



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. Sciences agricoles. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2010. Français. NNT : 2010MULH3233 . tel-00583320

HAL Id: tel-00583320

<https://theses.hal.science/tel-00583320>

Submitted on 5 Apr 2011

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 | Examineur |
| M. Julien TOURNEBIZE | CEMAGREF, Antony | Examineur |
| 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 Gwénaél 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 RITMO, 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 |
| <i>1.1.1. Cultures et ravageurs.....</i> | <i>6</i> |
| <i>1.1.2. Données mondiales et locales.....</i> | <i>8</i> |
| 1.2. Cas de la vigne | 9 |
| <i>1.2.1. Emploi des fongicides.....</i> | <i>9</i> |
| <i>1.2.2. Emploi des herbicides.....</i> | <i>10</i> |
| 2. Les produits phytopharmaceutiques dans l'environnement | 14 |
| 2.1. Distribution dans les différents compartiments | 15 |
| <i>2.1.1. Dans les sols.....</i> | <i>15</i> |
| <i>2.1.2. dans l'atmosphère.....</i> | <i>18</i> |
| <i>2.1.3. dans les eaux.....</i> | <i>19</i> |
| <i>2.1.4. Cas du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA.....</i> | <i>21</i> |
| <i>2.1.5. Interactions.....</i> | <i>26</i> |
| 2.2. Écotoxicité | 27 |
| <i>2.2.1. Généralités</i> | <i>27</i> |
| <i>2.2.2. Le cas des herbicides</i> | <i>28</i> |
| 2.3. Réglementation | 32 |
| <i>2.3.1. Législation Européenne.....</i> | <i>32</i> |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2. <i>Législation Française</i> | 33 |
| 3. Le traitement des produits phytopharmaceutiques | 35 |
| 3.1. Approche physico-chimique | 35 |
| 3.2. Approche biologique | 35 |
| 3.2.1. <i>Généralités</i> | 35 |
| 3.2.2. <i>La bioremédiation</i> | 37 |
| 3.2.3. <i>La phytoremédiation</i> | 44 |
| 3.2.4. <i>Méthodes d'évaluation des systèmes de traitement in situ</i> | 47 |
| 3.2.5. <i>Bioremédiation des polluants étudiés</i> | 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. <i>Caractérisation</i> | 58 |
| 4.2.2. <i>Capacités épuratrices</i> | 61 |
| 4.2.3. <i>Un cas particulier de ZHA : le bassin d'orage (BO)</i> | 62 |
| 4.3. Ingénierie écologique appliquée à la ZHA | 64 |
| 4.3.1. <i>Amélioration de la rétention des produits phytopharmaceutiques</i> | 64 |
| 4.3.2. <i>Couplage bioaugmentation/phytoremédiation</i> | 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 |
| <i>2.1.1. Matériaux sorbants.....</i> | <i>73</i> |
| <i>2.1.2. Cinétiques.....</i> | <i>73</i> |
| <i>2.1.3. Isothermes.....</i> | <i>74</i> |
| | |
| 2.2. Sélection de souches | 74 |
| <i>2.2.1. Stratégie de prélèvement.....</i> | <i>74</i> |
| <i>2.2.2. Analyses de la structure de la communauté bactérienne.....</i> | <i>75</i> |
| <i>2.2.3. Détermination de la microflore bactérienne cultivable.....</i> | <i>75</i> |
| <i>2.2.4. Tests de tolérance - Isolement des bactéries cultivables.....</i> | <i>76</i> |
| <i>2.2.5. Tri génétique.....</i> | <i>77</i> |
| <i>2.2.6. Tri fonctionnel</i> | <i>78</i> |
| <i>2.2.7. Conservation de souches</i> | <i>78</i> |
| | |
| 2.3. Expériences en logettes | 79 |
| <i>2.3.1. Dispositif commun.....</i> | <i>79</i> |
| <i>2.3.2. Expérience en logettes I.....</i> | <i>83</i> |

| | |
|---|------------|
| 2.3.3. <i>Expérience en logettes II</i> | 83 |
| 2.3.4. <i>Expérience en logettes III</i> | 84 |
| 2.3.5. <i>Expérience en logettes IV</i> | 84 |
| 2.3.6. <i>Expérience en logettes V</i> | 85 |
| 2.3.7. <i>Expérience en logettes VI</i> | 86 |
| RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 1 | 89 |
| Tests de matériaux de sorption | 89 |
| 1.1. Cinétiques de sorption | 89 |
| 1.1.1. <i>Performances de sorption</i> | 89 |
| 1.1.2. <i>Modifications de sorption selon la matrice liquide</i> | 91 |
| 1.1.3. <i>Modifications des sorptions individuelles en présence d'autres composés</i> | 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. <i>Physico-chimie</i> | 104 |
| 2.1.2. <i>Analyse microbiologique</i> | 106 |
| 2.2. Tri des populations | 109 |
| 2.2.1. <i>Sélection de populations bactériennes tolérantes</i> | 109 |
| 2.2.2. <i>Différenciation génétique</i> | 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 <i>Phragmites australis</i>..... | 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 <i>in situ</i> | 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 écologique¹, 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 oeuvre 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 1/150000^{ème} (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).

Marché mondial 2007 : 23,9 milliards d'euros

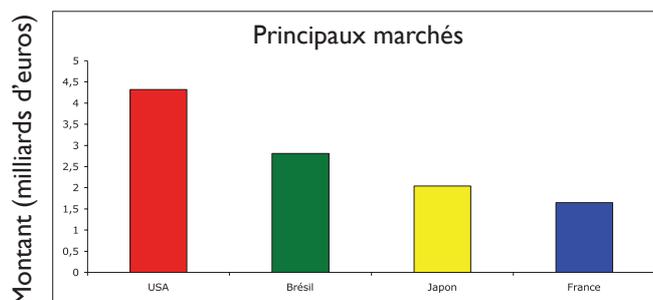
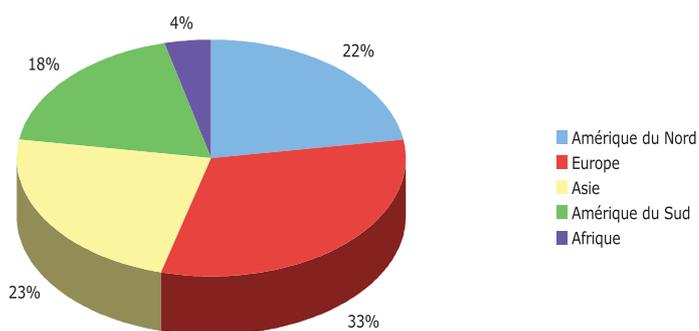


Figure I.1a : Principaux marchés pour les produits phytosanitaires.
(UIPP 2007)

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

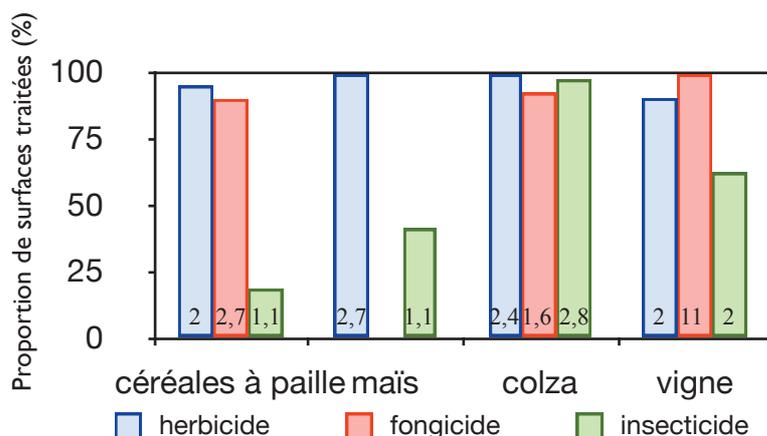
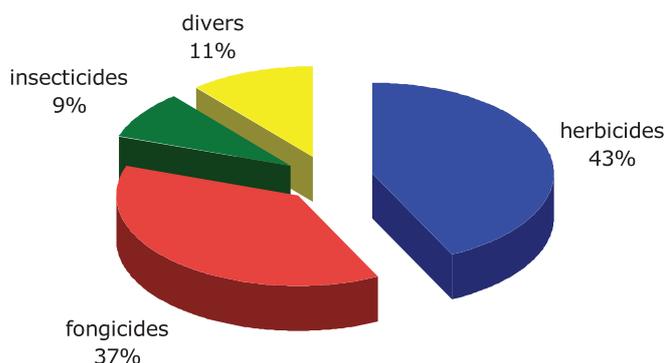


Figure I.2 : Répartition des ventes de produits phytosanitaires en France.
(UIPP 2007)

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 | <ul style="list-style-type: none"> économique manipulation aisée rangement et stockage faciles | <ul style="list-style-type: none"> pression et taux de sortie variables pas assez d'agitation pour garder les poudres en suspension (besoin d'agitation fréquente) |
| Pulvérisation (motorisée) | Liquide | <ul style="list-style-type: none"> plus grande capacité que les pulvérisateurs manuels réglage possible de la pression agitation intégrée | <ul style="list-style-type: none"> coût relativement élevé |
| Epandage de pesticides en granulés | Solide | <ul style="list-style-type: none"> peu coûteux forme simple à manipuler pas besoin d'en mélanger dans l'eau faible risque de dérive faible risque d'exposition du manipulateur | <ul style="list-style-type: none"> coûteux en pesticides usage spécifique, les granulés n'adhèrent pas au feuillage calibrage pour chaque formulation hétérogénéité de la distribution en fonction des terrains |
| Semis de substances traitées | Solide | <ul style="list-style-type: none"> facilité d'utilisation | <ul style="list-style-type: none"> mort de la semence si excès de produit ; absence de protection si trop peu |

