

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

			K (mg¹⁻ⁿ Lⁿ kg⁻¹)	n	r²
Diuron	Sédiment	EUP	24,7	1,37	0,992
		EBO	35,7	0,94	0,848
	Sable	ES	-	-	-
3,4 DCA	Sédiment	EUP	84,9	1,23	0,977
		EBO	52,3	1,38	0,816
	Sable	ES	-	-	-

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

PARTIE III
CHAPITRE 2

-

SELECTION de
SOUCHES

RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 2

Sélection de souches

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

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

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

2.1. Caractérisation préliminaire du sédiment

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

2.1.1. Physico-chimie

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

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

2.1.2. Analyse microbiologique

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

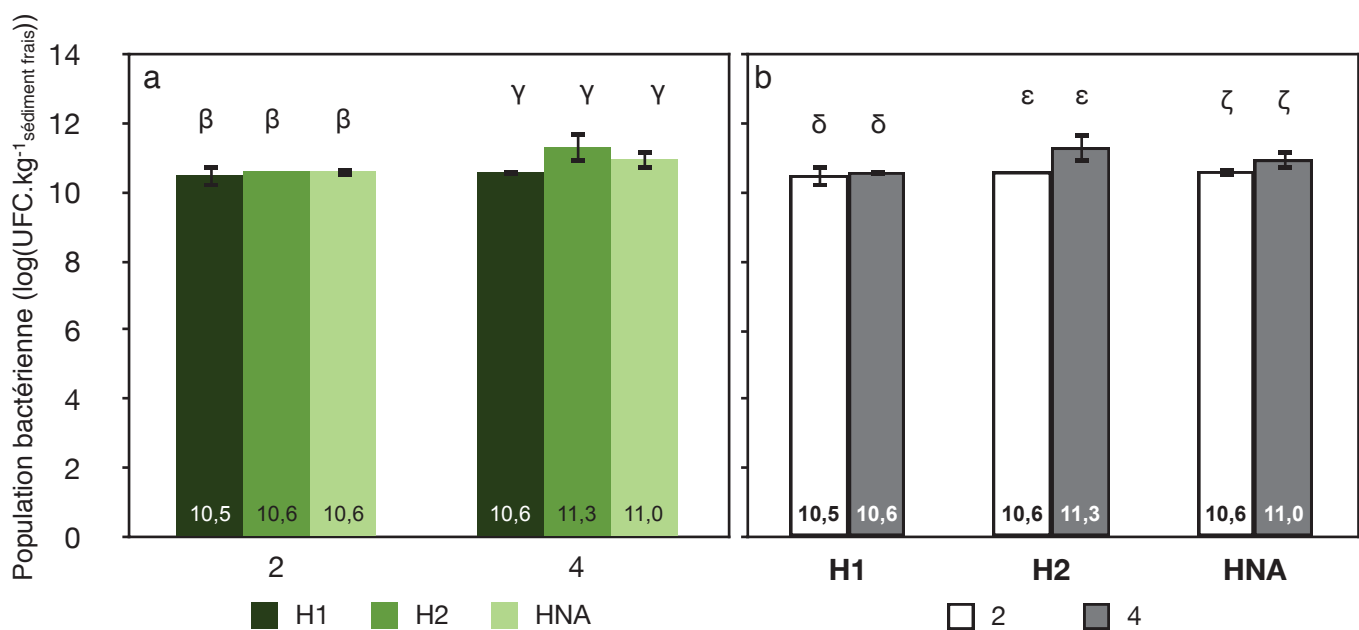


Figure III.4 : Population bactérienne cultivable initiale selon les points de prélèvement.

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

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

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

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

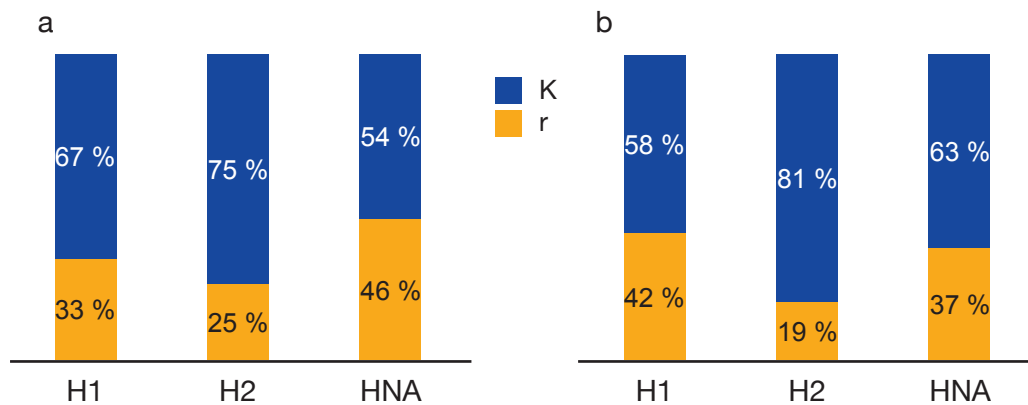


Figure III.5 : Répartition de la population bactérienne selon les points de prélèvement en fonction de la stratégie de croissance.
a : point de prélèvement 2 ; b : point de prélèvement 4.

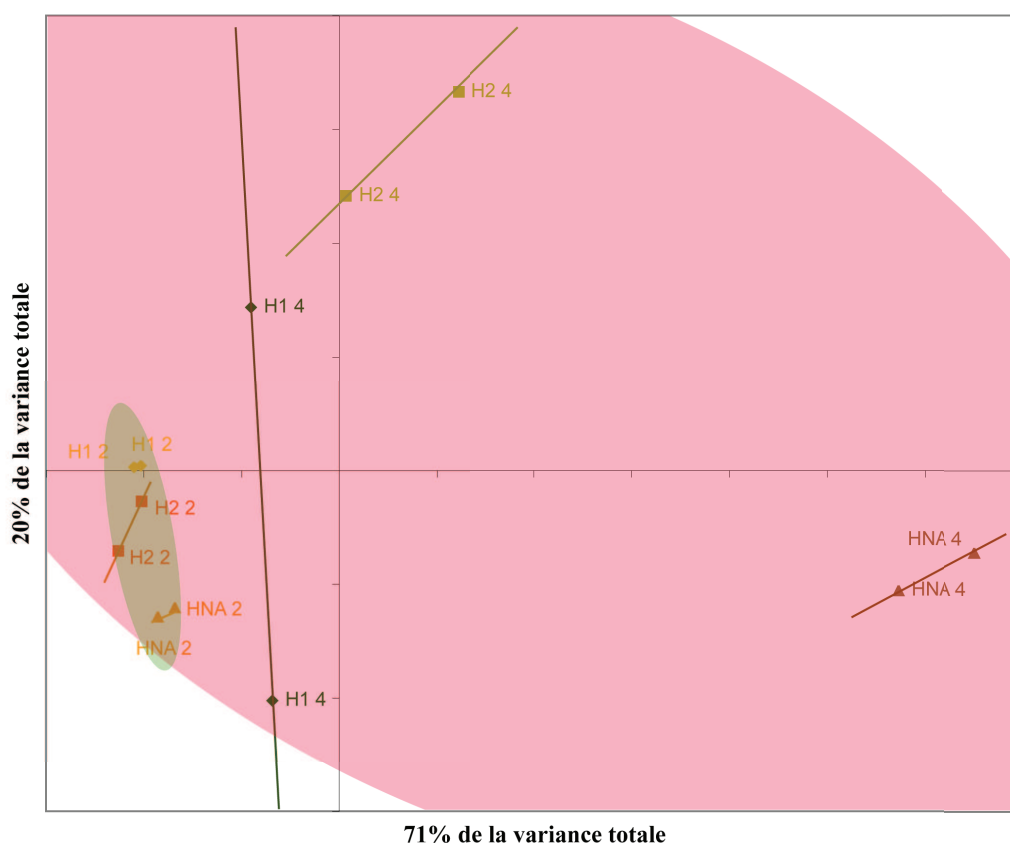


Figure III.6 : Diversité microbienne au sein du bassin d'orage.

Les différentes origines de prélèvement sont indiquées et associées à un code couleur. Les segments représentent les ellipses de corrélation associées à chaque origine de prélèvement et sont ici plates. Les points annotés de la même façon correspondent aux duplicats. Les axes représentés sont les deux premiers axes obtenus lors du calcul.

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

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

2.2. Tri des populations

2.2.1. Sélection de populations bactériennes tolérantes

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

Population totale : les concentrations bactériennes obtenues sont comprises entre 7,9.10⁶ et 1,6.10⁸UFC.mL⁻¹ pour les cultures en milieu MM non pollué et entre 2,0.10⁶ et 1,6.10⁹UFC.mL⁻¹ pour les cultures en milieu MM pollué (40mg.L⁻¹ de glyphosate, 10mg.L⁻¹ de diuron et 3,4-DCA et 130mg.L⁻¹ de cuivre) (figure III.7). L'ajout de polluants entraîne des variations de population inférieures à 1 log, que l'on pourrait donc qualifier de non significatives, sur presque tous les points de prélèvement. Il peut paraître surprenant que les polluants à ces concentrations n'ait pas réduit significativement la taille des populations des différents points de prélèvement. En effet une étude de Cycon et coll. (2009) a montré un effet significatif du diuron à 7,5mg.kg⁻¹ de sol sur la population totale d'un sol où les polluants sont censés être moins disponibles que dans un milieu liquide. Une explication pourrait venir de la quantité de carbone dans le milieu de culture rapportée à celle des polluants. Dans notre cas, le milieu utilisé pour la culture liquide contient 11,5mM de gluconate de sodium et 22,7mM de pyruvate de sodium. L'ajout de polluants à des concentrations de 237μM pour le glyphosate, 42,9μM pour le diuron et 61,7μM pour le 3,4-DCA ne constitue donc pas un apport significatif de carbone (< 2%) dans le milieu, ce qui expliquerait le peu de modification de la population totale. Les seules variations de

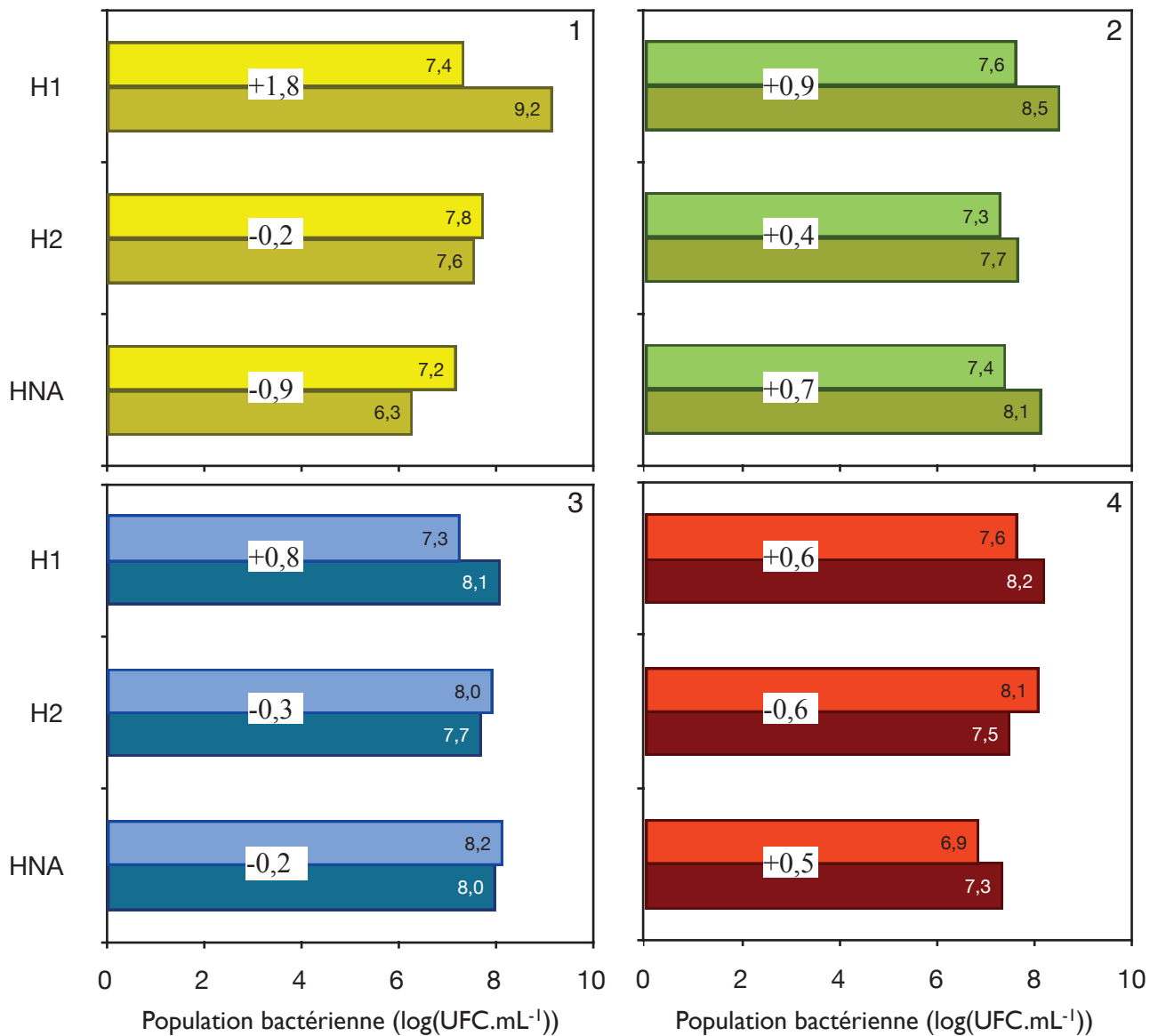


Figure III.7 : Evolution quantitative de la population bactérienne cultivable du sédiment suite à la pression de pollution.

En ordonnées, l'horizon de prélèvement. Les points de prélèvement sont indiqués en haut à droite de chaque graphe. En couleur claire : culture non polluée, en couleur foncée : culture polluée ([glyphosate] = 40mg.L⁻¹, [diuron] = 10mg.L⁻¹, [3,4-DCA] = 10mg.L⁻¹). Les chiffres dans les étiquettes blanches indiquent la variation de population lors du passage de la culture non-polluée à la culture polluée.

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

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

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

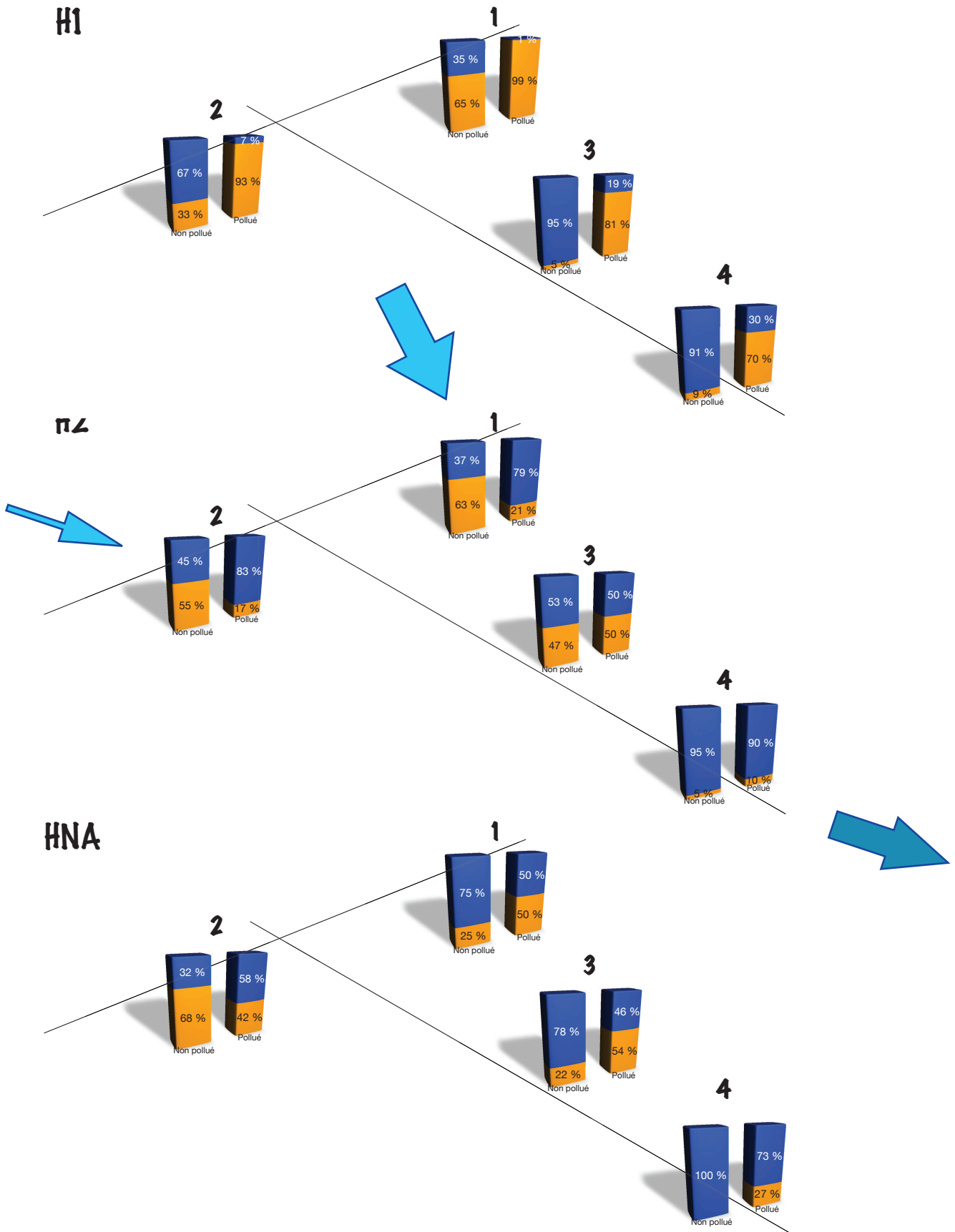


Figure III.8 : Evolution de la répartition quantitative entre stratégies r et stratégies K en fonction de la pression sélective.

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

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

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

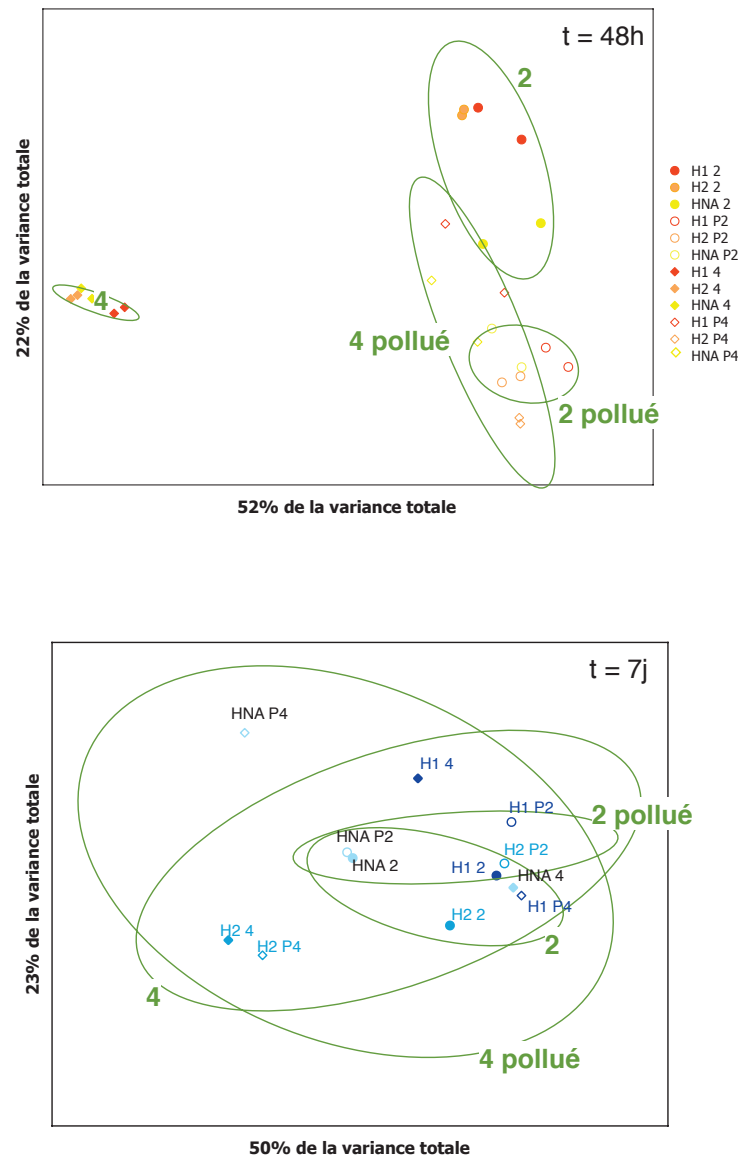


Figure III.9 : Evolution de la diversité microbienne du bassin d'orage avant/après pression de pollution.

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

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

2.2.2. Différenciation génétique

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

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

Le protocole de l'expérience est détaillé dans le paragraphe § 2.2.4. de la partie matériel et méthodes. Le chiffre encadré en rouge correspond au nombre total de colonies isolées.

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

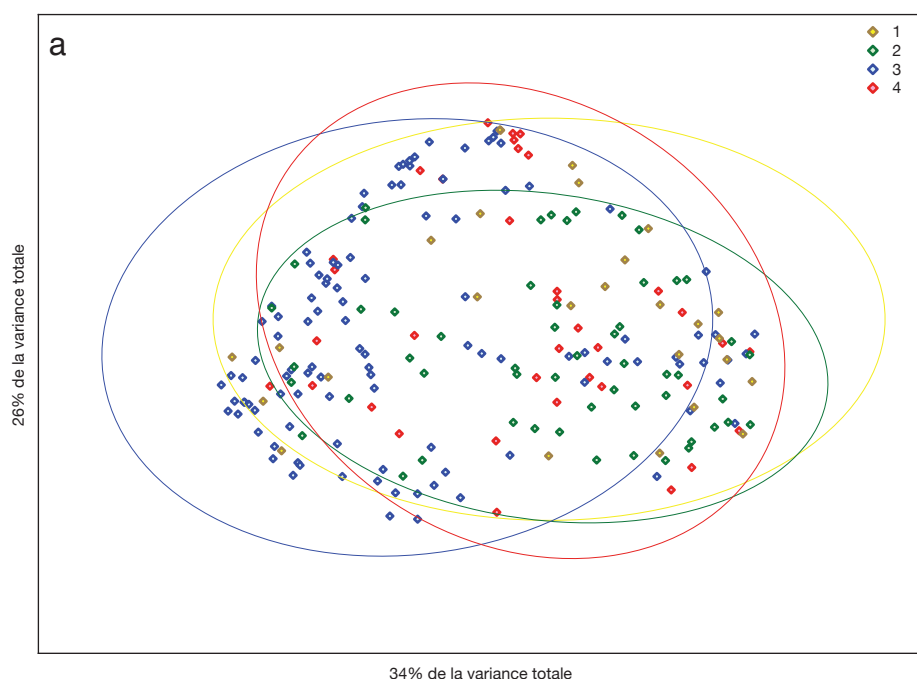
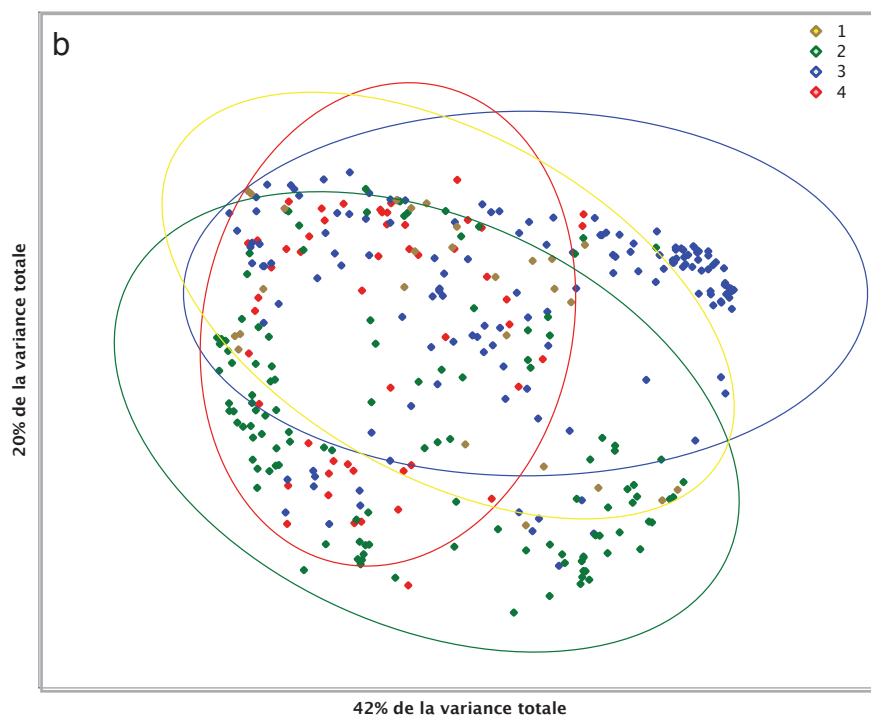


Figure III.10 : Proximité génétique des différents isolats obtenus.

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



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

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

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

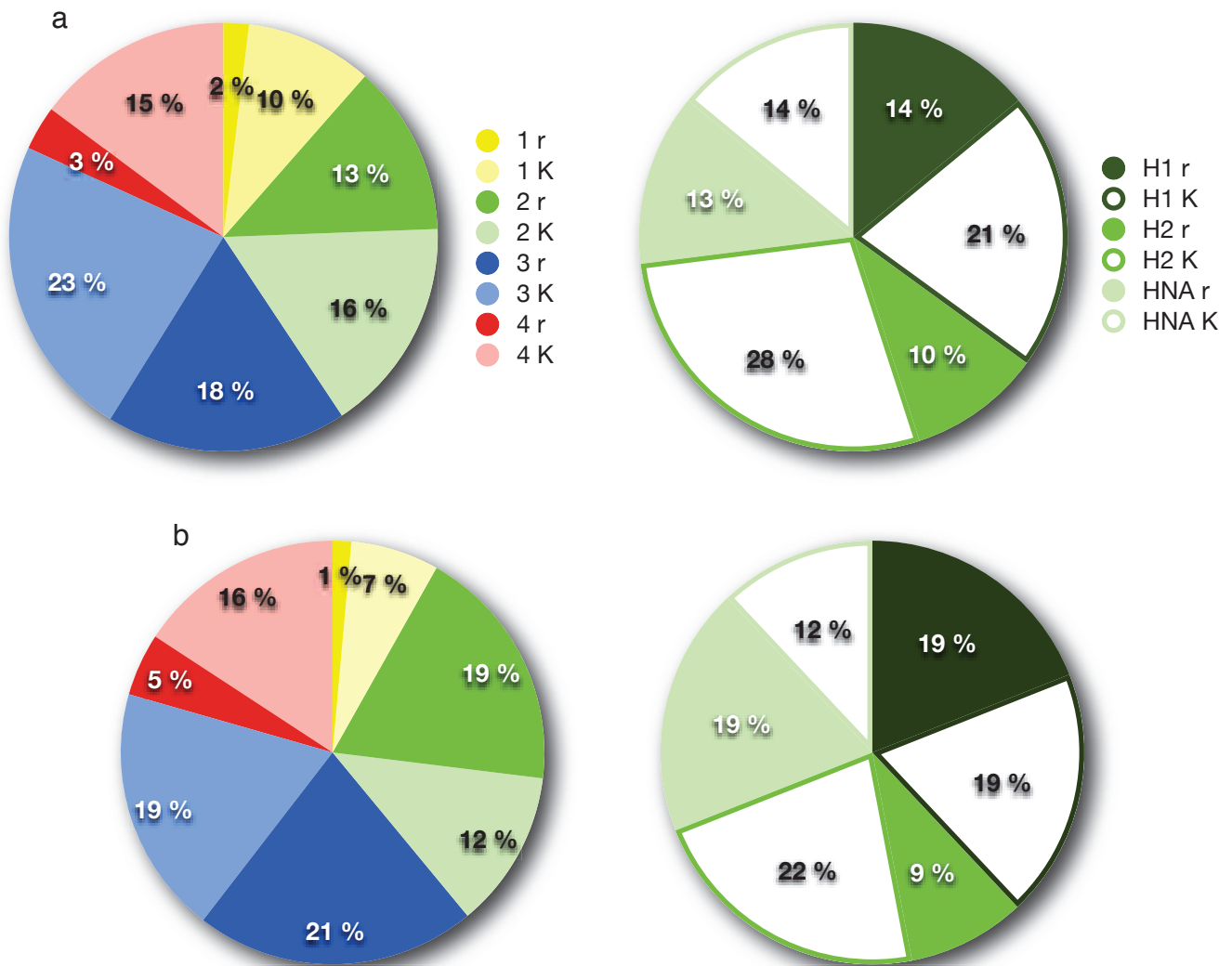


Figure III.11 : Caractéristiques des isolats tolérants distincts génétiquement.

Les pourcentages indiqués sur les graphes sont calculés à partir des informations sur les 209 isolats discriminés en fin de RISA-RFLP (a) et à partir des informations sur les 564 colonies isolées après les tests de résistance aux polluants (glyphosate, 40mg.L⁻¹, diuron, 10mg.L⁻¹, 3,4-DCA, 10mg.L⁻¹, cuivre, 130mg.L⁻¹) (b). La légende est commune au a et au b.

2.3. Tri fonctionnel

2.3.1. Performances de dissipation

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

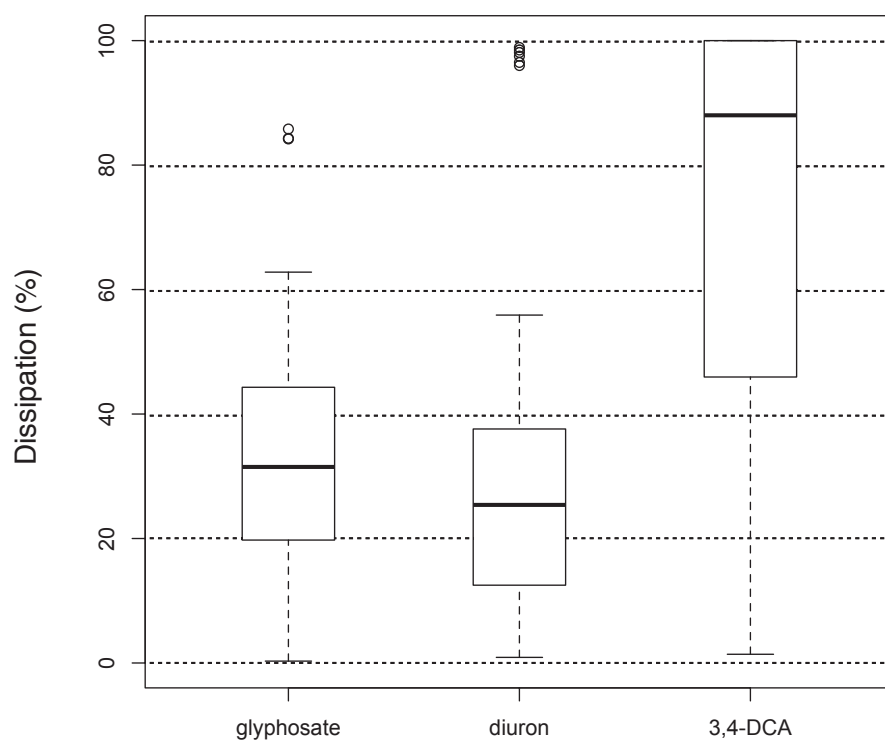


Figure III.12 : Performances de dissipation des isolats (vue globale).

Le diagramme en boîtes et moustaches représente la répartition des performances de dissipation des 209 colonies isolées en RISA-RFLP en termes de quartiles, pour chaque polluant. Le trait en gras représente la médiane.

