



Maize herbicides mixtures effects on soil microbial communities : microcosms studies

Pierre Joly

► To cite this version:

Pierre Joly. Maize herbicides mixtures effects on soil microbial communities : microcosms studies. Agricultural sciences. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. English. NNT : 2014CLF22440 . tel-01020037

HAL Id: tel-01020037

<https://theses.hal.science/tel-01020037>

Submitted on 7 Jul 2014

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL – N° D.U. 2440 – ANNEE 2014
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE ET
ENVIRONNEMENT

N° d'ordre 627

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Ecologie Microbienne

Par

Pierre JOLY

Master Recherche de l'Université Blaise Pascal

**Etude des effets de mélanges d'herbicides employés sur le
maïs, sur les communautés microbiennes édaphiques :
approche en microcosmes**

Thèse dirigée par le Dr. Clarisse MALLET

Soutenue le 25 Février 2014 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Agnès RICHAUME-JOLION
Annette BERARD

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
Ingénieur en chef spécialiste du GREF (ICPEF),
Avignon

Examineurs :

Bruno COMBOURIEU
Jacques BOHATIER
Clarisse MALLET

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
Maître de Conférences, Université Blaise Pascal,
Clermont-Ferrand

Invitée :

Pascale BESSE-HOGGAN

Directeur de Recherches CNRS, Université Blaise
Pascal, Clermont-Ferrand

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon accomplissement de ces travaux de thèse, que ce soit professionnellement ou humainement.

Merci aux rapporteurs et examinateurs de ces travaux, Agnès Richaume-Jolion, Annette Bérard et Bruno Combourieu, pour avoir accepté de les évaluer.

Merci à Christian Amblard et Téléphore Sime-Ngando pour leur accueil au sein du LMGE. Merci à Jacques Bohatier et Clarisse Mallet pour avoir placé leur confiance en moi en me proposant ce sujet de thèse. Merci à l'équipe CMES pour leur soutien de tous les jours et plus particulièrement à Clarisse, Isabelle, Frédérique et Corinne.

Difficile de citer tout le monde, et donc de façon non exhaustive, j'aimerais remercier particulièrement les nombreux membres du LMGE, bien souvent enseignants, puis collègues et amis, qui m'ont insufflé l'envie de continuer mes travaux de recherche. Merci Frédéric, Marie, Catherine, Alex, Isabelle M., Didier, François, Clarisse et Isabelle B. Merci à tous les collègues qui ont su travailler toujours dans la bonne humeur. Merci Pascale, Frédérique, Fanny, Florence, Jean-Pierre, Benjamin et les nombreuses stagiaires.

Merci également à ceux qui, au-delà du travail, m'ont apporté ce vent d'amusement qui est cher à ma personnalité. Merci Sam, Nico, Ivan, Mathieu, Julie et les amis du SEESIB.

Merci aux nombreux « jeunes » doctorants ou autres, avec qui j'ai partagé cette aventure, pour certains depuis plus de 8 ans maintenant. Merci Muriel, William, Julie, Mathieu, Mylène, Mélanie, Stéphanie, Simon, Najwa, Benjamin, Olivier, J-F, Benoît, Louis et tous les autres !

Merci aux aficionados du Nota Bene et à son barman, mon ami Fred, qui a su abreuver ma soif de culture (de *S. cerevisiae*).

Merci à ceux qui ont permis depuis le début de mes études post-bac de me hisser jusqu'à la rédaction de ce manuscrit. Pour leur soutien indéfectible de tous les jours, mes parents Sylvie et François, mon frère, mes grands-parents, et plus généralement les membres de ma famille en or ! Merci à ma femme Muriel, pour son soutien passé et présent, et pour toutes les belles choses qui nous attendent encore. Je vous aime.