1.2. Cas de la vigne

La vigne arrive en 4^e 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

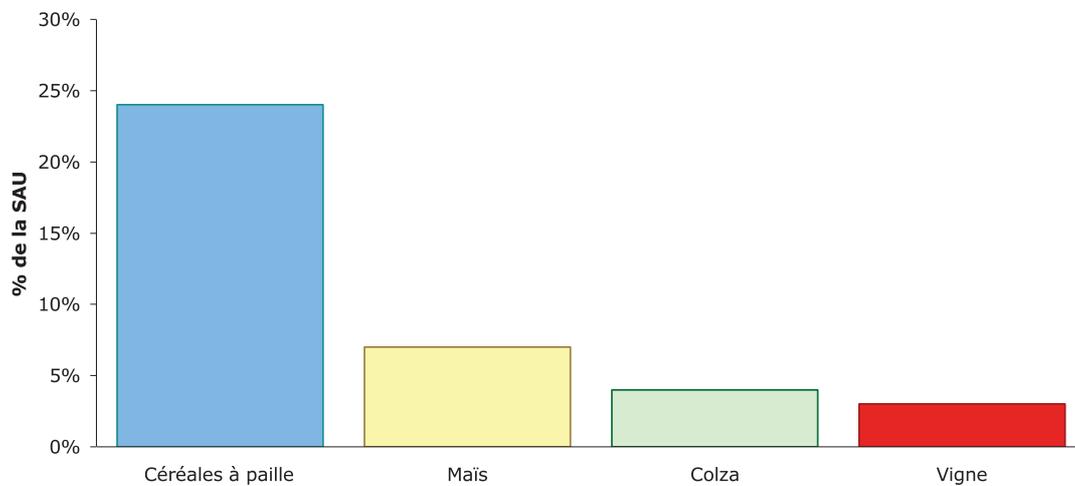


Figure I.4a : Occupation des sols par les principales cultures en France.
(Aubertot et coll. 2005)

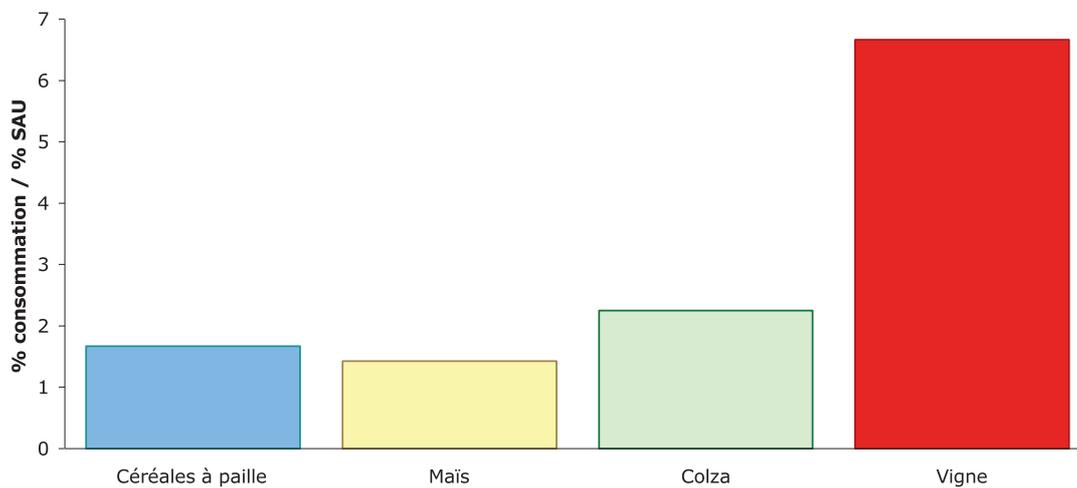


Figure I.4b : Impact phytosanitaire théorique des principales cultures en France.
(Aubertot et coll. 2005)

cuire (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 6kg.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 C₃H₈NO₅P, comporte un groupement phosphonate (liaison carbone-phosphore) et un groupement acide carboxylique (tableau I.4). Il est zwitterionique² 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 ₃ H ₈ NO ₅ P | | 169g.mol ⁻¹ | acide carboxylique -COOH phosphonate CPO ₃ H 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 ^{-3b} | 554-34000L.kg ^{-1a} | 184,5°C | < 1,31.10 ⁻⁵ Pa ^b | 10,1g.L ⁻¹ (20°C) ^b | < 7.10 ⁻¹¹ Pa.m ³ .mol ^{-1b} | Solide cristallin |

ou en mélange (Torstensson et Aamissepp 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, $1,4\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; pour les dicotylédones bisannuelles, annuelles et adventices bisannuelles, $2,2\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; pour les adventices vivaces, $2,9\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (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 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OCl}_2$, comporte un groupement urée et un groupement phényle 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 $3\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$.

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

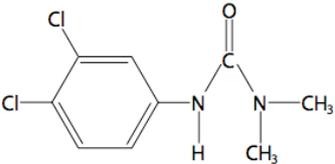
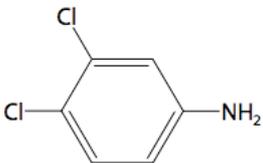
| | Formule brute | Formule semi-développée | Masse molaire | Groupements chimiques |
|----------------|---------------------|---|------------------------|-----------------------|
| Diuron | $C_9H_{10}N_2OCl_2$ |  | 233g.mol ⁻¹ | urée + phényl |
| 3,4-DCA | $C_6H_5NCl_2$ |  | 162g.mol ⁻¹ | aniline + 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 ^{-1c} | 72°C ^b | 0,184Pa (20°C) ^b | 580mg.L ⁻¹ (20°C) ^b | 0,05Pa.m ³ .mol ^{-1b} | 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).

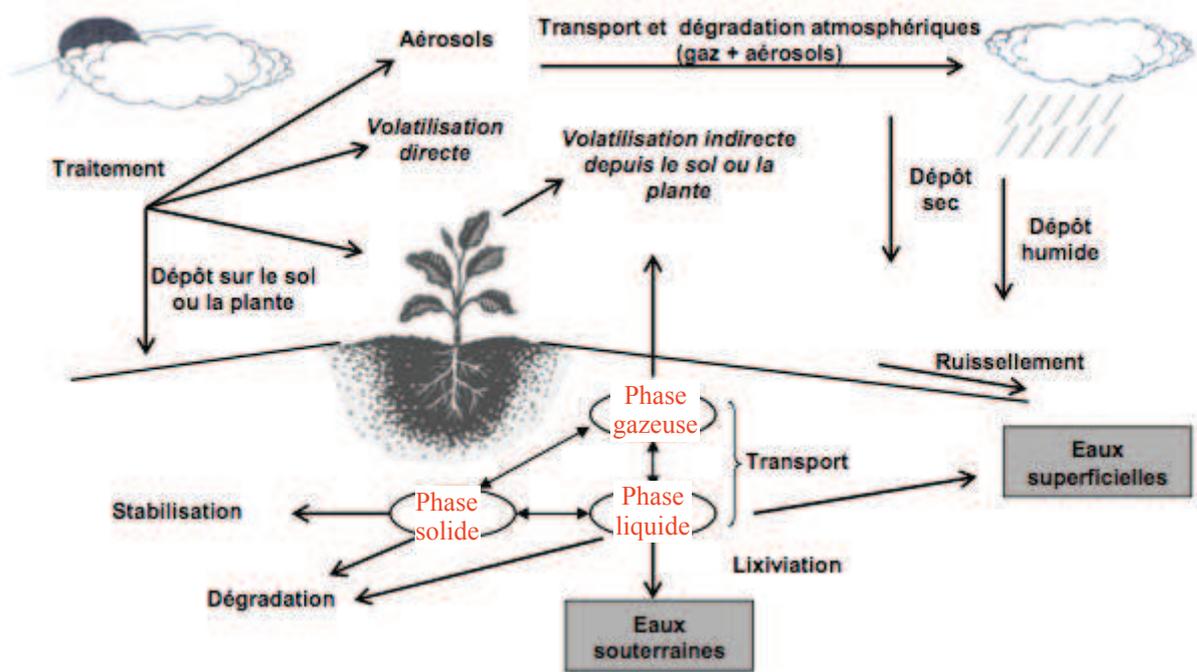


Figure I.5 : Répartition des produits phytosanitaires dans l'environnement.
(d'après Guigon-Moreau 2006)

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 épanchée (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 |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> •pH •Eh •Fraction fine des sols •Matière organique •Oxydes et hydroxydes (Fe, Mn, Al) •Microorganismes | <ul style="list-style-type: none"> •Argile •Matière organique •Taille des particules •Surface spécifique •Nature du solvant | <ul style="list-style-type: none"> •Humidité du sol •CEC •pH •Solubilité •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 la plus sorbée. 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 $0,1\text{mg.kg}_{\text{sol sec}}^{-1}$ 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 $1\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Carafa et coll. 2007, Kitada et coll. 2008), les produits organochlorés s'accumulent 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 coefficient 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 ($1800L.kg^{-1}$) tandis que cette quantité atteint 1,3% de la quantité appliquée pour un insecticide (le diméthoate) 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)