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

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

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

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

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

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

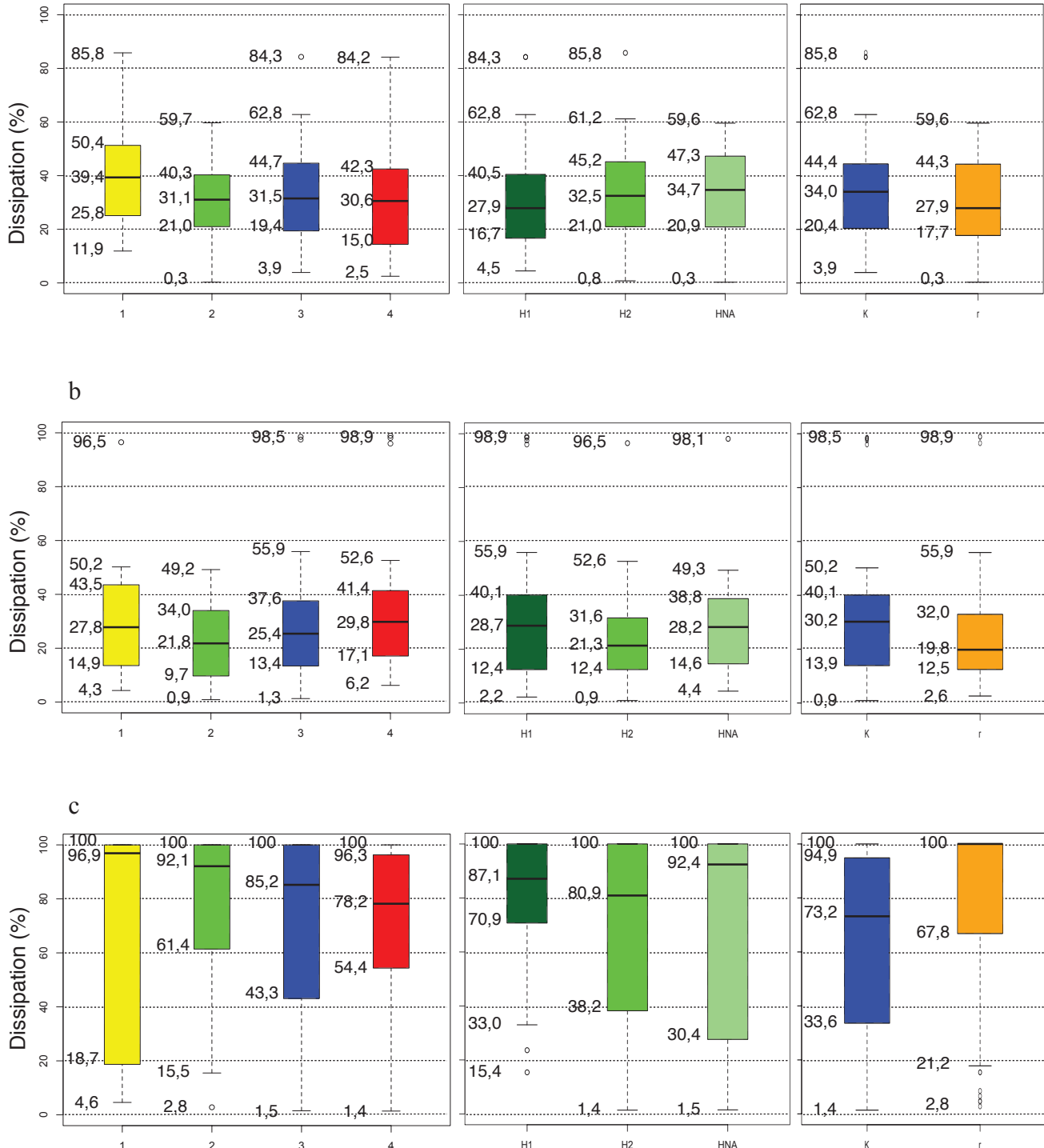


Figure III.13 : Performances de dissipation des isolats (vue détaillée).

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

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

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

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

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

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

* Vitesse de dissipation pour la présente étude.

Tableau III.6 : Performances de dégradation du diuron.

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

* Vitesse de dissipation pour la présente étude.

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

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

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

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

* Vitesse de dissipation pour la présente étude.

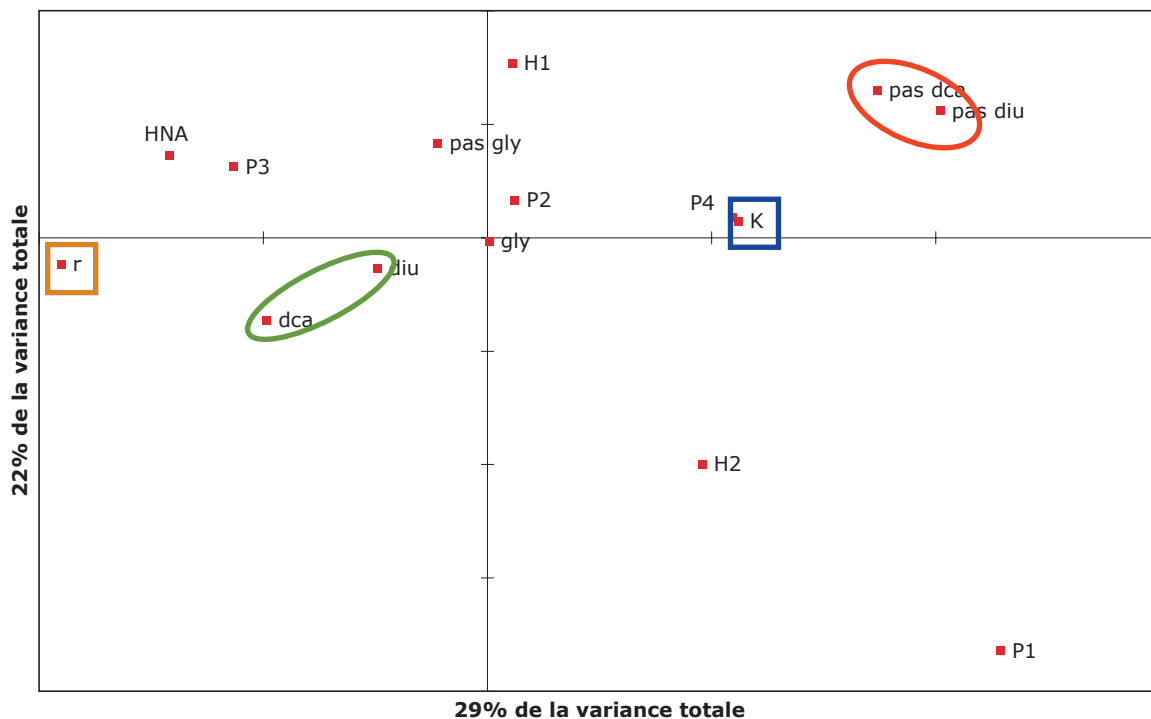


Figure III.14 : Corrélations entre caractéristiques géographiques et fonctionnelles des isolats.

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

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

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

2.3.2. Choix d'un consortium

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

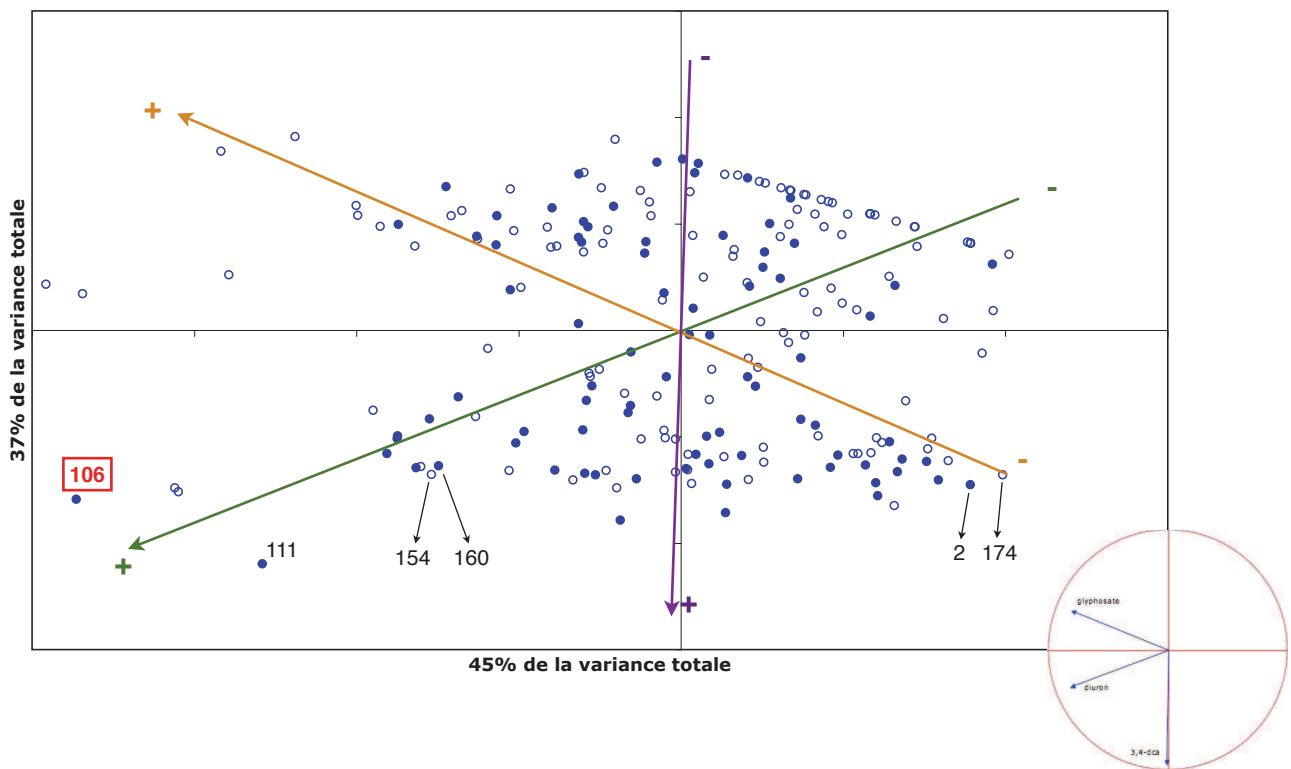


Figure III.15 : Choix du consortium pour la bioaugmentation.

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

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

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

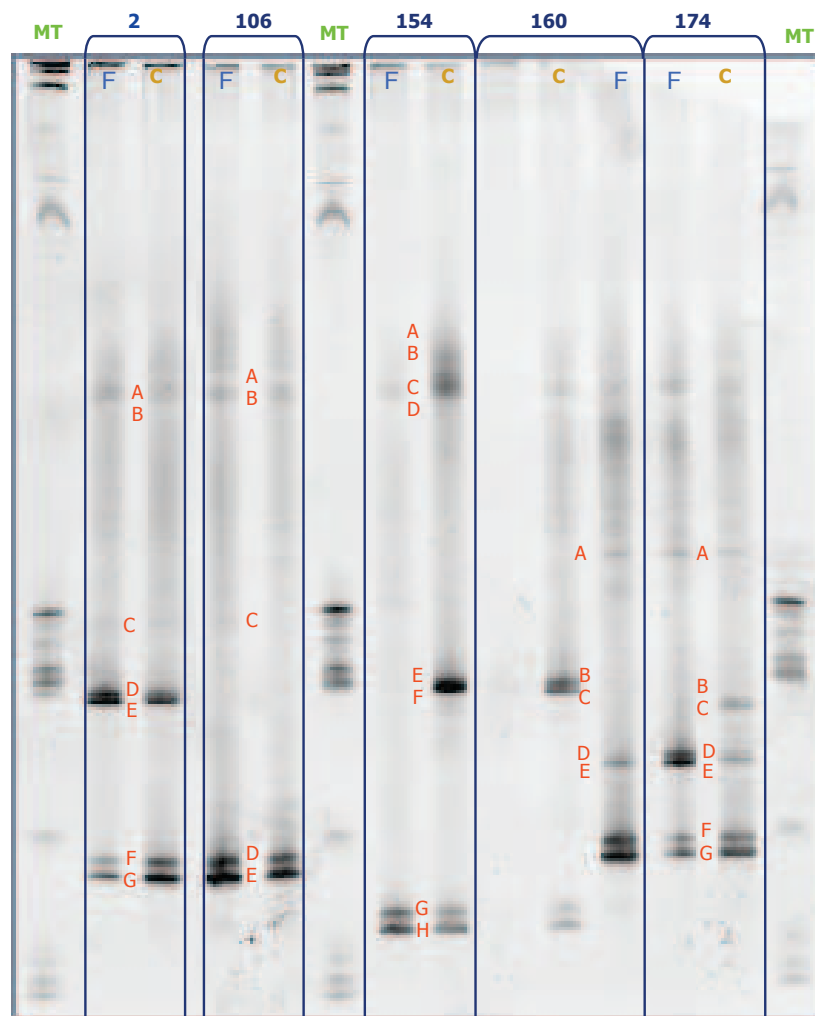


Figure III.16 : Stabilité des consortia après cryogénéisation.

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

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

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

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

d'après Farhan 2009. Le nombre de différences exprime le nombre de nucléotides différents par rapport à la séquence de référence, renseignée sous le numéro d'accèsion indiqué.

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

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

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

PARTIE III
CHAPITRE 3

-

EXPERIENCES en
LOGETTES

RESULTATS et DISCUSSION : CHAPITRE 3

Expériences en logettes

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

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

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

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

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

3.1. Résultats

3.1.1. Récapitulatif des expériences et des analyses associées

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

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

SC : semi-continu ; I : inoculé ; NI : non-inoculé ; P : planté ; NP : non-planté.

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

Tableau III.10 : Détail des conditions expérimentales.

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

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

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

	pH	Eh	Humidité	Population	Plantes	Volumétrie	[polluant]	
							eau	sédiment
I	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗
II	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓
III	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓
IV	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
V	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VI	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

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

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

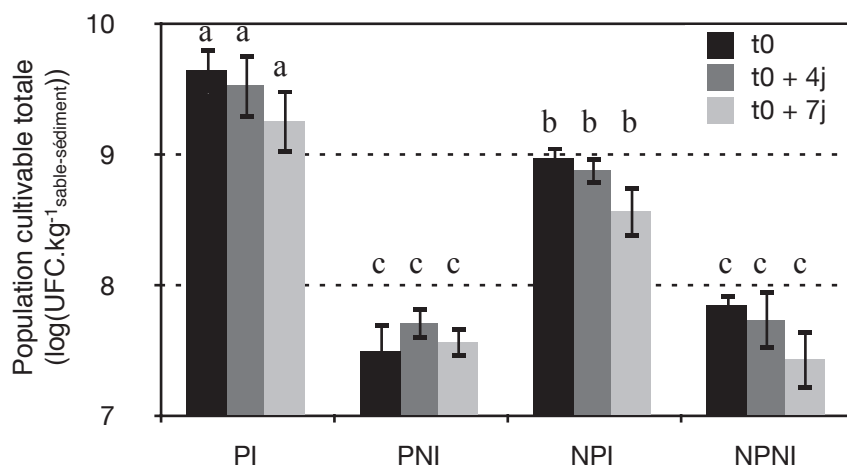


Figure III.17 : Population cultivable totale dans le sol (Expérience I).

PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée non inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les lettres correspondent aux groupes de similitude déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). Les barres d'erreurs représentent les erreurs-types.

3.1.3. Expériences à faibles concentrations en polluants

Expérience II

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

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

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

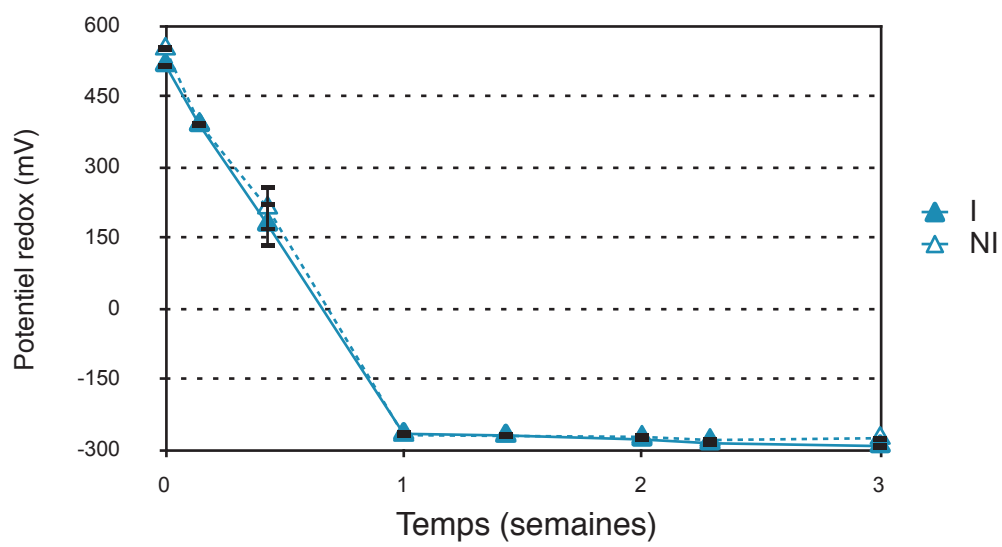


Figure III.18 : Evolution du potentiel redox (Expérience II).

I : modalité inoculée, NI : modalité non inoculée. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

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

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

Expérience III

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

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

Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les groupes de similitude indiqués entre parenthèses sont déterminés pour chaque polluant, par ANOVA ($P < 0,05$). L'intervalle est celui donné par les erreurs-types.

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

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

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

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

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

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

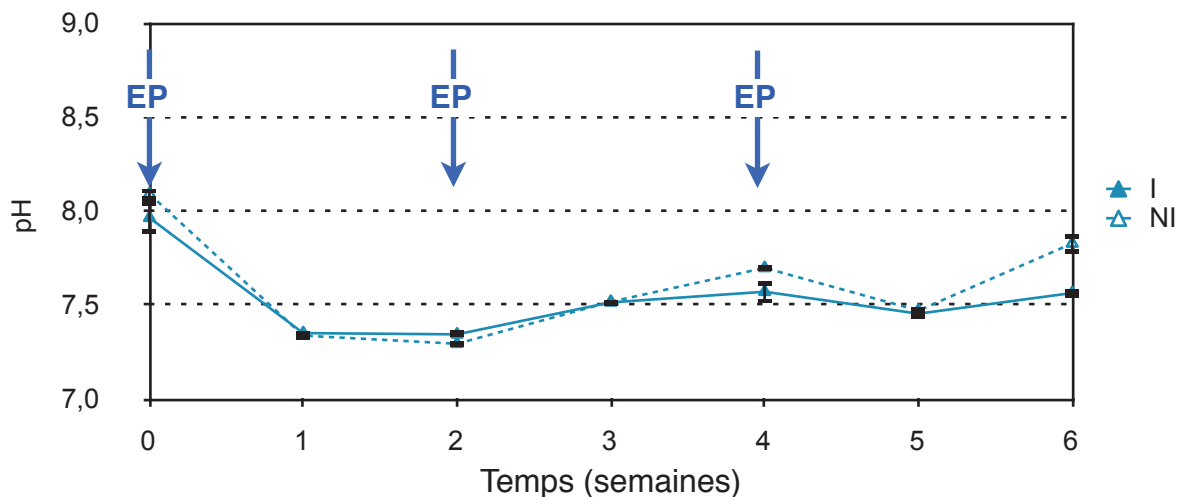


Figure III.19 : Evolution du pH de la solution de sol (Expérience III).

I : modalité inoculée, NI : modalité non-inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

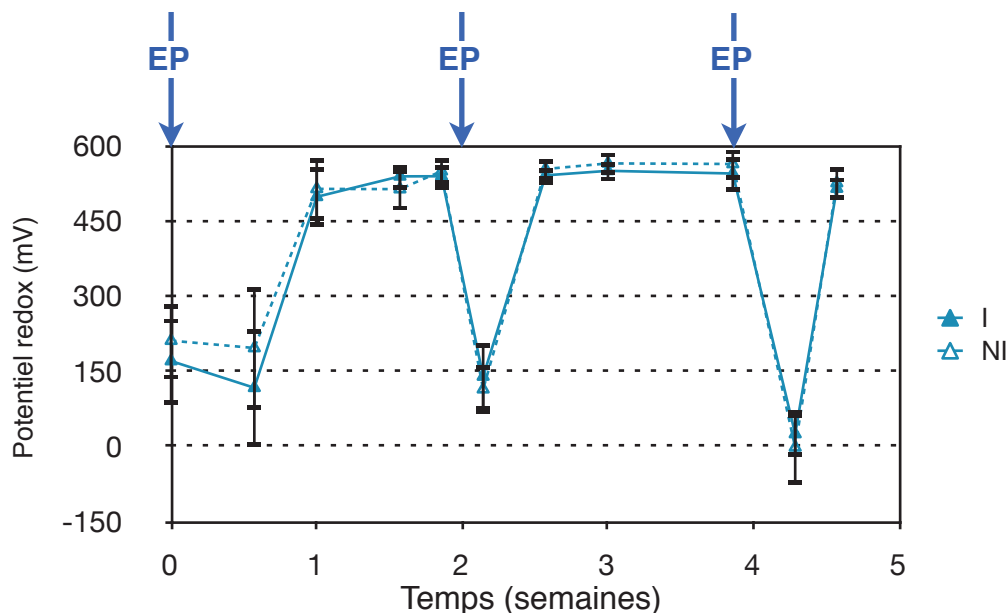


Figure III.20 : Evolution du potentiel redox (Expérience III).

I : modalité inoculée, NI : modalité non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 0, t = 2 et t = 4. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

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

L'humidité est exprimée en %. Les groupes de similitude indiqués entre parenthèses sont déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). L'intervalle est celui donné par les erreurs-types.

	t ₀	t ₀ + 1 semaine	t ₀ + 3 semaines	t ₀ + 5 semaines
I	7,6 ± 0,3 (a)	6,4 ± 0,5 (b)	1,8 ± 0,5 (c)	0,8 ± 0,0 (d)
NI	7,6 ± 0,3 (a)	6,9 ± 0,3 (b)	2,3 ± 0,2 (c)	0,8 ± 0,1 (d)

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

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

3.1.4. Expériences à fortes concentrations en polluants

Expérience IV

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

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

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

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

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

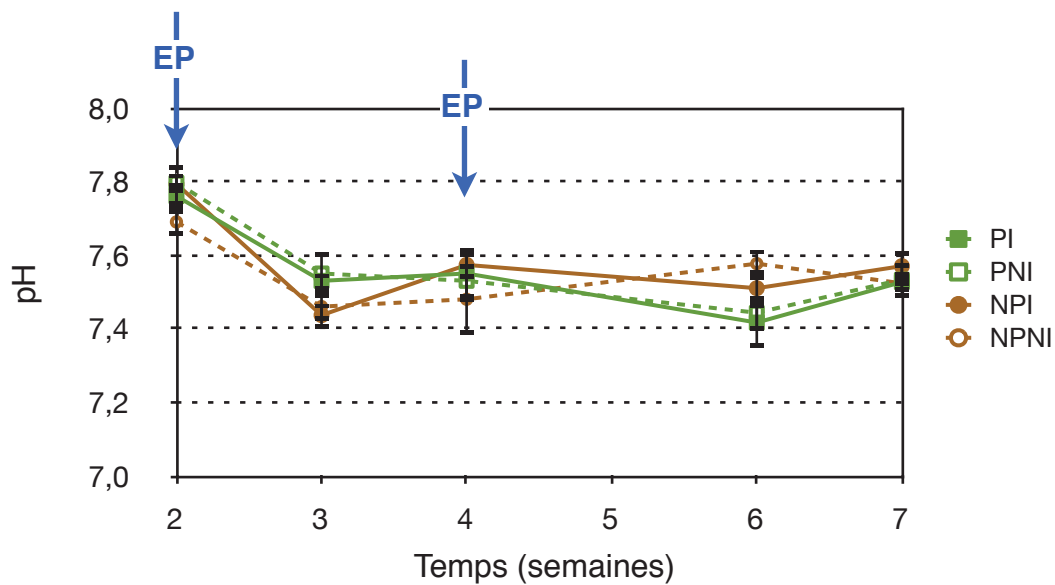


Figure III.21 : Evolution du pH de la solution de sol (Expérience IV).

En abscisses figure le temps en semaines, en ordonnées les valeurs de pH. PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée non inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps $t = 0$, $t = 2$ et $t = 4$. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

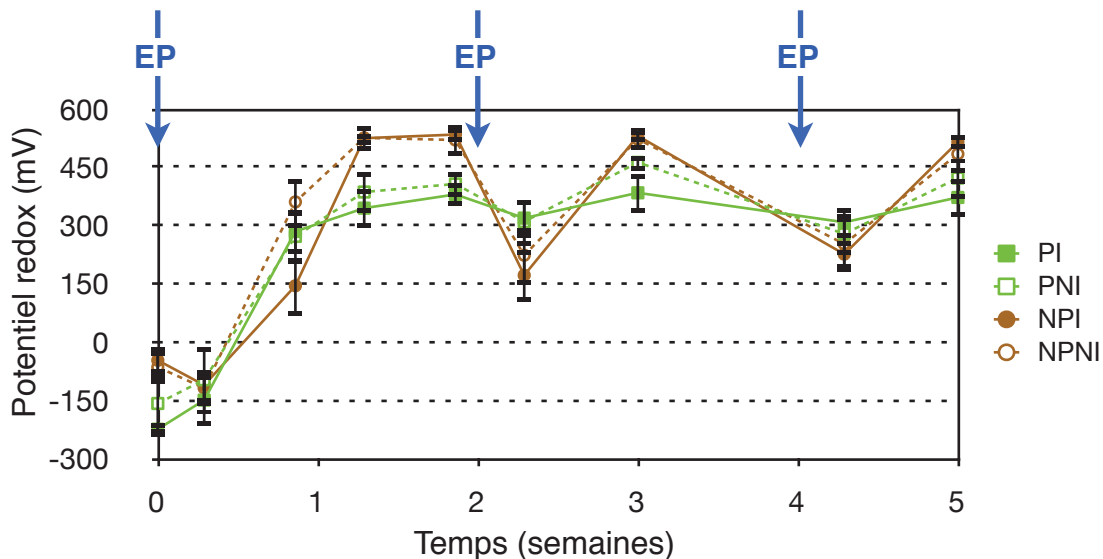


Figure III.22 : Evolution du potentiel redox (Expérience IV).

PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée non inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps $t = 0$, $t = 2$ et $t = 4$. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

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

L'humidité est exprimée en %. Les groupes de similitude indiqués entre parenthèses sont déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). L'intervalle est celui donné par les erreurs-types.

	$t_0 + 4$ semaines	$t_0 + 6$ semaines
PI	$5,8 \pm 0,4$ (a)	$2,0 \pm 0,5$ (a)
PNI	$7,1 \pm 0,9$ (a)	$1,1 \pm 1,1$ (a)
NPI	$2,6 \pm 0,2$ (b)	$1,9 \pm 1,5$ (a)
NPNI	$2,4 \pm 0,7$ (b)	$0,7 \pm 0,4$ (a)

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

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

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

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

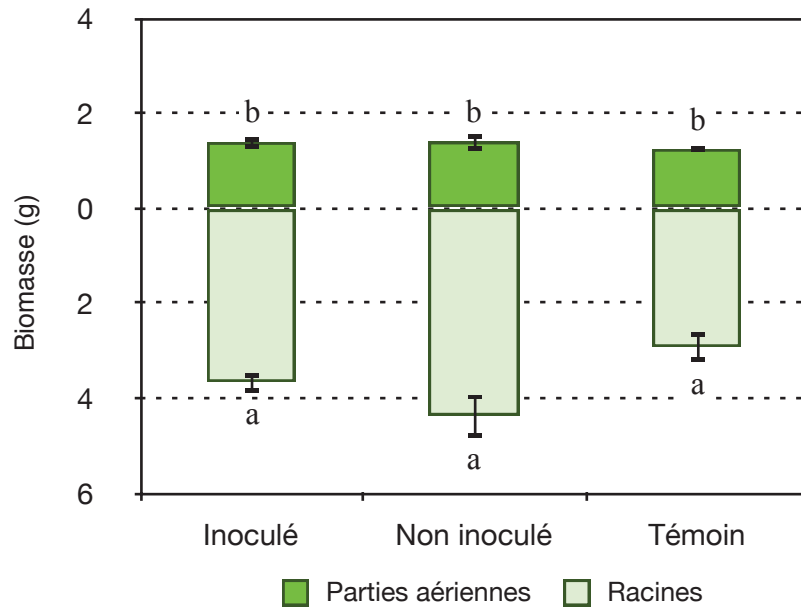


Figure III.23 : Biomasse totale récoltée à la fin de l'expérience (Expérience IV).

En ordonnées figure la biomasse en g. Les groupes de similitude sont déterminés par ANOVA ($P < 0,05$). Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

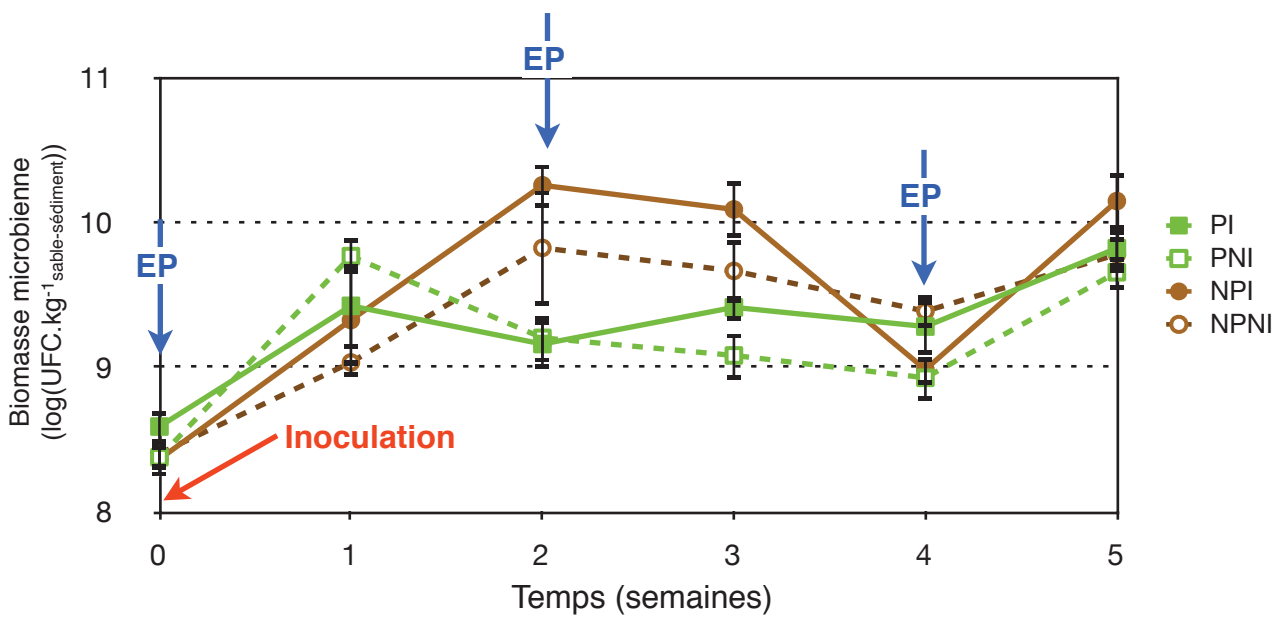


Figure III.24 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience IV).

PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps $t = 0$, $t = 2$ et $t = 4$. La population en $t = 0$ a été évaluée après l'évènement pluvieux. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

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

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

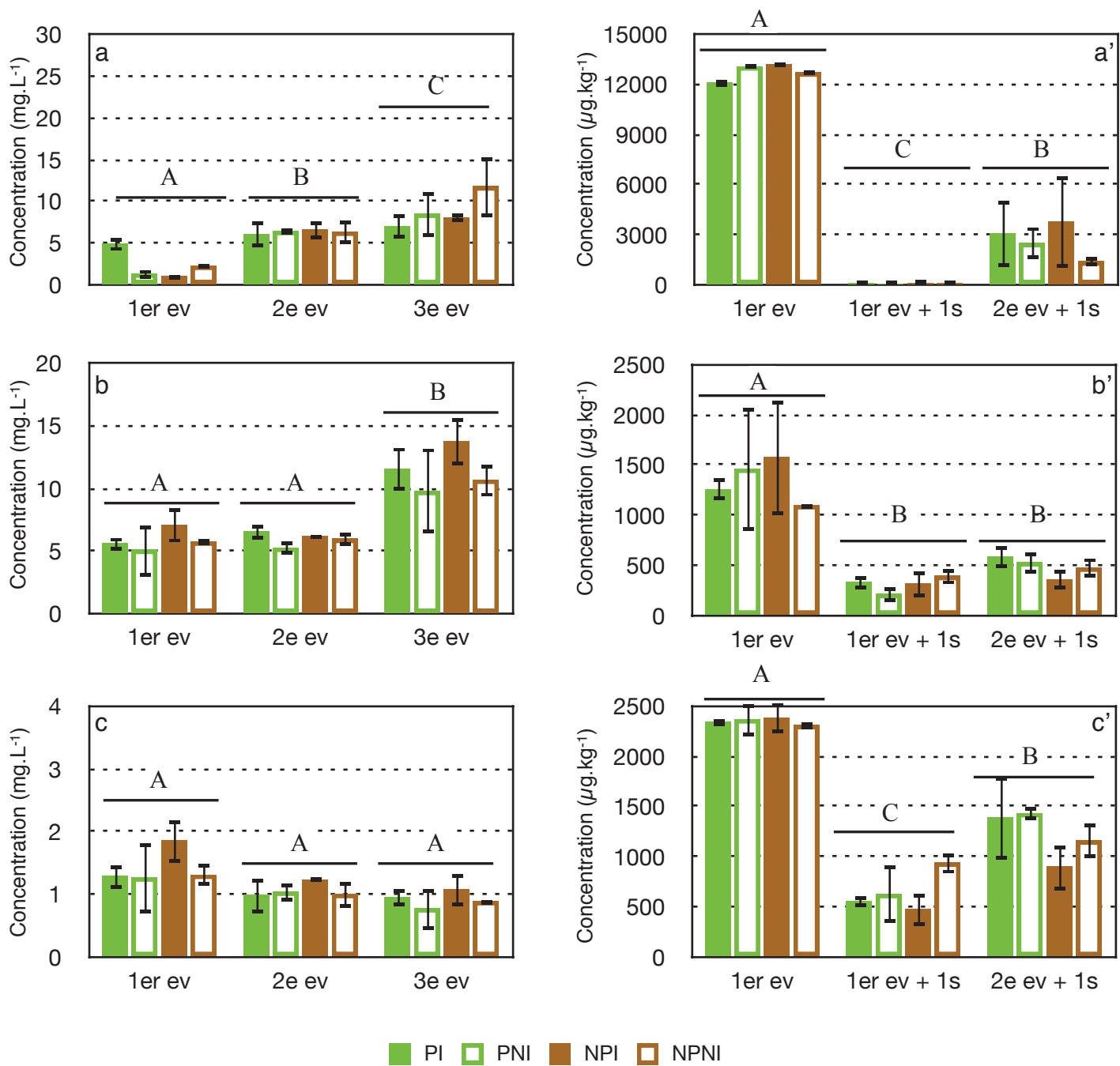


Figure III.25 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience IV).

