

Effets comparés et interactifs des pesticides et facteurs physiques sur la minéralisation de substrats carbonés dans le sol

Ahmed GAMOUH¹, Mohammed BENSALAH¹, Nourreddine ABAADI¹, Abdelmajid ZYAD¹,
Camille-Michel COSTE² & Jean-Claude FOURNIER³

1. Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal, Laboratoire d'immunologie, biochimie et biologie moléculaire, BP 523, 23000 Beni Mellal, Maroc. agamou@caramail.com

2. Université de Perpignan, Centre de phytopharmacie, UMR CNRS 5054, 52 avenue de Villeneuve, 66860 Perpignan Cedex, France.

3. Laboratoire de Microbiologie des Sols, Centre de microbiologie des sols et de l'environnement, INRA, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Résumé. Les mesures de radiorespirométrie sont utilisées soit pour estimer la biodégradabilité des substances organiques, soit comme des indicateurs de l'effet des produits phytosanitaires sur les activités cataboliques de la microflore tellurique. En ce qui concerne ce second aspect, l'interprétation des résultats en termes d'effets des produits phytosanitaires sur la qualité du sol est difficile. Les objectifs de cette étude étaient : (1) de permettre une meilleure interprétation des tests de minéralisation, (2) de comparer les effets des produits phytosanitaires à ceux de perturbations naturelles, (3) d'estimer les conséquences d'une combinaison des deux types de facteurs. L'étude a été menée dans des conditions de laboratoire en soumettant des échantillons de 2 g de sol à divers traitements phytosanitaires ou chocs physiques, puis en y introduisant un substrat organique : ¹⁴C(U)-glucose, ¹⁴C(cycle U)-acide benzoïque ou ¹⁴C(cycle U)-2,4-D Le ¹⁴CO₂ libéré a été analysé après 3 heures, 24 heures, 8 jours et 64 jours d'incubation. Les résultats obtenus démontrent que le type de réponse à un traitement phytosanitaire (augmentation ou diminution de la minéralisation) dépend du rapport initial Biomasse dégradante / Concentration en substrat. En ce qui concerne les facteurs physiques, l'importance des effets de stimulation ou de réduction de la minéralisation constatés s'accroît dans l'ordre congélation < dessiccation < chauffage ménagé. Il existe en outre de grandes similitudes entre les cinétiques de minéralisation des substrats observées après application de pesticides ou de facteurs physiques ce qui justifie l'évaluation qualitative des effets non spécifiques des produits phytosanitaires sur la microflore par référence à l'impact de facteurs "naturels" de stress.

Mots clés : 2,4-D, DNOC, stress physiques, pesticides, microflore du sol.

Comparative and interactive effects of pesticides and physical factors on the mineralisation of carbonated substrates in soil.

Abstract. Measurements of radiorespirometry are used either to estimate the biodeterioration of the organic substances, or like indicators of the effect of the plant health products on the catabolic activities of the telluric microflora. With regard to this second aspect however, the interpretation of the results in terms of effects of the plant health products on the quality of the ground is difficult. The objectives of this study were: (1) to allow a better interpretation of the tests of mineralisation, (2) to compare the effects of the plant health products with those of natural disturbances, (3) to estimate the consequences of a combination of the two types of factors. The study was undertaken under conditions of laboratory by subjecting samples of 2 g ground to various plant health treatments or shocks physical, then by introducing an organic substrate there: ¹⁴C(U)-glucose, benzoic ¹⁴C(cycle U)-acid or ¹⁴C(cycle U)-2,4-D the released ¹⁴CO₂ were analyzed after 3 hours, 24 hours, 8 days and 64 days of incubation. The results obtained show that the type of response to a plant health treatment (increase or reduction in mineralisation) depends on the initial report/ratio Biomasse dégradante/Concentration in substrate. With regard to the physical factors, the importance of the effects of stimulation or reduction of mineralisation noted increases in the order congelation < desiccation < spared heating. There are moreover great similarities between the kinetics of mineralisation of the substrates observed after application of pesticides or physical factors what justifies the qualitative evaluation of the nonspecific effects of the plant health products on the microflora by reference to the impact of "natural" factors of stress.