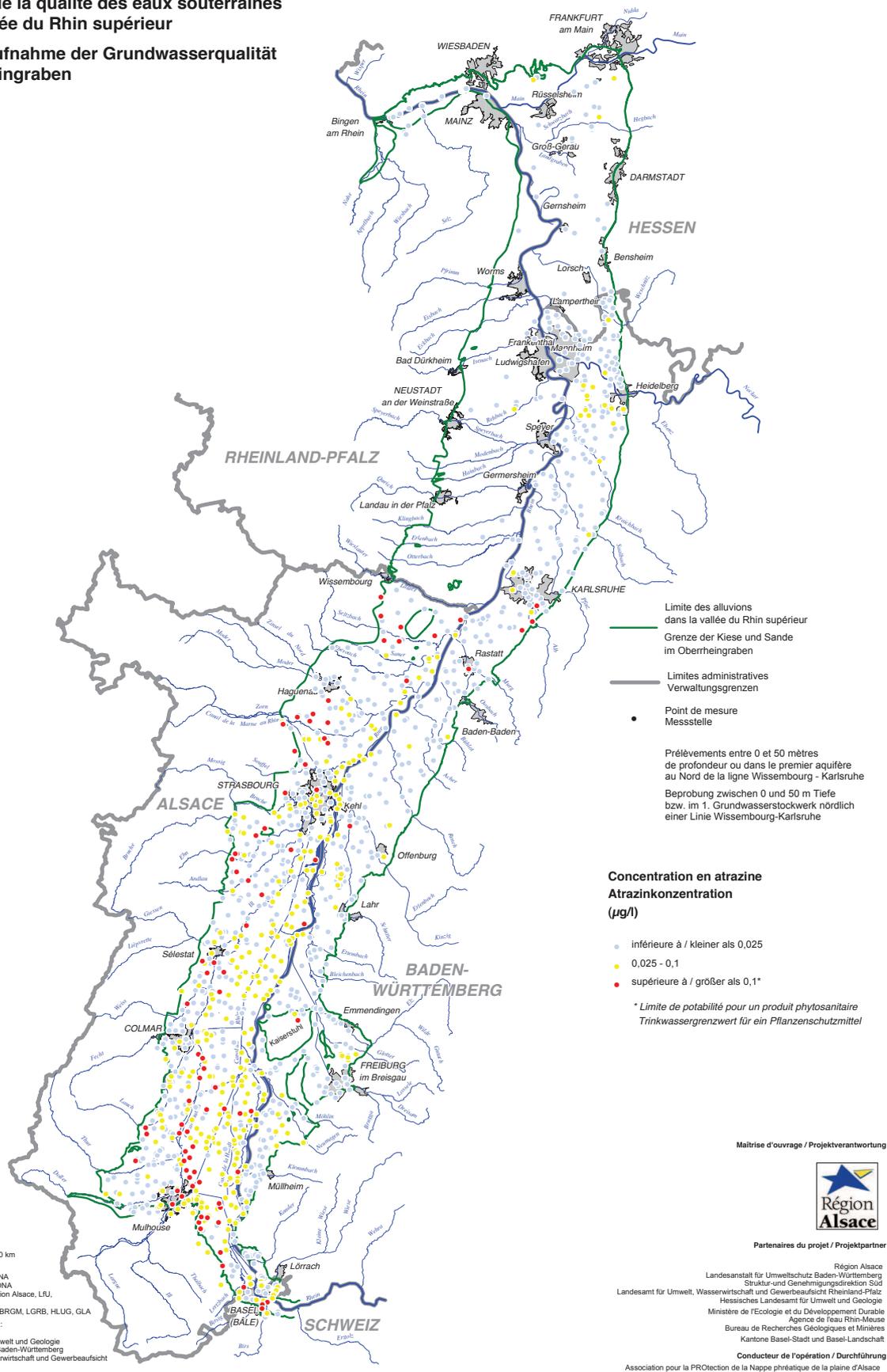
Inventaire de la qualité des eaux souterraines dans la vallée du Rhin supérieur

Bestandsaufnahme der Grundwasserqualität im Oberrheingraben

Atrazine

2002 - 2003

Atrazin



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 K_d 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 structurales 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.

Le diuron

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 8,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (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 apparence 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 agrosystèmes³ (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,

³Ensemble 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 neurotoxiques⁴ (Colosio et coll. 2003), reprotoxiques⁵ (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

Généralités

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 ($5\text{-}50\text{mg.kg}^{-1}$) 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 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 (DL₅₀) | orale ^a : 5,6g.kg ⁻¹ (rat) dermale ^a : 5g.kg ⁻¹ | orale ^a : 3,4g.kg ⁻¹ (rat) dermale ^a : > 2g.kg ⁻¹ | orale ^g : 0,5g.kg ⁻¹ (rat) 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, <i>Brachydanio rerio</i>) ^f |
| Reprotoxicité | > 0,15g.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (rare) ^a | 1mg.L ⁻¹ (lézard) ⁱ | non connue ^g |
| Térogénicité | > 300mg.kg ⁻¹ .j ^{-1d} | 0,25g.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (rat) ^a | non connue ^g |
| Mutagénicité | non ^a | non ^a | non classés ^g |
| Carcinogénicité | non ^a | 2,5mg.L ⁻¹ (rat) ^k | oui ^e |
| Microtox[®], CE₅₀ 15 min (mg.L⁻¹) | 17,5 ± 2,0 ^h | 66,87 ± 7,47 ^b | 0,61 ± 0,08 ^a |
| Microtox[®], CE₅₀ 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, <i>Oncorhynchus mykiss</i>) ^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 $10\mu\text{g.kg}^{-1}$ (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 $2,5\text{mg.L}^{-1}$ 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 (Tadonlélé 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 10mg.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 $1\mu\text{g.L}^{-1}$ et 5mg.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 $0,1\mu\text{g.L}^{-1}$, et la concentration en mélange ne doit pas dépasser $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$. 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 Confinement des sols comme déchets ultimes contaminés, par des barrières étanches (argile, textiles synthétiques) | Nécessite une surveillance Utilisé pour les sols hautement pollués 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 Chauffage de la terre à 100-600°C pour vaporiser les contaminants et traitement des effluents | A basse température, n'altère pas la teneur en matière organique du sol ; Remédiation efficace >99% et indépendante de la concentration en polluants Détruit la flore et faune du sol | 40 à 250 |
| Lavage du sol | Organiques (COV, HAP, pesticides) / inorganiques (métaux) | Traitement sur site ou ex situ 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 Dépend de la teneur en argile et limon Traitement des eaux de lavage | 130 |
| Soil flushing | Organiques/ inorganiques | Traitement in situ 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 Dépend de la géologie du terrain et notamment de la perméabilité et de la nature du sol ; traitement de longue durée | 20 à 190 |
| Solidification/ stabilisation | Organiques/ inorganiques | Traitement in situ et ex situ Immobilisation ou réduction de la mobilité des polluants par des moyens chimiques ou physiques | La vitrification et autres procédés <i>in situ</i> 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 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 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 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) Efficacité limitée à 95% en particulier avec HAP récalcitrants et en concentrations élevées ; inhibition possible si présence de métaux toxiques Nécessite une grande surface (mais moins que le landfarming) | 80 à 175 |
| Bioréacteur | Organiques | Traitement ex situ 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) 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 bioremédiation sur les terres excavées et épanchées en couche fine (1,5 cm), addition possible d'eau et de nutriments | Nécessite une grande surface ; pas de récupération des COV Efficace pour les hydrocarbures légers Conditions contrôlées (pH, O ₂ , nutriments, humidité) pour dégradation efficace | 20 à 45 |
| Phytoremédiation | Organiques (HAP, PCB, pesticides) /inorganiques | Traitement in situ Utilisation de végétaux pour biosorber, stabiliser ou accumuler des métaux | Conserve les propriétés agronomiques du sol, méthode non-destructive Méthode longue (plusieurs années) Traitement des déchets | 10 à 20 |
| Bioatténuation (Mulligan et Yang 2004) | Organiques/Inorganiques | Traitement in situ rien à faire | Décontamination potentiellement complète ; coûts peu élevés Méthode longue ; surveillance obligatoire ; mobilité des polluants ; métabolites plus dangereux que les composés parents | 0 |
| Bioéremédiation (Iwamoto et Nasu 2001) | Organiques | Traitement in situ Utilisation de microorganismes pour dégrader les polluants | Élimine définitivement les polluants ; diminue les coûts par rapport à des méthodes physiques 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 5mg.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 $2,6\mu\text{g.kg}^{-1}$ 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 $0,063\text{j}^{-1}$ (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 microorganismes 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