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

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

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

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

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

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

Expérience V

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

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

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

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

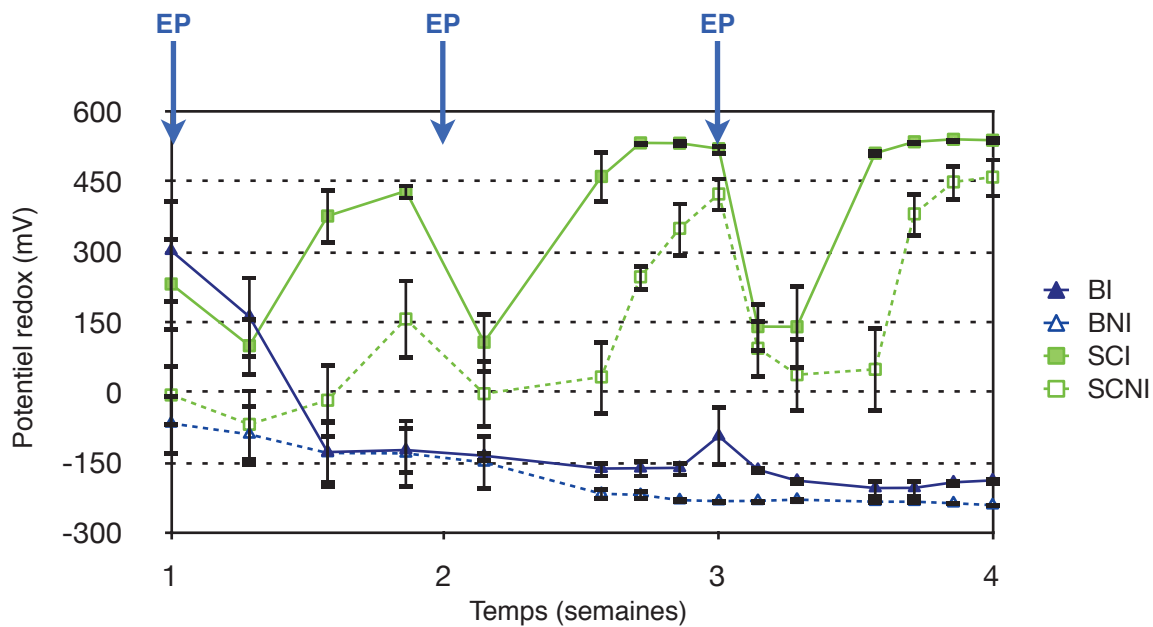


Figure III.26 : Evolution du potentiel redox (Expérience V).

Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps $t = 1$, $t = 2$ et $t = 3$. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

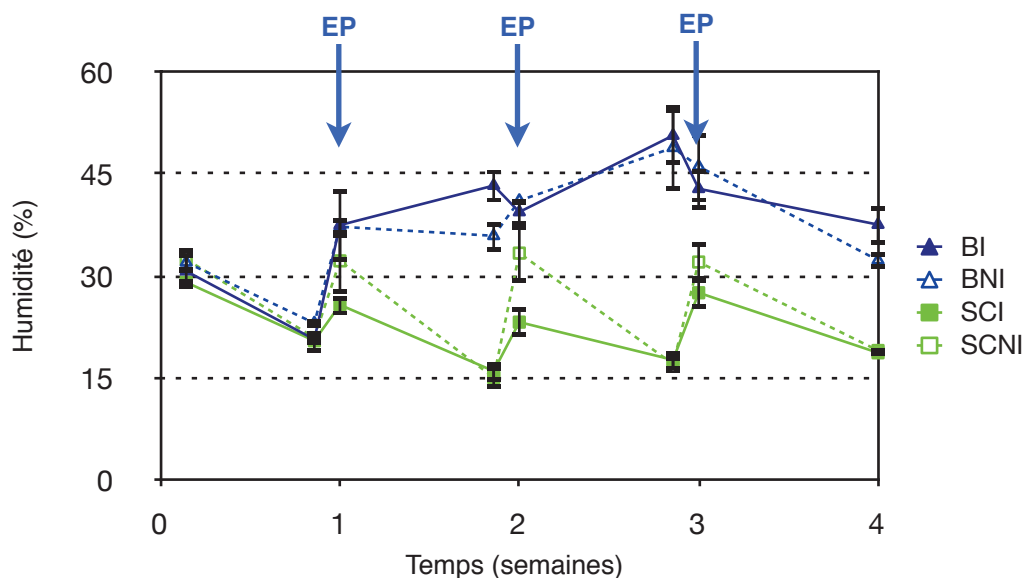


Figure III.27 : Evolution de l'humidité (Expérience V).

B : modalité batch, SC : modalité semi-continue ; I : modalité inoculée, NI : modalité non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps $t = 1$, $t = 2$ et $t = 3$. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

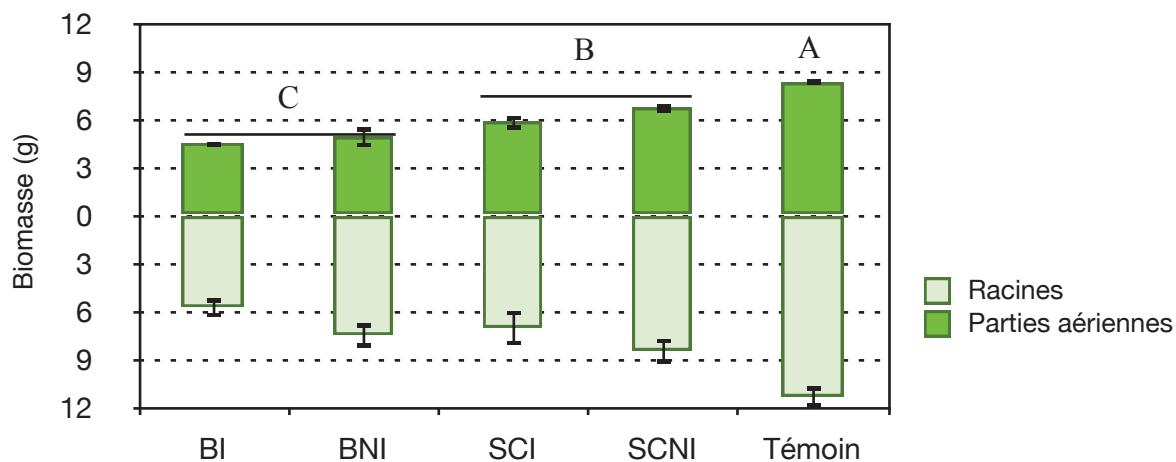


Figure III.28 : Biomasse végétale fraîche récoltée à la fin de l'expérience (Expérience V).

BI : modalité batch inoculée, BNI : modalité batch non-inoculée, SCI : modalité semi-continue inoculée, SCNI : modalité semi-continue non-inoculée. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

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

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

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

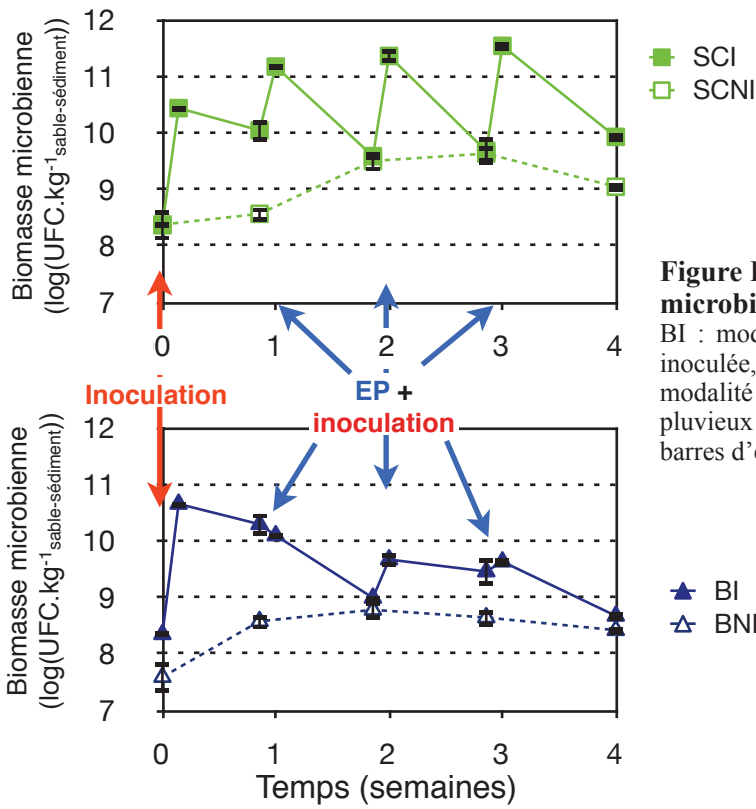


Figure III.29 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience V).

BI : modalité batch inoculée, BNI : modalité batch non inoculée, CI : modalité semi-continue inoculée, CNI : modalité semi-continue non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1, t = 2 et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

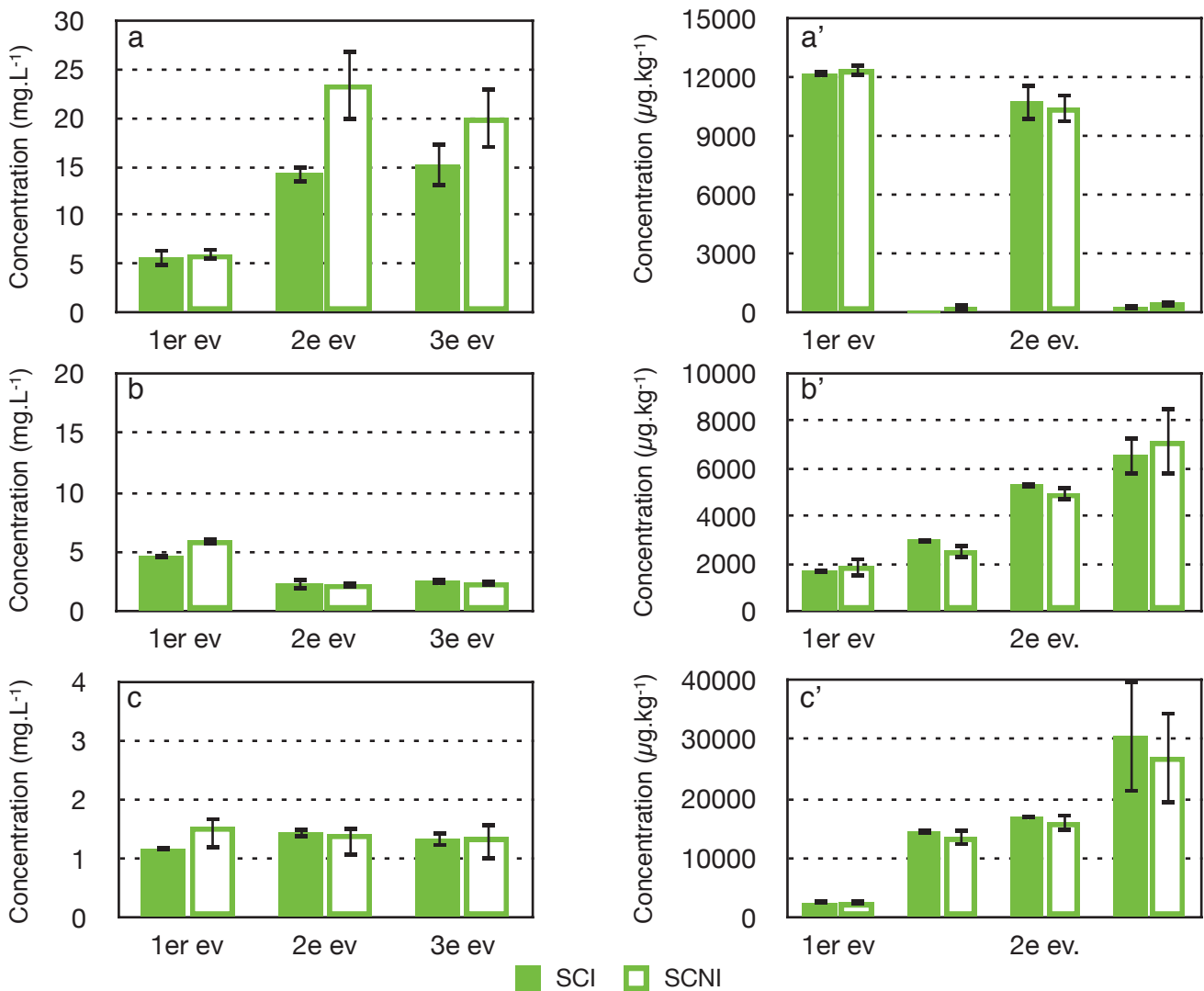


Figure III.30 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience V).

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

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

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

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

Expérience VI

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

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

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

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

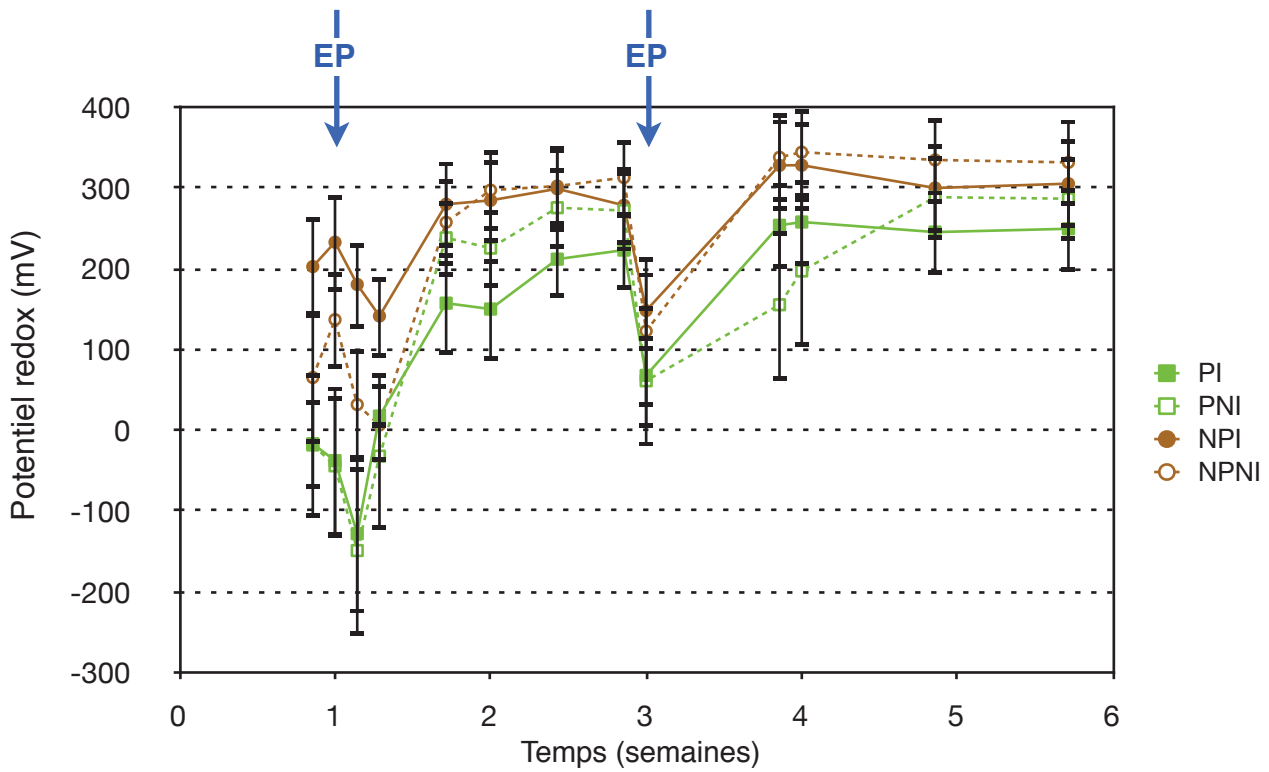


Figure III.31 : Evolution du potentiel redox (Expérience VI).

Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1 et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

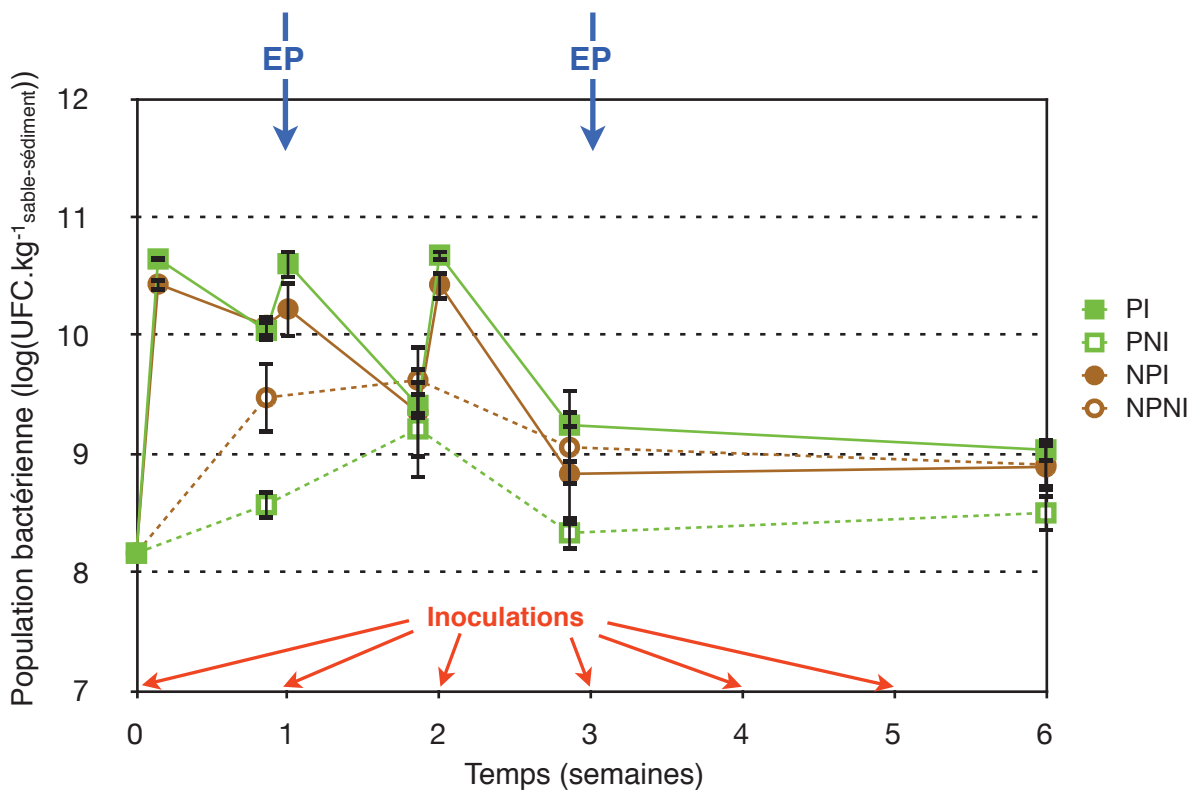


Figure III.32 : Evolution de la biomasse microbienne totale (Expérience VI).

PI : modalité plantée inoculée, PNI : modalité plantée inoculée, NPI : modalité non plantée inoculée, NPNI : modalité non plantée non inoculée. Les évènements pluvieux (EP) ont lieu aux temps t = 1, et t = 3. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types.

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

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

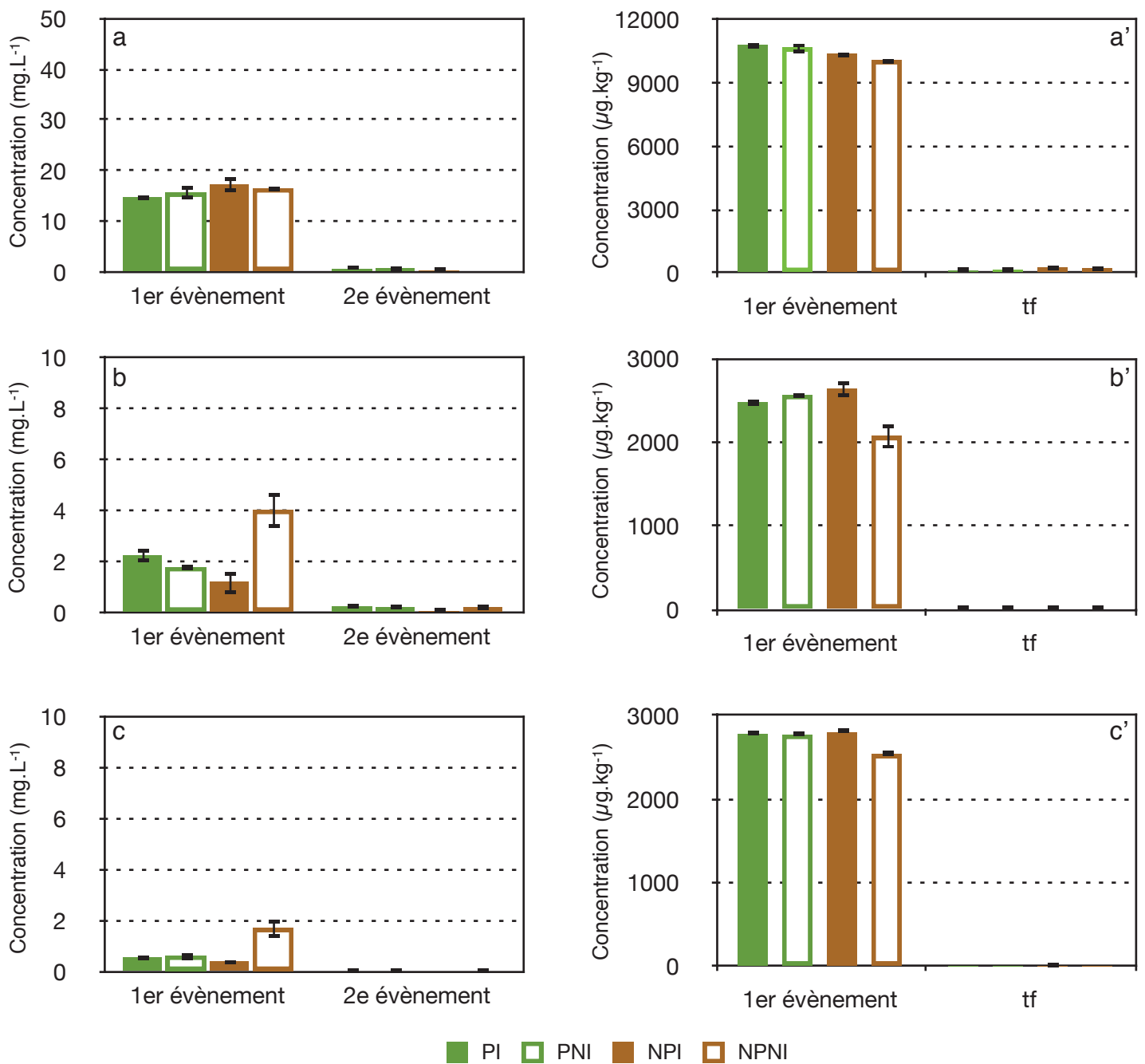


Figure III.33 : Evolution de la concentration en polluants dans l'eau et dans le mélange sable-sédiment (Expérience VI).

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

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

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

3.2. Fonctionnement du système

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

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

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

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

3.2.1. Paramètres physico-chimiques

pH

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

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

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

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

Eh

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

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

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

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

Humidité

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

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

3.2.2. Paramètres biologiques

Végétation

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

Microorganismes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3. Efficacité du procédé

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

3.3.1. Évolution des teneurs en polluants dans les effluents

Le phénomène de sorption s'opère en quelques heures alors que la biodégradation prend une semaine ou plus au vu des différentes expériences. L'efficacité de la rétention des polluants ne peut donc être évaluée en toute rigueur qu'à l'issue du premier événement pluvieux, c'est à dire après 4h ou 6h de présence des polluants dans le mélange sable-sédiment. Le seul phénomène contrôlant la quantité de polluants dans l'effluent est alors la capacité de sorption du système. Lors des événements suivants, la quantité de polluants dans l'effluent dépend à la fois de

la capacité et de la vitesse de sorption du mélange sable-sédiment à la suite des différents apports de polluants lors des événements successifs, tout en déduisant les autres phénomènes inclus dans le terme générique de dissipation. Le terme d'abattement, prenant en compte des phénomènes physiques et biologiques, sera alors employé.

De très bons abattements sont observés au bout d'une semaine (tableau III.17) dans le système batch à des concentrations de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$, sans différence significative pour le glyphosate entre les modalités inoculées ou non. Les différences obtenues ne permettent cependant pas de conclure à un effet marqué de la bioaugmentation car les différences restent ténues, qu'elles soient significatives ou non. Aux fortes concentrations (tableau III.18), l'efficacité moyenne du filtre lors des expériences IV et V est de $(90,8 \pm 4,5)\%$ pour le glyphosate, $(47,8 \pm 5,7)\%$ pour le diuron et $(86,8 \pm 1,6)\%$ pour le 3,4-DCA (moyenne effectuée sur toutes les modalités et sur les deux expériences). L'efficacité augmente avec la capacité de sorption des molécules, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors de la sélection de matériaux sorbants. Les résultats pour le diuron sont comparables à ceux obtenus par Gonzales-Pradas et coll. (1998). En ajoutant de la tourbe à un sol calcaire, l'efficacité de sorption passe de 14,3% à 64,3%, pour une concentration initiale de 14mg.L^{-1} . Landry et coll. (2004) après application d'une dose de $3,6\text{kg.ha}^{-1}$ de diuron ont eux trouvé une capacité de rétention de 96,8%, 88,2% et 81,2% sur 3 sols viticoles après 845mm de pluie en 5 jours. Enfin Margoum et coll. (2006) indiquent un abattement de l'ordre de 30% pour un sédiment. L'efficacité du système pour la rétention du diuron est donc bonne sans être excellente. Une efficacité de 99,9% a été atteinte pour le glyphosate par Landry et coll. (2005) dans un sol. Une autre étude réalisée par Mamy et coll. (2005) montre une efficacité de sorption de 80% pour du glyphosate dans trois sols à une concentration initiale de 5mg.L^{-1} . L'efficacité du système pour le glyphosate est donc en accord avec les valeurs de la littérature. Pour le 3,4-DCA, une étude de Flores-Cespedes et coll. (2006) mentionne une efficacité de sorption de 85% sur un sol calcaire pour une concentration initiale de 10mg.L^{-1} . Les valeurs que nous avons trouvées sont donc en accord avec la littérature. L'abattement du glyphosate et du 3,4-DCA reste important au cours des 3 événements lors de l'expérience IV mais diminue pour le glyphosate lors de l'expérience V. Au contraire

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

Les abattements sont calculés au bout d'une semaine. Les encadrements indiqués sont les écarts-types. Les lettres entre parenthèses indiquent les groupes de similitude ($P < 0,05$) déterminés par ANOVA.

	inoculé	non inoculé
glyphosate	99,6 ± 0,0 % (a)	99,2 ± 0,2 % (a)
diuron	90,1 ± 1,3 % (b)	93,5 ± 0,6 % (a)
3,4-DCA	99,5 ± 0,1 % (a)	99,2 ± 0,1% (b)

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

Seuls les abattements des modalités plantées en régime semi-continu sont indiqués. Pour les expériences IV, V et le 1^{er} évènement de l'expérience VI, les abattements sont calculés pour chaque évènement. Pour l'expérience VI, l'abattement pour le 2^{ème} évènement est calculé en prenant en compte la quantité apportée au premier évènement. PI : planté inoculé ; NPI : non planté inoculé ; PNI : planté non inoculé ; NPNI : non planté non inoculé. Les encadrements indiqués sont les écarts-types. Les valeurs en gras correspondant à l'efficacité de sorption du filtre (cf. texte pour plus de précisions).

		IV		V		VI	
		I	NI	I	NI	PI, NPI, PNI	NPNI
glyphosate	1^{er} évènement	90,1 ± 3,0%	97,3 ± 2,1%	88,8 ± 3,1%	87,2 ± 2,1%	68,1 ± 4,3%	67,0 ± 1,4%
	2^e évènement	90,9 ± 5,1%	91,8 ± 3,4%	71,4 ± 3,5%	53,1 ± 12,9%	98,9 ± 0,7%	100,0 ± 0,0%
	3^e évènement	85,9 ± 4,9%	83,0 ± 9,4%	69,7 ± 7,9%	60,0 ± 10,9%	-	-
diuron	1^{er} évènement	46,3 ± 9,5%	51,3 ± 34,6%	53,3 ± 3,2%	40,4 ± 6,5%	83,7 ± 6,1%	63,6 ± 10,9%
	2^e évènement	69,2 ± 4,9%	74,5 ± 16,0%	77,2 ± 9,0%	77,3 ± 6,4%	98,5 ± 0,8%	98,0 ± 1,4%
	3^e évènement	-8,3 ± 27,6%	8,1 ± 54,7%	74,2 ± 7,0%	75,9 ± 6,7%	-	-
3,4-DCA	1^{er} évènement	87,1 ± 3,5%	87,3 ± 9,8%	88,3 ± 0,3%	84,6 ± 3,0%	95,2 ± 1,7%	84,2 ± 5,8%
	2^e évènement	95,6 ± 1,1%	96,2 ± 0,8%	85,6 ± 1,5%	85,9 ± 2,7%	99,9 ± 0,1%	99,8 ± 0,2%
	3^e évènement	90,5 ± 2,5%	92,2 ± 5,8%	86,6 ± 2,3%	86,4 ± 4,7%	-	-

l'abattement du diuron ne se maintient pas dans le temps. C'est le polluant le plus problématique quant à l'efficacité du filtre physique, en raison du risque de désorption. On constate cependant que l'augmentation du temps de rétention (de 4h pour l'expérience V à 6h pour l'expérience VI) permet d'améliorer sensiblement l'efficacité de rétention du système, dans le cas du diuron notamment (tableau III.18), ce qui est d'autant plus intéressant que ce dernier était le moins retenu par le système lors des expériences précédentes. On note de plus que l'abattement reste satisfaisant pour les trois polluants, tout en ayant oté la tourbe. On remarque cependant, toujours dans l'expérience VI, un léger relargage des polluants lors du second évènement pluvieux, chargé en cuivre uniquement ($< 0,5\text{mg.L}^{-1}$ pour le glyphosate, $< 0,3\text{mg.L}^{-1}$ pour le diuron et $< 0,04\text{mg.L}^{-1}$ pour le 3,4-DCA). En outre l'augmentation du temps de rétention entre l'expérience III (circulation en continu) et l'expérience IV (1h30 de remplissage, 4h de stockage et 2h de vidange) a permis d'atteindre des abattements similaires (50% pour le diuron, 80% pour le 3,4-DCA) alors que les concentrations initiales en polluants ont été multipliées par 25. L'ajout de betterave en aval des bacs, pour les modalités PNI, NPI et PNI de l'expérience VI, permet également d'améliorer l'abattement pour le diuron et le 3,4-DCA (tableau III.18), ce qui est logique puisque l'on rajoute une étape de filtration. En revanche la betterave n'a pas d'effet sur l'abattement du glyphosate, dont le niveau est inférieur à celui obtenu lors des expériences IV et V. Ceci s'explique par la présence du cuivre en plus grande quantité dans la solution de départ comparée aux expériences IV et V (56mg.L^{-1} contre $37,5\text{mg.L}^{-1}$) : le cuivre et le glyphosate sont en effet en compétition pour la sorption et la complexation sur certains sols (Maqueda et coll. 1998). Ces résultats ne concordent pas avec les tests de sorption que nous avons menés en milieu liquide mais les concentrations employées étant différentes, il est difficile de conclure. Il paraît en tout cas plus pertinent de retenir pour le glyphosate la configuration de l'expérience V, qui témoigne d'un bon fonctionnement du filtre physique, pour l'évaluation de la capacité de dissipation du système.