Key words: 2,4-D, DNOC, physical stresses, pesticides, soil microflora.

INTRODUCTION

La respiration des sols est un critère largement utilisé pour mettre en évidence l'impact des xénobiotiques sur l'activité de la microflore dans les sols (Andersson & Domsch 1978, Fournier *et al.* 1992). Cependant, l'interprétation des résultats est difficile puisqu'ils ne rend pas compte de l'évolution de chaque compartiment carboné (biomasse, carbone endogène, substrats introduits). L'utilisation de traceurs radioactifs des substrats étudiés ou le marquage *in situ* de la biomasse microbienne (Soulas & Fournier 1987, Fournier *et al.* 1992) peuvent permettre une meilleure interprétation des effets constatés.

Une série d'expérimentations basée sur l'utilisation de traceurs isotopiques a été réalisée avec pour objectif d'estimer les effets individuels ou combinés de pesticides et de certains facteurs de stress climatiques sur la

dégradation microbienne de plusieurs substrats carbonés. Des résultats préliminaires concernant ces travaux ont été précédemment présentés (Gamouh & Fournier 1995, Gamouh 1998).

MATERIEL ET METHODES

Sol expérimental et traitements des échantillons

Le sol expérimental a été prélevé dans la région d'Auxonne (Côte d'Or). C'est un sol sableux contenant 2,6% de matière organique, présentant un pH de 6 et une humidité équivalente de 12%. Après tamisage en dessous de 5 mm, le sol a été stocké à 4°C pendant une durée maximale de 3 mois. Au moment des expérimentations, le sol expérimental a été partagé en deux fractions. L'une de ces fractions a été inoculée avec une souche d'*Alcaligenes xylosoxidans* précédemment isolée du sol de Dijon et capable de minéraliser le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

(Gunalan & Fournier 1993). On a ainsi introduit 10^9 bactéries.g⁻¹ dans un sol contenant déjà une population dégradante endogène de 10^1 micro-organismes.g⁻¹. Les deux fractions de sol, inoculé ou non-inoculé, ont été ensuite réparties par échantillon de 2 g (équivalent sec) dans des godets en polyéthylène d'un volume de 3 ml. Les différents échantillons ont été soumis à différents facteurs physiques ou chimiques de stress : congélation à -20°C pendant 5 jours, chauffage à 50°C pendant deux heures, séchage en salle ventilée à 28°C pendant 5 jours ou apport d'un toxique, le DNOC (10 ou 50 mg de pesticide kg⁻¹ de sol introduit dans 50 µl d'eau). Des traitements combinés ont été également réalisés en appliquant successivement un traitement physique et le traitement chimique. Une autre série d'échantillons n'a reçu aucun traitement.

Après application des facteurs de stress, les échantillons non inoculés ont été ensuite amendés soit avec 0,5 ; 50 ou 5000 mg C kg⁻¹ de ¹⁴C(U)-glucose (activité spécifique : 296,4 MBq mmole⁻¹), en solution aqueuse (50 µl), de façon à introduire 3,7 ; 3,6 et 18 KBq du traceur respectivement par échantillon, soit avec une solution de ¹⁴C(cycle)-2,4-D (activité spécifique : 370 MBq mmole⁻¹) de façon à introduire 0,65 ; 6,5 ou 65 mg kg⁻¹ et 1,3 ; 1,5 et 2,8 KBq de substrat respectivement par échantillon dans 100 µl de tampon KH₂PO₄-Na₂HPO₄, M/20, pH 7. Les échantillons inoculés ont été amendés dans les mêmes conditions que précédemment uniquement avec le 2,4-D. Après ajustement de l'humidité à 223% de l'humidité équivalente, ce taux d'humidité équivalente élevé est dû à la faible quantité de sol (2 g), au stress pesticide et le fait que le substrat carboné ne peuvent être introduits que dans les solutions aqueuses. Les échantillons (quatre par traitement) ont été incubés à 20°C, à l'obscurité, dans des flacons de polyéthylène clos de 55 ml, en présence d'un flacon contenant 2 ml de soude 0,2 N. Le ¹⁴CO₂ piégé a été analysé au cours du temps à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tricarb TR 1900, Packard) après mélange avec un cocktail scintillant (ACSII, Amersham).