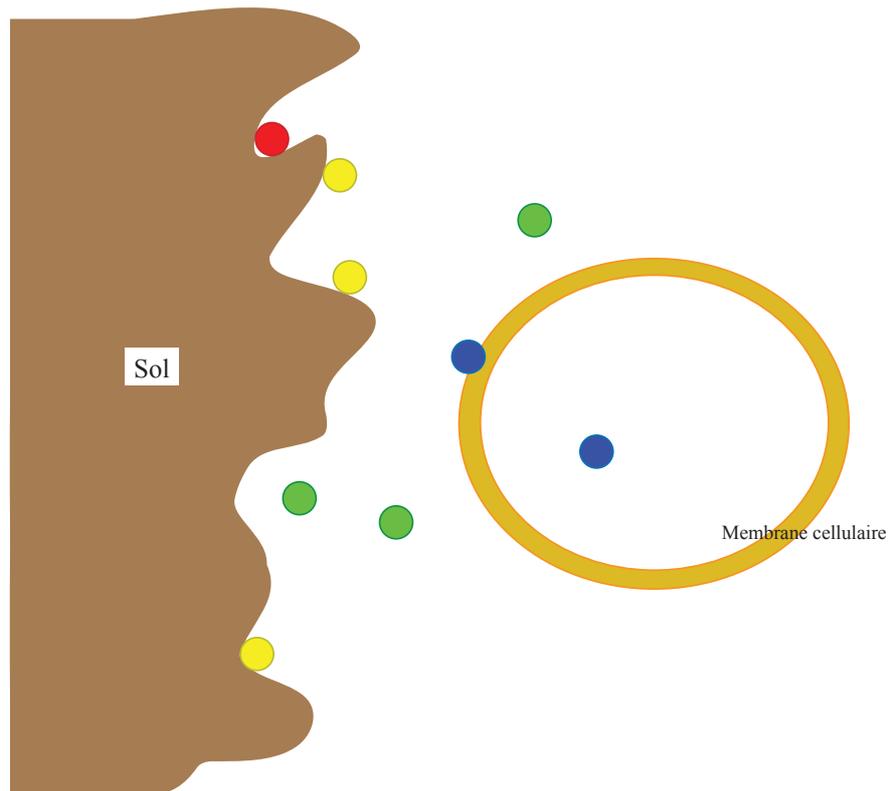
Tableau I.13 : Stratégies de croissance des microorganismes.
(Van Elsas et coll. 2005)

| | r (zymogène) | K (autochtone) |
|--|---------------------|-----------------------|
| 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.



- Polluant non bioaccessible / pas d'interaction possible
- Polluant bioaccessible / interaction possible si désorption ou chimiotactisme
- Polluant biodisponible / interaction possible
- Polluant métabolisé

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 $75\mu\text{g.kg}^{-1}$ et $280\mu\text{g.kg}^{-1}$ 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-biphényles et plusieurs produits phytopharmaceutiques (Gentry et coll. 2004a). Une étude menée par Siripattanakul et coll. (2009) sur de l'atrazine à $1,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 $8,15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}_{\text{sol}}$ 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 (Sarithchandra 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 devenir 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-cyhalothrin (insecticide) à $2,8\text{g.ha}^{-1}$ 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

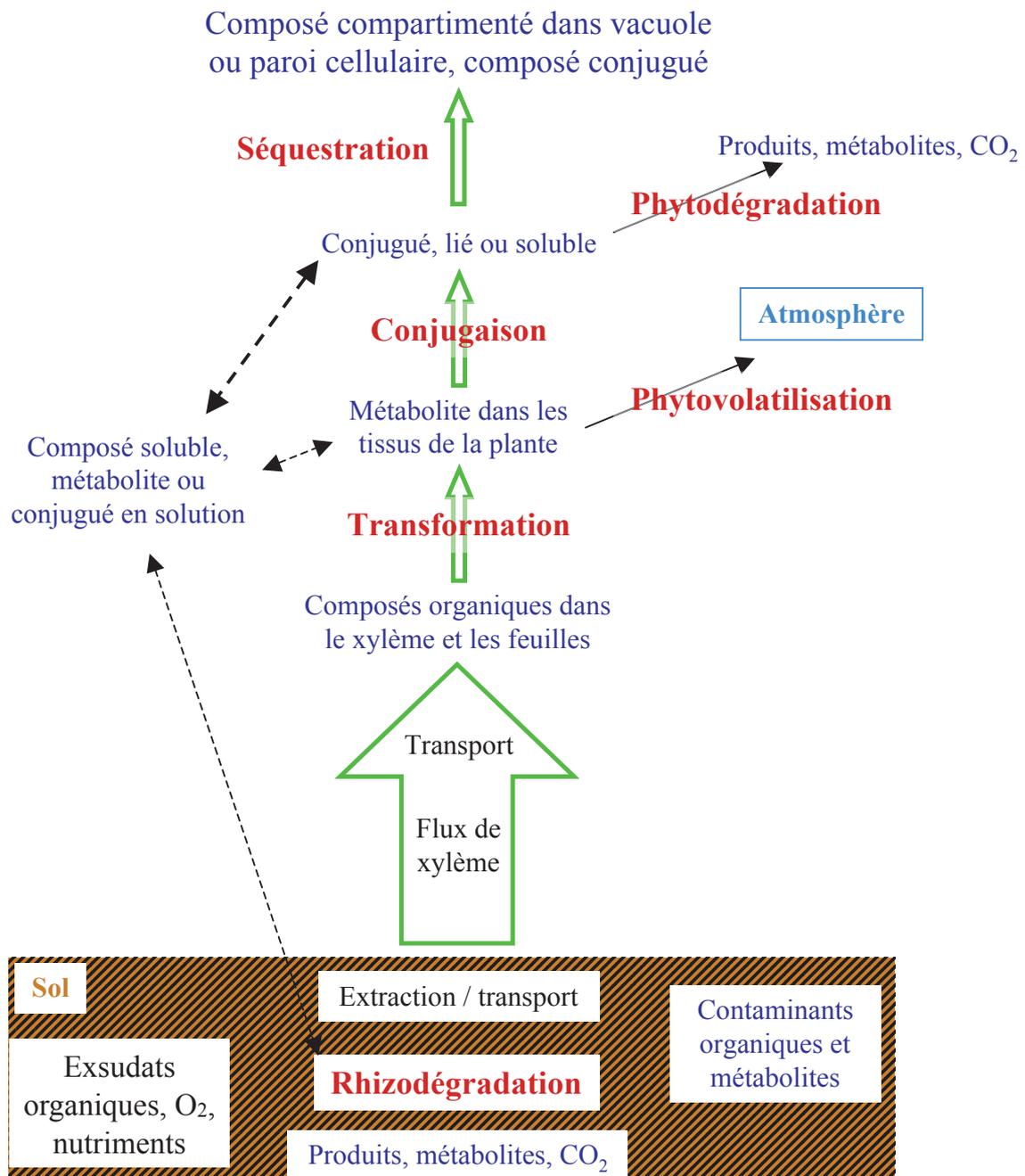


Figure I.8 : Devenir des contaminants lors de la phytoremédiation.
 (d'après Singh et Jain 2003). Les flèches vertes indiquent le transport dans la plante, les flèches pointillées indiquent les transports possibles dans le cas des plantes aquatiques; en rouge les phénomènes intervenant lors de la phytoremédiation.

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, mucilage⁶) 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, PGPR⁷ 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.

Réduction de la charge polluante

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) - 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 ^e | 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 ^e | 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 ^e | Eh > 50mV ^d O ₂ dissout > 0,2mg.L ⁻¹ ^d 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^e | 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) ^e - 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 - 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'O₂ (Taok et coll. 2007) ou du dégagement de CO₂ (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'O₂ ou le dégagement de CO₂ 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 $\text{isotopeC}/^{12}\text{C}$ due à la dégradation du polluant permettra de distinguer la biodégradation des autres phénomènes. De plus, l'isotope ¹⁴C 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 ¹⁴C 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 FISH⁸ ou le marquage GFP⁹, 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 Nyysönen 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 nucléiques | Tout l'ADN est extrait; pas d'influences des biais de PCR; étude de l'ADN ou de l'ARN; peut être étudié <i>in situ</i> | 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 <i>in situ</i> ; 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 | <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> | <i>Pseudomonas sp. Lbr</i> | <i>Pseudomonas sp. 4ASW</i> | <i>Pseudomonas pseudomallei 22</i> | <i>Streptomyète</i> | <i>Penicillium notatum</i> | <i>non identifié</i> |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 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 | - | - | 0,58mgP _i /L/h | - | 2,35mgP _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 |

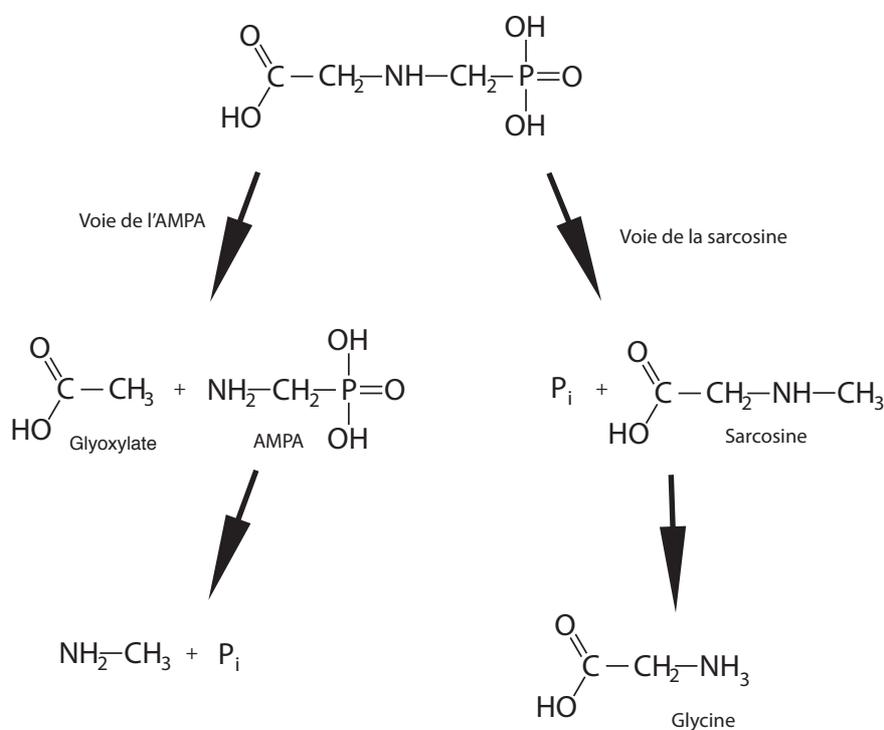


Figure I.9 : Voies de dégradation aérobie du glyphosate. (d'après Jacob et coll. 1988). P_i désigne le phosphate.