Enfin, merci Mamie, car même absente aujourd'hui, tu n'as jamais douté de cette réussite.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Table des matières	5
Liste des figures et tables.....	10
Figures.....	10
Tables	12
Introduction	1
Valorisation des travaux au cours de la thèse	4
Partie I	7
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	9
Sous-chapitre 1.1 : De l'usage des pesticides	9
1.1 - Introduction aux pesticides / produits phytosanitaires	9
1.2 - Risques pour l'environnement et la santé humaine	10
1.3 - Règlementation	13
1.4 - De la molécule seule aux mélanges de pesticides.....	16
Sous-chapitre 1.2 : Pesticides et sol	18
2.1 - Temps de résidence des pesticides dans le système sol	19
2.1.1 - Mécanismes de sorption-désorption	19
2.1.2 - Facteurs influençant les mécanismes de sorption-désorption	20
2.1.2.1 - Les propriétés physico-chimiques des pesticides	20
2.1.2.2 - Les fractions minérales et organiques du sol	21
2.1.2.3 - Le pH du sol.....	21
2.1.2.4 - L'humidité, la structure et le type de sol.....	22
2.1.3 - Passage à l'état de résidus liés	22
2.1.4 - Etat de biodisponibilité des pesticides	22
2.2 - Dégradation des pesticides dans les sols.....	23
2.2.1 - Processus de dégradation abiotique	24
2.2.1.1 - Photolyse.....	24
2.2.1.2 - Oxydo-réduction et hydrolyse.....	24
2.2.2 - Processus de dégradation biotique	24

2.2.2.1 - Action de la microflore	25
2.2.3 - Effets des formulations et des mélanges de pesticides sur les processus de dégradation	26
2.2.3.1 - Effets de la formulation et des adjuvants	26
2.2.3.2 – Photodégradation des mélanges de pesticides.....	27
2.2.3.3 – Biodégradation des mélanges de pesticides	28
2.3 - Mécanismes de transfert des pesticides du sol vers d'autres écosystèmes	29
2.3.1 - Transfert aérien	30
2.3.2 - Transfert aquatique	30
2.3.2.1 - Processus de lessivage	30
2.3.2.2 - Processus de ruissellement.....	31
2.4 - Conclusion	31
Sous-chapitre 1.3 : Les communautés microbiennes du sol et leurs réponses aux perturbations phytosanitaires	33
3.1 - Diversité des communautés microbiennes du sol	33
3.1.1 - La communauté bactérienne	34
3.1.2 - La communauté archéenne	35
3.1.3 - Les groupes fonctionnels du cycle de l'azote	35
3.1.4 - La communauté fongique	38
3.1.5 - La communauté des phototrophes	38
3.2 - Effets des pesticides sur les communautés microbiennes du sol et leurs réponses	39
3.2.1 - Effets des pesticides sur les communautés microbiennes.....	39
3.2.1.1 - Effets directs	39
3.2.1.2 - Effets indirects	40
3.2.2 - Réponses des communautés microbiennes du sol aux pressions phytosanitaires.....	40
3.2.2.1 – Suivi de la biomasse, de l'activité et de la structure des communautés microbiennes	40

3.2.2.2- Effets des mélanges de pesticides sur les communautés microbiennes .	43
3.2.3 - Conclusion	45
3.3 - Approches multi-échelles en écotoxicologie	46
Sous-chapitre 1.4 : Données sur les molécules utilisées dans cette étude	49
4.1 - La mésotrione.....	50
4.1.1 - Mode d'action	50
4.1.2 - Comportement et devenir dans l'environnement	50
4.1.2.1 - Caractéristiques physico-chimiques et processus de rétention	50
4.1.2.2 - Processus de dégradation	51
4.1.2.3 - Impact sur les écosystèmes	52
4.2 - Le S-métolachlore	54
4.2.1 - Mode d'action	54
4.2.2 - Comportement et devenir dans l'environnement	54
4.2.2.1 - Caractéristiques physico-chimiques et processus de rétention	54
4.2.2.2 - Processus de dégradation	55
4.2.2.3 - Impact sur les écosystèmes	55
4.3 - Le bénomexacor.....	57
4.3.1 - Mode d'action	57
4.3.2 - Comportement et devenir dans l'environnement	58
4.4 - Le nicosulfuron	59
4.4.1 - Mode d'action	59
4.4.2 - Comportement et devenir dans l'environnement	59
4.4.2.1 - Caractéristiques physico-chimiques et processus de rétention	59
4.4.2.2 - Processus de dégradation	60
4.4.2.3 - Impact sur les écosystèmes	61
Schéma récapitulatif de la synthèse bibliographique.....	61
Questionnement découlant de cette synthèse	64
Chapitre 2 : Etude prospective	65
Chapitre 3 : Mise en œuvre expérimentale	77