RESULTATS

Minéralisation du glucose

Les résultats concernant l'effet des différents facteurs de stress sur la minéralisation du glucose sont présentés dans le tableau I. Il apparaît que les phénomènes observés : stimulation ou inhibition de la minéralisation du substrat par rapport aux témoins, dépendent en premier lieu de la concentration du substrat et beaucoup moins de la nature physique ou chimique du stress. A la plus faible concentration en substrat, l'effet des différents facteurs de stress, à l'exception de la congélation, se traduit par une forte stimulation du ¹⁴CO₂ dégagé dans les premières 24 heures d'incubation conduisant à un accroissement de plus de 200% du ¹⁴CO₂ piégé par rapport aux échantillons témoins.

A la dose moyenne de substrat, on observe en revanche une inhibition systématique de la vitesse de minéralisation dans les premières heures d'incubation avant de retrouver une nette augmentation de la minéralisation par rapport aux témoins aux temps suivants. Avec la forte dose de glucose,

le phénomène d'inhibition devient systématique, au moins lorsque l'on considère les bilans de minéralisation établis après 8 et 64 jours d'incubation.

Les effets de stimulation de la minéralisation augmentent dans l'ordre séchage < chauffage < DNOC alors que les effets inhibiteurs les plus marqués sont observés après chauffage des échantillons, les effets du séchage et du DNOC restant plus modérés. Dans les deux cas, les effets de la congélation restent très limités.

La combinaison du traitement chimique avec l'un des traitements physiques ne modifie pratiquement pas la nature des effets observés. D'une façon générale, l'effet résultant est voisin de celui du stress individuel présentant l'effet le plus élevé. Quelquefois (faible dose de glucose, 3 premières heures d'incubation), les effets de la combinaison des traitements peuvent même être inférieurs à l'effet du facteur le plus important à ce stade (DNOC). Il est à signaler que la formule pour l'évaluation du pourcentage d'inhibition ou de stimulation d'un traitement donné par rapport au témoin est :

% d'inhibition ou de stimulation = % de dégradation du traitement x / % de dégradation du témoin

Minéralisation du 2,4-D

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II. La capacité dégradante relativement faible de la microflore présente dans le sol non inoculé n'a permis d'exploiter que les seuls résultats correspondants à la dose la plus faible de 2,4-D. Dans ces conditions on remarque que le DNOC, le chauffage et la combinaison du DNOC avec les trois types de stress physique conduisent à une inhibition de la vitesse de minéralisation du ¹⁴C après 3 ou 8 jours d'incubation. En revanche, la congélation et surtout le séchage semblent provoquer une légère augmentation de la vitesse de minéralisation du 2,4-D aux deux mêmes temps d'incubation.