(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 Aamissepp 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 (Goody 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 microorganismes 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.

| | <i>non identifié</i> | <i>Rhizoctonia solanii</i> | <i>Cunninghamella elegans</i> | <i>non identifié</i> | <i>Arthrobacter globiformis</i> | <i>Arthrobacter sp. N2</i> |
|------------------------|-----------------------|----------------------------|---|------------------------|---|---|
| Type d'organisme | bactéries-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 |

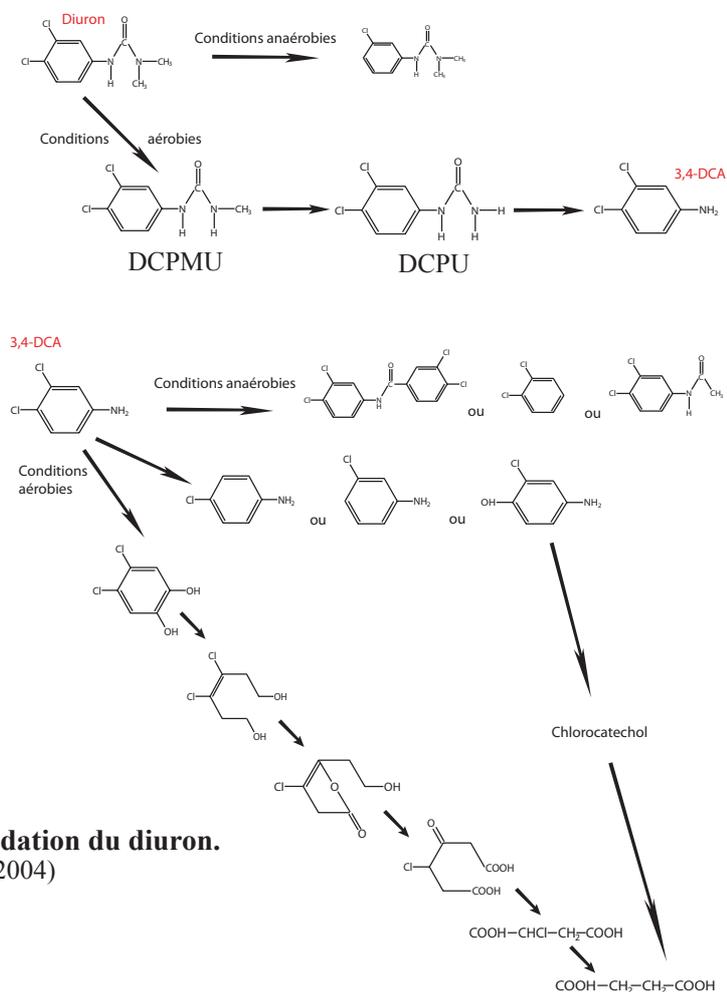


Figure I.10 : Voies de dégradation du diuron.
(d'après Giacomazzi et Cochet 2004)

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.

Cas du 3,4-DCA (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.

| | <i>Pseudomonas fluorescens 26K</i> | <i>Delfia acidovorans</i> | <i>Comamonas testosteroni</i> |
|-------------------------------|---|---|---|
| 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,

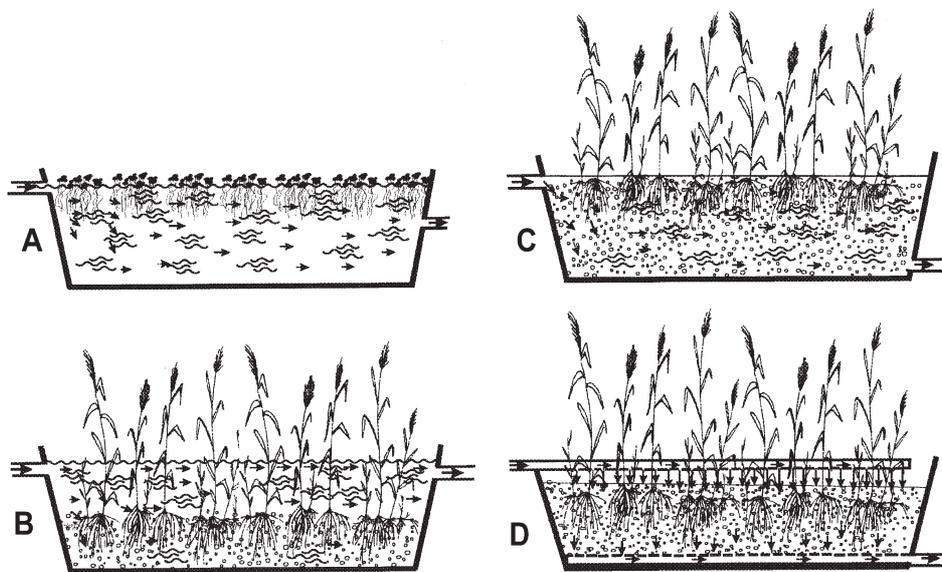


Figure I.11 : Différents types de ZHA .

(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

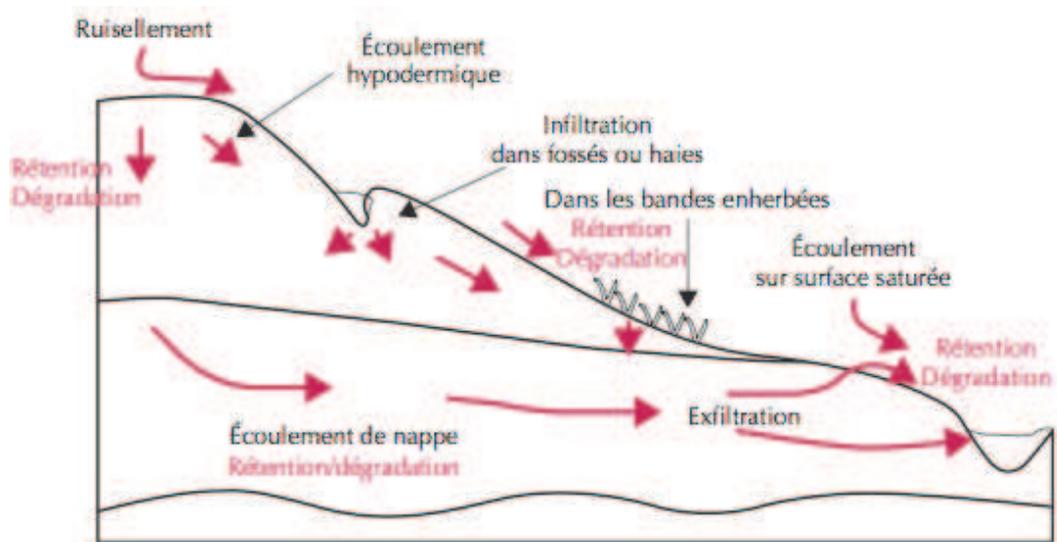


Figure I.12 : Trajet des pesticides sur un bassin versant.
(Gouy et coll. 2008)

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) ont 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 écosystèmes 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 163m³. 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).

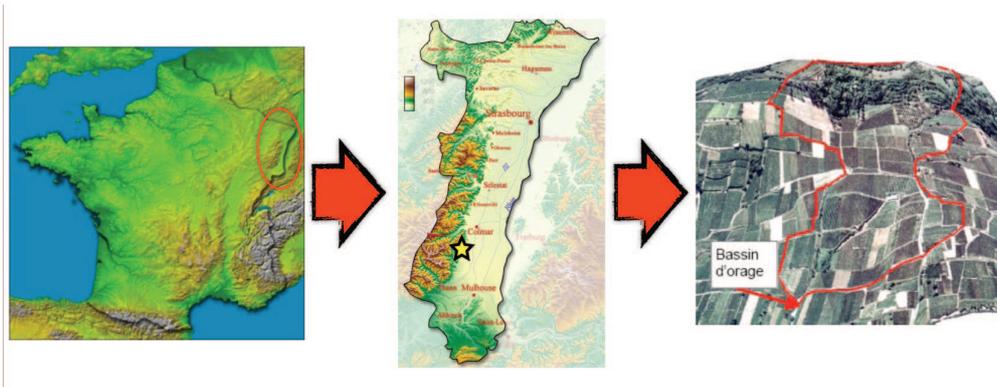


Figure II.1 : Situation géographique du lieu de l'étude.
A droite, le bassin versant du Waldweg.