Sous-Chapitre 3.1 : Mise en place des microcosmes	78
1.1 - Choix des molécules	78
1.2 - Test de chimie de surface	79
1.3 - Traitement du sol	80
1.3.1 – Préparation et acclimatation	80
1.3.2 – Epannage des herbicides	81
Sous-Chapitre 3.2 : Paramètres suivis et présentation des résultats	84
Partie II	87
Chapitre 4 : Etude toxicologique de la réponse de l'organisme modèle <i>Vibrio fischeri</i> aux mélanges d'herbicides de cette étude	89
Des bioessais aux microcosmes de sol : les apports des tests de toxicité	97
Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne	98
Introduction	100
Material and methods	101
Experimental design	101
Herbicide dissipation	103
Soil chemical analyses	103
Estimated soil microbial activities and biomass	104
Abundance of nitrifying and denitrifying communities	104
Quantification of nitrifiers	105
Quantification of denitrifiers	105
Soil microbial structures	106
Statistical analyses	106
Results	106
Herbicide dissipation	106
Soil chemical analyses	108
Responses of microbial communities	110
Discussion	114
Modifications in dissipation kinetics of the herbicides	114
Soil microbial communities resistance to herbicide mixtures	115
N-cycle communities expressed transients reactions to herbicides mixtures	116
Conclusion	118

Acknowledgments	118
Bibliography	119
Supplementary data	123
Des réponses pour le sol de Limagne : quid d’une généralisation des effets observés ?	128
Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d’herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols	129
Abstract.....	131
Introduction	132
Material and methods	133
Experimental design.....	133
Pigments extraction and analyses	135
Main phototrophic communities identification.....	136
Statistical analyses	136
Results	137
Soil colonization by phototrophic organisms.....	137
Effects of treatments on phototrophic colonization	139
Discussion.....	142
Microbial phototrophic colonization.....	142
Dual Gold Safeneur® as the major stressor of microbial phototrophic communities	143
Callisto® and Milagro® as non-significant stressors of microbial phototrophic communities	144
Conclusion	145
References	146
Supplementary data	150
Conclusions et perspectives	151
Références bibliographiques	165
Annexes	185
Annexe 1 : Rapport d’analyses du laboratoire des sols d’Arras	187
Annexe 2 : New molecular methods to study phototrophic microorganisms at the community level in terrestrial ecosystems	190