Les résultats obtenus avec le sol d'Auxonne inoculé mettent en évidence la forte capacité dégradante des échantillons inoculés (témoins) aux trois concentrations de 2,4-D. Par ailleurs, ces résultats rappellent davantage les observations précédentes concernant la minéralisation du glucose. Ainsi, à la faible concentration en 2,4-D, on retrouve une nette stimulation de la vitesse de minéralisation du substrat en présence du DNOC ou de façon beaucoup moins marquée après le séchage ou encore la congélation des échantillons. En revanche, le chauffage ou les différentes combinaisons de traitements conduisent systématiquement à une inhibition marquée de la minéralisation. Avec la plus forte concentration de 2,4-D, des phénomènes d'inhibition de la minéralisation sont systématiquement observés quel que soit le traitement ou la combinaison de traitements.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats présentés mettent en évidence les difficultés d'interprétation des effets constatés. Cette difficulté résulte du choix d'un paramètre facilement mesurable, la vitesse de minéralisation d'un substrat carboné, qui peut en fait rendre compte de la stimulation ou de la perturbation de différents

Tableau I. Effets de différents facteurs de stress sur la minéralisation du ¹⁴C-glucose. **1**, % de minéralisation dans les témoins non stressés ; **2,3,4,5**, accroissement (+) ou réduction de la minéralisation (-) exprimés en % de la valeur du témoin mesurée après le même temps d'incubation pour le DNOC (**2**), le chauffage (**3**), le séchage (**4**) et la congélation (**5**).

glucose mg C/kg ⁻¹	Temps (jours)	Tém. 1	DNOC 2	CH 3	DNOC + CH	Séch. 4	DNOC + Séch.	Cong. 5	DNOC + Cong.
0,50	0,15	9,3	207% +	77% +	94% +	6% +	63% +	11% I	177% +
0,50	1	13,5	196% +	181% +	250% +	110% +	163% +	10% I	175% +
0,50	8	19,7	178% +	150% +	248% +	79% +	152% +	7% I	157% +
0,50	64	27,1	136% +	94% +	167% +	52% +	82% +	9% I	114% +
50	0,15	5,0	12% -	76% -	78% -	56% -	66% -	20% -	14% -
50	1	21,3	67% +	71% +	66% +	27% +	69% +	10% +	83% +
50	8	28,8	78% +	71% +	138% +	33% +	108% +	10% +	82% +
50	64	35,7	80% +	47% +	104% +	20% +	82% +	5% +	65% +
5000	0,15	0,2	50% -	100% -	100% -	50% -	50% -	0%	50% -
5000	1	2,2	36% -	45% -	36% -	41% +	50% -	32% +	18% -
5000	8	55,0	47% -	67% -	68% -	48% -	41% -	9% -	52% -
5000	64	68,7	11% -	18% -	14% -	1% -	6% -	1% -	14% -

Tableau II. Effets de différents facteurs de stress sur la minéralisation du ¹⁴C-2,4-D dans un sol inoculé avec *Alcaligenes xyloxydans* et dans le même sol non inoculé (valeurs en italiques). Tém, témoin ; CH, chauffage ; Cong, congélation ; **1**, % de minéralisation dans les témoins non stressés ; **2,3,4,5**, accroissement (S) ou réduction de la minéralisation (I) exprimés en % de la valeur du témoin mesurée après le même temps d'incubation pour le DNOC (**2**), le chauffage (**3**), le séchage (**4**) et la congélation (**5**).

2,4-D mgC/ kg	Temps (jours)	Tém. 1	DNOC 2	CH 3	DNOC +CH	Séch. 4	DNOC +Séch.	Cong. 5	DNOC +Cong.
0,65	1	32,8	41% +	92% -	98% -	45% S	92% I	23% +	88% -
		<i>2,9</i>	<i>0</i>	<i>53% -</i>	<i>86% -</i>	<i>48% I</i>	<i>51% I</i>	<i>51% -</i>	<i>39% -</i>
0,65	3	44,2	37% +	93% -	93% -	9% S	90% -	8% +	57% -
		<i>25,9</i>	<i>64% -</i>	<i>24% -</i>	<i>96% -</i>	<i>17% +</i>	<i>79% -</i>	<i>5% +</i>	<i>71% -</i>
0,65	8	45,3	39% +	90% -	90% -	10% +	67% -	5% +	54% -
		<i>33,5</i>	<i>77% -</i>	<i>50% -</i>	<i>95% -</i>	<i>17% +</i>	<i>37% -</i>	<i>3% +</i>	<i>26% -</i>
6,5	1	41,8	19% -	99% -	99% -	16% +	95% -	1% +	98% -
	3	64,1	54% -	86% -	96% -	20% -	65% -	34% -	76% 4
	8	64,9	57% -	85% -	95% -	19% -	62% -	34% -	64% -
65	1	39,6	89% -	99% -	100% -	10% -	94% -	12% -	8% -
	3	77,0	73% -	51% -	99% -	15% -	88% -	55% -	87% -
	8	77,7	72% -	78% -	98% -	14% -	56% -	44% -	55% -