En combinant un temps de stockage de 6h et les matériaux sorbants sélectionnés lors de la première étape, on arrive donc à un abattement d'environ 91% pour le glyphosate, 64% pour le diuron et 87% pour le 3,4-DCA. Une fois que les polluants sont ainsi retenus dans le système, on peut s'intéresser à leur dissipation.

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

Lors de l'expérience IV on observe une diminution de la **concentration** de tous les polluants une semaine après le premier évènement pluvieux (figure III.28), puis une augmentation significative du glyphosate et du 3,4-DCA une semaine après le second évènement. La présence de la tourbe nous empêchant de conclure, nous avons renouvelé l'expérience sans tourbe autour des plantes et avec un temps d'action réduit (une semaine) pour évaluer l'efficacité du procédé dans un temps relativement court. Les résultats sont contrastés, avec une concentration en glyphosate faible en fin d'expérience (figure III.30) et des concentrations en diuron et 3,4-DCA au contraire très élevées, qui témoignent sans doute à la fois d'un problème d'échantillonnage – probablement dû à une répartition non homogène de la molécule dans le mélange sable-sédiment ce qui peut engendrer des erreurs si l'échantillonnage n'est pas fait sur le mélange homogénéisé – et de l'accumulation des polluants dans la matrice solide. Ces concentrations n'en restent pas moins très élevées, représentant ainsi la quasi-totalité du diuron apporté et environ trois fois la quantité de 3,4-DCA. Ce résultat montre qu'une semaine est un temps trop court pour que les microorganismes puissent agir même si on réinocule régulièrement, toutes les semaines dans cette expérience, contre une fois au début de l'expérience IV. Ce phénomène de temps de traitement nécessaire dans les ZHA est déjà connu : ainsi après 11 semaines de traitement, Newcombe et Crowley (1999) obtiennent 72% de dégradation de 100mg.kg⁻¹ d'atrazine en faisant 8 inoculations, et 38% en en faisant 4. Dans une étude d'Haarstad et Braskerud (2005), 96% de dégradation des herbicides propachlor, linuron et metamitron, et des fongicides propiconazole, fenpropimorph, metribuzin et metalaxyl est obtenu au bout d'un an de traitement. Pour Anderson et coll. (2002), 70-80% de dégradation est obtenu en un mois pour de l'atrazine. Enfin, Runes et coll. (2001) obtiennent 100% de dégradation de l'atrazine en 30 jours. Il semble donc impossible d'obtenir la dégradation d'une telle dose de pesticides en si peu de temps, même avec l'aide d'un inoculum massif. Lors de l'expérience VI la tourbe a été ôtée mais 5 semaines ont été laissées au système pour agir. Après vidange, la concentration initiale en glyphosate ($\approx 10\text{mg.kg}^{-1}$) est inférieure à celles observées lors des expériences précédentes ($\approx 12,5\text{mg.kg}^{-1}$ pour l'expérience IV et $\approx 12\text{mg.kg}^{-1}$ pour l'expérience

V), cela étant dû à la présence du cuivre en plus grande quantité (cf. ci-dessus). Pour le diuron, cette concentration est de 2mg.kg^{-1} ce qui est supérieur aux expériences précédentes ($\approx 1,3\text{mg.kg}^{-1}$ pour l'expérience IV et $\approx 1,8\text{mg.kg}^{-1}$ pour l'expérience V) tandis que pour le 3,4-DCA, cette concentration est de $2,5\text{mg.kg}^{-1}$ ce qui est légèrement supérieur aux expériences précédentes ($\approx 2,3\text{mg.kg}^{-1}$ pour l'expérience IV et $\approx 2,4\text{mg.kg}^{-1}$ pour l'expérience V). Pour les trois polluants on observe une baisse sensible de la concentration en fin d'expérience (figure III. 33), on peut donc en conclure qu'il y a dissipation de ces polluants dans notre système, sans toutefois que l'effet de la bioaugmentation soit significatif.

Dissipation des polluants : le récapitulatif des abattements dans le mélange sable-sédiment est présenté dans le tableau III.19. Pour l'expérience IV, il est calculé à partir de la concentration dans le mélange sable-sédiment une semaine après le second événement pluvieux. Pour les expériences V et VI, il est calculé à partir de la valeur finale de la concentration dans le mélange sable-sédiment (1 semaine après le dernier apport d'eau dans le cas de l'expérience V, 3 semaines après le dernier apport d'eau dans le cas de l'expérience VI). La dissipation obtenue dans l'expérience IV est bonne pour tous les polluants, mais l'effet de la tourbe pourrait influencer sur le résultat, de manière marginale probablement puisque la quantité de tourbe rapportée à la quantité du mélange sable-sédiment est très faible et que les polluants n'ont pas été plus en contact avec ce matériau qu'avec le sable-sédiment. Dans l'expérience V, l'emploi d'un temps d'action très court se traduit par des effets contrastés : très bonne dissipation du glyphosate mais résultats médiocres pour le diuron et le 3,4-DCA. Les valeurs de dissipation pour ces deux polluants redeviennent acceptables dans l'expérience VI. L'effet traitement est peu visible : la bioaugmentation, qu'elle soit faite uniquement en début d'expérience (expérience IV) ou renouvelée toutes les semaines (expériences V et VI) ne produit donc pas d'effet significatif. Ceci peut s'expliquer par le fait que la microflore du mélange sable-sédiment est probablement bien adaptée aux polluants ; en effet le sédiment du mélange étant issu du BO, il a été exposé aux polluants. C'est également le matériau dont nous sommes partis pour la sélection de souches : il contient donc les espèces bactériennes composant le consortium 106 bien qu'elles y soient en plus faible proportion. La diminution de la quantité dissipée après le 2^{ème} événement pour tous les polluants pourrait être due à l'accumulation des polluants et à l'absence d'une dissipation

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

Seuls les abattements des modalités en régime semi-continu sont indiqués. Pour l'expérience IV, l'abattement est calculé entre le temps initial et une semaine après le 2^{ème} évènement. Pour les expériences V et VI, l'abattement est calculé entre le temps initial et le temps final. PI : planté inoculé ; NPI : non planté inoculé ; PNI : planté non inoculé ; NPNI : non planté non inoculé. Les encadrements indiqués sont les écarts-types. La manière de les calculer est indiquée dans le texte.

		Expérience		
		IV	V	VI
glyphosate	PI	87,7 ± 13,6%	99,3 ± 0,5%	99,8 ± 0,0%
	NPI	85,1 ± 18,9%	-	99,6 ± 0,2%
	PNI	90,2 ± 6,5%	98,6 ± 1,0%	99,8 ± 0,0%
	NPNI	94,4 ± 1,7%	-	99,6 ± 0,1%
diuron	PI	81,4 ± 6,3%	2,2 ± 23%	65,8 ± 6,7%
	NPI	88,2 ± 9,5%	-	64,5 ± 4,4%
	PNI	83,3 ± 6,1%	-1,0 ± 38%	63,0 ± 8,8%
	NPNI	84,0 ± 4,6%	-	63,2 ± 7,7%
3,4-DCA	PI	71,5 ± 14,8%	-305 ± 180%	84,2 ± 0,0%
	NPI	81,5 ± 9,0%	-	83,7 ± 0,9%
	PNI	70,7 ± 0,6%	-252 ± 155%	84,2 ± 0,0%
	NPNI	76,1 ± 5,6%	-	84,2 ± 0,0%

suffisante (expériences IV et V). En revanche l'influence du temps d'action sur la dissipation est indéniable, ce qui se voit notamment sur la dissipation du 3,4-DCA, supérieure dans l'expérience VI à celle obtenue dans l'expérience IV, pour laquelle le temps d'action maximum était de 3 semaines. Notons que ce temps d'action permet au système d'être plus longtemps oxydant et qu'il donne ainsi plus de temps à une dissipation efficace de la part des microorganismes présents dans le mélange sable-sédiment.

Synthèse : d'un point de vue physico-chimique, la stabilité du pH observée dans le système fait que ce paramètre n'a pas d'influence sur le système. La forte variation du potentiel redox qui est observée est due aux divers événements pluvieux reproduisant en cela les ZHA réelles. L'effet stabilisateur de *P. australis* sur le potentiel d'oxydoréduction est également confirmé dans cette étude mais entraîne curieusement une baisse du potentiel redox, comparé aux modalités non plantées, probablement en raison d'un maintien de l'humidité au niveau des racines dont l'effet sur la baisse d'Eh n'est pas contrebalancé par l'apport d'oxygène racinaire ; ceci pourrait être dû à la non-saturation du milieu qui rend négligeable l'effet de l'oxygène dégagé par les racines. D'un point de vue biologique, les plantes n'ont pas d'effet significatif sur la population bactérienne cultivable totale au sein des microcosmes. De plus, la hausse de population entraînée par les inoculations successives ne se maintient pas, en général, dans les différentes expériences : la diminution de population totale constatée pourrait provenir d'une compétition interspécifique (sans que cela ait été prouvé), ou d'une quantité limitée de nutriment, le rapport C/N du mélange étant adapté à la croissance microbienne. Le temps de stockage est un paramètre important pour le rôle de filtre physique des microcosmes, le passage de ce temps de 4 à 6 h permettant d'augmenter l'abattement du diuron dans les eaux de sortie de 10%. La dissipation des polluants constatée dans les microcosmes n'est pas due à la bioaugmentation (amélioration non significative de la dissipation dans le cas de modalités inoculées) mais est significativement influencée par le temps d'action dans le cas du diuron et du 3,4-DCA. On constate dans le meilleur des cas une dissipation dans le mélange du sable-sédiment de 99% pour le glyphosate, 84% pour le 3,4-DCA et 65% pour le diuron.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Le traitement des sédiments des bassins versants viticoles stockés dans les bassins d'orage (BO) et des eaux qui y transitent devrait être une obligation réglementaire. En effet, l'atténuation naturelle variable qui s'opère au sein de ces ouvrages hydrauliques se traduit par des valeurs de concentration dans les eaux de sortie régulièrement au-dessus des seuils réglementaires. Le temps de rétention des contaminants dans le BO, souvent inférieur au temps nécessaire aux organismes vivants, dont la composante microbienne, pour traiter la pollution explique le manque d'efficacité souvent observée. Par ailleurs, les organismes présents ne sont pas toujours très efficaces face à la pollution rencontrée. Différentes techniques de traitement existent, dont des techniques biologiques telle que la bioaugmentation qui, associée à la présence de plantes, pourrait contribuer à stimuler et entretenir l'action des microorganismes introduits dans des environnements en constante évolution. La bioaugmentation repose sur l'utilisation de microorganismes compétents parfois absents des milieux à traiter, ou dont l'abondance est trop faible.

Dans le cas du bassin versant viticole auquel nous faisons référence (Rouffach, Haut-Rhin), la pollution est multiple car constituée à la fois de produits organiques et de produits contenant des éléments traces métalliques, en particulier du sulfate de cuivre, épandus lors des traitements phytopharmaceutiques. De plus la diversité physico-chimique des produits employés est grande, ce qui augmente la difficulté du traitement, un seul microorganisme pouvant rarement dégrader plusieurs classes de produits organiques et de surcroît contribuer à faciliter la phytoextraction des métaux du sol. Enfin, l'environnement dans lequel doit être réalisée la dépollution n'est pas idéal (milieu plutôt oligotrophe, conditions physico-chimiques variables). Les verrous que ce travail avait pour ambition de lever étaient donc multiples :

- d'une part assurer un temps de rétention des contaminants dans le le BO compatible avec un traitement biologique de la pollution ;

- d'autre part traiter une pollution multiple, à base de deux herbicides de propriétés physico-chimiques différentes (le glyphosate et le diuron), d'un de leur métabolite de dégradation (3,4-DCA) et d'un métal (le cuivre) ;
- enfin de tester en microcosmes un système de traitement par bioaugmentation en présence ou non de macrophytes (*Phragmites australis*) dans un milieu aux conditions proches de celles du BO. Une contrainte annexe était de proposer un système de traitement plutôt rustique, pour des raisons de coût, de facilité de mise en œuvre et de gestion lorsqu'un tel système serait mis en œuvre en conditions réelles.

Afin d'assurer un temps de rétention suffisant, des matériaux sorbants ont été testés parmi une série de matériaux simples : la pulpe de betterave, les rafles de maïs brutes et les cendres de rafles de maïs, la perlite, la vermiculite, le sable et le sédiment. Les cendres de rafles de maïs appartiennent à la large famille des charbons actifs, dont l'efficacité de sorption pour les différents polluants s'est avérée être la meilleure dans notre étude. Cependant la volonté de mettre au point un procédé aussi rustique que possible nous a conduit à considérer les autres matériaux d'autant plus que la vitesse de sorption n'était pas la plus élevée. Un test « classique » de sorption réalisé avec matériau sorbant dans de l'EUP en présence d'un polluant seul aurait alors conduit à choisir le sable pour les trois molécules étudiées. Cependant des tests réalisés dans des matrices de complexité croissante (EUP, EBO et enfin ES) avec des polluants seuls ou en mélange montrent que les capacités de sorption des différents matériaux dépendent à la fois de la matrice considérée et du nombre de polluants en présence dans la solution, tout en sachant que les fortes concentrations employées exacerbent probablement les phénomènes de sorption compétitive. Le même test réalisé en milieu complexe, l'ES, avec les 4 polluants en mélange nous a fait choisir le sédiment pour le glyphosate, le sable pour le diuron et la betterave ou les rafles de maïs pour le 3,4-DCA. Pour ce dernier, le sable donne des performances de sorption similaires et présente l'avantage d'être présent dans le BO auquel fait référence cette étude, dont le filtre a été réalisé dans ce matériau lors d'un réaménagement récent. La simplicité voulue pour le procédé nous a donc conduit à choisir ce matériau pour le 3,4-DCA.

Pour pouvoir traiter la polycontamination, une sélection de souches bactériennes performantes pour la dégradation a été réalisée par des techniques classiques de cultures d'enrichissement en milieu pollué, l'idée étant de faire de la bioaugmentation avec la souche sélectionnée. Afin d'éviter une cause classique d'échec de cette technique, à savoir la sélection de souches inadaptées à l'environnement dans lequel elles sont inoculées, nous avons sélectionné des isolats issus du sédiment du BO dans lequel ils étaient destinés à être réintroduits. Par ailleurs, notre sélection s'est basée certes sur les capacités de tolérance et de dissipation des polluants mais aussi sur quelques critères écologiques, notamment la stratégie de croissance et l'origine rhizosphérique ou non des isolats. Les capacités de tolérance aux polluants et de dissipation ne semblent pas être liées à l'origine géographique des prélèvements réalisés à partir du sédiment du BO, mais se sont avérées être fortement variables selon le polluant. Le milieu dans lequel l'isolat devait être réintroduit étant par définition changeant et sujet à des arrivées ponctuelles de grandes quantités de polluants, nous avons décidé de conserver un isolat à stratégie de croissance rapide, qui présente de bonnes capacités de dissipation des polluants organiques et complexe par ailleurs le cuivre. Cet isolat est en fait un consortium de plusieurs bactéries, ce qui n'est finalement pas surprenant au regard de la diversité des capacités métaboliques requises. Ceci pose néanmoins plusieurs questions, notamment sur la stabilité de ce dernier et sur les possibilités de son suivi une fois inoculé dans le milieu.

La mise au point du procédé de dépollution en conditions semi-contrôlées, dans des microcosmes reproduisant à l'échelle le BO auquel se réfère l'étude, a permis de mettre en évidence l'importance de certains paramètres dans la réussite d'un tel procédé de dépollution. Ainsi l'adaptation du temps de stockage de l'eau lors d'un évènement pluvieux simulé (passage de 4 à 6h) permet-il de trouver relativement facilement des performances de rétention analogues à celles obtenues lors des tests de sorption (91% pour le glyphosate, 87% pour le 3,4-DCA et 64% pour le diuron). De plus le temps laissé au procédé une fois la rétention effectuée est un paramètre d'importance. L'allongement du temps d'action de une à 5 semaines permet d'obtenir de bonnes performances de dissipation qui varient cependant entre les polluants (99% du glyphosate, 84% du 3,4-DCA et 65% du diuron dissipé). De fortes variations de potentiel redox

ont été observées ce qui est intéressant pour comparer le fonctionnement des microcosmes avec celui du BO d'étude, dans lequel ce paramètre est également fortement variable. De manière assez surprenante, l'inoculation régulière et massive du consortium sélectionné ne s'est traduite par aucun effet significatif sur la dissipation des polluants, au mieux une tendance à l'amélioration pour le diuron. Sachant que les caractéristiques physico-chimiques du mélange sable-sédiment, notamment son rapport C/N (13,8) sont compatibles avec la croissance microbienne, ceci amène à se demander si la quantité globale de substrats ne serait pas insuffisante pour supporter l'entretien d'une biomasse microbienne supplémentaire.

Ce travail a permis d'obtenir un certain nombre de résultats et ainsi d'apporter des éléments de compréhension sur la dépollution par bioaugmentation en présence ou non de plantes dans une ZHA modèle. Un certain nombre de points soulevés lors de ce travail pourraient être le point de départ de travaux ultérieurs, dont par exemple :

- faire des expériences en logettes avec un temps d'action plus long et un seul apport de polluants organiques pour voir si la tendance à une meilleure dissipation du diuron qui a été observée lorsque la bioaugmentation devient significative ;
- mettre au point un suivi des populations du consortium (FISH pour la visualisation de populations particulières, qPCR pour la quantification de ces populations) pour déterminer s'il y a survie ou pas et la dynamique des populations au sein du consortium ;
- si la non-survie est avérée, en déterminer les causes (carence en nutriments, compétition interspécifique ?). Si une carence nutritionnelle est avérée, il pourrait être intéressant d'apporter des nutriments afin de maintenir la biomasse supplémentaire apportée par bioaugmentation ;
- mener une étude de bioaugmentation dans les mêmes conditions avec des souches à stratégie de croissance lente, pour voir si le paramètre-clé de l'efficacité du procédé est l'adaptation au système oligotrophe ou la capacité métabolique ponctuelle ;
- faire des expériences en microcosmes à différentes températures pour évaluer la variation saisonnière des performances de dépollution, et anticiper ainsi sur le comportement du procédé en ZHA ;

- faire des expériences en microcosmes à des concentrations en polluants plus faibles pour évaluer l'effet de la diminution des interactions entre polluants sur la sorption ;
- réaliser des expériences de bioaugmentation du consortium 106 dans un sol sans historique de pollution au glyphosate, diuron et 3,4-DCA ; on pourrait ainsi évaluer l'effet des populations indigènes sur la dissipation observée en logettes, étude qui pourrait être affinée par la recherche des gènes de dégradation des polluants et/ou par l'étude de leur expression dans le sédiment. Cette expérience permettrait d'expliquer pourquoi les témoins non bioaugmentés dans l'expérience en logettes présentent également de bonnes performances de dissipation et peut-être mettre alors en évidence dans ce cas l'intérêt de la bioaugmentation;
- mettre au point un suivi du fractionnement isotopique des polluants (^{13}C) dans des matrices complexes pour déterminer des signatures isotopiques spécifiques de chaque phénomène (sorption, dégradation) et affiner ainsi le suivi de la dégradation.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : NORMES DE QUALITÉ ENVIRONNEMENTALE POUR LES SUBSTANCES PRIORITAIRES ET CERTAINS AUTRES POLLUANTS (Annexe 1 à la DIRECTIVE 2008/105/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2008)

L 348/92

FR

Journal officiel de l'Union européenne

24.12.2008

ANNEXE I

NORMES DE QUALITÉ ENVIRONNEMENTALE POUR LES SUBSTANCES PRIORITAIRES ET CERTAINS AUTRES POLLUANTS

PARTIE A: NORMES DE QUALITÉ ENVIRONNEMENTALE (NQE)

MA: moyenne annuelle.

CMA: concentration maximale admissible.

Unité: [µg/l].

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS ⁽¹⁾	NQE-MA ⁽²⁾ Eaux de surface intérieures ⁽³⁾	NQE-MA ⁽²⁾ Autres eaux de surface	NQE CMA ⁽⁴⁾ Eaux de surface intérieures ⁽³⁾	NQE CMA ⁽⁴⁾ Autres eaux de surface
(1)	Alachlore	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7
(2)	Anthracène	120-12-7	0,1	0,1	0,4	0,4
(3)	Atrazine	1912-24-9	0,6	0,6	2,0	2,0
(4)	Benzène	71-43-2	10	8	50	50
(5)	Diphényléthers bromés ⁽⁵⁾	32534-81-9	0,0005	0,0002	sans objet	sans objet
(6)	Cadmium et ses composés (suivant les classes de dureté de l'eau) ⁽⁶⁾	7440-43-9	≤ 0,08 (classe 1) 0,08 (classe 2) 0,09 (classe 3) 0,15 (classe 4) 0,25 (classe 5)	0,2	≤ 0,45 (classe 1) 0,45 (classe 2) 0,6 (classe 3) 0,9 (classe 4) 1,5 (classe 5)	≤ 0,45 (classe 1) 0,45 (classe 2) 0,6 (classe 3) 0,9 (classe 4) 1,5 (classe 5)
(6 bis)	Tétrachlorure de carbone ⁽⁷⁾	56-23-5	12	12	sans objet	sans objet
(7)	Chloroalcanes C10-13	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4
(8)	Chlorfenvinphos	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3
(9)	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1
(9 bis)	Pesticides cyclodiènes: Aldrine ⁽⁷⁾ Dieldrine ⁽⁷⁾ Endrine ⁽⁷⁾ Isodrine ⁽⁷⁾	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ = 0,01	Σ = 0,005	sans objet	sans objet
(9 ter)	DDT total ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾ para-para-DDT ⁽⁷⁾	sans objet 50-29-3	0,025 0,01	0,025 0,01	sans objet sans objet	sans objet sans objet
(10)	1,2-Dichloroéthane	107-06-2	10	10	sans objet	sans objet
(11)	Dichlorométhane	75-09-2	20	20	sans objet	sans objet
(12)	Di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	sans objet	sans objet
(13)	Diuron	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8
(14)	Endosulfan	115-29-7	0,005	0,0005	0,01	0,004
(15)	Fluoranthène	206-44-0	0,1	0,1	1	1
(16)	Hexachlorobenzène	118-74-1	0,01 ⁽⁹⁾	0,01 ⁽⁹⁾	0,05	0,05
(17)	Hexachlorobutadiène	87-68-3	0,1 ⁽⁹⁾	0,1 ⁽⁹⁾	0,6	0,6
(18)	Hexachlorocyclohexane	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS ⁽¹⁾	NQE-MA ⁽²⁾ Eaux de surface intérieures ⁽³⁾	NQE-MA ⁽²⁾ Autres eaux de surface	NQE CMA ⁽⁴⁾ Eaux de surface intérieures ⁽³⁾	NQE CMA ⁽⁴⁾ Autres eaux de surface
(19)	Isoproturon	34123-59-6	0,3	0,3	1,0	1,0
(20)	Plomb et ses composés	7439-92-1	7,2	7,2	sans objet	sans objet
(21)	Mercure et ses composés	7439-97-6	0,05 ⁽⁵⁾	0,05 ⁽⁵⁾	0,07	0,07
(22)	Naphthalène	91-20-3	2,4	1,2	sans objet	sans objet
(23)	Nickel et ses composés	7440-02-0	20	20	sans objet	sans objet
(24)	Nonylphénol (4-nonylphénol)	104-40-5	0,3	0,3	2,0	2,0
(25)	Octylphénol (4-(1,1', 3,3' - tétraméthylbutyl)-phénol)	140-66-9	0,1	0,01	sans objet	sans objet
(26)	Pentachlorobenzène	608-93-5	0,007	0,0007	sans objet	sans objet
(27)	Pentachlorophénol	87-86-5	0,4	0,4	1	1
(28)	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ⁽¹⁰⁾	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet
	Benzo(a)pyrène	50-32-8	0,05	0,05	0,1	0,1
	Benzo(b)fluoranthène	205-99-2	Σ = 0,03	Σ = 0,03	sans objet	sans objet
	Benzo(k)fluoranthène	207-08-9				
	Benzo(g,h,i)perylène	191-24-2	Σ = 0,002	Σ = 0,002	sans objet	sans objet
	Indeno(1,2,3-cd)pyrène	193-39-5				
(29)	Simazine	122-34-9	1	1	4	4
(29 bis)	Tétrachloroéthylène ⁽⁷⁾	127-18-4	10	10	sans objet	sans objet
(29 ter)	Trichloroéthylène ⁽⁷⁾	79-01-6	10	10	sans objet	sans objet
(30)	Composés du tributylétain (tributylétain-cation)	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
(31)	Trichlorobenzènes	12002-48-1	0,4	0,4	sans objet	sans objet
(32)	Trichlorométhane	67-66-3	2,5	2,5	sans objet	sans objet
(33)	Trifluraline	1582-09-8	0,03	0,03	sans objet	sans objet

⁽¹⁾ CAS: Chemical Abstracts Service.

⁽²⁾ Ce paramètre est la NQE exprimée en valeur moyenne annuelle (NQE-MA). Sauf indication contraire, il s'applique à la concentration totale de tous les isomères.

⁽³⁾ Les eaux de surface intérieures comprennent les rivières et les lacs et les masses d'eau artificielles ou sérieusement modifiées qui y sont reliées.

⁽⁴⁾ Ce paramètre est la norme de qualité environnementale exprimée en concentration maximale admissible (NQE-CMA). Lorsque les NQE-CMA sont indiquées comme étant «sans objet», les valeurs retenues pour les NQE-MA sont considérées comme assurant une protection contre les pics de pollution à court terme dans les rejets continus, dans la mesure où elles sont nettement inférieures à celles définies sur la base de la toxicité aiguë.

⁽⁵⁾ Pour le groupe de substances prioritaires «diphényléthers bromés» (n° 5) retenu dans la décision n° 2455/2001/CE, une NQE n'est établie que pour les numéros des congénères 28, 47, 99, 100, 153 et 154.

⁽⁶⁾ Pour le cadmium et ses composés (n° 6), les valeurs retenues pour les NQE varient en fonction de la dureté de l'eau telle que définie suivant les cinq classes suivantes: classe 1: < 40 mg CaCO₃/l, classe 2: 40 à < 50 mg CaCO₃/l, classe 3: 50 à < 100 mg CaCO₃/l, classe 4: 100 à < 200 mg CaCO₃/l et classe 5: ≥ 200 mg CaCO₃/l.

⁽⁷⁾ Cette substance n'est pas une substance prioritaire mais un des autres polluants pour lesquels les NQE sont identiques à celles définies dans la législation qui s'appliquait avant le 13 janvier 2009.

⁽⁸⁾ Le DDT total comprend la somme des isomères suivants: 1,1,1-trichloro-2,2 bis (p-chlorophényl) éthane (numéro CAS 50-29-3; numéro UE 200-024-3); 1,1,1-trichloro-2 (o-chlorophényl)-2-(p-chlorophényl) éthane (numéro CAS 789-02-6; numéro UE 212 332 5); 1,1 dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl) éthylène (numéros CAS 72 55-9; numéro UE 200-784 6); et 1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl) éthane (numéro CAS 72 54-8; numéro UE 200-783-0).

⁽⁹⁾ Si les États membres n'appliquent pas les NQE pour le biote, ils instaurent des NQE plus strictes pour l'eau afin de garantir un niveau de protection identique à celui assuré par les NQE applicables au biote fixées à l'article 3, paragraphe 2 de la présente directive. Ils notifient à la Commission et aux autres États membres, par l'intermédiaire du comité visé à l'article 21 de la directive 2000/60/CE, les raisons motivant le recours à cette approche et les fondements de ce recours, les autres NQE établies pour l'eau, y compris les données et la méthode sur la base desquelles les autres NQE ont été définies, et les catégories d'eau de surface auxquelles elles s'appliqueraient.

⁽¹⁰⁾ Pour le groupe de substances prioritaires «hydrocarbures aromatiques polycycliques» (HAP) (n° 28), chacune des différentes NQE est applicable, c'est-à-dire que la NQE pour le benzo(a)pyrène, la NQE pour la somme du benzo(b)fluoranthène et du benzo(k)fluoranthène et la NQE pour la somme du benzo(g,h,i)perylène et de l'indéno(1,2,3-cd)pyrène doivent être respectées.

Annexe 2 : Liste des produits épandus sur le BV en 2004 (Domange 2005)

alkyl polysacharrides	simazine	flufenoxuron	oryzalin
myclobutanil	huile de pétrole	diuron	Kresoxim-methyl
sulfosate	dimethomorphe	methidathion	mancozebe
flusilazol	fenoxycarbe	pyraclostrobine	thyocyanate d'ammonium
tetraconazole	hexaconazole	glufosinate	aminotriazole
diquat	azoxystrobine	spiroxamine	cymoxanil
famoxadone	dinocap	vinchlozoline	metirame-zinc
lufenuron	flumioxazine	quinoxifen	glyphosate
tebuconazole	terbuthylazine	fenhexamid	folpel
paraquat	thiodicarbe	pyrimethanil	Fosétyl-Al

Annexe 3 : Données complémentaires RISA

Composition du mix PCR pour un échantillon

Tampon (×10)	2,5µL
MgCl ₂ (25mM)	2,5µL
dNTP (25mM)	0,25µL
ITSF (20µM)	0,25µL
ITSR (20µM)	0,25µL
Taq (5U.µL ⁻¹)	0,3µL
H ₂ O qsp	25µL
ADN	25 à 50ng

Programme du thermocycleur

Température	Durée	Nombre de cycles
94°C	3 minutes	1
94°C	45 secondes	
55°C	1 minute	30
72°C	2 minutes	
72°C	7 minutes	1

Amorces utilisées

Nom	Séquence (5' → 3')	T _m
ITSF	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	60°C
ITSR	GCCAAGGCATCCACC	50°C

Annexe 4 : Protocole TTGE et séquençage

1. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) de l'ADN ribosomique bactérien

Les amorces universelles utilisées 1401r et 968f amplifient un fragment de la région (V6-V8) 16S de l'ADN ribosomique bactérien (475 paires de bases) (Felske et coll. 1998 ; Heuer et coll. 1999).

Une séquence de 40 paires de bases riche en guanine et cytosine (riche en GC) (GC-968f) est ajoutée à l'amorce 968f afin d'éviter la dénaturation complète de la molécule lors de l'utilisation des fragments amplifiés en TTGE. L'amplification de l'ADN ribosomique bactérien avec les amorces 1401r et GC-968f donne alors un fragment de 475 paires de bases.

Amorces :

GC-968f (968-984) : 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'.

1401r (1385-1401) : 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'.

N.B. : Toutes les manipulations doivent être réalisées dans la glace. Tous les produits sont aliquotés et conservés à -20°C (sauf le DMSO). Tout le matériel en contact avec les échantillons doit être stérile.

1.1. Composition du milieu réactionnel d'amplification par PCR

	Molarité	Volume (µL)
	TRIS-HCl 50mM	
Tampon 10x	KCl 10mM	5
	(NH ₄)SO ₄ 5mM	
MgCl ₂	25mM	3
dNTP	10mM	1
Amorce 1401r	20µM	0,5
Amorce GC-968f	20µM	0,5
BSA 3%	3mg.mL ⁻¹	2
DMSO		1,5
Taq polymerase (Faststart Roche)	5U.µL ⁻¹	0,4
Echantillon		1
Eau stérile	qsp	35,1
Volume réactionnel final		50

1.2. Programme d'amplification par PCR

Thermocycleur utilisé : Mycycler Thermalcycler, Biorad

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	5 minutes	1
Amplification	94°C	40 secondes	38
	56°C	30 secondes	
	72°C	1 minute	
Elongation finale	72°C	5 minutes	1

1.3. Préparation des gels d'agarose

La qualité et la quantité de l'ADN obtenu après extraction ou après amplification par PCR sont analysées par électrophorèse sur gel d'agarose.

1.3.1. Préparation du gel

- Les gels d'agarose 1% w/v sont préparés avec 1g d'agarose dans 100mL de tampon TAE 1×
- La dissolution de l'agarose dans le TAE se réalise en chauffant le mélange quelques minutes au four micro-ondes (ne pas utiliser la puissance maximale)
- Placer le mélange d'agarose dissout dans le tampon TAE 1× préalablement refroidi (sinon le dispositif en plastique se dilate) dans le dispositif contenant du bromure d'éthidium (BET) 0,5mg.l⁻¹
- La polymérisation du gel prend de 20 à 40min.