LISTE DES FIGURES ET TABLES

FIGURES

Figure 1 - Valeurs monétaires des marchés phytosanitaires européens principaux, en million d'euros (données de l'Union des Industries pour la Protection des Plantes (UIPP), 2009).....	10
Figure 2 - Concentrations moyennes en pesticides dans les cours d'eau français en 2011 (données statistiques du gouvernement).....	11
Figure 3 - Molécules pesticides les plus détectées dans les cours d'eau de métropole en 2010, en pourcentage d'analyses quantifiées de la substance (données statistiques du gouvernement).....	12
Figure 4 - Evolution de la contribution au NODU des pesticides entre 2008 et 2009 (adapté de la première note de service Ecophyto 2018).	15
Figure 5 - Evolution des tonnages des substances actives de pesticides vendues en France entre 1998 et 2011 (UIPP, 2011).....	16
Figure 6 - Ensemble des processus contrôlant le devenir des pesticides suite à leur épandage.	18
Figure 7 - Représentation des sites de sorption des pesticides au niveau des agrégats du sol. La macroporosité est symbolisée en bleu foncé, et la microporosité (mésoporosité $> 0,2\mu\text{m}$ et nanoporosité $< 0,2\mu\text{m}$) en rouge.	20
Figure 8 - Evolution des interactions des pesticides entre la phase solide et la phase liquide du sol. D'après Loiseau (2001).	23
Figure 9 - Comparaison des phénomènes de dégradation microbienne de métabolisme direct et de co-métabolisme, d'après Calvet (2005).....	25
Figure 10 - Présentation des grandes classes d'adjuvants. AEO : Ethoxylates d'alcool ; ANEO : Ethoxylates d'alkylamine ; APEO :Ethoxylates d'alkylphénol ; AEO :Ethoxylates d'acides gras. D'après (Nobels et al., 2011).	27
Figure 11 - Schéma simplifié décrivant les étapes du cycle de l'azote dans le sol avec le détail des produits intermédiaires (en gras) et des enzymes décrites (<i>en italique</i>). Inspiré des travaux de Phillipot et al. (2007).....	36
Figure 12 - Fréquence de données recueillies concernant les méthodes utilisées dans les études d'impact de pesticide sur les communautés microbiennes du sol. D'après Puglisi (2012).	42

Figure 13 - Présentation des différents modèles prédictifs utilisés dans les études d'écotoxicologie, avec l'intégration des notions de complexité, de représentativité, de simplicité de mise en œuvre et de reproductibilité. D'après Caquet et al. (1989).	47
Figure 14 - Proposition de voies de biodégradation de la mésotrione par une souche bactérienne isolée d'eau de nuage (<i>Bacillus sp. 3B6</i>). D'après Durand et al. (2010).	52
Figure 15 - Présentation des possibles voies de signalisation de gènes de défense et d'activation des voies de détoxification chez les plantes, par les herbicides safeneurs. D'après Riechers et al. (2010).	57
Figure 16 - Proposition de de biodégradation du nicosulfuron par une souche fongique isolée de boues activées (<i>Talaromyces flavus</i> LZM1). D'après Song et al. (2013).	60
Figure 17 - Schéma de synthèse reprenant les points clefs du travail bibliographique.....	62-63
Figure 18 - Photographie du dispositif expérimental de type microcosme, utilisé lors de l'étude prospective. (Photographie personnelle).	65
Figure 19 - Détail des différentes formulations commerciales employées dans cette étude (adapté des données Syngenta).	79
Figure 20 - Microcosme rectangulaire en polystyrène cristal de dimensions 90x60x50 mm (LxPxH).....	80
Figure 21 - Planning d'application des formulations commerciales herbicides, distinction des huit conditions de traitement (0, 1, 2 et 3 molécules) et des temps de prélèvement.	81
Figure 22 - Aérographe type TG-470 (buse de 0,3 mm de diamètre et réservoir gravitaire d'une capacité de 7 cc, Fraulein 3°8) utilisé pour cette étude.	82
Figure 23 - Présentation des chapitres de la Partie II, suivant les stratégies expérimentales suivies.	84
Figure 24 - Microbics M 500 toxicity analyzer utilisé pour la réalisation des tests de toxicité sur <i>Vibrio fischeri</i> dans cette étude (Photographie personnelle).	89
Figure 25 - Mise en place des microcosmes de sol, avant la pré-incubation de deux semaines précédent le début de l'expérimentation (Photographie personnelle).	98
Figure 26 - Communautés phototrophes de surface du sol de Versailles d'un microcosme contrôle, après 56 jours d'expérimentation.	129
Figure 27 - Abondance de la communauté AHAS dans les microcosmes contrôle (Co) et traités (Milagro : M ; Dual Gold Safeneur/Milagro : DG/M ; Callisto/Milagro : C/M et Dual Gold Safeneur/Callisto/Milagro : DG/C/M).	156
Figure 28 - Schéma de synthèse du devenir et des effets des mélanges d'herbicides employés à la dose agronomique, à court et moyen termes (en haut) et à long terme	