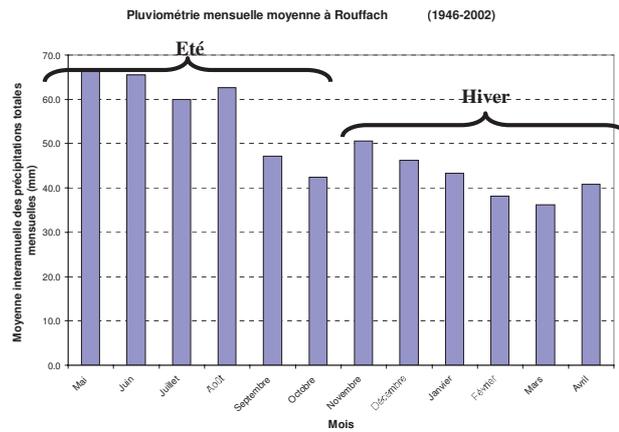


Figure II.2 : Pluviométrie moyenne sur le site d'étude.
(d'après Domange 2005)

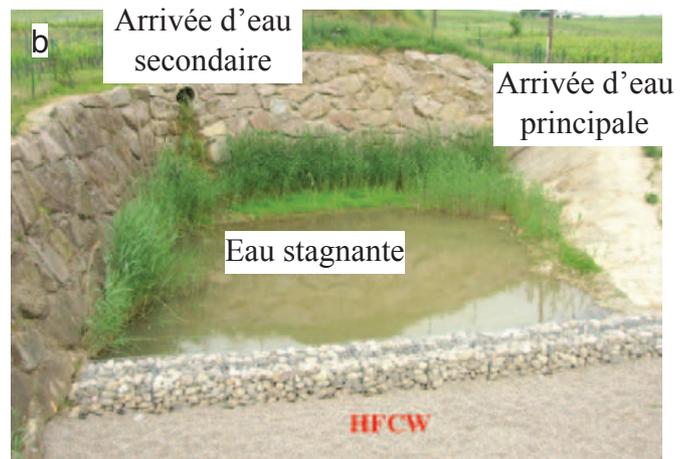
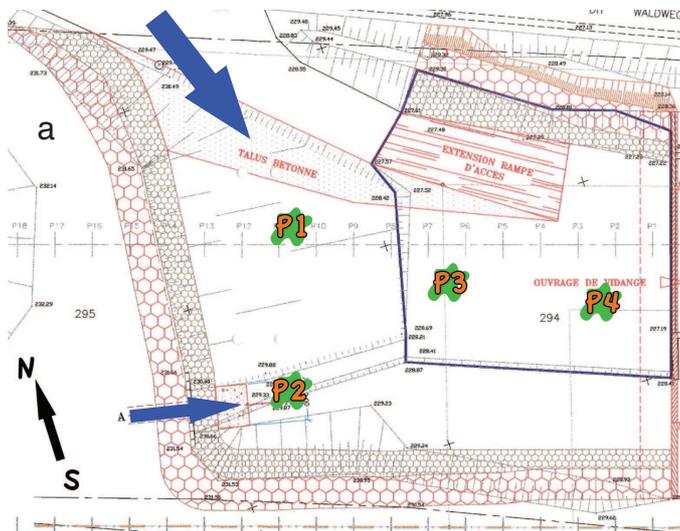


Figure II.3 : Arrivées d'eau du bassin d'orage et points de prélèvement.
a : schéma vue de dessus (Source personnelle) ; b : photo vue depuis l'Est (Wanko et coll. 2009).

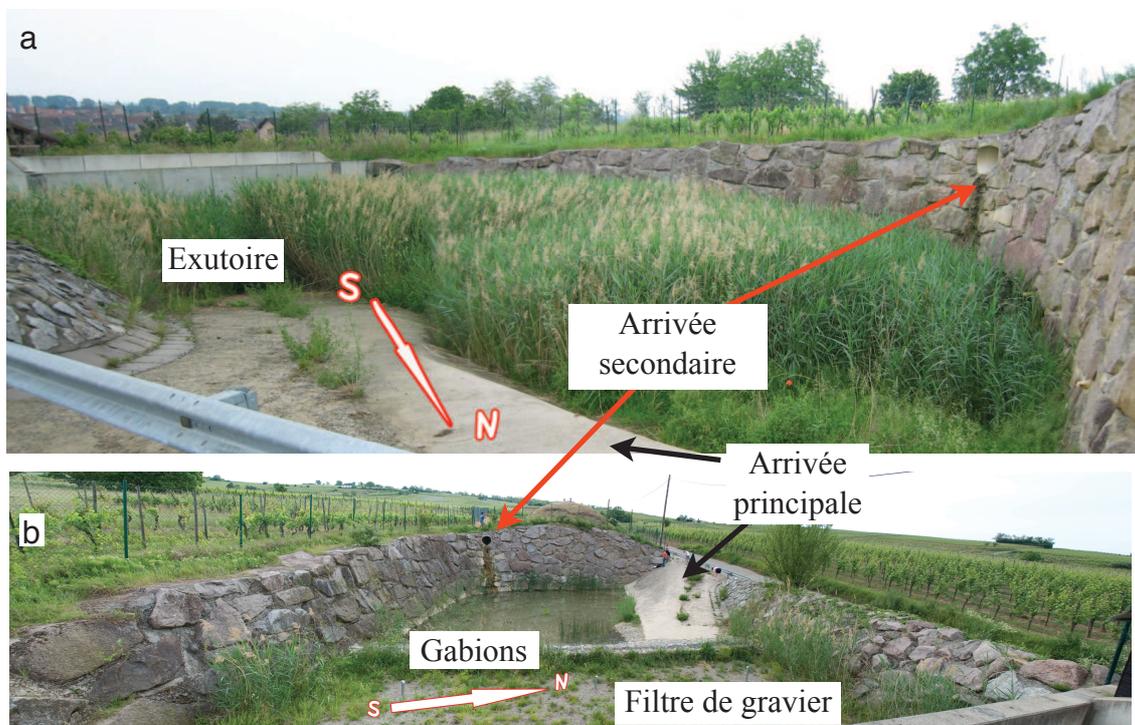


Figure II.4 : Configurations du bassin d'orage.
a : ancienne configuration ; b : nouvelle configuration.

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 ₂ O ₅ (Joret-Hébert en g.kg ⁻¹) | 634 | 70 | 78 | 0,34 |
| K ₂ O 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 ₄ Cl | 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 : - ZnSO ₄ .7H ₂ O : 10mg.L ⁻¹ - MnSO ₄ .4H ₂ O : 3mg.L ⁻¹ - H ₃ BO ₄ : 30mg.L ⁻¹ - CaCl ₂ .6H ₂ O : 20mg.L ⁻¹ - CuCl ₂ .2H ₂ O : 1mg.L ⁻¹ - NiCl ₂ .2H ₂ O : 2mg.L ⁻¹ - 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 ₂ PO 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 Wiczorek 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 H₃PO₄ 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) (sucrierie 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-chimiques 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 ($\mu\text{eq.g}^{-1}$) | 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 200rpm 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 $V_{\text{éch}}$, permet de retrouver la concentration de bactéries cultivables dans la suspension initiale à l'aide de la formule : [bactéries] en $\text{UFC.mL}^{-1} = N/d.V_{\text{éch}}$. 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 : $n_K = n_{\text{total}} - n_r$ (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 ($100\mu\text{L}$) 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 $500\mu\text{L}$ 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 20 μ L d'EUP stérile et 20 μ L 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, 2 μ L de la suspension sont alors dilués dans 30 μ L d'EUP stérile et 2 μ L de cette solution diluée sont ajoutés à un volume réactionnel de 23 μ L 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 *AluI*) des brins d'ADN issus de l'amplification de l'intergène 16S-23S d'ARNr. 8 μ L d'amplifiats issus de la RISA sont ajoutés à 2 μ L de mélange à base d'eau distillée stérile, de bases nucléiques et d'amorces (1 μ L tampon 10 \times (Buffer Tango) spécifique de l'enzyme utilisé, 0,5 μ L de l'enzyme *AluI* et 0,5 μ L d'EUP) dans un tube Eppendorf de 1,5mL et incubés une nuit à 37°C. La digestion est alors arrêtée par ajout de 2 μ L d'EDTA à 0,25mM. 1,6 μ L de tampon de charge 6 \times 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 560g 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

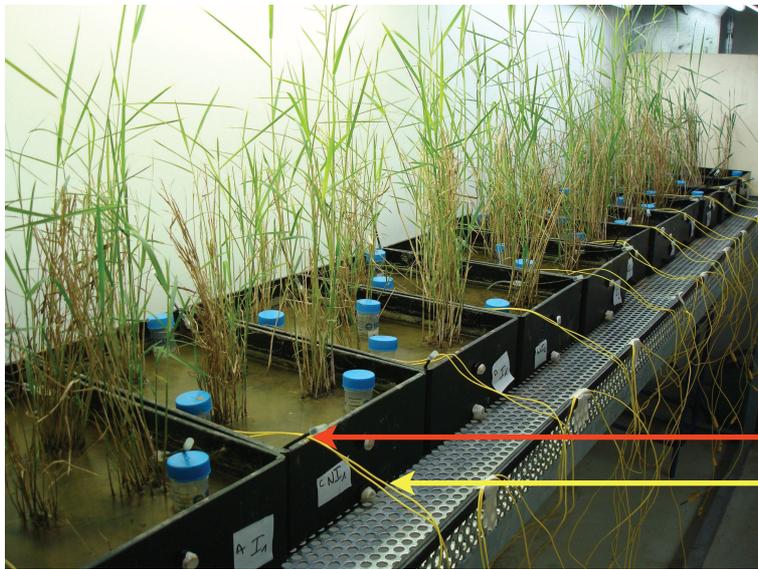
Logettes

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 $3,5\mu\text{molphotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (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 1000m³. 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.