1.3.2. Dépôt des échantillons d'ADN amplifiés par PCR

- Les puits sont remplis avec 5-10μL d'échantillon en mélange avec 2μL de tampon de charge 6× (Ce tampon de charge permet à l'échantillon de tomber au fond des puits du gel, la densité de ce tampon est moins importante que celui utilisé en TTGE)
- Au moins un puits contient 1μL de marqueur de taille, 2μL de tampon de charge 6× et 4-9μL d'eau distillée (pour avoir le même volume final dans chacun des puits, cela évite la distorsion de la migration)

1.3.3. Conditions de migration des échantillons sur gel d'agarose

- Bain de TAE 1X
- Courant constant : 120-130V
- Durée : 20-30min

1.3.4. Révélation des gels d'agarose

Observer et numériser sous lumière UV (Geldoc, BIORAD).

2. Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE)

Le système d'électrophorèse par TTGE utilisé est le Dcode (Universel Mutation Detection System, Biorad).

Le gradient de température permettant la séparation des doubles brins d'ADN est déterminé à l'aide du logiciel DNA Melting Profil analysis Software (version 2.0, Biorad).

Les concentrations du gel de polyacrylamide ainsi que les conditions de migration ont été adaptées d'après les instructions trouvées dans « The Dcode universal mutation detection system ».

2.1. Préparation du dispositif d'électrophorèse

Au préalable :

- Nettoyer l'ensemble du matériel à l'eau savonneuse ou au détergent
- Rincer à l'eau claire
- Rincer à l'eau distillée
- Rincer à l'éthanol 70% (pour aider le séchage et éviter les traces)
- Nettoyer avec un papier qui ne fait pas de trace avec de l'isopropanol

Les plaques en verre doivent absolument être propres et lisses.

L'ensemble du matériel doit être sec avant le montage du dispositif.

2.2. Préparation du gel d'acrylamide partiellement dénaturant

2.2.1. Préparation du gel

- Peser 14,4g d'urée (8M) dans un tube plastique de type Falcon de 50mL
- Ajuster à 20mL avec de l'eau distillée
- Placer le tube dans un Becher contenant de l'eau bouillante pour faciliter la dissolution (eau distillée + urée = réaction endothermique)
- Agiter au Vortex régulièrement pour faciliter la dissolution
- Ajouter 0,6mL de glycérol
- Ajouter 0,75mL de tampon TAE 50×
- Ajouter 6mL de la solution d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5:1) (6% acrylamide)
- Ajuster le volume final à 30mL avec de l'eau distillée
- Filtrer la solution à 0,45µm (pas forcément nécessaire, à voir selon usage)

- Laisser refroidir la solution en l'incubant dans de la glace (l'étape suivante va permettre la polymérisation du gel qui se fera d'autant plus vite que la préparation est chaude)
- Ajouter les catalyseurs de polymérisation : en premier 300 μ L de persulfate d'ammonium (APS) puis 30 μ L de TEMED
- Placer le peigne, en éliminant les bulles (sinon le fond des puits ne sera pas linéaire et la migration se fera mal)
- Mettre des morceaux de scotch pour tenir le peigne afin qui se trouve correctement placé contre la grande plaque de verre
- Laisser polymériser le gel 1 heure à température ambiante
- Enlever le peigne et rincer les puits trois fois à avec du tampon TAE 1,25 \times pour éliminer tous les résidus d'urée
- Placer le dispositif contenant le gel polymérisé dans la cuve d'électrophorèse contenant un bain de TAE 1,25 \times à la température de début de migration

2.2.2. Dépôt des échantillons d'ADN amplifiés par PCR

Selon la quantité d'ADN obtenu par amplification par PCR on peut déposer de 5 à 10 μ L d'extrait dans chacun des puits en mélange avec du tampon de charge 2 \times (la quantité sera déterminé lors de l'analyse des produits de PCR sur gel d'agarose). L'ensemble des mélanges se fait au préalable, avant de les placer dans les puits du gel. Le chargement des échantillons dans le gel se fait de préférence lorsque le gel est déjà dans la cuve qui contient 7L de TAE 1,25 \times (le gel peut s'acclimater à la température, pas de risque de faire sortir les échantillons des puits en immergeant le dispositif dans la cuve).

Un gel d'acrylamide pour la TTGE comporte 20 puits.

- Les deux pistes des extrémités contiennent un mélange contenant autant d'eau distillée que de tampon de charge 2 \times (v/v) pour éviter un effet de bord (on remplit ces puits quand même pour qu'il n'y ait pas distorsion du gel) (1^{er}, 2^{ème}, 19^{ème} et 20^{ème} puits)
- Le 3^{ème}, 10^{ème} et 18^{ème} puits contiennent 1-3 μ L de marqueur de taille (selon la quantité d'ADN des extraits et la quantité d'extrait), de l'eau distillée et du tampon de charge 2 \times . La quantité de tampon de charge est égale à la quantité de marqueur de taille plus la quantité d'eau distillée. La présence de marqueur de taille permettra de redresser les photographies de gel lors de l'analyse de ce dernier (le marqueur de taille sert de marqueur de redressement)
- Les autres puits contiennent un mélange contenant autant d'extrait de PCR que de tampon de charge 2 \times (v/v)
- Il est important d'avoir la même quantité de tampon de charge dans chacun des puits : en effet, comme ce dernier a une densité plus importante que l'eau ou les échantillons (c'est grâce et cette densité que les échantillons peuvent tomber au fond des puits) sa présence en quantité égale permet d'éviter les distorsions lors de la migration de l'ADN. Ainsi, quelle que soit la quantité d'extrait utilisé il faut adapter le volume du tampon de charge et, dans le cas des marqueurs de taille, jouer sur la quantité d'eau afin que tout les puits du gel contiennent le même volume final

2.2.3. Conditions de migrations des échantillons

- Tension constante : 100V
- Température initiale : 57°C
- Température finale : 64°C
- Incrément de température : selon le degré de séparation souhaitée donc soit 0,5°C par heure (soit 14h) soit 1°C par heure (bandes moins discriminées)

2.2.4. Révélation des gels d'acrylamide

- Placer les gels dans un bain de SybrGold (Invitrogen, Molecular Probes) (25µL dans 250mL eau) pendant 30min
- Observer et numériser sous lumière UV (Geldoc, BIORAD)
- Si les gels doivent être utilisés par la suite (découpe des bandes pour le séquençage), il est indispensable de les placer 30min dans un bain d'eau distillée pour rinçage

3. Analyse des gels obtenus par TTGE

Les résultats obtenus pourront faire l'objet d'analyses statistique par dendrogramme (StatBox) ou ACP (ADE4) (Thioulouse et coll. 1997).

3.1. Séquençage

Les bandes majoritaires obtenues par TTGE ont été découpées du gel d'acrylamide et placées dans 25µL d'eau distillée stérile.

Les échantillons subissent une série de congélation/décongélation (pour rompre le maillage d'acrylamide)

L'ADN est amplifié avec le couple d'amorces 1401r et 968f (cette fois il ne faut pas de queue GC, qui empêcherait le séquençage).

Amorces :

GC-968f (968-984) : 5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'.

1401r (1385-1401) : 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'.

La composition du mélange réactionnel et les conditions d'amplification sont les même que pour la PCR réalisée pour la TTGE (voir plus haut).

L'ADN obtenu est purifié grâce au kit commercial High Pure™ PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostic) selon le protocole fourni par le fabriquant.

Le séquençage a été réalisé par MWG Biotech (Courtaboeuf, France) à partir de 75ng d'ADN obtenu par ré-amplification.

3.2. Analyse des séquences

Les séquences identifiées sont comparées aux banques de données (National Center for Biotechnology Informatic, NCBI) à l'aide du logiciel BLAST-N (Basic Local Alignment Search Tool).

L'analyse phylogénétique est réalisée par alignement des séquences d'ADN avec programme d'alignements multiples CLUSTAL W (Thompson et coll. 1994) du logiciel BioEdit Sequence alignment Editor.

Le dendrogramme est construit grâce aux programmes DNADIST-NEIGHBOR-SEQBOOT-CONSENSE du logiciel PHYLIP 3.65 (Felsenstein 1989).

La matrice des distances obtenue a été ensuite utilisée pour réaliser des arbres des plus proches voisins (neighbor-joining trees) qui ont été traités avec le logiciel TREE VIEW.

4. Solutions utilisées

- Tampon TAE 1,25× : 25mL TAE 50× pour 1L d'eau distillée
- Persulfate d'ammonium 10% : 100mg d'APS dans 1mL d'eau distillée (2jours 4°C)
- Tampon de charge 6× : (Sambrook et coll. 1989) : Bleu de Bromophenol 0,25%, Cyanol de Xylene 0,25% et Glycerol 30%
- Tampon de charge 2× : 2% Bleu de bromophénol (0,05%), 2% Cyanol de xylène (0,05%) et 100% Glycérol (70%)
- Bain de Sybr Gold : 25µL Sybr Gold pour 250mL d'eau distillée

5. Abréviations

ADN : Acide DesoxyriboNucleique

ADNr : Acide DesoxyriboNucleique ribosomique

APS : Ammonium PerSulfate

BET : Bromure d'Ethidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Bp : Base Pair

BSA : Sérum d'Albumine Bovine

CTAB : CetylTrimethylAmmonium Bromide

DMSO : DiMethylSulfOxide

dNTP : DesoxyNucleoside TriPhosphate

EDTA : : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

PCR : Polymerase Chain Reaction

PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

TAE : Tris base 2 M, Acide acétique glacial 1 M, EDTA pH = 8,50 mM

Taq polymerase : *Thermophilus aquaticus* polymerase

TEMED : N, N, N, N, TEtraMethylEthyleneDiamine

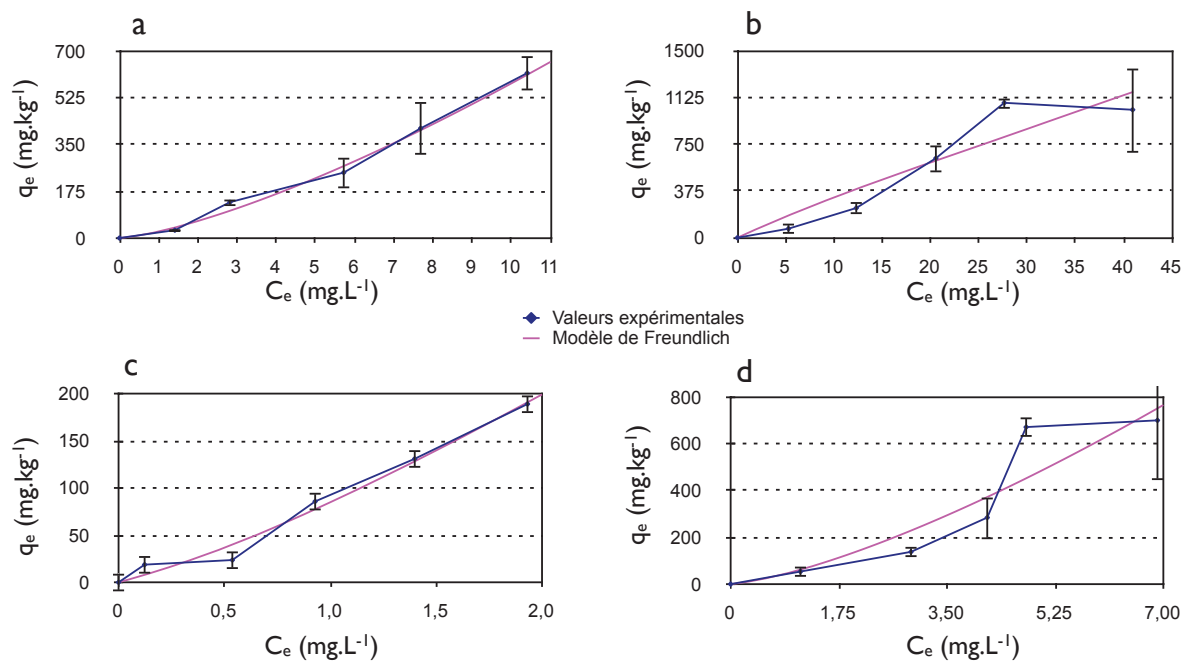
T_m : Température de dénaturation

TTGE : Temporal Temperature Gradient Electrophoresis

UV : Ultra Violet

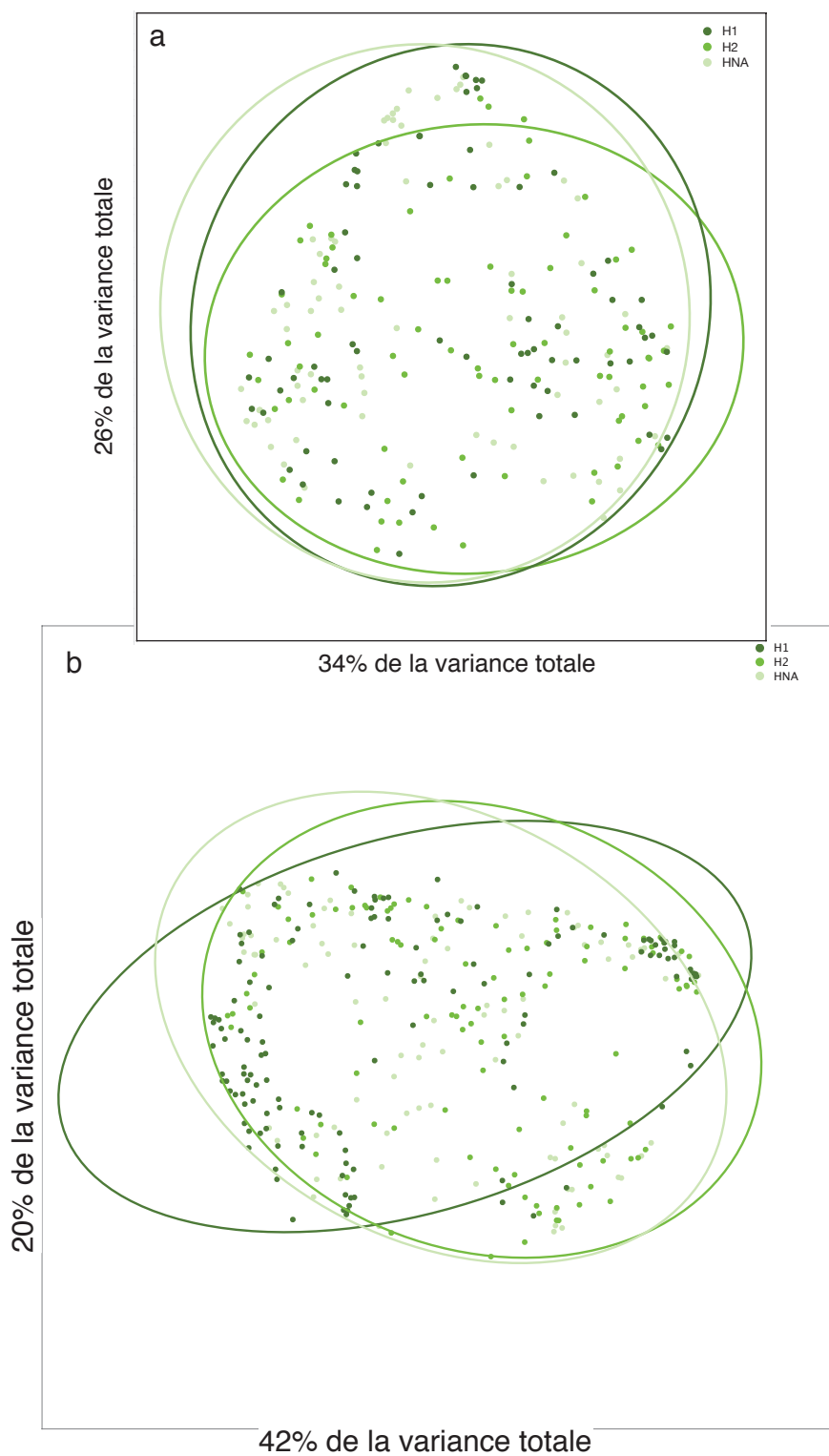
Annexe 5 : Isothermes de sorption

Les isothermes de sorption sont représentées pour : le diuron dans l'EUP (a), le diuron dans l'EBO (b), le 3,4-DCA dans l'EUP (c) et le 3,4-DCA dans l'EBO (d). Les barres d'erreur représentent les écarts-types. La modélisation est faite à l'aide du modèle de Freundlich : $q_e = K \cdot C_e^n$. Pour les coefficients K et n, voir le tableau III.2.



Annexe 6 : ACP sur la RISA-RFLP

L'ACP est celle utilisée dans la partie Résultats et Discussion, § 2.2.2. Le tracé des ellipses de corrélation par horizon de prélèvement montre que la diversité génétique des isolats n'est pas non plus liée à ce paramètre, en RISA (a) comme en RFLP (b).



Annexe 7 : Identification des isolats

Les séquences obtenues ont été tout d'abord analysées sur le site internet Ribosomal Project Database website (<http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch>) à l'aide du programme Seqmatch. Les séquences (bonne qualité, de longueur >1200) issues de la base de données présentant les scores S_{ab} les plus élevés et le plus grand nombre d'oligos uniques (Olig) ont été ensuite déterminées. Les alignements sur les meilleures correspondances ont été réalisés à l'aide du programme Blast2seq disponible sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et les alignements multiples ont été réalisés par la plateforme Mobyly (<http://mobyly.pasteur.fr>) en utilisant le programme ClustalW avec les paramètres par défaut. Les alignements ont été optimisés sur la plateforme Myhits (<http://hits.isb-sib.ch>) avec une visualisation sur Jalview tel qu'implémenté sur la plateforme MSA et le réalignement de séquences a été réalisé avec RCOFFEE. L'analyse phylogénétique a été menée en utilisant ces alignements, l'algorithme des plus proches voisins et la suite logicielle Phylip (DNADIST et NEIGHBOR avec les paramètres par défaut), tel qu'implémenté sur la plateforme Mobyly. Les résultats ont été visualisés à l'aide du logiciel NJPLOT (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>).

LISTE des ABREVIATIONS

INDEX DES ABREVIATIONS

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

3,4-DCA : 3,4-dichloroaniline

ACM : Analyse des Correspondances Multiples

ACN : ACétoNitrile

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

AFPP : Association Française de Protection des Plantes

AMPA : Acide Amino-Méthyl Phosphonique

APRONA : Association pour la PROtection de la Nappe phréatique de la plaine d'Alsace

ARN : Acide RiboNucléique

ASE : Accelerated Solvent Extraction

BO : Bassin d'Orage

BTEX : Benzène Toluène Ethyl-benzène et Xylène

CAS : Chemical Abstract Service

CE : Communauté Européenne

CE₅₀ : Concentration d'Effet 50

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CEE : Communauté Economique Européenne

CL₅₀ : Concentration Létale 50

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CPDMU : ChloroPhénylDiMéthylUrée

CSEO : Concentration Sans Effet Observé

DCPU : DiChloroPhénylUrée

DCPMU : DiChloroPhénylMéthylUrée

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DO : Densité Optique

EBO : Eau de Ruissellement du BO

EDTA : acide Ethylène Diamine Tétracétique

ENGEES : Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg

EPA : Environmental Protection Agency

ES : Extrait de Sédiment

ETM : Élément Trace Métallique

EUP : Eau Ultra Pure

FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization

GFP : Green Fluorescent Protein

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

IEE : Institut Ecologie Environnement

IFEN : Institut Français de l'Environnement

IHCP : Institute for Health and Customer Protection

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IPL : Institut Pasteur de Lille

ISPB : Institut de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

LB : Luria Bertani broth

MCPA : Acide 2-Méthyl-4-ChloroPhénoxyacétique

MM : Milieu Minimum

MS : Mass Spectrometer

MTBE : Methyl Tert -Butyl Ether

NPP : Nombre le Plus Probable

ORP : Observatoire des Résidus de Pesticides

PCB : PolyChloroBiphényles

PCP : PentaChloroPhénol

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEHD : PolyEthylène Haute Densité

PGPR : Plant-Growth Promoting Rhizobacteria

RISA : Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SAU : Surface Agricole Utile

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

TCE : Trichloréthylène

TTGE : Temperature Temporal Gradient Electrophoresis

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

UE : Union Européenne

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

ZHA : Zone Humide Artificielle

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Articles

A

- Abate G., Masini J.C. Sorption of Atrazine, Propazine, Deethylatrazine, Deisopropylatrazine and Hydroxyatrazine onto Organovermiculite. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 16 (5) : 936-943 (2005)
- Abollino O., Giacomino A., Malandrino M., Menstati E. Interaction of metal ions with montmorillonite and vermiculite. *Applied Clay Science* 38 (3-4) : 227-236 (2008)
- Accinelli C., Koskinen W.C., Seebinger J.D., Vicari a., Sadowsky M.J. Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10) : 4110-4117 (2005)
- Ahangar A.G., Smernik R.J., Kookana R.S., Chittleborough D.J. Clear effects of soil organic matter chemistry, as determined by NMR spectroscopy, on the sorption of diuron. *Chemosphere* 70 : 1153-1160 (2008)
- Ahmaruzzaman M., 2008, Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 143 (1) : 48-67 (2008)
- Ahn C., Gillevet P.M., Sikaroodi M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecological Indicators* 7 : 852-863 (2007)
- Akhtar M., Iqbal S., Bhangar M.I., Zia-Ul-Haq M., Moazzam M., Low cost sorbents for the removal of methyl parathion pesticide from aqueous solutions. *Chemosphere* 66 (10) : 1829-1838 (2007)
- Aksu Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40 : 997-1026 (2005)
- Albers C.N., Banta G.T., Hansen P.E., Jacobsen O.S. Effect of different humic substances on the fate of diuron and its main metabolite 3,4-dichloroaniline in soil. *Environmental Science and Technology* 42 : 8687-8691 (2008)
- Albers C.N., Banta G.T., Hansen P.E., Jacobsen O.S. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil – Comparing different soils and humic substances. *Environmental Pollution* 157 (10) : 2865-2870 (2009)
- Alisi C., Musella R., Tasso F., Ubaldi C., Manzo S., Cremisini C., Sprocati A.R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment* 407 : 3024-3032 (2009)
- Alkan M., Dogan M., Adsorption of Copper(II) onto Perlite. *Journal of Colloid and Interface Science* 243 (2) : 280-291 (2001)
- Alkorta I., Garbisu C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* 79 : 273-276 (2001)
- Altundogan H.S., Arslan N.E., Tumen F. Copper removal from aqueous solutions by sugar beet pulp treated by NaOH and citric acid. *Journal of Hazardous Materials* 149 (2) : 432-439 (2007)
- Alva A.K., Singh M. Sorption of bromacil, diuron, norflurazon, and simazine at various horizons in two soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45 : 365-374 (1990)

- Alva A.K., Singh M. Sorption-desorption of herbicides in soil as influenced by electrolyte cations and ionic strength. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 26 (2) : 147-163 (1991)
- Amaya-Chavez A., Martinez-Tabche L., Lopez-Lopez E., Galar-Martinez M. Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha latifolia* in water and artificial sediments. *Chemosphere* 63 : 1124-1129 (2006)
- Amon J.P., Agrawal A., Shelley M.L., Opperman B.C., Enright M.P., Clemmer N.D., Slusser T., Lach J., Sobolewski T., Gruner W., Entingh A.C. Development of a wetland constructed for the treatment of groundwater contaminated by chlorinated ethenes. *Ecological Engineering* 30 : 51-66 (2007)
- Amrhein N., Johännig D., Schab J., Schulz A. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. *FEBS Letters* 157 (1) : 191-196 (1983)
- Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology* 27 (13) : 2630-2636 (1993)
- Anderson K.L., Wheeler K.A., Robinson J.B., Tuovinen O.H. Atrazine mineralization potential in two wetlands. *Water Research* 36 : 4785-4794 (2002)
- Araujo A.S.F., Monteiro R.T.R., Abarkeli R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52 : 799-804 (2003)
- Arbeli Z., Fuentes C.L. Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection* 26 : 1733-1746 (2007)
- Arias-Estévez M., López-Periágo E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C., Luis García-Río L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems and Environment* 123 (4) : 247-260 (2008)
- Arshad M., Saleem M., Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology* 25 (8) : 356-362 (2007)
- Armstrong W., Cousins J., Armstrong J., Turner D.W., Beckett P.M. Oxygen Distribution in Wetland Plant Roots and Permeability Barriers to Gas-exchange with the Rhizosphere: a Microelectrode and Modelling Study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* 86 : 687-703 (2000)
- Attaway H.H., Camper N.D., Paynter M.J.B., Anaerobic microbial degradation of diuron by pond sediment. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 17 (1) : 96-101 (1982)
- Ayotamuno J.M., Kogbara R.B., Agoro O.S. Biostimulation supplemented with phytoremediation in the reclamation of a petroleum contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 : 1567-1572 (2009)

B

- Badawi N., Rønhede S., Olsson S., Kragelund B.B., Johnsen A.H., Jacobsen O.S., Aamand J. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. *Environmental Pollution* 157 (10) : 2806-2812 (2009)
- Bailey S.E., Olin T.J., Bricka R.M., Adrian D.D. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research* 33 (11) : 2469-2479 (1999)
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The Role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57 : 233-266 (2006)
- Bakhaeva L.P., Vasilyeva G.K., Surovtseva E.G., Mukhin V.M. Microbial degradation of 3,4-dichloroaniline sorbed by activated carbon. *Microbiology* 70 (3) : 277-284 (2001)

- Baldwin B.R., Nakatsu C.H., Nies L. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. *Water Research* 42 : 723-731 (2008)
- Balthazor T.M., Hallas L. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (2) : 432-434 (1986)
- Banas D., Marin B., Skraber S., Chopin E.I.B., Zanella A. Copper mobilization affected by weather conditions in a stormwater detention system receiving runoff waters from vineyard soils (Champagne, France). *Environmental Pollution* 158 (2) : 476-482 (2010)
- Bankston J.L., Sola D.L., Komor A.T., Dwyer D.F. Degradation of trichloroethylene in wetland microcosms containing broad-leaved cattail and eastern cottonwood. *Water Research* 36 : 1539-1546 (2002)
- Baptista J.C., Davenport R.J., Donnelly T., Curtis T.P. The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Research* 42 : 3182-3190 (2008)
- Barr D.B., Bishop A., Needham L.L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reproductive Toxicology* 23 : 260-266 (2007)
- Barra Caracciolo A., Giuliano G., Grenni P., Guzzella L., Pozzoni F., Bottoni P., Fava L., Crobe A., Orru M., Funari E. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environmental Pollution* 134 : 525-534 (2005)
- Barrett K.A., McBride M.B. Trace element mobilization in soils by glyphosate. *Soil Science Society of America Journal* 70 : 1882-1888 (2006)
- Barrett K.A., McBride M.B. Phosphate and glyphosate mobility in soil columns amended with roundup. *Soil Science* 172 (1) : 17-26 (2007)
- Barretti P.B., de Souza R.M., Pozza A.A.A., Pozza E.A., de Carvalho J.G., de Souza J.T. Increased nutritional efficiency of tomato plants with growth-promoting endophytic bacteria. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 32 (4) : 1541-1548 (2008)
- Barriuso J., Solano B.R., Manero F.J.G. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus sp* on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 98 (6) : 666-672 (2008)
- Batisson I., Pesce S., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Bohatier J. Isolation and characterization of diuron-degrading Bacteria from lotic surface water. *Microbial Ecology* 54 : 761-770 (2007)
- Bauer C., Römbke J. Factors influencing the toxicity of two pesticides on three lumbricid species in laboratory tests. *Soil Biology and Biochemistry* 29 (3/4) : 705-708 (1997)
- Bazot S., Bois P., Joyeux C., Lebeau T. Mineralization of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] by co-immobilized *Arthrobacter sp.* and *Delftia acidovorans*. *Biotechnology Letters* 29 : 749-754 (2007)
- Bazot S., Lebeau T. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free-and/or immobilized-cells formulations. *Applied Microbial and Cell Physiology* 77 : 1351-1358 (2009)
- Behrens S., Rühland C., Inacio J., Huber H., Fonseca A., Spencer-Martins I., Fuchs B.M., Amann R. *In Situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains bacteria, archaea, and eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3) : 1748-1758 (2003)
- Bejat L., Perfect E., Quisenberry V.L., Coyne M.S., Haszler G.R. Solute transport as related to soil structure in unsaturated intact soil blocks. *Soil Science Society Of America Journal* 64 : 818-826 (2000)
- Belmonte Vega A., Garrido Frenich A., Martinez Vidal J.L. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 538 :

117-127 (2005)

Beltran J., Gerritse R.G., Hernandez F. Effect of flow rate on the adsorption and desorption of glyphosate, simazine and atrazine in columns of sandy soils. *European Journal of Soil Science* 49 : 149-156 (1998)

Benachour N., Séralini G.-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology* 22 : 97-105 (2009)

Bending G.D., Lincoln S.D., Sørensen S.R., Morgan J.A.W., Aamand J., Walker A. In-Field Spatial Variability in the Degradation of the Phenyl-Urea Herbicide Isoproturon Is the Result of Interactions between Degradative *Sphingomonas* spp. and Soil pH. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2) : 827-834 (2003)

Benoît P., Barriuso E., Calvet R. Biosorption characterization of herbicides, 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium. *Chemosphere* 31 (7) : 1271-1282 (1998)

Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.C., Frankenberger W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96 : 1049-1055 (2005)

Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68 : 1-13 (2009)

Berry K.A.T., Burton D.L. Natural attenuation of diesel fuel in heavy clay soil. *Canadian Journal of Soil Science* 77 (3) : 469-477 (1997)

Beuret C.J., Zirulnik F., Gimenez M.S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology* 19 : 501-504 (2005)

Bhatnagar A., Sillanpää M. Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment: A review. *Chemical Engineering Journal* in press (2010)

Bishop C.A., Struger J., Shirose L.J., Dunn L., Campbell G.D. Contamination and wildlife communities in stormwater detention ponds in Guelph and the Greater Toronto Area, Ontario, 1997 and 1998. Part II - Contamination and biological effects of contamination. *Water Quality Research Journal of Canada* 35 (3) : 437-474 (2000)

Blankenberg A.-G. B., Braskerud B., Haarstad K. Pesticide retention in two small constructed wetlands: treating non-point source pollution from agriculture runoff. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 86 (3-4) : 225-231 (2006)

Blessing M., Jochmann M.A., Schmidt T.C. Pitfalls in compound-specific isotope analysis of environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 : 591-603 (2008)

Blumenroth P., Wagner-Döbler I. Survival of inoculants in polluted sediments: effect of strain origin and carbon source competition. *Microbial Ecology* 35 : 279-288 (1998)

Bonnet J.-L., Bonnemoy F., Dusser M., Bohatier J. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology* 22 : 78-91 (2007)

Bony S., Gillet C., Bouchez A., Margoum C., Devaux A. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology* 89 : 197-203 (2008)

Boon N., Goris J., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-Chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, 12gfp. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7) : 2906-2913 (2000)

- Boon N., Top E.M., Verstraete W., Siciliano S.D. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3) : 1511-1520 (2003)
- Borggaard O.K., Gimsing A.L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* 64 (4) : 441-456 (2008)
- Botta F., Lavison G., Couturier G., Alliot F., Moreau-Guigon E., Fauchon N., Guery B., Chevreuril M., Blanchoud H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77 (1) : 133-139 (2009)
- Bouchez T., Patureau D., Dabert B.P., Juretschko S., Doré J., Delgenès P., Moletta R., Wagner M. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology* 2 (2) : 179-190 (2000)
- Bouldin, J.L., Farris, J.L., Moore M.T., Smith Jr. S., Stephens W.W., Cooper C.M. Evaluated fate and effects of atrazine and lambda-cyhalothrin in vegetated and unvegetated microcosms. *Environmental Toxicology* 20 (5) : 487-498 (2005)
- Bouldin J.L., Farris J.L., Moore M.T., Smith Jr. S., Cooper C.M. Hydroponic uptake of atrazine and lambda-cyhalothrin in *Juncus effusus* and *Ludwigia peploides*. *Chemosphere* 65 : 1049-1057 (2006)
- Boutin C., Elmegaard N., Kjaer C. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology* 13 : 349-369 (2004)
- Boving T.B., Neary K. Attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban stormwater runoff by wood filters. *Journal of Contaminant Hydrology* 91 : 43-57 (2007)
- Braeckevelt M., Rokadia H., Imfeld G., Stelzer N., Paschke H., Kusch P., Kästner M., Richnow H.-H., Weber S. Assessment of *in situ* biodegradation of monochlorobenzene in contaminated groundwater treated in a constructed wetland. *Environmental Pollution* 148 : 428-437 (2007)
- Braeckevelt M., Mirschel G., Wiessner A., Rueckert M., Reiche N., Vogt C., Schultz A., Paschke H., Kusch P., Kaestner M. Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecological Engineering* 33 : 45-53 (2008)
- Braskerud B.C., Haarstad K. Screening the retention of thirteen pesticides in a small constructed wetland. *Water Science and Technology* 48 (5) : 267-274 (2003)
- Braud A., Jezequel K., Bazot S., Lebeau T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74 (2) : 280-286 (2009)
- Breguet V., Boucher J., Pesquet F., Vojinovic V., vonStockar U., Marison I.W. Immobilization of rapeseed press-cake in an alginate matrix for the sorption of atrazine. *Water Research* 42 : 1606-1612 (2008)
- Brigmon R.L., Bell N.C., Freedman D.L., Berry C.J. Natural attenuation of trichloroethylene in rhizosphere soils at the Savannah River Site. *Journal of soil Contamination* 7 (4) : 433-453 (1998)
- Briones Jr A.M., Reichardt W. Estimating microbial population counts by 'most probable number' using Microsoft Excel®. *Journal of Microbiological Methods* 35 : 157-161 (1999)
- Brix H. Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants - the root-zone method. *Water Science and Technology* 19 : 107-118 (1987)
- Buée M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321 : 189-212 (2009)
- Bujacz B., Wiczorek P., Krzysko-Lupicka T., Gola Z., Lejczak B., Kavfarski P. Organophosphonate Utilization by the wild-type strain of *Penicillium notatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8) : 2905-2910 (1995)