(en bas), sur les communautés microbiennes du sol de Limagne, dans les conditions expérimentales de cette étude.....	158
Figure 29 - Comparaison des propriétés physicochimique des deux sols utilisés dans le cadre du projet DevImCocMic	161
Figure 30 - <i>Graphical abstract</i> de la méthode proposée, réalisé lors de la première soumission de l'article.....	190

TABLES

Table 1 - Détail des caractéristiques pédologiques et physico-chimiques principales du sol de Limagne de cette étude.....	77
Table 2 - Quantités maximales d'ingrédient actif épandues par hectare.....	83

INTRODUCTION

Dans un monde en plein changement, fort d'une croissance démographique toujours en hausse (plus de 7 milliards d'êtres humains selon les Nations Unies en 2013¹ et une prévision estimée de 9 milliards pour l'horizon 2050), l'Homme doit faire face à de multiples problématiques. L'une d'entre elle : nourrir les habitants de notre planète ; ce qui sous-entend de produire toujours plus de nourriture dans un espace qui, lui, reste peu variable, celui des terres cultivables. L'avènement des techniques agricoles modernes, comprenant la mécanisation des techniques agricoles toujours plus perfectionnées, la sélection végétale et animale, et l'utilisation de produits phytosanitaires, a permis de dépasser les limites de production en termes de rendement et de qualité nutritive des aliments. A titre d'exemple, la production de blé en France en 1850 ne dépassait pas les dix quintaux à l'hectare alors qu'actuellement le rendement moyen est huit fois supérieur. Toutefois, ces grandes avancées technologiques entraînent à leur tour d'autres problématiques, environnementales cette fois-ci. Or, il est du devoir de l'Homme, pour préserver et maintenir l'équilibre de la biosphère, de prendre en considération ces problématiques environnementales et d'agir en conséquence, afin de développer une gestion durable des ressources en agriculture.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans cette thématique en se focalisant plus avant sur l'effet des pratiques agricoles actuelles sur le fonctionnement de l'écosystème sol et à plus grande échelle, au niveau de la biosphère. Depuis plusieurs années, une prise de conscience concernant le problème que peuvent représenter les pesticides (toxicité sur des organismes non cibles, rémanence, transfert entre écosystèmes, problèmes de santé humaine et animale...) mène à la réévaluation de certains composés et à l'augmentation des tests nécessaires à leur autorisation de mise sur le marché. Ainsi, des molécules dites de « première génération » se sont vues interdites et remplacées par de nouvelles molécules qui, appliquées en mélange avec d'autres molécules (nouvelles ou existantes), permettent le traitement des cultures à l'aide de doses moindres de pesticides.

Le sol agricole est une ressource qu'il faut préserver, pour les services écosystémiques qu'il permet et la production qu'il apporte. Son fonctionnement est assuré par les communautés qu'il abrite, dont les communautés microbiennes. Ces dernières, très diversifiées, assurent un ensemble de métabolismes essentiels dans le renouvellement des nutriments et la balance des

¹ <http://www.census.gov/popclock/>

composés chimiques. Ces mécanismes sont dépendants de relations complexes liant leur diversité et leur abondance à leurs potentiels métaboliques. Le sol est aussi un acteur majeur du stockage du carbone, ce qui ajoute un enjeu à sa préservation afin d'éviter toute possibilité d'impact sur les changements climatiques globaux.

De nombreuses études mettent en avant les effets délétères que peuvent entraîner les pesticides dans le sol (Lo, 2010; Puglisi, 2012) et permettent de faire évoluer les pratiques agricoles quant à leur utilisation. L'utilisation de multiples molécules, appliquées en mélanges directs ou de façon séquentielle, est désormais un phénomène courant pour le traitement des cultures. Cependant, ces pratiques de « mélanges de pesticides » sont à l'heure actuelle très peu étudiées, limitant les données sur les effets potentiels qu'ils peuvent avoir dans l'écosystème sol.