Branchement rhizon
Branchement sonde redox

Figure II.6 : Bacs PEHD en logettes climatisées.

(Source personnelle) Les rhizons et les branchements des sondes redox sont indiqués par des flèches.

Tableau II.6 : Récapitulatif des expériences en logette.

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

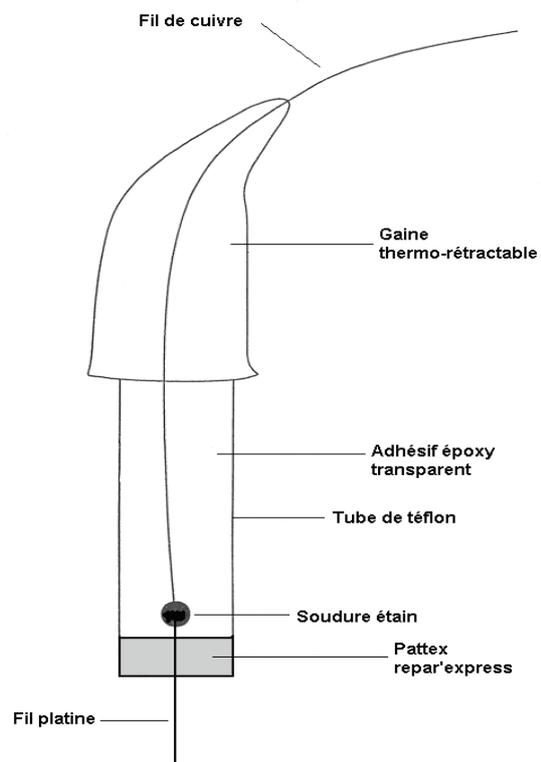


Figure II.7 : Sonde redox.
(J.-Y. Cornu)

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) 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 M_{sec} par la formule :

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

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 1120g 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

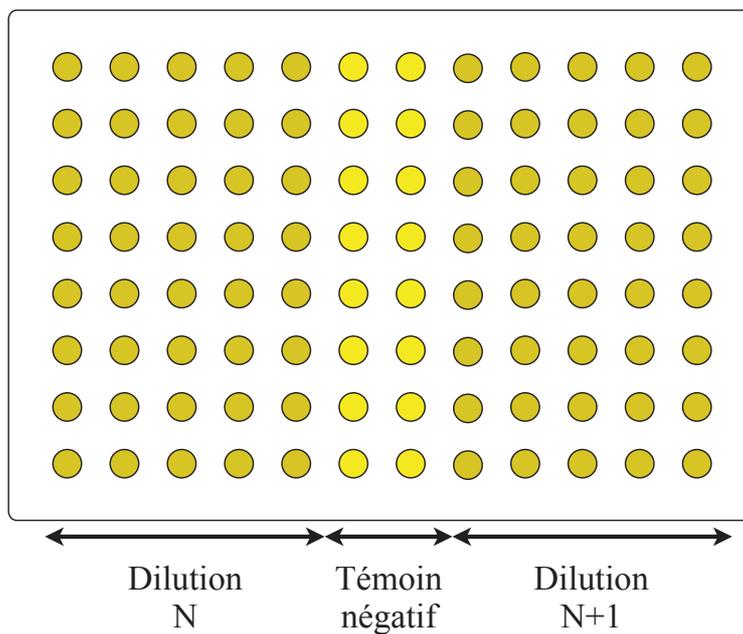


Figure II.8 : Plan des microplaques utilisées pour le dénombrement.

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 $1,1 \cdot 10^{11} \text{UFC} \cdot \text{kg}^{-1}$ 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 ($9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) et agité pendant 10 minutes à 200rpm. 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).

$$(C_i - C_f) / C_i = (C_i - \sum C_{\text{frac}} \cdot V_{\text{frac}}) / C_i = (\sum C_i \cdot V_{\text{frac}} - \sum C_{\text{frac}} V_{\text{frac}}) / \sum C_i \cdot V_{\text{frac}}$$

et

$$(M_i - M_f) / M_i = (C_i \cdot V_{\text{tot}} - \sum C_{\text{frac}} \cdot V_{\text{frac}}) / C_i \cdot V_{\text{tot}} = (\sum C_i \cdot V_{\text{frac}} - \sum C_{\text{frac}} V_{\text{frac}}) / \sum C_i \cdot V_{\text{frac}}$$

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 : $300\mu\text{g.L}^{-1}$, glyphosate : $50\mu\text{g.L}^{-1}$, diuron : $25\mu\text{g.L}^{-1}$, 3,4-DCA : $25\mu\text{g.L}^{-1}$) 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).

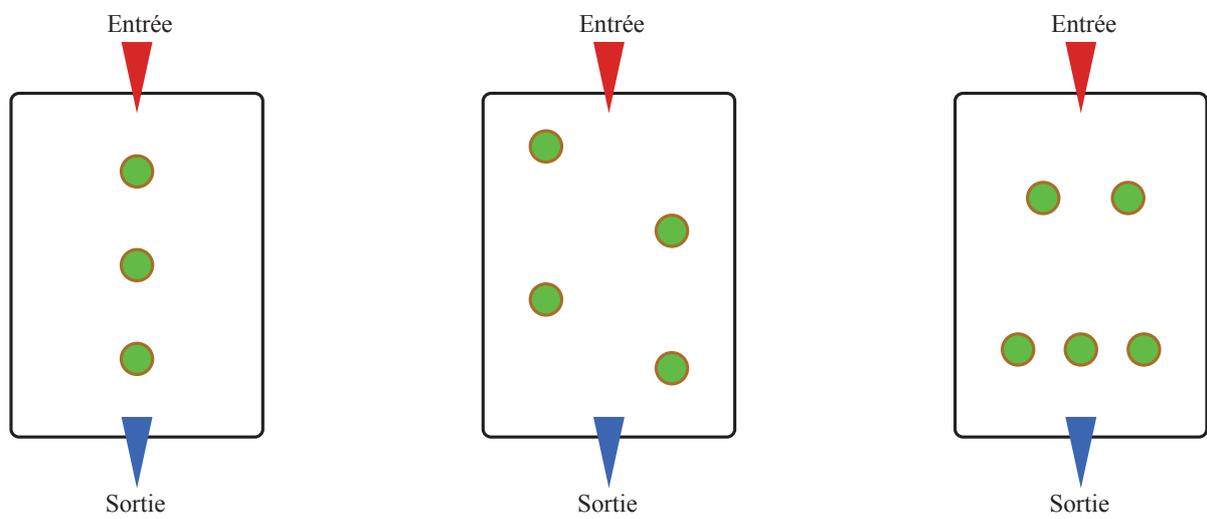


Figure II.9 : Schéma d'implantation des plantes dans les bacs PEHD.

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, 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, glyphosate, 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, diuron, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 3,4-DCA, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$) 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 événement. 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 événement. 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, 37,5 mg.L^{-1} ; glyphosate, 50 mg.L^{-1} ; diuron et 3,4-DCA, 10 mg.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 événements 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 ôtée 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 $30\pm 0,01\text{kg}$) 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 SiO₂ 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