Bullock A, Acreman M. The role of wetlands in the hydrological cycle. *Hydrology and Earth System Sciences* 7 (3) : 358-389 (2003)

Busse M.D., Ratcliff A.W., Shestak C.J., Powers R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 33 : 1777-1789 (2001)

C

Calheiros C.S.C., Duque A.F., Moura A., Henriques I.S., Correia A., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. Changes in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology* 100 : 3228-3235 (2009)

Capelli S.M., Busalmen J.P., de Sanchez S.R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 47 : 233-238 (2001)

Carafa R., Wollgast J., Canuti E., Lighthart J., Dueri S., Hanke G., Eisenreich S.J., Viaroli P., Zaldívar J.M. Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69 : 1625-1637 (2007)

Cardone A., Comitato R., Angelini F. Spermatogenesis, epididymis morphology and plasma sex steroid secretion in the male lizard *Podarcis sicula* exposed to diuron. *Environmental Research* 108 : 214-223 (2008)

Carlsen S.C.K., Spliid N.H., Svensmark B. Drift of 10 herbicides after tractor spray application. 2. Primary drift (droplet drift). *Chemosphere* 64 (5) : 778-786 (2006)

Carter A. How pesticides get into water – and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook* 11 : 149-156 (2000)

Casida J.E. Pest toxicology : the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research in Toxicology* 22 : 609-619 (2009)

Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology* 16 (2) : 79-101 (1996)

Castillo M.A., Felisa N., Aragon P., Cuesta G., Sabater C. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58 (3-4) : 196-202 (2006)

Causserand C., Aimar P., Cravedi J.P., Singland E. Dichloroaniline retention by nanofiltration membranes. *Water Research* 39 : 1594-1600 (2005)

Cavalca L., Colombo M., Larcher S., Gigliotti C., Collina E., Andreoni V. Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus* sp. strain 1BN in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology* 92 : 1058-1065 (2002)

Cederlund H., Börjesson E., Onneby K., Stenström J. Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast. *Soil Biology and Biochemistry* 39 : 473-484 (2007)

Celis E., Elefsiniotis P., Singhal N. Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. *Water Research* 42 : 3218-3224 (2008)

Chaplain V., Barriuso E., Dur J.C., Vergnet C. Influence of the formulation on the sorption and the mobility of diuron in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66 : 664-670 (2001)

Chen S.-S., Taylor J.S., Mulford L.A., Norris C.D. Influences of molecular weight, molecular size, flux, and recovery for aromatic pesticide removal by nanofiltration membranes. *Desalination* 160 : 103-111 (2004)

- Chen C.Y., Wang Y.J., Yang C.F. Estimating low-toxic-effect concentrations in closed-system algal toxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (5) : 1514-1522 (2009)
- Cheng S., Vidakovic-Cifrek Z., Grosse W., Karrenbrock F. Xenobiotics removal from polluted water by a multifunctional constructed wetland. *Chemosphere* 48 : 415-418 (2002)
- Chernyak S.M., Rice C.P., McConnell L.L. Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. *Marine Pollution Bulletin* 32 (5) : 410-419 (1996)
- Ciglasch H., Amelung W., Totrakool S., Kaupenjohann M. Water flow patterns and pesticide fluxes in an upland soil in northern Thailand. *European Journal of Soil Science* 56 : 765-777 (2005)
- Cirja M., Hommes G., Ivashechkin P., Prell J., Schäffer A., Corvini P.F.X., Lenz M. Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 : 183-189 (2009)
- Claver A., Ormad P., Rodriguez L, Ovelleiro J.L. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64 : 1437-1443 (2006)
- Clementi M., Tiboni G.M., Causin R., La Rocca C., Maranghi F., Raffagnato F., Tenconi R. Pesticides and fertility: an epidemiological study in Northeast Italy and review of the literature. *Reproductive Toxicology* 26 : 13-18 (2008)
- Coleman J.O.D., Blake-KaJff M.M.A., Emyr Davies T.G. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2 (4) : 144-151 (1997)
- Colosio C., Tiramani M., Maroni M. Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. *NeuroToxicology* 24 : 577-591 (2003)
- Colten C.E. Groundwater contamination: reconstructing historical knowledge for the courts. *Applied Geography* 18 (3) : 259-273 (1998)
- Comoretto L., Arfib B., Talva R., Chauvelon P., Pichaud M., Chiron S., Höhener P. Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): Field study and modeling. *Environmental Pollution* 151 : 486-493 (2008)
- Conkle J.L., White J.R., Metcalfe C.D. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere* 73 : 1741-1748 (2008)
- Contardo-Jara V., Klingelmann E., Wiegand C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution* 157 : 57-63 (2009)
- Corgié S.C., Joner E.J., Leyval C. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil* 257 : 143-150 (2003)
- Covelo E.F., Vega F.A., Andrade M.L. Competitive sorption and desorption of heavy metals by individual soil components. *Journal of Hazardous Materials* 140 : 308-315 (2007)
- Csutoras C., Kiss A. Efficient method for the characterization of the interaction of pesticides with different soil samples. *Microchemical Journal* 85 (1) : 21-24 (2007)
- Cullington J.E., Walker A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 31 : 677-686 (1999)
- Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. Phytoremediation of contaminated soils. *Tibtech* 13 : 393-397 (1995)
- Cycon M., Piotrowska-Seget Z. Changes in bacterial diversity and community structure following pesticides addition to soil estimated by cultivation technique. *Ecotoxicology* 18 : 632-642 (2009)

D

- Dabrowski J.M., Bollen A., Bennett E.R., Schulz R. Pesticide interception by emergent aquatic macrophytes: Potential to mitigate spray-drift input in agricultural streams. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 111 : 340-348 (2005)
- Dadhwal M., Singh A., Prakash O., Gupta S.K., Kumari K., Sharma P., Jit S., Verma M., Holliger C., Lal R. Proposal of biostimulation for hexachlorocyclohexane (HCH)-decontamination and characterization of culturable bacterial community from high-dose point HCH-contaminated soils. *Journal of Applied Microbiology* 106 : 381-392 (2009)
- Dams R.I., Paton G., Killham K. Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic systems. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60 : 171-177 (2007a)
- Dams R.I., Paton G.I., Killham K. Rhizoremediation of pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Chemosphere* 68 : 864-870 (2007b)
- Davis C., Cort T., Dai D., Illangasekare T.H., Munakata-Marr J. Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel. *Biodegradation* 14 : 373-384 (2003)
- Davies L.C. , Cabrita G.J.M., Ferreira R.A., Carias C.C., Novais J.M., Martins-Dias S. Integrated study of the role of *Phragmites australis* in azo-dye treatment in a constructed wetland: From pilot to molecular scale. *Ecological Engineering* 35 : 961-970 (2009)
- De Jonge H., De Jonge L.W. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere* 39 (5) : 753-763 (1999)
- De Jonge H., De Jonge L.W., Jacobsen O.H., Yamaguchi T., Moldrup P. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science* 166 : 230-238 (2001)
- Dejonghe W., Goris J., Dierickx A., De Dobbeleer V., Crul K., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. Diversity of 3-chloroaniline and 3,4-dichloroaniline degrading bacteria isolated from three different soils and involvement of their plasmids in chloroaniline degradation. *FEMS Microbiology Ecology* 42 : 315-325 (2002)
- Dejonghe W., Berteloot E., Goris J., Boon N., Crul K., Maertens S., Höfte M., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3) : 1532-1541 (2003)
- De Leij F.A.A.M., Whipps J.M., Lynch J.M. The Use of Colony Development for the Characterization of Bacterial Communities in Soil and on Roots. *Microbial Ecology* 27 : 81-97 (1993)
- Delille D, Pelletier E. Natural attenuation of diesel-oil contamination in a subantarctic soil (Crozet Island). *Polar Biology* 25 (9) : 682-687 (2002)
- Dellamatrice P.M., Monteiro R.T.R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47 (6) : 999-1003 (2004)
- Delle Site A. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal Of Physical And Chemical Reference Data* 30 (1) : 187-439 (2000)
- De Silva P.M.C.S., Pathiratne A., van Gestel C.A.M. Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. *Chemosphere* 76 (10) : 1410-1415 (2009)
- Devlin J.F., Katic D., Barker J.F. In situ sequenced bioremediation of mixed contaminants in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology* 69 : 233-261 (2004)

- De Wilde T., Spanoghe P., Ryckeboer J., Jaeken P., Springael D. Sorption characteristics of pesticides on matrix substrates used in biopurification systems. *Chemosphere* 75 : 100-108 (2009)
- Dick R.E., Quinn J.P. Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiology Letters* 134 : 177-182 (1995a)
- Dick R.E., Quinn J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43 : 545-550 (1995)
- Dideriksen K., Stipp S.L.S. The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: A molecular-scale atomic force microscopy study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67 (18) : 3313-3327 (2003)
- Dion H.M., Harsh J.B., Hill H.H. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 249 (2) : 385-390 (2001)
- Domagalski J. Pesticides and pesticide degradation products in stormwater runoff: Sacramento river basin California. *Water Resources Bulletin* 32 (5) : 953-964 (1996)
- Domde P., Kapley A., Purohit H.J. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environmental Science Pollution Research* 14 (1) : 7-11 (2007)
- Dordio A.V., Teimão J., Ramalho I., Carvalho A.J.P., Candeias A.J.E. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of the Total Environment* 380 : 237-246 (2007)
- Dorn P.B., Salanitro J.P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere* 40 : 419-426 (2000)
- Dos Santos J.B., Ferreira E.A., Kasuya M.C.M., da Silva A.A., de Oliveira Procopio S. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. *Crop Protection* 24 : 543-547 (2005)
- Doublet J., Mamy L., Barriuso E. Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* 77 (4) : 582-589 (2009)
- Dousset S., Chauvin C., Durlot P., Thévenot M. Transfer of hexazinone and glyphosate through undisturbed soil columns in soils under Christmas tree cultivation. *Chemosphere* 57 : 265-272 (2004)
- Drenovsky R.E., Vo D., Graham K.J., Scow K.M. Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition. *Microbial Ecology* 48 : 424-430 (2004)
- Dronnet V.M., Axelos M.A.V., Renard C.M.G.C. and Thibault J.-F. Improvement of the binding capacity of metal cations by sugar-beet pulp. 2. Binding of divalent metal cations by modified sugar-beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 35 : 239-241 (1998)
- Duquenne P., Parekh N.R., Catroux G., Fournier J.-C. Effect of inoculant density, formulation, dispersion and soil nutrient amendment on the removal of carbofuran residues from contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (12) : 1805-1811 (1996)
- Duquenne P., Chenu C., Richard G., Catroux G. Effect of carbon source supply and its location on competition between inoculated and established bacterial strains in sterile soil microcosm. *FEMS Microbiology Ecology* 29 : 331-339 (1999)
- Dusek J., Pícek T., Cízková H. Redox potential dynamics in a horizontal subsurface flow constructed wetland for wastewater treatment: Diel, seasonal and spatial fluctuations. *Ecological Engineering* 34 : 223-232 (2008)
- Dvorska A., Lammel G., Klanova J., Holoubek I. Kositice, Czech Republic – ten years of air pollution monitoring and four years of evaluating the origin of persistent organic pollutants *Environmental Pollution* 156 (2) : 403-408

(2008)

E

Egamberdiyeva D. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168 (1) : 94-99 (2005)

El-Deeb B.A., Soltan S.M., Ali A.M., Ali K.A. Detoxication of the herbicide diuron by *Pseudomonas* sp. *Folia Microbiologica* 45 (3) : 211-216 (2000)

El-Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W., Top E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3) : 982-988 (1999)

El-Fantroussi S. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12) : 5110-5115 (2000)

El-Fantroussi S., Agathos S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation ? *Current Opinion in Microbiology* 8 : 268-275 (2005)

El-Shenawy N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (3) : 379-385 (2009)

Ellis P.A., Camper N.D. Aerobic degradation of diuron by aquatic microorganisms. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Food contaminants and Agricultural Wastes* 17 (3) : 277-289 (1982)

Engloner A.I. Structure, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*) – A review. *Flora* 204 : 331-346 (2009)

Eriksson E., Baun A., Scholes L., Ledin A., Ahlman S., Revitt M., Noutsopoulos C., Mikkelsen P.S. Selected stormwater priority pollutants — a European perspective. *Science of the Total Environment* 383 : 41-51 (2007)

Esposito E., Paulillo S.M., Manfio G.P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomycetes. *Chemosphere* 37 (3) : 541-548 (1998)

Esteve K., Poupot C., Mietton-Peuchot M., Milisic V. Nouveau procédé de bio-élimination combinée des effluents vitivinicoles. (2007)

F

Farenhorst A. Importance of Soil organic matter fractions in soil-landscape and regional assessments of pesticide sorption and leaching in soil. *Soil Science Society Of America Journal* 70 : 1005-1012 (2006)

Farenhorst A., McQueen D.A.R., Saiyed I., Hilderbrand C., Li S., Lobb D.A., Messing P., Schumacher T.E., Papiernik S.K., Lindstrom M.J. Variations in soil properties and herbicide sorption coefficients with depth in relation to PRZM (pesticide root zone model) calculations. *Geoderma* 150 : 267-277 (2009)

Fauchon N., Branchereau V., Heim V., Guery B. Variabilité intra et pluri-annuelle des concentrations de phytosanitaires dans les rivières d'Ile-de-France. *AFPP* (2007)

Faulwetter J.L., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc F., Burra M.D., Brisson J., Camper A.K., Stein O.R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering* 35 (6) : 987-1004

(2009)

Felske A., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. Quantification of 16S rRNA in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* 64 : 4581-4587 (1998)

Fernandez-Bayo J.D., Nogales R., Romero J. Evaluation of the sorption process for imidacloprid and diuron in eight agricultural soils from southern Europe using various kinetic models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 : 5266-5272 (2008)

Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5 : 164-166 (1989)

Field J.A., Reed R.L., Sawyer T.E., Griffith S.M., Wigington Jr P.J. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *Journal of Environmental Quality* 32 : 171-179 (2003)

Fierer N., Schimel J.P. Effects of drying+rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry* 34 : 777-787 (2002)

Fleegeer J.W., Carman K.R., Nisbeta R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* 317 : 207-233 (2003)

Flores-Céspedes F., Fernández-Pérez M., Villafranca-Sánchez M., González-Pradas E. Cosorption study of organic pollutants and dissolved organic matter in a soil. *Environmental Pollution* 142 : 449-456 (2006)

Flury M. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils – A review. *Journal of Environmental Quality* 25 (1) : 25-45 (1996)

Fontecha-Camara M.A., Lopez-Ramon M.V.L., Pastrana-Martinez L.M., Moreno-Castilla C. Kinetics of diuron and amitrole adsorption from aqueous solution on activated carbons. *Journal of Hazardous Materials* 156 : 472-477 (2008)

Forlani G., Mangiagalli A., Nielsen E., Suardi C.M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 31 : 991-997 (1999)

Fratila-Apachitei L.E., Hirst J.A., Siebel M.A., Gijzen H.J. Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media. *Biotechnology Letters* 21 : 147-154 (1999)

Freemark K., Boutin C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 52 : 67-91 (1995)

Freundlich H.M.F. Über die adsorption in Lösungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 57 : 385-470 (1906)

Frimmel F.H., Assenmacher M., Sørensen M., Abbt-Braun G., Gräbe G. Removal of hydrophilic pollutants from water with organic adsorption polymers Part I. Adsorption behaviour of selected model compounds. *Chemical Engineering and Processing* 38 : 601-610 (1999)

Fu S., Cheng H.-X., Liu Y.-H., Xu X.-B. Levels and distribution of organochlorine pesticides in various media in a mega-city, China. *Chemosphere* 75 : 588-594 (2009a)

Fu S., Fan H., Liu S., Liu Y., Liu Z. A bioaugmentation failure caused by phage infection and weak biofilm formation ability. *Journal of Environmental Sciences* 21 : 1153-1161 (2009b)

G

- Gao J.P., Maguhn J., Spitzauer P., Kettrup A. Sorption of pesticides in the sediment of the teufelsweiher pond (Southern Germany). II: competitive adsorption, desorption of aged residues and effect of dissolved organic carbon. *Water Research* 32 (7) : 2089-2094 (1998)
- Garcinuno R.M., Fernandez Hernando P., Camara C. Removal of carbaryl, linuron, and permethrin by *Lupinus angustifolius* under hydroponic conditions. *Agriculture and Food Chemistry* 54 : 5034-5039 (2006)
- Garmouma M., Blanchard M., Chesterikoff A., Ansart P., Chevreuril M. Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin : Mèlarchez (France) *Water Research* 31 (6) : 1489-1503 (1997)
- Garry V.F. Pesticides and children. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198 : 152-163 (2004)
- Gasnier C., Dumont C., Benachour N., Clair E., Chagnon M.-C., Séralini G.-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262 : 184-191 (2009)
- Gavrilescu M. Fate of Pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5 (6) : 497-526 (2005)
- Gentry T.J., Rensing C., Pepper I.L. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34 : 447-494 (2004a)
- Gentry T.J., Josephson K.L., Pepper I.L. Functional establishment of introduced chlorobenzoate degraders following bioaugmentation with newly activated soil. *Biodegradation* 15 : 67-75 (2004b)
- Gerhardt K.E., Huang X.-D., Glick B.R., Greenberg B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges *Plant Science* 176 : 20-30 (2009)
- Getenga Z.M., Kengara F.O. Mineralization of glyphosate in compost-amended soil under controlled conditions. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology* 72 : 266-275 (2004)
- Gevao B., Semple K.T., Jones K.C. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108 : 3-14 (2000)
- Ghanem A., Bados P., Estaun A.B., de Alencastro L.F., Taibi S., Einhorn J., Mougin C. Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69 : 1368-1373 (2007)
- Ghodrati M., Jury W.A. A field-study of the effects of soil structure and irrigation method on preferential flow of pesticides in unsaturated soil. *Journal of Contaminant Hydrology* 11 (1-2) : 101-125 (1992)
- Giacomazzi S., Cochet N. Environmental impact of diuron transformation - a review. *Chemosphere* 56 : 1021-1032 (2004)
- Gianotti V., Benzi M., Croce G., Frascarolo P., Gosetti F., Mazzucco E., Bottaro M., Gennaro M.C. The use of clays to sequester organic pollutants. Leaching experiments. *Chemosphere* 73 : 1731-1736 (2008)
- Gimsing A.L., Borggaard O.K., Jacobsen O.S., Aamand J., Sørensen J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* 27 : 233-242 (2004)
- Gimsing A.L., Borggaard O.K. Phosphate and glyphosate adsorption by hematite and ferrihydrite and comparison with other variable-charge minerals. *Clays and Clay Minerals* 55 (1) : 108-114 (2007)
- Goldsborough L.G., Brown D.J. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12 (7) : 1139-1147 (1993)
- Golovchenko A.V., Tikhonova E.Y., Zvyagintsev D.G. Abundance, biomass, structure, and activity of the microbial complexes of minerotrophic and ombrotrophic peatlands. *Microbiology* 76 (5) : 630-637 (2007)

- Gomez E., Ferreras L., Lovottia L., Fernandez E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45 (2) : 163-167 (2009)
- Gonzalez-Pradas E., Villafranca-Sanchez M., Fernandez-Perez M., Socias-Viciano M., Urena-Amate M.D. Sorption and leaching of diuron on natural and peat-amended calcareous soil from Spain. *Water Research* 32 (9) : 2814-2820 (1998)
- Gonzalez-Pradas E., Fernandez-Perez M., Flores-Cespedes F., Villafranca-Sanchez M., Urena-Amate M.D., Socias-Viciano M., Garrido-Herrera F. Effects of dissolved organic carbon on sorption of 3,4-dichloroaniline and 4-bromoaniline in a calcareous soil. *Chemosphere* 59 : 721-728 (2005)
- Goody D.C., Chilton P.J., Harrison I. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *The Science of the Total Environment* 297 : 67-83 (2002)
- Gosselin F. Redefining ecological engineering to promote its integration with sustainable development and tighten its links with the whole of ecology *Ecological Engineering* 32 : 199-205 (2008)
- Gouy V., Dur J.-C., Calvet R., Belamie R., Chaplain V. Influence of adsorption-desorption phenomena on pesticide run-off from soil using simulated rainfall. *Pesticide Science* 55 : 175-182 (1999)
- Gouy V., Gril J.J., Lacas J.-G., Boivin A., Carluier N. Contamination des eaux de surface par les pesticides et rôle des zones tampon pour en limiter le transfert : état des connaissances et conséquences pour l'action. *Ingénieries n° spécial* : 49-63 (2008)
- Gregoire C., Elsaesser D., Huguenot D., Lange J., Lebeau T., Merli A., Mose R., Passeport E., Payraudeau S., Schütz T., Schulz R., Tapia-Padilla G., Tournebize J., Trevisan M., Wanko A. Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. *Environmental Chemistry Letters* 7 (3) : 205-231 (2009)
- Grenni P., Barra Caracciolo A., Rodriguez-Cruz M.S., Sanchez-Martina M.J. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. *Applied Soil Ecology* 41 : 2-7 (2009)
- Grundmann S., Fuß R., Schmid M., Laschinger M., Ruth B., Schulin R., Munch J.-C., Reiner Schroll R. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere* 68 : 511-517 (2007)
- Guo S., Li Y., Liu L., Hua X. Adsorption of Pb and Cd on the natural surface coatings (NSCs) in the presence of organochlorine pesticides: A preliminary investigation. *Journal of Environmental Management* 88 : 147-153 (2008)
- Gutierrez A., Baran N. Long-term transfer of diffuse pollution at catchment scale: Respective roles of soil, and the unsaturated and saturated zones (Brévilles, France). *Journal of Hydrology* 369 : 381-391 (2009)
- Gutknecht J.L.M., Goodman R.M., Balsler T.C. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. *Plant Soil* 289 : 17-34 (2006)
- Guzzella L., Capri E., Di Corcia A., Barra Carracciolo A., Giuliano G. Fate of diuron and linuron in a field lysimeter experiment. *Journal of Environmental Quality* 35 : 312-323 (2006a)
- Guzzella L., Pozzoni F., Giuliano G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environmental Pollution* 142 : 344-353 (2006b)
- Gypens N., Lancelot C., Soetaert K. Simple parameterisations for describing N and P diagenetic processes: Application in the North Sea. *Progress in Oceanography* 76 : 89-110 (2008)

H

- Haarstad K., Braskerud B.C. Pesticide retention in the watershed and in a small constructed wetland treating diffuse pollution. *Water Science and Technology* 51 (3-4) : 143-150 (2005)

- Hallas L.E., Hahn M.H., Korndorfer C. Characterization of microbial traits associated with glyphosate degradation in industrial activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology* 3 : 377-385 (1988)
- Hartgers E.M., Renaalderink G.H., Van den Brink P.J., Gylstra R., Wiegman J.W.F., Brock T.C.M. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquatic Ecology* 32 : 135-152 (1998)
- Hartmann M., Frey B., Kflliker R., Widmer F. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *Journal of Microbiological Methods* 61 : 349-360 (2005)
- Hashimoto T., Hattori T. Grouping of soil bacteria by analysis of colony formation on agar plates. *Biology and Fertility of Soils* 7 : 198-201 (1989)
- Hatt B.E., Fletcher T.D., Deletic A. Hydrologic and pollutant removal performance of stormwater biofiltration systems at the field scale. *Journal of Hydrology* 365 : 310-321 (2009)
- Henderson K.L.D., Belden J.B., Zhao S., Coatsa J.R. Phytoremediation of pesticide wastes in soil. *Zeitschrift Naturforschung* 61 : 213-221 (2006)
- Heuer H., Hartung K., Wieland G., Kramer I., Smalla K. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S-RNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 1045-1049 (1999)
- Hofstetter T.B., Schwarzenbach R.P., Bernasconi S.M. Assessing Transformation Processes of Organic Compounds Using Stable Isotope Fractionation. *Environmental Science and Technology* 42 (21) : 7737-7743 (2008)
- Höhener P., Hunkeler D., Hess A., Bregnard T., Zeyer J. Methodology for the evaluation of engineered in situ bioremediation: lessons from a case study. *Journal of Microbiological Methods* 32 : 179-192 (1998)
- Hollinger E., Cornisha P.S., Baginska B., Mann R., Kuczer G. Farm-scale stormwater losses of sediment and nutrients from a market garden near Sydney, Australia. *Agricultural Water Management* 47 : 227-241 (2001)
- Honders A., Maas T., Gadella J.M. *Ex-situ* treatment of contaminated soil - the Dutch experience *Service Centre Grond* (2003)
- Hu S.J., van Bruggen A.H.C., Grünwald N.J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Applied Soil Ecology* 13 : 21-30 (1999)
- Huang J., Su Z., Xu Y. The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. *Journal of Molecular Evolution* 61 : 682-690 (2005)
- Hund-Rinke K., Simon M. Terrestrial ecotoxicity of eight chemicals in a systematic approach. *Journal of Soils and Sediments* 55 (1) : 59-65 (2005)
- Hunkeler D., Höhener P., Bernasconi S., Zeyer J. Engineered in situ bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer: assessment of mineralization based on alkalinity, inorganic carbon and stable carbon isotope balances. *Journal of Contaminant Hydrology* 37 : 201-223 (1999)
- Hussain S., Siddique T., Arshad M., Saleem M. Bioremediation and Phytoremediation of Pesticides: Recent Advances. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 39 (10) : 843-907 (2009)

I

Ibañez M., Pozo O.J., Sancho J.V., Lopez F.J., Hernández F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem

mass spectrometry *Journal of Chromatography A* 1081 : 145-155 (2005)

Imfeld G., Estop Aragonés C., Zeiger S., Vitzthum von Eckstadt C., Paschke H., Trabitsh R., Weiss H., Richnow H.-H. Tracking in situ Biodegradation of 1,2-Dichloroethenes in a Model Wetland. *Environmental Science and Technology* 42 (21) : 7924-7930 (2008)

Imfeld G., Braeckevelt M., Kusch P., Richnow H.H. Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74 : 349-362 (2009)

Iovieno P., Bååth E. Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 65 : 400-407 (2008)

Irace-Guigand S., Aaron J.J. The role of organic colloids in herbicide transfer to rivers: a quantitative study of triazine and phenylurea interactions with colloids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 : 431-435 (2003)

Ivanov V.N., Wang J.-Y., Stabnikova O.V., Tay S.T.-L., Tay J.-H. Microbiological monitoring in the biodegradation of sewage sludge and food waste. *Journal of Applied Microbiology* 96 : 641-647 (2004)

Iwamoto T., Nasu M. Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (1) : 1-8 (2001)

J

Jackson C.R., Liew K.C., Yule C.M. Structural and functional changes with depth in microbial communities in a tropical Malaysian peat swamp forest. *Microbial Ecology* 57 : 402-412 (2009)

Jacob G.S., Garbow J.R., Hallas L.E., Kimack N.M., Kishore G.M., Schaefer J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12) : 2953-2958 (1988)

Jacobson A.R., Dousset S., Guichard N., Baveye P., Andreux F. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. *Environmental Pollution* 138 : 250-259 (2005)

Jansson J.K., Björklöf K., Elvang A.M., Jørgensen K.S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. *Environmental Pollution* 107 : 217-223 (2000)

Jones K.C., de Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution* 100 : 209-221 (1999)

Jones R. The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. *Marine Pollution Bulletin* 51 : 495-506 (2005)

Joner E.J., Corgié S.C., Amellal N., Leyval C. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 34 : 859-864 (2002)

Jouanneau Y., Willison J.C., Meyer C., Krivobok S., Chevron N., Besombes J.-L., Blake G. Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environmental Science and Technology* 39 (15) : 5729-5735 (2005)

Ju Y.-H., Chen T.-C., Liu J.C. A study on the biosorption of lindane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 9 : 187-196 (1997)

K

Kadir S., Al-Khatib K. Weed control in grape after fall and spring application of selected herbicides. *Weed*

Technology 20 (1) : 74-80 (2006)

Kaksonen A.H., Jussila M.M., Lindstrom K., Suominen L. Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38 : 817-827 (2006)

Kanagawa T. Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (4) : 317-323 (2003)

Kennedy G., Mayer T. Natural and constructed wetlands in Canada: An overview. *Water Quality Research Journal of Canada* 37 (2) : 295-325 (2002)

Kent Moore J., Braymer H.D., Larson A.D. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (2) : 316-320 (1983)

Khadrani A., Seigle-Murandi F., Steiman R., Vroumsia T. Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil. *Chemosphere* 38 (13) : 3041-3050 (1999)

Khan F.I., Husain T., Hejazi R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* 71 : 95-122 (2004)

Khrolenko M.V., Wieczorek P.P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A* 1093 : 111-117 (2005)

Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58 : 169-188 (2004)

Kishore G.M., Jacob G.S. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG1982 via a sarcosine intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (25) : 12164-12168 (1987)

Kitada Y., Kawahata H., Suzuki A., Oomori T. Distribution of pesticides and bisphenol A in sediments collected from rivers adjacent to coral reefs *Chemosphere* 71 : 2082-2090 (2008)

Klimek M., Lejczak B., Kafarski P., Forlani G. Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Management Science* 57 : 815-821 (2001)

Knauert S., Escher B., Singer H., Hollender J., Knauer K. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (Atrazine, Isoproturon, and Diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environmental Science and Technology* 42 : 6424-6430 (2008)

Knauert S., Singer H., Hollender J., Knauer K. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. *Environmental pollution* 158 (1) : 167-174 (2010)

Koelmans A.A., Jonker M.T.O., Cornelissen G., Bucheli T.D., Van Noort P.C.M., Gustafsson O. Black carbon: The reverse of its dark side. *Chemosphere* 63 (3) : 365-377 (2006)

Kolic N.U., Hrsaka D., Kolar A.B., Petrica I., Stipicevic S., Soulas G., Martin-Laurent F. Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60 : 299-307 (2007)

Kools S.A.E., van Roover M., van Gestel C.A.M., van Straalen N.M. Glyphosate degradation as a soil health indicator for heavy metal polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37 : 1303-1307 (2005)

Kookana R.S., Baskaran S., Naidu R. Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review. *Australian Journal Of Soil Research* 36 (5) : 715-764 (1998)

- Kotsou M., Mari I., Lasaridi K., Chatzipavlidis I., Balis C., Kyriacou A. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology* 26 : 113-121 (2004)
- Kozdroj J., van Elsas J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 32 : 1405-1417 (2000)
- Krasnits E., Friedler E., Sabbah I., Beliaevski M., Tarre S., Green M. Spatial distribution of major microbial groups in a well established constructed wetland treating municipal wastewater. *Ecological Engineering* 35 (7) : 1085-1089 (2009)
- Kreuger J. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *The Science of the Total Environment* 216 : 227-251 (1998)
- Kröger R., Moore M.T., Locke M.A., Cullum R.F., Steinriede Jr. R.W., Testa III S., Bryant C.T., Cooper C.M. Evaluating the influence of wetland vegetation on chemical residence time in Mississippi Delta drainage ditches. *Agricultural Water Management* 96 : 1175-1179 (2009)
- Krogh K.A., Halling-Sørensen B., Mogensen B.B., Vejrup K.V. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50 : 871-901 (2003)
- Kruijt M., Tran H., Raaijmakers J.M. Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of Applied Microbiology* 107 (2) 546-556 (2009)
- Krzysko-Lupicka T., Orlik A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* 34 (12) : 2601-2605 (1997a)
- Krzysko-Lupicka T., Strof W., Kubs K., Skorupa M., Wieczorek P., Lejczak B., Kafarski P. The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 : 549-552 (1997b)
- Kuiper I., Lagnedijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. Rhizoremediation : a beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17 (1) : 6-15 (2004)
- Kuklinsky-Sobral J., Araujo W.L., Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil* 273 : 91-99 (2005)
- Kurniawan, T.A., Chan G.Y.S., Lo W.H., Babel S. Comparisons of low-cost adsorbents for treating wastewaters laden with heavy metals. *Science of The Total Environment* 366 (2-3) : 409-426 (2006)

