K., Cornu J-Y., Lebeau T., Selection of low cost materials for the sorption of copper and herbicides as single or mixed compounds in matrices of increasing complexity

Article soumis à FEMS Microbiology Ecology :
Paul Bois, David Huguenot, Marie-Paule Norini, Muhammad Farhan Ul Haque, Stéphane Vuilleumier, Thierry Lebeau, Herbicide dissipation and copper complexation by bacterial consortia isolated from vineyard stormwater basins

Vine-growing induced environmental pressure is high: indeed every environmental compartments are likely to undergo long-lasting phytopharmaceuticals contamination. A part of these products is carried by run-off water from vineyard to surface waters that become contaminated. On their way down, they go through stormwater basins (SWB), hydraulic systems located at the outlet of vineyard watersheds. Although there is degradation/storage within SWB (bioattenuation), epuration efficiences may vary. Most of the time, water environmental criteria fail to be reached because of weak phytopharmaceuticals hydraulic retention time and insufficient biological purification.

This study aims at developing a depollution system for vineyard SWB-accumulated sediments and passing water. Glyphosate, diuron and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) have been chosen for the study, taking a copper load into account. Strategical choices are increased pollutant hydraulic retention time and the use of bioaugmentation together with phytoextraction. Each item of this « sorbent-bacterial inoculum-plant » triplet has been beforehand selected in the laboratory and this triplet has been implemented in microcosm experiments in partially controlled conditions.

Sorbent material (sugar beet pulp, raw and burned corn cob, sand, sediment, vermiculite and perlite) selection in different liquid matrices (ultra pure water, run-off water and sediment extract medium) with pollutants alone or in combination shows that material sorption capacities change with the type of pollutant. It has also been shown that these capacities vary with formulation (alone or in combination) and liquid matrix chosen. Sediment is awarded the best sorbent for glyphosate, sand is awarded the best sorbent for diuron and 3,4-DCA.

Bacterium selection carried out with SWBs sediment is based on glyphosate, diuron and 3,4-DCA dissipation performances as well as on some system ecological features. Bacterial community genetic fingerprint established through PCR-TTGE reveals variation within sampling horizons and pollution pressure. Rapid-growing populations are then favoured, which shows adjustment to discontinuous pollutant presence. Overall *Phragmites australis* genetic fingerprint remains unchanged after pollution presence. 209 colony-forming units (CFU) have been selected that tolerate the pollutant mix and are genetically different (through RISA-RFLP). Degradation performances are strongly related to the nature of the compound. Several isolated colonies are actually consortia; one of them, elected for the process set-up, degrades glyphosate, diuron and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) in liquid culture as well as it complexes copper, in order to enchance phytoextraction.

Microcosm experiments show that hydraulic retention time weighs on pollutant concentration in water at the system outlet. Sorbents prove to be efficient and allow to reach 91% glyphosate, 87% 3,4-DCA and 64% diuron retention efficiency after six-hour storage time. Dissipation performances are satisfactory: 99% glyphosate, 84% 3,4-DCA and 65% diuron are dissipated after retention and five weeks action. Bioaugmentation does not impact on glyphosate and 3,4-DCA dissipation performances significantly, but enhances diuron dissipation in average. Suitable process efficiency requires both increased action time within the solid matrix.

Mots-clés : bioaugmentation, ecological engineering, glyphosate, diuron, 3,4-dichloroaniline, sorption, microcosms

La pression environnementale induite par la viticulture est forte, tous les compartiments de l'environnement étant susceptibles de subir une contamination durable par les produits phytopharmaceutiques employés. Ces produits sont pour partie transportés par ruissellement depuis le vignoble jusqu'aux eaux de surface qu'ils contaminent après avoir emprunté des bassins d'orage (BO), ouvrages hydrauliques aménagés à l'exutoire des bassins versants viticoles. Bien qu'une partie de ces produits soit dégradée et/ou stockée au sein des BO (bioatténuation), le niveau d'épuration est variable. Un temps de séjour insuffisant des produits phytopharmaceutiques et une épuration biologique insuffisamment efficace expliquent ainsi que la qualité de l'eau de sortie de ces ouvrages ne réponde pas, le plus souvent, aux exigences de qualité pour un rejet dans le milieu naturel.

Cette étude vise à développer un système de dépollution de sédiments viticoles accumulés dans les BO et d'eaux qui y transitent. Le glyphosate, diuron et 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) sont les molécules considérées, tout en tenant compte de la charge en cuivre. L'augmentation du temps de séjour des polluants dans le BO et le choix d'une technique associant la bioaugmentation à la phytoremédiation est la stratégie retenue. Chaque composante d'un triplet « sorbant-inoculum bactérien-plante » a été sélectionnée en laboratoire et le triplet mis en œuvre en microcosmes dans des conditions partiellement contrôlées.

La sélection de matériaux sorbants (pulpe de betterave, rafles de maïs brute et calcinée, sable, sédiment, vermiculite, perlite) dans différentes matrices liquides (eau ultra pure, eau de ruissellement et extrait de sédiment) en présence des polluants seuls ou en mélange montre que les capacités de sorption des différents matériaux testés varient selon le polluant, sa formulation (seul ou en mélange) et la matrice liquide. Le sédiment se révèle être le meilleur sorbant pour le glyphosate ; le sable pour le diuron et le 3,4-DCA.

La sélection bactérienne à partir du sédiment du BO est basée sur les performances de dissipation du glyphosate, diuron et 3,4-DCA tout en prenant en compte des caractéristiques écologiques de l'ouvrage. L'empreinte génétique de la communauté bactérienne du sédiment analysée par PCR-TTGE varie selon les horizons de prélèvement et suite à une pression de pollution. Les populations à croissance rapide sont alors favorisées, signe d'une adaptation de ces dernières à la présence intermittente des polluants. Globalement l'empreinte génétique dans la rhizosphère de *Phragmites australis* varie peu sous l'effet des polluants. 209 unités formant des colonies (UFC) tolérantes au mélange de polluants et génétiquement différentes (par analyse séquentielle RISA-RFLP) ont été sélectionnées. Les performances de dissipation varient fortement selon le polluant. Plusieurs de ces colonies isolées sont en fait des consortia bactériens ; le consortium sélectionné pour le procédé dissipe le glyphosate, le diuron et le 3,4-DCA en milieu liquide et complexe par ailleurs le cuivre dans le but d'augmenter les performances de phytoextraction.

L'expérience en microcosmes montre que le temps de rétention hydraulique influe sur la quantité de polluants retrouvés dans l'eau en sortie du système et que les matériaux sorbants sont efficaces : la rétention atteint ainsi 91% pour le glyphosate, 87% pour le 3,4-DCA et 64% pour le diuron après six heures de stockage. De plus les performances de dissipation atteintes sont bonnes : 99% du glyphosate, 84% du 3,4-DCA et 65% du diuron retenus dans le mélange sable-sédiment sont dissipés après 5 semaines. L'effet de la bioaugmentation sur les performances de dissipation n'est pas significatif pour le glyphosate et le 3,4-DCA, mais améliore en moyenne la dissipation du diuron. Un temps d'action prolongé dans la matrice solide s'avère nécessaire pour obtenir une bonne efficacité du procédé.

Mots-clés : bioaugmentation, ingénierie écologique, glyphosate, diuron, 3,4-dichloroaniline, sorption, microcosmes