mécanismes microbiens interactifs. L'accroissement de la vitesse de minéralisation d'un substrat en présence d'un stress chimique peut notamment résulter d'un dysfonctionnement des chaînes respiratoires et d'une diminution du quotient carbone assimilé/carbone respiré. Le DNOC est particulièrement connu pour sa forte action découplante (Anonyme 1991) mais d'autres pesticides présentent le même type d'effets. Ce phénomène peut probablement masquer l'inhibition partielle d'une partie de la microflore initialement capable de dégrader le substrat. De plus, ces perturbations du fonctionnement des cellules microbiennes peuvent rapidement aboutir à la mort des cellules, ce qui explique probablement la succession observée avec certains échantillons d'une période de stimulation puis d'inhibition de la vitesse de minéralisation. Pour expliquer les réponses observées, il faut encore tenir compte de la durée des expérimentations qui peut permettre le développement d'une microflore résistante au toxique, voire la dégradation de ce même toxique.

Un intérêt de l'étude effectuée est de mettre en évidence une certaine similitude des phénomènes observés en présence du DNOC et après application de divers facteurs de stress physique. En particulier le séchage et le chauffage peuvent provoquer dans certaines conditions une stimulation temporaire de la minéralisation du glucose, ce qui pourrait indiquer que les mêmes fonctions du métabolisme microbien central sont perturbées.

La non additivité apparente qui est généralement observée entre les effets d'un stress chimique et d'un stress physique semble indiquer une grande proximité entre les populations microbiennes visées par les deux types de stress, l'effet résultant correspondant pour l'essentiel à l'effet du facteur le plus important. Cependant, certains résultats suggèrent des hypothèses plus complexes. Ainsi, le chauffage, le séchage mais aussi la congélation limitent nettement l'effet de stimulation du DNOC sur la minéralisation du glucose à la concentration la plus faible lorsque ces facteurs sont

combinés. Dans ces mêmes conditions, avec le 2,4-D en sol inoculé, on observe même que la stimulation de la minéralisation observée avec chaque effet individuel est remplacée par un fort effet inhibiteur des traitements combinés. Dans ces conditions de substrat limitant par rapport à la flore dégradante disponible, on peut admettre que l'addition des effets biocides ou biostatiques aboutit à une limitation de la taille de la flore active limitant ainsi l'expression du dysfonctionnement respiratoire.

Le rapport quantités de substrat / biomasse dégradante est de fait un élément essentiel à prendre en compte pour la prédiction des effets observés. Clairement, dans le cas du glucose, les phénomènes de stimulation de la minéralisation l'emportent lorsque la concentration du substrat est faible. En revanche, lorsque les quantités de substrat deviennent excédentaires par rapport à la microflore disponible ce sont les phénomènes d'inhibition qui dominent. Les résultats obtenus en utilisant le 2,4-D comme substrat microbien permettent dans une large mesure de généraliser les observations précédentes. Ainsi, lorsque les quantités de substrat 2,4-D sont importantes et/ou lorsque la microflore dégradante est très faible (sol d'Auxonne non inoculé), les phénomènes d'inhibition l'emportent systématiquement après l'application du DNOC. En revanche, lorsque les concentrations de 2,4-D sont faibles et que la biomasse dégradante inoculée est importante, l'impact du DNOC se traduit par un fort accroissement de la vitesse de minéralisation par rapport aux témoins. Les mêmes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer les effets du séchage et de la congélation sur la vitesse de minéralisation du 2,4-D. Cependant, les effets relativement

importants de la congélation, de même que la forte inhibition résultant systématiquement du chauffage du sol montrent qu'il faut aussi tenir compte de la sensibilité particulière de chaque population microbienne, ici un organisme inoculé, à chaque facteur de stress.