L

- Landau-Ossondo M., Rabia N., Jos-Pelage J., Marquet L.M., Isidore Y., Saint-Aimé C., Martin M., Irigaray P., Belpomme D. Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 63 : 383-395 (2009)
- Landry D., Dousset S., Andreux F. Laboratory leaching studies of oryzalin and diuron through three undisturbed vineyard soil columns. *Chemosphere* 54 : 735-742 (2004)
- Landry D., Dousset S., Andreux F. Leaching of oryzalin and diuron through undisturbed vineyard soil columns under outdoor conditions. *Chemosphere* 62 (10) : 1736-1747 (2006)
- Langenbach T., Schroll R., Paim S. Fate and distribution of ¹⁴C-atrazine in a tropical oxisol. *Chemosphere* 40 : 449-455 (2000)

- Lanyi K. Assessment of the relations between the spectroscopic characteristics of soils and their ability to adsorb organic pollutants. *Microchemical Journal* 79 : 249-256 (2005)
- Lao S.-H., Loutre C., Brazier M., Coleman J.O.D., Cole D.J., Edwards R., Theodoulou F.L. 3,4-dichloroaniline is detoxified and exported via different pathways in *Arabidopsis* and soybean *Phytochemistry* 63 : 653-661 (2003)
- Lapertot M.E., Pulgarin C. Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: Choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity. *Chemosphere* 65 : 682-690 (2006)
- Lapworth D.J., Goody D.C. Source and persistence of pesticides in a semi-confined chalk aquifer of southeast England. *Environmental pollution* 144 : 1031-1044 (2006)
- Lear G., Harbottle M.J., Sills G., Knowles C.J., Semple K.T., Thompson I.P. Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil. *Environmental Pollution* 146 : 139-146 (2007)
- Lebeau T. Traitement des pesticides dans les zones humides artificielles : de l'atténuation naturelle à la gestion par bioremédiation et phytoremédiation. *Ingénieries* n° spécial : 87-102 (2008)
- Lebeau T., Braud A., Jézéquel K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* 153 : 497-522 (2008)
- Leglize P., Saada A., Berthelin J., Leyval C. Adsorption of phenanthrene on activated carbon increases mineralization rate by specific bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 151 : 339-347 (2008)
- Lehrfeld J. Conversion of agricultural residues into cation exchange materials. *Journal Of Applied Polymer Science* 61 (12) : 2099-2105 (1996)
- Leistra M., Matser A.M. Adsorption, transformation, and bioavailability of the fungicides carbendazim and iprodione in soil, alone and in combination. *Journal of Environmental Science and Health Part B - Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 39 (1) : 1-17 (2004)
- Lendvay J.M., Löffler F.E., Dollhopf M., Aiello M.R., Daniels G., Fathepure B.Z., Gebhard M., Heine R., Helton R., Shi J., Krajmanlik-Brown R., Major Jr C.L., Barcelona M.J., Petrovskis E., Hickey R., Tiedje J.M., Adriaens P. Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science and Technology* 37 : 1422-1431 (2003)
- Lennartz B., Louchart X., Voltz M., Andrieux P. Diuron and simazine losses to runoff water in Mediterranean vineyards. *Journal of Environmental Quality* 26 : 1493-1502 (1997)
- Lennartz B., Louchart X. Effect of drying on the desorption of diuron and terbuthylazine from natural soils. *Environmental Pollution* 146 (1) : 180-187 (2007)
- Lerbs W., Stock M., Parthier B. Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes spec.* strain GL. *Archives of Microbiology* 153 (2) : 146-150 (1990)
- Li K., Baoshan Xing B., Torello W.A. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environmental Pollution* 134 : 187-194 (2005)
- Li K.-B., Cheng J.-T., Wang X.-F., Zhou Y., Liu W.-P. Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. *Pedosphere* 18 (2) : 265-272 (2008)
- Li X., Lin X., Li P., Liu W., Wang L., Ma F., Chukwuka K.S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials* 172 (2-3) : 601-605 (2009)
- Liao M., Xie X. Effects of combination of plant and microorganism on degradation of simazine in soil. *Journal of Environmental Sciences* 20 : 195-198 (2008)

- Lima D., Viana P., André S., Chelinho S., Costa C., Ribeiro R., Sousa J.P., Fialho A.M., Viegas C.A. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches. *Chemosphere* 74 : 187-192 (2009)
- Lipok J., Owsiak Y., Młynarz P., Forlani G., Kafarski P. Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme and Microbial Technology* 41 : 286-291 (2007)
- Liu C.-M., McLean P.A., Sookdeo C.C., Cannon F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (6) : 1799-1804 (1991)
- Liu L., Jiang C.-Y., Liu X.-Y., Wu J.-F., Han J.-G., Liu S.-J. Plant–microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology* 9 (2) : 465-473 (2007)
- Liu M., Cheng S., Ou D., Yang Y., Liu H., Hou L., Gao L., Xu S. Organochlorine pesticides in surface sediments and suspended particulate matters from the Yangtze estuary, China. *Environmental Pollution* 156 : 168-173 (2008a)
- Liu J., Xie J., Chu Y., Sun C., Chen C., Wang Q. Combined effect of cypermethrin and copper on catalase activity in soil. *Journal of Soils and Sediments* 8 : 327-332 (2008b)
- Liu J., Lu X., Xie J., Chu Y., Sun C., Wang Q. Adsorption of lambda-cyhalothrin and cypermethrin on two typical Chinese soils as affected by copper. *Environment Science and Pollution Research* 16 : 414-422 (2009a)
- Liu W., Zhang Y.-B., Quan X., Jin Y.-H., Chen S. Effect of perfluorooctane sulfonate on toxicity and cell uptake of other compounds with different hydrophobicity in green alga. *Chemosphere* 75 (3) : 405-409 (2009b)
- Lopez-Ramon M.V., Fontecha-Camara M.A., Alvarez-Marino M.A., Moreno-Castilla C. Removal of diuron and amitrole from water under static and dynamic conditions using activated carbons in form of fibers, cloth, and grains. *Water Research* 41 : 2865-2870 (2007)
- Lorraine-Colwill D.F., Powles S.B., Hawkes T.R., Hollinshead P.H., Warner S.A.J., Preston C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74 : 62-72 (2003)
- Louchart X., Voltz M., Andrieux P. Dynamique de la mobilisation et du transfert du diuron par ruissellement. *Earth and Planetary Sciences* 331 : 475-481 (2000)
- Louchart X., Voltz M., Andrieux P., Moussa R. Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. *Journal of Environmental Quality* 30 : 982-991 (2001)
- Louchart X., Voltz M. Aging effects on the availability of herbicides to runoff transfer. *Environmental Science and Technology* 41 : 1137-1144 (2007)
- Lupwayi N.Z., Harker K.N., Clayton G.W., Turkington T.K., Rice W.A., O'Donovan J.T. Soil microbial biomass and diversity after herbicide application. *Canadian Journal of Plant Science* 84 (2) : 677-685 (2004)
- Lupwayi N.Z., Harker K.N., Clayton G.W., O'Donovan J.T., Blackshaw R.E. Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 129 : 171-176 (2009)

M

- Macek T., Macková M., Kás J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18 : 23-34 (2000)
- Machate T., Noll H., Behrens H., Kettrup A., Degradation of phenanthrene and hydraulic characteristics in a constructed wetland. *Water Research* 31 (3) : 554-560 (1997)

- Madhun Y.A., Young J.L., Freed V.H. Binding of herbicides by water-soluble organic materials from soil. *Journal of Environmental Quality* 15 : 64-68 (1986)
- Magnusson M., Heimann K., Negri A.P. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56 : 1545-1552 (2008)
- Malandrino M., Abollino O., Giacomino A., Aceto M., Menstati E. Adsorption of heavy metals on vermiculite: Influence of pH and organic ligands. *Journal of Colloid and Interface Science* 299 (2) : 537-546 (2006)
- Malik S., Michael Beer M., Megharaj M., Naidu R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* 34 : 265-276 (2008)
- Malone R.W., Shipitalo M.J., Wauchope R.D., Sumner H. Residual and contact herbicide transport through field lysimeters via preferential flow. *Journal of Environmental Quality* 33 : 2141-2148 (2004)
- Maltais-Landry G., Maranger R., Brisson J. Effect of artificial aeration and macrophyte species on nitrogen cycling and gas flux in constructed wetlands. *Ecological Engineering* 35 : 221-229 (2009)
- Mamy L., Barriuso E. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere* 61 : 844-855 (2005)
- Mamy L., Barriuso E. Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *European Journal of Soil Science* 58 : 174-187 (2007)
- Manas F., Peralta L., Raviolo J., Garcia Ovando H., Weyers A., Ugnia L., Gonzalez Cid M., Larripa I., Gorla N. Genotoxicity of Glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (1) : 37-41 (2009)
- Maqueda C., Morillo E., Undabeytia T., Martin F. Sorption of glyphosate and Cu(II) on a natural fulvic acid complex : mutual influence. *Chemosphere* 37 (6) : 1063-1072 (1998)
- Margesin R., Schinner F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7) : 3127-3133 (2001)
- Margoum C., Malessard C., Gouy V. Investigation of various physicochemical and environmental parameter influence on pesticide sorption to ditch bed substratum by means of experimental design. *Chemosphere* 63 : 1835-1841 (2006)
- Maron P.-A., Schimann H., Ranjard L., Brothier E., Domenach A.-M., Lensi R., Nazaret S. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology* 42 : 65-73 (2006)
- Marron-Montiel E., Ruiz-Ordaz N., Rubio-Granados C., Juarez-Ramirez C., Galindez-Mayer C.J. 2,4-D-degrading bacterial consortium : Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochemistry* 41 : 1521-1528 (2006)
- Matamoros V., Jaume Puigagut J., Joan Garcia J., Bayona J.M. Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: A preliminary screening. *Chemosphere* 69 : 1374-1380 (2007)
- Matamoros V., Aracelly Caselles-Osorio A., García J., Bayona J.M. Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. *Science of the Total Environment* 394 : 171-176 (2008)
- McAuliffe K.S., Hallas, L.E., Kulpa, C.F. 1Glyphosate degradation by *Agrobacterium radiobacter* isolated from activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology* 6 : 219-221 (1990)
- McGrath J.W., Ternan N.G., Quinn J.P. Utilization of organophosphonates by environmental micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 24 : 69-73 (1997)

- McGrath J.W., Kulakova A.N., Quinn J.P. A comparison of three bacterial phosphonoacetate hydrolases from different environmental sources. *Journal of Applied Microbiology* 86 : 834-840 (1999)
- McKinlay R.G., Kasperek K. Observations on decontamination of herbicide-polluted water by marsh plant systems. *Water Research* 33 (2) : 505-511 (1999)
- Meckenstock R.U. Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiology Letters* 177 : 67-73 (1999)
- Meckenstock R.U., Morasch B., Griebler C., Richnow H.-H. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology* 75 : 215-255 (2004)
- Menendez-Vega D., Gallego J.L.R., Pelaez A.I., Fernandez de Cordoba G., Moreno J., Munoz D., Sanchez J. Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* 43 : 310-321 (2007)
- Mentzer J.L., Goodman R.M., Balsler T.C. Microbial response over time to hydrologic and fertilization treatments in a simulated wet prairie. *Plant and Soil* 284 : 85-100 (2006)
- Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M., Bakker P.A.H.M. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* (2005) 6 (2) : 177-185 (2005)
- Miglioranza K.S.B., de Moreno J.E.A., Moreno V.J. Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina *Water Research* 38 : 1765-1772 (2004)
- Mijangos I., Becerril J.M., Albizu I., Epelde L., Garbisu C. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (3) : 505-513 (2009)
- Miller C.V., Foster G.D., Majedi B.F. Baseflow and stormflow metal fluxes from two small agricultural catchments in the Coastal Plain of the Chesapeake Bay Basin, United States. *Applied Geochemistry* 18 : 483-501 (2003)
- Mitchell C., Brodie J., White I. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday Region, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 51 : 23-36 (2005)
- Mo C.-H., Cai Q.-Y., Li H.-Q., Zeng Q.-Y., Tang S.-R., Zhao Y.-C. Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soils. *Chemosphere* 73 : 120-125 (2008)
- Monteiro M., Quintaneiro C., M. Pastorinho M., Pereira M.L., Morgado F., Guilhermino L., Soares A.M.V.M. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere* 62 : 1333-1339 (2006)
- Monteiro A., Lopes C.M. Influence of cover crop on water use and performance of vineyard in Mediterranean Portugal Agriculture. *Ecosystems and Environment* 121 : 336-342 (2007)
- Moore M.T., Rodgers Jr. J.H., Cooper C.M., Smith Jr. S. Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. *Environmental Pollution* 110 : 393-399 (2000)
- Moore M.T., Rodgers Jr. J.H., Smith Jr. S., Cooper C.M. Mitigation of metolachlor-associated agricultural runoff using constructed wetlands in Mississippi, USA. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 84 : 169-176 (2001)
- Moore M.T., Schulz R., Cooper C.M., Smith Jr. S., Rodgers Jr. J.H. Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. *Chemosphere* 46 : 827-835 (2002)
- Moran A.C., Müller A., Manzano M., Gonzalez B. Simazine treatment history determines a significant herbicide

degradation potential in soils that is not improved by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. *Journal of Applied Microbiology* 101 : 26-35 (2006)

Morillo E., Undabeytia T., Maqueda C., Ramos A. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. *Chemosphere* 40 : 103-107 (2000)

Morillo E., Undabeytia T., Maqueda C., Ramos A. The effect of dissolved glyphosate upon the sorption of copper by three selected soils. *Chemosphere* 47 : 747-752 (2002)

Muller M., Patureau D., Godon J.-J., Delgenès J.-P., Hernandez-Raquet G. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 : 691-701 (2010)

Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60 : 193-207 (2001)

Mulligan C.N., Yong R.N. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International* 30 : 587-601 (2004)

Munoz R., Alvarez M.T., Munoz A., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B. Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere* 63 : 903-911 (2006)

N

Nacamulli C., Bevivino A., Dalmastrì C., Tabacchioni S., Chiarini L. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology* 23 : 183-193 (1997)

Nascimento M.G., Cotrim Sartor de Oliveira M.L., Lima A.S., Viana de Camargo J.L. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology* 224 : 66-73 (2006)

Newcombe D.A., Crowley D.E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Applied and Microbiological Biotechnology* 51 : 877-882 (1999)

Newton M., Horner L.M., Cowell J.E., White D.E., Cole E.C. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42 (8) : 1795-1802 (1994)

Nguyen L.M. Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Ecological Engineering* 16 : 199-221 (2000)

Nicorarat D., Dick W.A., Dopson M., Tuovinen O.H. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (2) : 312-321 (2008)

Niemi R.M., Vepsäläinen M., Wallenius K., Erkoma K., Kukkonen S., Palojärvi A., Vestberg M. Conventional versus organic cropping and peat amendment: Impacts on soil microbiota and their activities. *European Journal of Soil Biology* 44 : 419-428 (2008)

Niemi R.M., Heiskanen I., Ahtiainen J.H., Rahkonen A., Mäntykoski K., Welling L., Laitinen P., Ruuttunen P. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Applied Soil Ecology* 41 (3) : 293-304 (2009)

Nikolausz M., Kappelmeyer U., Szekely A., Ruzsnyak A., Marialigeti K., Kästner M. Diurnal redox fluctuation and microbial activity in the rhizosphere of wetland plants. *European Journal of Soil Biology* 44 : 324-333 (2008)

Niu G.-L., Zhang J.-J., Zhao S., Liu H., Boon N., Zhou N.-Y. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environmental Pollution* 157 : 763-771 (2009)

Novak S.M., Portal J.-M., Schiavon M. Effects of soil type upon metolachlor losses in subsurface Drainage. *Chemosphere* 42 : 235-244 (2001)

Nurk K., Zaytsev I., Talpsep I., Truu J., Mander Ü. Bioaugmentation in a newly established LECA-based horizontal flow soil filter reduces the adaptation period and enhances denitrification. *Bioresource Technology* 100 (24) : 6284-6289 (2009)

Nyysönen M., Kapanen A., Piskonen R., Lukkari T., Itävaara M. Functional genes reveal the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following *in situ* biostimulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 : 169-182 (2009)

O

Obojska A., Lejczak B., Kubrak M. Degradation of phosphonates by streptomycete isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 : 872-876 (1999)

Obojska A., Ternan N.G., Lejczak B., Kafarski P., McMullan G. Organophosphonate Utilization by the Thermophile *Geobacillus caldxylosilyticus* T20. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4) : 2081-2084 (2002)

Obojska A., Lejczak B. Utilisation of structurally diverse organophosphonates by streptomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 : 557-563 (2003)

Ogier J.C., Son O., Gruss A., Tailliez P., Delacroix-Buchet A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68 : 3691-3701 (2002)

Olette R., Couderchet M., Biagianti S., Eullaffroy P. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. *Chemosphere* 70 : 1414-1421 (2008)

Olsen R.A., Bakken L.R. Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology* 13 : 59-74 (1987)

Orphan V.J. Methods for unveiling cryptic microbial partnerships in nature. *Current Opinion in Microbiology* 12 : 231-237 (2009)

P

Pang L., Close M.E. A field tracer study of attenuation of atrazine, hexazinone and procymidone in a pumice sand aquifer. *Pest Management Science* 57 : 1142-1150 (2001)

Park J.-H., Feng Y., Ji P., Voice T.C., Boyd S.A. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6) : 3288-3298 (2003)

Pascal-Lorber S., Rathahao E., Cravedi J.-P., Laurent F. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere* 56 : 275-284 (2004)

Pattanasupong A., Nagase H., Inoue M., Hirata K., Tani K., Nasu M., Miyamoto K. Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20 : 517-522 (2004)

Patureau D., Hernandez-Raquet G., Balaguer P., Delgenes N., Muller M., Dagnino S., Delgenes J. P. Relevant approach to assess performances of wastewater biosolids composting in terms of micropollutants removal. *Water Science and Technology* 58 (1) : 45-52 (2008)

Pei Z.-G., Shan X.-Q., Wen B., Zhang S., Yan L., Khan S.U. Effect of copper on the adsorption of p-nitrophenol onto soils. *Environmental Pollution* 139 : 541-549 (2006)

- Peiris-John R.J., Wickremasinghe R. Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 : 239-245 (2008)
- Pelekani C., Snoeyink V.L. Competitive adsorption between atrazine and methylene blue on activated carbon: the importance of pore size distribution. *Carbon* 38 : 1423-1436 (2000)
- Penaloza-Vazquez A., Mena G.L., Herrera-Estrella L., Bailey A.M. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2) : 538-543 (1995)
- Peruzzo P.J., Porta A.A., Roncoa A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina *Environmental Pollution* 156 : 61-66 (2008)
- Pesaro M., Nicollier G., Zeyer J., Widmer F. Impact of Soil Drying-Rewetting Stress on Microbial Communities and Activities and on Degradation of Two Crop Protection Products. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5) : 2577-2587 (2004)
- Pesce S., Fajon C., Bardot C., Bonnemoy F., Portelli C., Bohatier J. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquatic Toxicology* 78 : 303-314 (2006)
- Pesce S., Martin-Laurent F., Rouard N., Montuelle B. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: from treated plots to lotic receiver hydrosystem. *Pest Management Science* 65 (6) : 651-657 (2009)
- Pett-Ridge J., Firestone M.K. Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11) : 6998-7007 (2005)
- Piccolo A., Celano G. Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13 (11) : 1737-1741 (1994)
- Piccolo A., Gatta L., Campanella L. Interactions of glyphosate herbicide with a humic-acid and its iron complex. *Annali Di Chimica* 85 (1-2) : 31-40 (1995)
- Piccolo A., Celano G., Conte P. Adsorption of glyphosate by humic substances *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 : 2442-2446 (1996)
- Pignatello J.J., Xing B.S. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles *Environmental Science and Technology* 30 (1) : 1-11 (1996)
- Pipke R., Schulz A., Amrhein N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (5) : 974-978 (1987a)
- Pipke R., Amrhein N., Jacob G.S., Schaefer J., Kishore G.M. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. *European Journal of Biochemistry* 165 : 267-273 (1987b)
- Pipke R., Amrhein N. Carbon-Phosphorus lyase activity in permeabilized cells of *Arthrobacter* sp. GLP-1. *FEBS Letters* 236 (1) : 135-138 (1988)
- Plangklang P., Reungsang A. Effects of rhizosphere remediation and bioaugmentation on carbofuran removal from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 : 983-989 (2008)
- Popov K., Rönkkömäki H., Lajunen L.H.J. : Critical Evaluation of Stability Constants of Phosphonic Acids. *Pure and Applied Chemistry* 73 (10) : 1641-1677 (2001)
- Popov V.H., Cornish P.S., Sun H. Vegetated biofilters: The relative importance of infiltration and adsorption in reducing loads of water-soluble herbicides in agricultural runoff. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 114 : 351-359 (2006)
- Pozo K., Harner T., Lee S.C., Wania F., Muir D.C.G., Jones K.C. Seasonally Resolved Concentrations of Persistent

Organic Pollutants in the Global Atmosphere from the First Year of the GAPS Study. *Environmental Science and Technology* 43 (3) : 796-803 (2009)

Prado A.G.S., Airoidi C. The effect of the herbicide diuron on soil microbial activity. *Pest Management Science* 57 : 640-644 (2001)

Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N., Teaumroong N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology* 42 : 141-149 (2009)

Prospero J.M., Seba D.B. Some additional measurements of pesticides in lower atmosphere of Northern Equatorial Atlantic ocean. *Atmospheric Environment* 6 (5) : 363-364 (1972)

Q

Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (5) : 511-516 (1988)

Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Carbon-Phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31 (3) : 283-287 (1989)

R

Rabiet M., Margoum C., Gouy V., Carluier N., Coquery M. Transfert des pesticides et métaux dans un petit bassin versant viticole - Etude préliminaire de l'influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants. *Ingénieries n° spécial* : 65-75 (2008)

Rae J.L., Cooper C.S., Parker A., Peters A. Pesticide sorption onto aquifer sediments. *Journal of Geochemical Exploration* 64 : 263-276 (1998)

Rahman L., Whitelaw-Weckert M.A., Hutton R.J., Orchard B. Impact of floor vegetation on the abundance of nematode trophic groups in vineyards. *Applied Soil Ecology* 42 : 96-106 (2009)

Ramsburg C.A., Abriola L.M., Pennell K.D., Löffler F., Gamache M., Amos B.K., Petrovskis E.A. Stimulated microbial reductive dechlorination following surfactant treatment at the Bachman Road site. *Environmental Science and Technology* 38 : 5902-5914 (2004)

Ratcliff A.W., Busse M.D., Shestak C.J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* 34 : 114-124 (2006)

Reichenberger S., Bach M., Skitschak A., Frede H.-G. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; A review. *Science of the Total Environment* 384 : 1-35 (2007)

Relyea R., Hoverman J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9 : 1157-1171 (2006)

Richard J.Y., Vogel T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44 : 93-100 (1999)

Rios C., Salvadó V., Hidalgo M. Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane. *Journal of Membrane Science* 203 : 201-208 (2002)

Risebrough R.W., Huggett R.J., Griffin J.J., Goldberg E.D. Pesticides - Transatlantic movements in Northeast trades. *Science* 159 (3820) : 1233-1236 (1968)

Roberts S.J., Walker A., Cox L., Welch S.J. Isolation of isoproturon-degrading bacteria from treated soil via three

different routes. *Journal of Applied Microbiology* 85 : 309-316 (1998)

Roche H., Vollaire Y., Persic A., Buet A., Oliveira-Ribeiro C., Coulet E., Banas D., Ramade F. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France) *Environmental Pollution* 157 (8-9) : 2493-2506 (2009)

Rogers S.W., Ong S.K., Kjartanson B.H., Golchin J., Stenback G.A. Natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites: review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 6 (3) : 141-155 (2002)

Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Haahtela K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution* 107 : 179-185 (2000)

Rose M.T., Sanchez-Bayo F., Crossan A.N., Kennedy I.R. Pesticide removal from cotton farm tailwater by a pilot-scale ponded wetland. *Chemosphere* 63 : 1849-1858 (2006)

Rouchaud J., Neus O., Bulcke R., Cools K., Eelen H., Dekkers T. Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide, and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards. *Archives in Environmental and Contaminant Toxicology* 39 : 60-65 (2000)

Roudière L., Lorto S., Tallagrand E., Marchandin H., Jeannot J.-L., Jumas-Bilak E. Molecular fingerprint of bacterial communities and 16S rDNA intra-species heterogeneity: a pitfall that should be considered. *Pathologie Biologie* 55 : 434-440 (2007)

Rousseaux S., Hartmann A., Lagacherie B., Piutti S., F. Andreux F., Soulas G. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere* 51 : 569-576 (2003)

Rüdel H. Volatilisation of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere* 35 (1-2) : 143-152 (1997)

Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J., Marvel J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 25 (3) : 517-528 (1977)

Runes H.B., Jenkins J.J., Bottomley P.J. Atrazine degradation by bioaugmented sediment from constructed wetlands. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 : 427-432 (2001)

S

Saison C., Degrange V., Oliver R., Millard P., Commeaux C., Montange D., Le Roux X. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology* 8 (2) : 247-257 (2006)

Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34 : 635-648 (2007)

Salvestrini S., Di Cerbo P., Capasso S. : Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere* 48 : 69-73 (2002)

Sánchez-Camazano M., Arienzo M., Sánchez-Martin M.J., Crisanto T. Effect of different surfactants on the mobility of selected non-ionic pesticides in soil. *Chemosphere* 31 (8) : 3793-3801 (1995)

Sarathchandra S.U., Burch G., Cox N.R. Growth patterns of bacterial communities in the rhizoplane and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. *Applied Soil Ecology* 6 : 293-299 (1997)

- Sasikala S., Tanaka N., Wah Wah H.S.Y., Jinadasa K.B.S.N. Effects of water level fluctuation on radial oxygen loss, root porosity, and nitrogen removal in subsurface vertical flow wetland mesocosms. *Ecological Engineering* 35 : 410-417 (2009)
- Sathishkumar M., Binupriya A.R., Kavitha D., Selvakumar R., Jayabalan R., Choi J.G., Yun S.E. Adsorption potential of maize cob carbon for 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions: Equilibrium, kinetics and thermodynamics modeling. *Chemical Engineering Journal* 147 (2-3) : 265-271 (2008)
- Satsuma K. Complete biodegradation of atrazine by a microbial community isolated from a naturally derived river ecosystem (microcosm). *Chemosphere* 77 (4) 590-596 (2009)
- Schäfer R.B., Caquet T., Siimes K., Mueller R., Lagadic L., Liess M. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment* 382 : 272-285 (2007)
- Scheyer A., Graeff C., Morville S., Mirabel P., Millet M. Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France) *Chemosphere* 58 : 1517-1524 (2005)
- Scheyer A., Morville S., Mirabel P., Millet M. Pesticides analysed in rainwater in Alsace region (Eastern France) : Comparison between urban and rural sites. *Atmospheric Environment* 41 : 7241-7252 (2007)
- Schnürer Y., Persson P., Nilsson M., Nordgren A., Giesler R. Effects of Surface Sorption on Microbial Degradation of Glyphosate. *Environmental Science and Technology* 40 (13) : 4145-4150 (2006)
- Schowaneck D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (4) : 895-903 (1990)
- Schröder P., Maier H., Debus R. Detoxification of herbicides in *Phragmites australis*. *Zeitschrift für Naturforschung* 60 (3-4) : 314-324 (2005)
- Schröder P., Navarro-Aviñó J., Azaizeh H., Goldhirsh A.G., DiGregorio S., Komives T., Langergraber G., Lenz A., Maestri E., Memon A.R., Ranalli A., Sebastiani L., Smrcek S., Vanek T., Vuilleumier S., Wissing F. Using Phytoremediation Technologies to Upgrade Waste Water Treatment in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 14 (7) : 490-497 (2007)
- Schröder P., Daubner D., Maier H., Neustifter J., Debus R. Phytoremediation of organic xenobiotics – Glutathione dependent detoxification in *Phragmites* plants from European treatment sites. *Bioresource Technology* 99 : 7183-7191 (2008)
- Schulz R., Peall S.K.C., Hugo C., Krause V. Concentration, load and toxicity of spraydrift-borne azinphos-methyl at the inlet and outlet of a constructed wetland. *Ecological Engineering* 18 : 239-245 (2001)
- Schulz R., Peall S.K.C. Effectiveness of a constructed wetland for retention of nonpoint-source pesticide pollution in the Lourens River catchment, South Africa. *Environmental Science and Technology* 35 (2) : 422-426 (2001)
- Schwartz E., Trinh S.V., Scow K.M. Measuring growth of a phenanthrene-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative competitive polymerase chain reaction method. *FEMS Microbiology Ecology* 34 : 1-7 (2000)
- Scow K.M., Hicks K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology* 16 : 246-253 (2005)
- Screpanti C., Accinelli C., Vicari A., Catizone P. Glyphosate and glufosinate-ammonium runoff from a corn-growing area in Italy. *Agronomy for Sustainable Development* 25 (3) : 407-412 (2005)
- Scullion J. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* 93 : 51-65 (2006)
- Seba D.B., Prospero J.M. Pesticides in lower atmosphere of Northern Equatorial Atlantic ocean. *Atmospheric Environment* 5 (12) : 1043-1050 (1971)

- Semple K.T., Dew N.M., Doick K.J., Rhodes A.H. Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil ? *Environmental Pollution* 140 : 164-172 (2006)
- Semple K .T., Doick K.J., Wick L.Y., Harms H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* 150 : 166-176 (2007)
- Sharma R.K., Kumar A., Joseph P.E. Removal of Atrazine from Water by Low Cost Adsorbents Derived from Agricultural and Industrial Wastes. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology* 80 : 461-464 (2008)
- Shawabkeh R.A. Solidification and stabilization of cadmium ions in sand-cement-clay mixture. *Journal Of Hazardous Materials* 125 (1-3) : 237-243 (2005)
- Sheals J., Sjöberg S., Persson P. Adsorption of glyphosate on goethite : molecular characterization of surface complexes. *Environmental Science and Technology* 36 : 3090-3095 (2002)
- Shelton D. R., Parkin T.B. Effect of moisture on sorption and biodegradation of carbofuran in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 : 2063-2068 (1991)
- Sheng G., Yang Y., Huang M., Yang K. Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. *Environmental Pollution* 134 : 457-463 (2005)
- Sherrard R.M., Berr J.S., Murray-Gulde C.L., Rodgers Jr. J.H., Shah Y.T. Feasibility of constructed wetlands for removing chlorothalonil and chlorpyrifos from aqueous mixtures. *Environmental Pollution* 127 : 385-394 (2004)
- Shi Y., Meng F., Guo F., Lu Y., Wang T., Zhang H. Residues of organic chlorinated pesticides in agricultural soils of Beijing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49 : 37-44 (2005)
- Siczek A., Kotowska U., Lipiec J., Nosalewicz A. Macro-porosity and leaching of atrazine in tilled and orchard loamy soils. *Chemosphere* 70 : 1973-1978 (2008)
- Shinabarger D.L., Braymer H.D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG 2982. *Journal of Bacteriology* 168 (2) : 702-707 (1986)
- Silva I.S., da Costa dos Santos E., Ragagnin de Menezes C., Fonseca de Faria A., Franciscan E., Grossman M., Durrant L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology* 100 (20) : 4669-4675 (2009)
- Singh O.V., Jain R.K. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 : 128-135 (2003)
- Singh B., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. Role of Soil pH in the Development of Enhanced Biodegradation of Fenamiphos. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12) : 7035-7043 (2003)
- Singh S., Kang S.H., Mulchandani A., Chen W. Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 19 : 437-444 (2008)
- Singh B.K., Dawson L.A., Macdonald C.A., Buckland S.M. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology* 41 : 239-248 (2009)
- Siripattanakul S., Wirojanagud W., McEvoy J.M., Casey F.X.M., Khan E. A feasibility study of immobilized and free mixed culture bioaugmentation for treating atrazine in infiltrate. *Journal of Hazardous Materials* 168 : 1373-1379 (2009)
- Słaba M., Szewczyk R., Bernat P., Długoński J. Simultaneous toxic action of zinc and alachlor resulted in enhancement of zinc uptake by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii*. *Science of the Total Environment* 407 : 4127-4133 (2009)
- Sleytr K., Tietz A., Langergraber G., Haberl R., Sessitsch A. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering* 35 : 1021-1025 (2009)