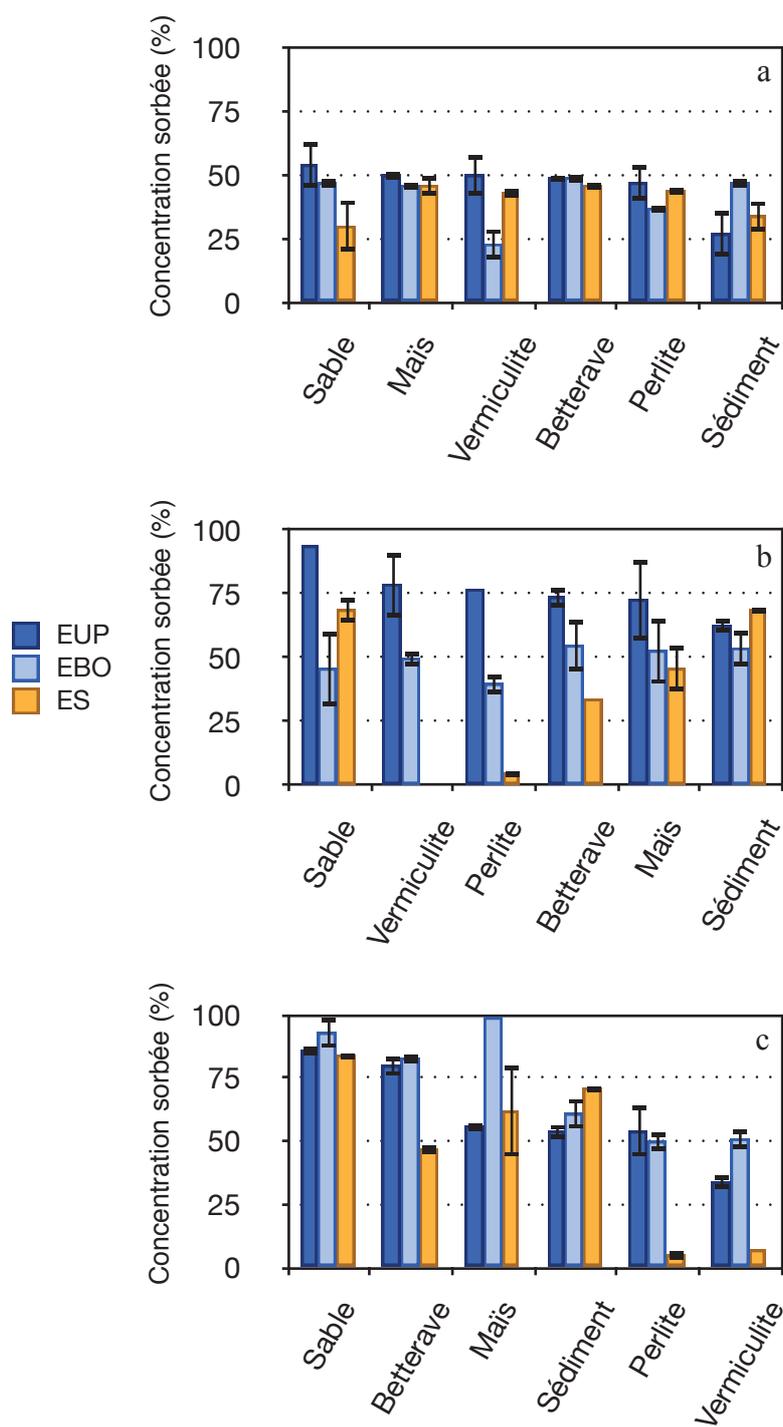


Figure III.1 : Performances de sorption dans les différentes matrices liquides.

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 entre 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.

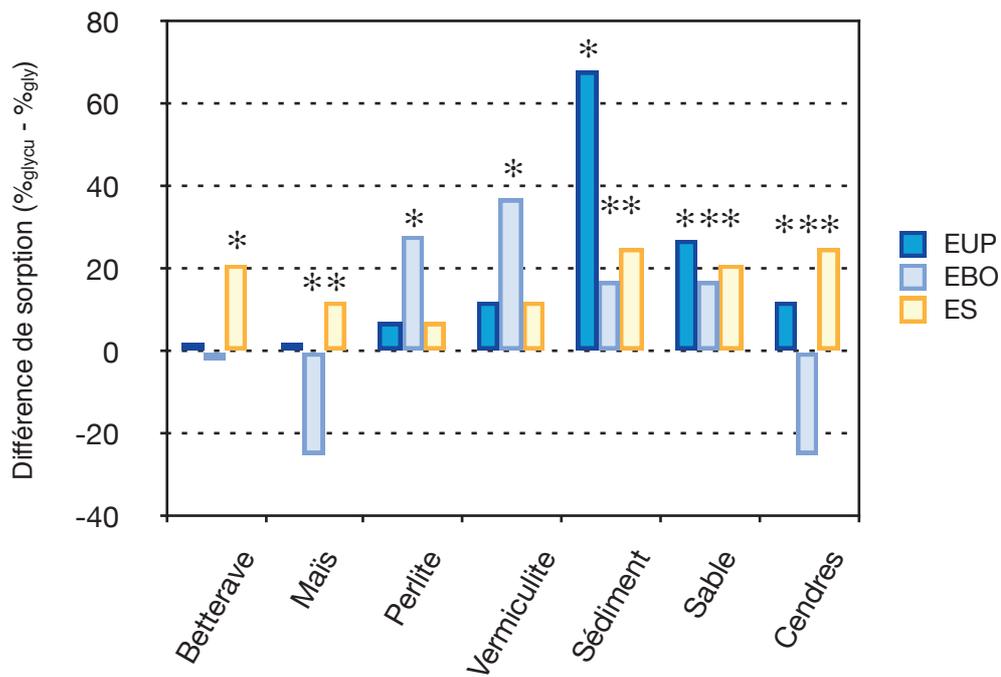


Figure III.2 : Evolution de la sorption du glyphosate en mélange avec du cuivre.

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

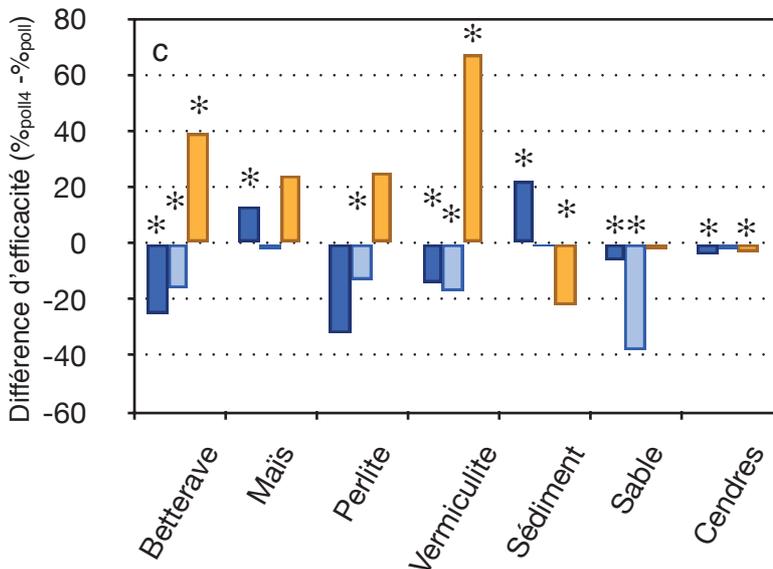
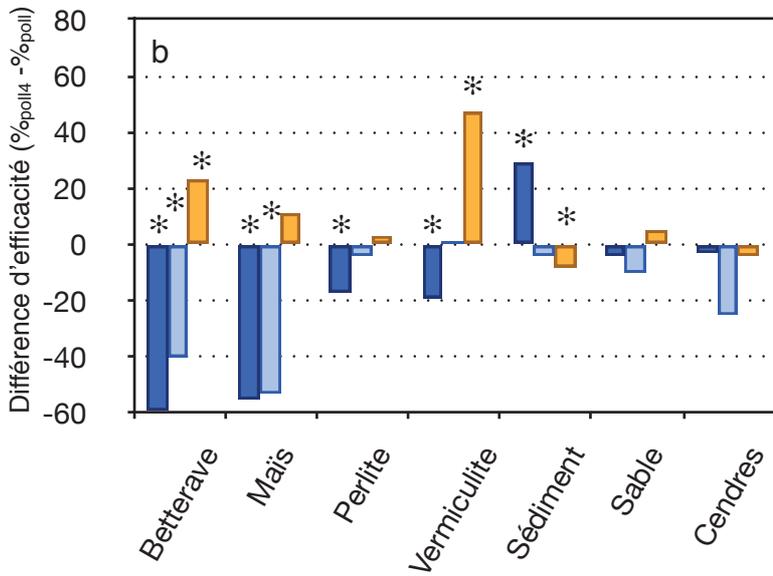
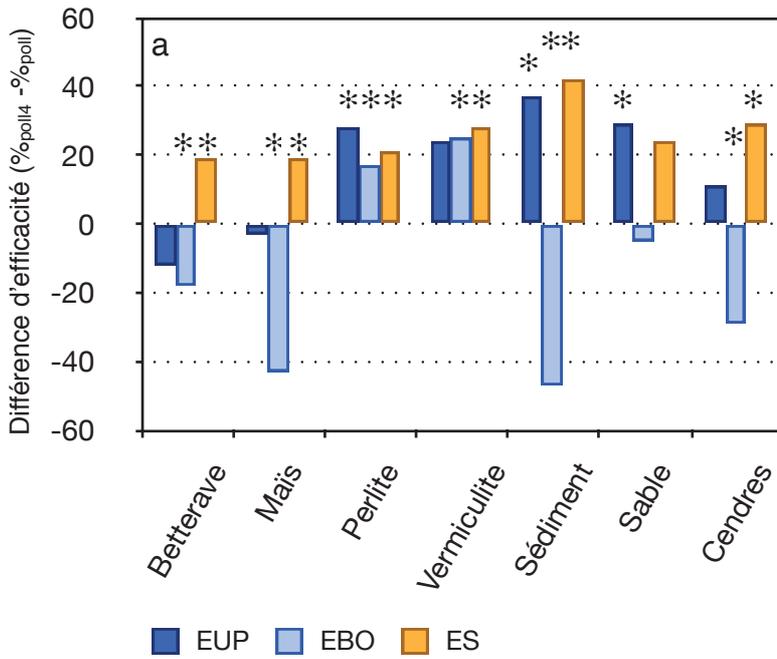


Figure III.3 : Evolution de la sorption du glyphosate, du diuron et du 3,4-DCA en milieu complexe (mélange de polluants).

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 paraît 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 $24.7 \text{ mg}^{1-n} \text{ L}^n \text{ kg}^{-1}$ pour le diuron et de $84.9 \text{ mg}^{1-n} \text{ L}^n \text{ kg}^{-1}$ pour le 3,4-DCA (graphes correspondants dans l'annexe 5). Ces valeurs sont relativement élevées comparées à celles rapportées 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.