En conclusion, les résultats présentés suggèrent de prendre un maximum de précautions avant de proposer des hypothèses permettant d'interpréter les résultats des tests. Même lorsque l'analyse du substrat est facilitée par le marquage de la molécule, l'utilisation de plusieurs doses de substrat et des temps d'incubation relativement prolongés sont indispensables. La mesure de la biomasse microbienne et une évaluation de la cinétique de dégradation des molécules organiques toxiques appliqués sur le sol peuvent aussi être utiles. Par ailleurs les phénomènes de stimulation observés au cours de certaines études peuvent représenter tout autant que l'inhibition de la minéralisation, un indice de la perturbation des fonctions microbiennes. Dans une certaine mesure ces observations s'appliquent aussi à la mesure des effets des toxiques sur la minéralisation du C-organique du sol. Certains phénomènes d'accroissement de la minéralisation de la matière organique endogène ont été imputés à des modifications de la nature des populations microbiennes mais aussi aux phénomènes précédemment décrits (dysfonctionnement, minéralisation du carbone de la biomasse tuée) plutôt qu'à une stimulation directe des fonctions métaboliques (Wardle & Parkinson 1990, Graves *et al.* 1991). D'un autre côté, ces études confirment aussi le bien fondé des propositions consistant à apprécier globalement l'impact d'un pesticide en le comparant à celui de facteurs naturels de stress.

Références

- Anderson J.P.E. & Domsch K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221.
- Anonyme 1991. In *the Agrochemical Handbook*, 3ème édition, RSC information service.
- Fournier J.-C., Hormatallah A., Collu T & Froncek B. 1992. Labelling of microbial biomass with radioactive substrates as a means to estimate pesticide effects in soil. *Sci. Total Env.*, 123/124, 325-332.
- Fournier J.-C., Froncek B., Gamouh A. & Collu T. 1992. Comparaison of three methods to test the side effects of pesticides on soil microbial biomass. In : Anderson J.P.E., Arnold D.L. & Lewis F. - Proc. Intern. Symp. on environmental aspects of pesticide microbiology.
- Gamouh A. & Fournier J.-C. 1995. Effets de divers stress chimiques (xénobiotiques) et naturels (aléas climatiques) sur l'activité microbienne dans le sol. In : Actes du XXV ème congrès du GFP, Montpellier 17-18 mai, 121.
- Gamouh A. 1998. *Effets comparés et interactifs des pesticides et des facteurs physiques sur la minéralisation de divers substrats carbonés dans le sol*. Thèse, Univ. Perpignan, France, 140 p.
- Graves D.A. Lang C.A. & Leavitt M.E. 1991. Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28/29, 813-826.
- Gunalan & Fournier J.-C. 1993. Effect of microbial competition on the survival and activity of 2,4-D degrading *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans* added to the soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16, 178-181.
- Soulas G. & Fournier J.-C. 1987. Radiospirometric measurements of microbial responses. In Sommerville L. (éd.) - *Pesticides effects on soil microflora*, Taylor and Francis, London, 171.
- Torstensson L. 1997 Microbial Assay in soils. In Tarradellas J., Bitton G. & Rossel D. (éds) - *Soil ecotoxicology*, Lewis publishers, 8, 207-.
- Wardle D.A. & Parkinson D. 1990. Effect of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant & Soil*, 122, 21-28.

*Manuscrit reçu le 14 décembre 2003
 Accepté le 10 mars 2004*