- Smith A.E., Aubin A.J. Degradation of C-14 glyphosate in Saskatchewan soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50 (4) : 499-505 (1993)
- Smith A.E., Hristova K., Wood I., Mackay D.M., Lory E., Lorenzana D., Scow K.M. Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl-tertiarybutyl ether (MTBE). *Environmental Health Perspective* 113 : 317-322 (2005)
- Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67 : 6-20 (2009)
- Song K.-Y., Zoh K.-D., Kang H. Release of phosphate in a wetland by changes in hydrological regime. *Science of the Total Environment* 380 : 13-18 (2007)
- Song N.H., Chen L., Yang H. Effect of dissolved organic matter on mobility and activation of chlorotoluron in soil and wheat. *Geoderma* 146 : 344-352 (2008)
- Sørensen S.R., Ronen Z., Aamand J. Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12) : 5403-5409 (2001)
- Sørensen S.R., Bending G.D., Jacobsen C.S., Walker A., Aamand J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology* 45 : 1-11 (2003)
- Sørensen S.R., Schultz A., Jacobsen O .S., Aamand J. Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles *Environmental Pollution* 141 : 184-194 (2006)
- Sørensen S.R., Albers C.N., Aamand J. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8) : 2332-2340 (2008)
- Spark K.M., Swift R.S. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of the Total Environment* 298 : 147-161 (2002)
- Spliid N.H., Helweg A., Heinrichson K. Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed. *Chemosphere* 65 (11) : 2223-2232 (2006)
- Stasinakis A.S., Kotsifa S., Gatidou G., Mamais D. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. *Water Research* 43 : 1471-1479 (2009)
- Stearman G.K., George D.B., Carlson K., Lansford S. Pesticide removal from container nursery runoff in constructed wetland cells. *Journal of Environmental Quality* 32 : 1548-1556 (2003)
- Steenwerth K., Belina K.M. Cover crops enhance soil organic matter, carbon dynamics and microbiological function in a vineyard agroecosystem. *Applied Soil Ecology* 40 : 359-369 (2008)
- Steinle P., Thalmann P., Höhener P., Hanselmann K.W. , Stucki G. Effect of Environmental Factors on the Degradation of 2,6-Dichlorophenol in Soil. *Environmental Science and Technology* 34 (5) : 771-775 (2000)
- Stenrød M., Eklo O.M., Charnay M.-P., Benoit P. Effect of freezing and thawing on microbial activity and glyphosate degradation in two Norwegian soils. *Pest Management Science* 61 : 887-898 (2005)
- Stenström J., Svensson K., Johansson M. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 36 : 93-104 (2001)
- Stepp T.D., Camper N.D., Paynter M.J.B., Anaerobis microbial degradation of selected 3,4-dihalogenated aromatic compounds. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 23 (2) : 256-260 (1985)

- Stone W.W., Wilson J.T. Preferential flow estimates to an agricultural tile drain with implications for glyphosate transport. *Journal of Environmental Quality* 35 : 1825-1835 (2006)
- Stottmeister U., Wießner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller R.A., Moormann H. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22 : 93-117 (2003)
- Struijs J., Rogers J.E. Reductive dehalogenation of dichloroanilines by anaerobic microorganisms in fresh and dichlorophenol-acclimated pond sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (10) : 2527-2531 (1989)
- Sturman P.J., Stewart P.S., Cunningham A.B., Bouwer E.J., Wolfram J.H. Engineering scale-up of *in situ* bioremediation processes: a review. *Journal of Contaminant Hydrology* 19 : 171-203 (1995)
- Sud D., Mahajan G., Kaur M.P., Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions - A review. *Bioresource Technology* 99 (14) : 6017-6027 (2008)
- Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.V. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18 : 647-658 (2002)
- Swami D., Buddhi D. Removal of contaminants from industrial wastewater through various non-conventional technologies: a review. *International Journal Of Environment And Pollution* 27 (4) : 324-346 (2006)
- Syversen N., Bechmann M. Vegetative buffer zones as pesticide filters for simulated surface runoff. *Ecological Engineering* 22 : 175-184 (2004)

T

- Tadonlélé R.D., Le Berre B., Perreau F., Humbert J.-F. Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquatic Toxicology* 94 : 103-113 (2009)
- Tailliez P., Beaud D., Ogier J.C. Le point sur les outils moléculaires de classification et d'écologie microbienne. *Science des Aliments* 22 : 5-21 (2002)
- Tao Q.-H., Tang H.-X. Effect of dye compounds on the adsorption of atrazine by natural sediment. *Chemosphere* 56 : 31-38 (2004)
- Taok M., Cochet N., Pauss A., Schoefs O. Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. *European Journal of Soil Biology* 43 : 335-340 (2007)
- Taylor R.L., Maxwell B.D., Boik R.J. Indirect effects of herbicides on bird food resources and beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 116 : 157-164 (2006)
- Teisseire H., Couderchet M., Vernet G. Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Pollution* 106 : 39-45 (1999)
- Tejada M. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate +diflufenican herbicides. *Chemosphere* 76 (3) : 365-373 (2009)
- Ternan N.G., McGrath J.W., McMullan G., Quinn J.P. Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 : 635-647 (1998)
- Tesfamariam T., Bott S., Cakmak I., Römheld V., Neumann G. Glyphosate in the rhizosphere - Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. *European Journal of Agronomy* 31 (3) : 126-132 (2009)
- Thévenot M., Dousset S., Rousseaux S., Andreux F. Influence of organic amendments on diuron leaching through an acidic and a calcareous vineyard soil using undisturbed lysimeters. *Environmental Pollution* 153 : 148-156 (2008)

- Thévenot M., Dousset S., Hertkorn N., Schmitt-Kopplin P., Andreux F. Interactions of diuron with dissolved organic matter from organic amendments. *Science of the Total Environment* 407 (14) : 4297-4302 (2009)
- Thioulouse J., Chessel D., Dolédec S., Olivier J.-M. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7 : 75-83 (1997)
- Thomas K.V., Hurst M.R., Matthiessen P., Sheahan D., Williams R.J. Toxicity characterization of organic contaminant in stormwaters from an agricultural headwater stream in South East England *Water Research* 35 (10) : 2411-2416 (2001)
- Thompson J.D., Higgins G.D., Gibson D.T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 : 4673-4680 (1994)
- Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., Singer A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology* 7 (7) : 909-915 (2005)
- Thullner M., Van Cappellen P., Regnier P. Modeling the impact of microbial activity on redox dynamics in porous media. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69 (21) : 5005-5019 (2005)
- Tian F., Ding Y., Zhu H., Yao L., Du B. Genetic Diversity of Siderophore-producing Bacteria of Tobacco Rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 : 276-284 (2009)
- Tixier C., Bogaerts P., Sancelme M., Bonnemoy F., Twagilimana L., Cuer A., Bohatier J., Veschambre H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron : structure and toxicity of metabolites. *Pest Management Science* 56 : 455-462 (2000)
- Tixier C., Sancelme M., Bonnemoy F., Cuer A., Veschambre H. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7) : 1381-1389 (2001)
- Tixier C., Sancelme M., Aït-Aïssa S., Widehem P., Bonnemoy F., Cuer A., Truffaut N., Veschambre H. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter sp. N2*: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* 46 : 519-526 (2002)
- Tominack R.L. Herbicide formulations. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 38 (2) : 129-135 (2000)
- Torstensson N.T.L., Aamissepp A. Detoxification of glyphosate in soils. *Weed Research* 17 (3) : 209-212 (1977)
- Torsvik V., Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5 : 240-245 (2002)
- Toyama T., Yu N., Kumada H., Sei K., Ike M., Fujita M. Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 : 346-353 (2006)
- Toyama T., Sato Y., Inoue D., Sei K., Chang Y.-C., Kikuchi S., Ike M. Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 (2) : 147-150 (2009)
- Travkin V., Baskunov B.P., Golovlev E.L., Boersma M.G., Boeren S., Vervoort J., van Berkel W.J.H., Rietjens I.M.C.M., Golovleva L.A. Reductive deamination as a new step in the anaerobic microbial degradation of halogenated anilines. *FEMS Microbiology Letters* 209 : 307-312 (2002)
- Travkin V.M., Golovleva L.A. The Degradation of 3,4-Dichloroaniline by *Pseudomonas fluorescens* Strain 26-K. *Microbiology* 72 (2) : 240-243 (2003)
- Trémolières M., Barrat-Segretain M.-H., Thiébaud G. Biologie et écophysologie des macrophytes. *Ingénieries* n°

spécial : 51-62 (2008)

Truhaut R. Eco-toxicology - objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1 (2) : 151-173 (1977)

Truu J., Nurk K., Juhanson J., Mander U. Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 40 (6-7) : 1191-1200 (2005)

Truu M., Juhanson J., Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 407 (13) : 3958-3971 (2009)

Tsui M.T.K., Chu L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52 : 1189-1197 (2003)

Tsui M.T.K., Chu L.M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Archives in Environment and Contaminant Toxicology* 46 : 316-323 (2004)

Tsui M.T.K., Wang W.-X., Chu L.M. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 138 : 59-68 (2005)

Tsui M.T.K., Chu L.M. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. *Chemosphere* 71 : 439-446 (2008)

Turgut C. Uptake and Modeling of Pesticides by Roots and Shoots of Parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *Environmental Science and Pollution Research* 12 (6) 342-346 (2005)

Turnbull G.A., Cullington J.E., Walker A., Morgan J.A.W. Identification and characterisation of a diuron-degrading bacterium. *Biology and Fertility of Soils* 33 : 472-476 (2001a)

Turnbull G.A., Ousley M., Walker A., Shaw E., Morgan J.A.W. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, puhA. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5) : 2270-2275 (2001b)

U

Undabeytia T., Cheshire M.V., McPhail D. Interaction of the herbicide glyphosate with copper in humic complexes. *Chemosphere* 32 (7) : 1245-1250 (1996)

V

Van Dijk J., Didden W.A.M., Kuenen F., van Bodegom P.M., Verhoef H.A., Aerts R. Can differences in soil community composition after peat meadow restoration lead to different decomposition and mineralization rates? *Soil Biology and Biochemistry* 41 : 1717-1725 (2009)

Van den Berg F., Kubiak R., Benjey W.G., Majewski M.S., Yates S.R., Reeves G.L., Smelt J.H., van der Linden A.M.A. Emission of pesticides into the air. *Water Air and Soil Pollution* 115 (1-4) : 195-218 (1999)

Van Hees P.A.W., Elgh-Dalgren K., Engwall M., von Kronhelm T. Re-cycling of remediated soil in Sweden: An environmental advantage ? *Resources, Conservation and Recycling* 52 : 1349-1361 (2008)

Van Veen J.A., van Overbeek L.S., van Elsas J.D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2) : 121-& (1997)

- Vereecken H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61 (12) : 1139-1151 (2005)
- Verkleij J.A.C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D.M., Schwitzguébel J.-P., Schröder P. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67 (1) : 10-22 (2009)
- Vijayaraghavan K., Yun Y.-S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26 : 266-291 (2008)
- Vischetti C., Monaci E., Cardinali A., Casucci C., Perucci P. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* 72 : 1739-1743 (2008)
- Vogel J.R., Majewski M.S., Capel P.D. Pesticides in rain in four agricultural watersheds in the United States. *Journal of Environmental Quality* 37 : 1101-1115 (2008)
- von Wiren-Lehr S., Glässgen D.W.E.K., Sandermann Jr H., Scheunert I. Mineralization of [¹⁴C]Glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems. *Pesticide Science* 51 : 436-442 (1997)
- Vroumsia T., Steiman R., Seigle-Murandi F., Benoit-Guyod J.-L., Khadrani A. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, And isoproturon) by soft fungi. A comparative study. *Chemosphere* 33 (10) : 2045-2056 (1996)
- Vryzas Z., Vassiliou G., Alexoudis C., Papadopoulou-Mourkidou E. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Research* 43 : 1-10 (2009)

W

- Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., Schleifer K.-H. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (3) : 792-800 (1994)
- Wang Y.-S., Yen J.-H., Hsieh Y.-N., Chen Y.-L. Dissipation of 2,4-D, glyphosate and paraquat in river water. *Water, Air, and Soil Pollution* 72 : 1-7 (1994)
- Wang Y.-J., Zhou D.-M., Sun R.-J., Cang L., Hao X.-Z. Cosorption of zinc and glyphosate on two soils with different characteristics. *Journal of Hazardous Materials* 137 : 76-82 (2006)
- Wang P., Keller A.A. Particle-size dependent sorption and desorption of pesticides within a water-soil-nonionic surfactant system. *Environmental Science and Technology* 42 (9) : 3381-3387 (2008)
- Wang P., Keller A.A. Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersible soil primary size fractions. *Water Research* 43 : 1448-1456 (2009a)
- Wang P., Keller A.A. Partitioning of hydrophobic pesticides within a soil-water-anionic surfactant system. *Water Research* 43 : 706-714 (2009b)
- Wang Y., Oyaizu H. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 168 (2-3) : 760-764 (2009c)
- Wanko A., Tapia G., Mosé R., Grégoire C. Adsorption distribution impact on preferential transport within horizontal flow constructed wetland (HFCW). *Ecological Modelling* 220 (23) : 3342-3352 (2009)
- Watanabe K., Hamamura N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology* : 14 : 289-295 (2003)
- Wauchope R.D. The pesticide content of surface water draining from agricultural fields – A review. *Journal of*

Environmental Quality 7 : 459-472 (1978)

Weaver M.A., Zablotowicz R.M., Locke M.A. Laboratory assessment of atrazine and fluometuron degradation in soils from a constructed wetland. *Chemosphere* 57 : 853-862 (2004)

Weber J.B., Wilkerson G.G., Reinhardt C.F. Calculating pesticide sorption coefficients (Kd) using selected soil properties. *Chemosphere* 55 : 157-166 (2004)

Welp G., Brümmer G.W. Effects of organic pollutants on soil microbial activity: the influence of sorption, solubility, and speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43 : 83-90 (1999)

Widada J., Nojiri H., Yoshida T., Habe H., Omori T. Enhanced degradation of carbazole and 2,3-dichlorodibenzo-p-dioxin in soils by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Chemosphere* 49 : 485-491 (2009)

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

Widenfalk A., Bertilsson S., Sundh I., Goedkoop W. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes e responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* 152 : 576-584 (2008)

Wiessner A., Kappelmeyer U., Kusch P., Kästner M. Influence of the redox condition dynamics on the removal efficiency of a laboratory-scale constructed wetland. *Water Research* 39 : 248-256 (2005)

Williams G.M., Kroes R., Munro I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31 : 117-165 (2000)

Williams G.M., Harrison I., Carlick C.A., Crowley O. Changes in enantiomeric fraction as evidence of natural attenuation of mecoprop in a limestone aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology* 64 : 253-267 (2003)

Winiarski T., Bedell J.-P., Delolme C., Perrodin Y. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeology Journal* 14 : 1244-1251 (2006)

Witters H.E. Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41 : 90-95 (1998)

Wolicka D., Suszek A., Borkowski A., Bieleck A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology* 100 : 3221-3227 (2009)

Wu Q., Riise G., Lundekvam H., Mulder J., Haugen L.E. Influences of suspended particles on the runoff of pesticides from an agricultural field at Askim, SE-Norway. *Environmental Geochemistry and Health* 26 : 295-302 (2004)

Wyss A., Boucher J., Montero A., Marison I. Micro-encapsulated organic phase for enhanced bioremediation of hydrophobic organic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 40 : 25-31 (2006)

X

Xing B., Pignatello J.J., Gigliotti B. Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environmental Science and Technology* 30 : 2433-2440 (1996)

Y

Yamada T., Kremer R.J., de Camargo e Castro P.R., Wood B.W. Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: Threat to agricultural sustainability ? *European Journal of Agronomy* 31 (3) : 111-113 (2009)

Yang Y., Shen G. Enhanced pesticide sorption by soils containing particulate matter from crop residue burns. *Environmental Science and Technology* 37 : 3635-3639 (2003)

You I.S., Bartha R. Metabolism of 3,4-dichloroaniline by *Pseudomonas putida*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 30 (2) : 274-277 (1982)

Yu Y., Q.X. Zhou Q.X. Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils. *Chemosphere* 58 : 811-816 (2005)

Yu X.Y., Ying G.G., Kookana R.S. Sorption and desorption behaviours of diuron in soils amended with charcoal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 : 8545-8550 (2006)

Yuan C.-I., Chaing M.-Y., Chen Y.-M. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Science* 163 : 543-554 (2002)

Z

Zabaloy M.C., Gómez M.A. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils* 42 : 83-88 (2005)

Zabaloy M.C., Garland J.L., Gomez M.A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40 : 1-12 (2008)

Zablotowicz R.M., Locke M.A., Krutz L.J., Lerch R.N., Lizotte R.E., Knight S.S., Gordon R.E., Steinriede R.W. *Science of the Total Environment* 370 : 552-560 (2006)

Zeyer J., Kearney P.C. Microbial-metabolism of propanil and 3,4-dichloroaniline. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 17 (3) : 224-231 (1982)

Zhang C., Bennett G.N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 600-618 (2005)

Zhang J.J., Wen B., Shan X.-Q., Zhang S., Khan S.U. Temporal change in the distribution patterns of hexachlorobenzene and dichlorodiphenyltrichloroethane among various soil organic matter fractions. *Environmental Pollution* 150 (2) : 234-242 (2007)

Zhao B., Zhang J., Gong J., Zhang H., Zhang C. Glyphosate mobility in soils by phosphate application : laboratory column experiments. *Geoderma* 149 (3-4) : 290-297 (2009)

Zhou L., Zhou G. Measurement and modelling of evapotranspiration over a reed (*Phragmites australis*) marsh in Northeast China. *Journal of Hydrology* 372 (1-4) : 41-47 (2009)

Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 33 : 406-413 (2007)

Thèses

Domange N. Etude des transferts de produits phytosanitaires à l'échelle de la parcelle et du bassin versant viticole (Rouffach, Haut-Rhin) (2005)

Guigon-Moreau E. Transferts des pesticides vers les eaux superficielles et l'atmosphère : caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle (2006)

Norini M.-P. Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization (2007)

Livres

Alexander M. Biodegradation and Bioremediation - 2nd edition. *Academic Press* (1999)

Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoît P., Charnay M.-P., Coquet Y. Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. *France Agricole* (2005)

Devigny, J., Chang, S.H., Bioaugmentation for soil bioremediation. *Bioremediation of Contaminated Soils. Marcel Dekker* 465–488 (2000)

Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. 3rd Edition. *CRC Press* (2001)

Kamrin M.A. Pesticide Profiles – Toxicity, Environmental Impact and Fate. *CRC Press* (2000)

Lemaire F., Dartigues A., Morel P., Charpentier S., Rivière L-M. Cultures en pots et conteneurs. *INRA Coll. : Du labo au terrain* (2003)

Lewis W.M. Wetlands explained: wetland science, policy, and politics in America. *Oxford University Press* (2001)

Mitch W.J., Gosselink J.G. Wetlands. 3rd ed. *John Wiley & Sons* (2000)

Pelmont J. Biodégradations et métabolismes. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. *EDP Sciences* (2005)

Pernthaler J., Glöckner F.-O., Schönhuber W., Amann R. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes. *Methods in Microbiology* vol.30. *Academic Press* (2001)

Pochon J., Tardieux P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Collection Techniques de base. *La Tourelle* 111 pp. (1957)

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. Microbiologie. 2nde édition. *De Boeck Université* (2003)

Sambrook J., Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual; 6-12. *CSH Press* (1989)

Tomlin. The Pesticide Manual. 15th edition. *BCPC* (2009)

Van Elsas J.D., Torsvik V., Hartmann A., Øvreås L., Jansson J.K. The bacteria and archaea in soil. *Modern soil microbiology*, 2nd edition. *CRC Press* (2007)

Waxman M.F. Agrochemical and Pesticide Safety Handbook. *CRC Press* (1998)

Actes de congrès

Courde L., Reuter S., Chaussod R., Andreux F. La dégradation des herbicides est-elle influencée par le cuivre accumulé dans les sols ? *30e congrès GFP* (2000)

Diels L., Lookman R. Microbial systems for in-situ soil and groundwater remediation Conference Information. In: Marmiroli N, Samotokin B (eds) *Advanced science & technology for biological decontamination of sites affected by chemical & radiological nuclear agents, Earth & environmental sciences*, vol. 75. *NATO Science series IV*, pp 61-77 (2007)

Novitski R.P. The effects of lakes and wetlands on flood flows and base flows in selected northern and eastern states. Proceedings of the Conference on Wetlands of the Chesapeake, Easton, Maryland, Environmental Law Institute (1985)

Rapports

AFPP. Répertoire terminologique en protection des plantes (2007)

APRONA. Inventaire 2003 de la qualité des eaux souterraines dans la vallée du Rhin supérieur (2005)

Atkins WS. Environment. Review of the Methodologies for the Extraction, Detection and Identification of Microorganisms in the Environment - Final Report (2000)

Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I., Voltz M. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref 64pp (2005)

EPA. Guide for Conducting Treatability Studies Under CERCLA Biodegradation Remedy Selection - Interim Guidance. EPA/540/R-93/519a (1993)

Farhan Ul Haque M. Function, structure and population dynamics of two diuron degrading microbial consortia (2009)

Hennebert P. Délivrables 6.2 et 6.3 : Performances des pratiques de protection des eaux de surface contre les transferts diffus de produits phytosanitaires – Relation coûts bénéfiques et domaine de validité – Vigne et Pomme de terre. *Life SWAP-CPP* (2007)

Hunault M. Influence des bassins d'orage sur le transfert de pesticide et possibilités de traitement. Cas du bassin d'orage de Rouffach (68) (2005)

IFEN. Les pesticides dans les eaux - données 2005. *Les dossiers IFEN* n°9 (2007)

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - 3,4-dichloroaniline (2005)

Institute for Health and Consumer Protection (IHCP). 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA) Summary risk assessment report (2006)

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Agreste - statistique annuelle agricole (2006)

Ministère de l'Agriculture, Direction générale de l'alimentation - Sous direction de la qualité et de la protection des végétaux. Guide pour une protection durable de la vigne : Stratégie de Protection pour une Utilisation Raisonnée et Durable des Intrants Phytosanitaires en Viticulture (1995)

Moncada, A. Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation (2005)

Monsanto. Backgrounder; Glyphosate and environmental fate studies (2005)

SERA. Glyphosate - Human Health and Ecological Risk Assessment Final Report (2003)

UIPP : Rapport d'activités 2007-2008 (2009)

Van Cauwenberghe L., Roote D.L. Technology Overview Report - *In Situ* Bioremediation. *Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center* (1998)

Vijgen J. Summary report on technical and legal barriers for the introduction of ex-situ biological soil treatment in the EU member states. EU Commission, Directorate General Research, 35p. (2002)

Zhang J. Etude expérimentale du transport des pesticides au sein des pilotes de dépollution. Optimisation du fonctionnement hydraulique (2008)

Textes de loi

Arrêté du 08/01/98 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques contenant les substances carbosulfan, carbofuran, diuron, cadusafos, haloxyfop-R. Ministère de l'Agriculture et de la pêche. 4 septembre 2007

Décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles

Décision 2007/417/CE de la Commission concernant la non-inscription du diuron à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations de produits phytopharmaceutiques contenant cette substance. 13 juin 2007

Décision 2008/809/CE de la Commission du 14 octobre 2008 concernant la non-inscription de certaines substances à l'annexe I, I A ou I B de la directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits biocides. 14 octobre 2008

Directive 80/68/CEE du Conseil du 17 décembre 1979 relative à la protection des eaux souterraines contre la pollution causée par certaines substances dangereuses

Directive 80/778/CEE du Conseil du 15 juillet 1980 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques

Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Directive 99/31/CE du Conseil du 26 avril 1999 concernant la mise en décharge des déchets

Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau

Directive 2008/105/CE du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE

Loi n°92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau. Définition de la Loi sur l'Eau du 3 janvier 1992 (article 2) (1992)

Proposition COM(2006) 232 final de Directive du Parlement Européen et du Conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE (2006)

Rapport sur la proposition de directive du Parlement européen et du Conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE (COM(2006)0232 – C6-0307/2006 – 2006/0086(COD)) (2007)

Règlement (CEE) n°2092/91 du Conseil du 24 juin 1991 concernant le mode de production biologique de produits agricoles et sa présentation sur les produits agricoles et les denrées alimentaires

Sites Internet

Ministère de l'Agriculture. Catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> consulté le 12 mars 2009

Site internet de l'Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP) : <http://www.observatoire-pesticides.fr/index.php?pageid=61> (historique sur les pesticides) consulté le 12 mars 2009

Site internet de l'Association Française de Protection des Plantes (AFPP) : <http://www.afpp.net>. Consulté le 12 mars 2009

http://zones-humides.parcs-naturels-regionaux.fr/zones_humides/kbcms.cgi?id=6 consulté le 29 août 2009

Site internet de l'Université de Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (IPSB) ; cours en ligne du laboratoire de mycologie. Page sur le mildiou : http://ispb.univ-lyon1.fr/mycologie/Site_lab_myco/Enseignement/3/Maladievigines02.htm. Consulté le 14 juillet 2009

Site internet de l'International Programme on Chemical Safety (IPCS). Page sur le glyphosate : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm> consultée le 13 mars 2009

Autres

AFNOR. Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau, méthode gravimétrique, NF ISO 11465 (1994)

Agence de l'eau Seine-Normandie. Document de synthèse sur les pesticides (2008)

CNRS. Programme interdisciplinaire « Ingénierie écologique » Appel d'offres (2008)

VALORISATION SCIENTIFIQUE

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture

Bazot S., Bois P., Joyeux C., Lebeau T. Mineralization of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] by co-immobilized *Arthrobacter* sp. and *Delftia acidovorans*. *Biotechnology Letters* 29 : 749-754 (2007)

Article soumis à Journal of Hazardous Materials et en cours de correction :

Huguenot D., Bois P., Jézéquel K., Cornu J-Y., Lebeau T., Selection of low cost materials for the sorption of copper and herbicides as single or mixed compounds in matrices of increasing complexity

Article soumis à FEMS Microbiology Ecology :

Paul Bois, David Huguenot, Marie-Paule Norini, Muhammad Farhan Ul Haque, Stéphane Vuilleumier, Thierry Lebeau, Herbicide dissipation and copper complexation by bacterial consortia isolated from vineyard stormwater basins

Vine-growing induced environmental pressure is high: indeed every environmental compartments are likely to undergo long-lasting phytopharmaceuticals contamination. A part of these products is carried by run-off water from vineyard to surface waters that become contaminated. On their way down, they go through stormwater basins (SWB), hydraulic systems located at the outlet of vineyard watersheds. Although there is degradation/storage within SWB (bioattenuation), epuration efficiencies may vary. Most of the time, water environmental criteria fail to be reached because of weak phytopharmaceuticals hydraulic retention time and insufficient biological purification.

This study aims at developing a depollution system for vineyard SWB-accumulated sediments and passing water. Glyphosate, diuron and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) have been chosen for the study, taking a copper load into account. Strategical choices are increased pollutant hydraulic retention time and the use of bioaugmentation together with phytoextraction. Each item of this « sorbent-bacterial inoculum-plant » triplet has been beforehand selected in the laboratory and this triplet has been implemented in microcosm experiments in partially controlled conditions.

Sorbent material (sugar beet pulp, raw and burned corn cob, sand, sediment, vermiculite and perlite) selection in different liquid matrices (ultra pure water, run-off water and sediment extract medium) with pollutants alone or in combination shows that material sorption capacities change with the type of pollutant. It has also been shown that these capacities vary with formulation (alone or in combination) and liquid matrix chosen. Sediment is awarded the best sorbent for glyphosate, sand is awarded the best sorbent for diuron and 3,4-DCA.

Bacterium selection carried out with SWBs sediment is based on glyphosate, diuron and 3,4-DCA dissipation performances as well as on some system ecological features. Bacterial community genetic fingerprint established through PCR-TTGE reveals variation within sampling horizons and pollution pressure. Rapid-growing populations are then favoured, which shows adjustment to discontinuous pollutant presence. Overall *Phragmites australis* genetic fingerprint remains unchanged after pollution presence. 209 colony-forming units (CFU) have been selected that tolerate the pollutant mix and are genetically different (through RISA-RFLP). Degradation performances are strongly related to the nature of the compound. Several isolated colonies are actually consortia; one of them, elected for the process set-up, degrades glyphosate, diuron and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) in liquid culture as well as it complexes copper, in order to enhance phytoextraction.

Microcosm experiments show that hydraulic retention time weighs on pollutant concentration in water at the system outlet. Sorbents prove to be efficient and allow to reach 91% glyphosate, 87% 3,4-DCA and 64% diuron retention efficiency after six-hour storage time. Dissipation performances are satisfactory: 99% glyphosate, 84% 3,4-DCA and 65% diuron are dissipated after retention and five weeks action. Bioaugmentation does not impact on glyphosate and 3,4-DCA dissipation performances significantly, but enhances diuron dissipation in average. Suitable process efficiency requires both increased action time within the solid matrix.

Mots-clés : bioaugmentation, ecological engineering, glyphosate, diuron, 3,4-dichloroaniline, sorption, microcosms

La pression environnementale induite par la viticulture est forte, tous les compartiments de l'environnement étant susceptibles de subir une contamination durable par les produits phytopharmaceutiques employés. Ces produits sont pour partie transportés par ruissellement depuis le vignoble jusqu'aux eaux de surface qu'ils contaminent après avoir emprunté des bassins d'orage (BO), ouvrages hydrauliques aménagés à l'exutoire des bassins versants viticoles. Bien qu'une partie de ces produits soit dégradée et/ou stockée au sein des BO (bioatténuation), le niveau d'épuration est variable. Un temps de séjour insuffisant des produits phytopharmaceutiques et une épuration biologique insuffisamment efficace expliquent ainsi que la qualité de l'eau de sortie de ces ouvrages ne réponde pas, le plus souvent, aux exigences de qualité pour un rejet dans le milieu naturel.

Cette étude vise à développer un système de dépollution de sédiments viticoles accumulés dans les BO et d'eaux qui y transitent. Le glyphosate, diuron et 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) sont les molécules considérées, tout en tenant compte de la charge en cuivre. L'augmentation du temps de séjour des polluants dans le BO et le choix d'une technique associant la bioaugmentation à la phytoremédiation est la stratégie retenue. Chaque composante d'un triplet « sorbant-inoculum bactérien- plante » a été sélectionnée en laboratoire et le triplet mis en œuvre en microcosmes dans des conditions partiellement contrôlées.

La sélection de matériaux sorbants (pulpe de betterave, rafles de maïs brute et calcinée, sable, sédiment, vermiculite, perlite) dans différentes matrices liquides (eau ultra pure, eau de ruissellement et extrait de sédiment) en présence des polluants seuls ou en mélange montre que les capacités de sorption des différents matériaux testés varient selon le polluant, sa formulation (seul ou en mélange) et la matrice liquide. Le sédiment se révèle être le meilleur sorbant pour le glyphosate ; le sable pour le diuron et le 3,4-DCA.

La sélection bactérienne à partir du sédiment du BO est basée sur les performances de dissipation du glyphosate, diuron et 3,4-DCA tout en prenant en compte des caractéristiques écologiques de l'ouvrage. L'empreinte génétique de la communauté bactérienne du sédiment analysée par PCR-TTGE varie selon les horizons de prélèvement et suite à une pression de pollution. Les populations à croissance rapide sont alors favorisées, signe d'une adaptation de ces dernières à la présence intermittente des polluants. Globalement l'empreinte génétique dans la rhizosphère de *Phragmites australis* varie peu sous l'effet des polluants. 209 unités formant des colonies (UFC) tolérantes au mélange de polluants et génétiquement différentes (par analyse séquentielle RISA-RFLP) ont été sélectionnées. Les performances de dissipation varient fortement selon le polluant. Plusieurs de ces colonies isolées sont en fait des consortia bactériens ; le consortium sélectionné pour le procédé dissipe le glyphosate, le diuron et le 3,4-DCA en milieu liquide et complexe par ailleurs le cuivre dans le but d'augmenter les performances de phytoextraction.

L'expérience en microcosmes montre que le temps de rétention hydraulique influe sur la quantité de polluants retrouvés dans l'eau en sortie du système et que les matériaux sorbants sont efficaces : la rétention atteint ainsi 91% pour le glyphosate, 87% pour le 3,4-DCA et 64% pour le diuron après six heures de stockage. De plus les performances de dissipation atteintes sont bonnes : 99% du glyphosate, 84% du 3,4-DCA et 65% du diuron retenus dans le mélange sable-sédiment sont dissipés après 5 semaines. L'effet de la bioaugmentation sur les performances de dissipation n'est pas significatif pour le glyphosate et le 3,4-DCA, mais améliore en moyenne la dissipation du diuron. Un temps d'action prolongé dans la matrice solide s'avère nécessaire pour obtenir une bonne efficacité du procédé.

Mots-clés : bioaugmentation, ingénierie écologique, glyphosate, diuron, 3,4-dichloroaniline, sorption, microcosmes