J'ai donc entrepris durant mes travaux de thèse de mettre en place des études visant à caractériser les effets de mélanges d'herbicides couramment employés sur les cultures de maïs (S-métolachlore, mésotrione et nicosulfuron), sur les communautés microbiennes du sol, afin d'apporter de nouvelles informations et de nouvelles pistes sur les effets des mélanges de molécules, tout en dégageant les enjeux majeurs soulevés par de tels travaux.

Le manuscrit se divise en deux parties :

— La **Partie I** fait un état des lieux sur la problématique des pesticides dans les sols (**Chapitre 1**). Elle resitue l'évolution des pratiques agricoles au cours des dernières décennies (Sous-Chapitre 1.1), décrit les interactions connues entre le sol et les molécules pesticides employées seules ou en mélanges (Sous-Chapitre 1.2) et les effets qu'elles peuvent entraîner sur les communautés microbiennes de façon générale (Sous-Chapitre 1.3). Une présentation des molécules herbicides choisies pour mes travaux de thèse est également faite (Sous-Chapitre 1.4). S'en suit une étude en microcosmes qualifiée « d'étude prospective » (**Chapitre 2**), initiée durant mes travaux de Master 2 et conclue durant ma première année de thèse, sur les effets d'un mélange de deux herbicides formulés, le S-métolachlore et la mésotrione, sur les communautés microbiennes d'un sol de la plaine de la Limagne (Auvergne). Cette étude prospective, **publiée en 2012**, a permis de dégager les conditions et les paramètres à suivre pour la réalisation des travaux de thèse à proprement parler. Une section « Mise en œuvre expérimentale », décrivant l'expérimentation mise en place, les différents paramètres suivis et les moyens utilisés pour les suivre, conclue cette Partie I (**Chapitre 3**).

— La **Partie II** est constituée de trois publications scientifiques. La première (**Chapitre 4, publiée en 2013**) est une étude de toxicologie des herbicides employés dans ces travaux de thèse, qui cherche à caractériser les effets de mélanges de ces molécules, formulées ou non, sur un organisme modèle : la bactérie *Vibrio fischeri*. La deuxième (**Chapitre 5**) est une étude en microcosmes qui s'intéresse aux effets sur les communautés microbiennes du sol, de ces mélanges d'herbicides formulés, appliqués à la dose agronomique et suivant un planning agricole réaliste. Les différentes analyses décrivent à la fois le devenir des molécules et les changements en termes de biomasse, de structure et d'activités des communautés microbiennes prises en globalité et incluant les communautés impliquées dans le cycle biogéochimique de l'azote. La troisième étude (**Chapitre 6**), menée en parallèle de la précédente, se focalise sur les effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de surface avec une comparaison de ces effets sur un second type de sol aux propriétés différentes (en termes de granulométrie et de contenu en matière organique).

La conclusion finale de ce travail de doctorat essaie d'apporter une réflexion dans les choix à faire, par la communauté scientifique, pour continuer de travailler sur ces thématiques d'écotoxicologie microbienne et plus précisément sur les mélanges de pesticides.

VALORISATION DES TRAVAUX AU COURS DE LA THESE

Publications :

- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J., and Mallet, C. (2012). Impact of maize formulated herbicides Mesotrione and S-Metolachlor, applied alone and in mixture, on soil microbial communities. **ISRN Ecology**, 2012, 1–9.
- Joly, P., Bonnemoy, F., Charvy J-C., Bohatier, J., and Mallet, C. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. **Chemosphere**, 2013, 2444–2450.

Communications orales :

- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J. et Mallet C. Impact d'un cocktail d'herbicides employé sur le maïs (Callisto + Dual Gold), sur les communautés microbiennes édaphiques. *8ème journée des Microbiologistes clermontois*, Clermont-Ferrand (France), Avril 2011.
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J. et Mallet C. Impact d'un cocktail d'herbicides sur les communautés microbiennes édaphiques : une approche expérimentale en microcosme. *Journées Thématiques du Groupement des Protistologues de Langue Française (GPLF) 2011*, Clermont-Ferrand (France), Octobre 2011
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Perrière, F., Bohatier, J., and Mallet, C., Impact of Herbicide Mixtures, on Soil Microbial Communities. *4th International Congress of the European Soil Science Societies Eurosoil 2012: Soil Science for the Benefit of Mankind and Environment*, Bari (Italy), July 2012.
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Perrière, F., Bohatier, J., and Mallet, C., Impact of Maize Herbicide Mixtures in Soil on the Nitrogen Cycle. *7th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and the 13th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides*, Porto (Portugal), October 2012.
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Perrière, F., Bohatier, J., and Mallet, C., Fate of realistic maize herbicide mixtures and impacts on soil microbial communities. *York Pesticides 2013 - Pesticide Behaviour in Soils, Water and Air*, York (United Kingdom), September 2013.

Posters :

- Bardot, C., Besse-Hoggan, P., Joly, P., and Batisson, I. Fate of the herbicide mesotrione in the environment: coupling of chemical and biological (2D-DIGE) approaches to identify its degradation pathway by a *Bacillus* sp. strain isolated from an agrosystem. *4th International Congress of the European Soil Science Societies Eurosoil 2012: Soil Science for the Benefit of Mankind and Environment*, Bari (Italy), July 2012.
- Dumas, E., Giraudo, M., Joly, P., Nkhili, E-Z., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bohatier, J., Bouchard, P., Celle-jeanton, H., Costa Gomes, M., Delbac, F., Forano, C., Guix, N., Ledoigt, G., Mallet, C., Mousty, C., Perrier, C., Richard, C., and Sarraute, S. Fate and impact of pesticides: a multi-scale and interdisciplinary study for a rational use. *4th International Congress of the European Soil Science Societies Eurosoil 2012: Soil Science for the Benefit of Mankind and Environment*, Bari (Italy), July 2012.
- Bardot C., Besse-Hoggan P., Joly, P., and Batisson, I. Fate of the herbicide mesotrione in the environment: coupling chemical and biological (2D-DIGE) approaches to identify the herbicide mesotrione degradation pathway by a *Bacillus* sp. strain isolated from an agrosystem. *7th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and the 13th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides*, Porto (Portugal), October 2012.
- Stauffert M., Boisnoir M., Bardot C., Besse-Hoggan P., Perrière F., Joly P., Mallet C., and Batisson I. Isolation and characterization of edaphic herbicide-degrading fungal strains after exposure to a mixture of herbicides. *York Pesticides 2013 - Pesticide Behaviour in Soils, Water and Air*, York (United Kingdom), September 2013.
- Joly P., Besse-Hoggan P., Bonnemoy F., Perrière F., Bohatier J. et Mallet C.. Devenir dans le sol de mélanges réalistes d'herbicides et leurs impacts sur les communautés microbiennes édaphiques. *Association Francophone d'Ecologie Microbienne : AFEM 2013 – Parent* (France), Octobre 2013.



PARTIE I

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Afin de répondre à la nécessité d'une production végétale abondante, les écosystèmes naturels sont intensivement transformés et exploités. Les milieux cultivés, aussi nommés agrosystèmes, se caractérisent par leur forte anthropisation, une modification des espèces végétales indigènes, et l'apport important d'intrants de type fertilisant ou pesticide, parfois utilisés en mélange de plusieurs molécules actives. Ces milieux particuliers présentent un intérêt majeur de nos jours de par les enjeux environnementaux qu'ils soulèvent : la modification des cycles biogéochimiques et des flux hydriques favorisant les phénomènes d'érosion et de pollution diffuse dans les sols, mais également à plus large échelle, des milieux aquatiques et atmosphériques.

SOUS-CHAPITRE 1.1 : DE L'USAGE DES PESTICIDES

1.1 - Introduction aux pesticides / produits phytosanitaires

Le terme pesticide (qui englobe les phytosanitaires) tire son origine d'une double étymologie : anglaise pour *pest-* (animal, insecte ou plante nuisible) et latine pour le suffixe *-cide* (tuer). Il désigne les substances inorganiques (sulfate de fer, cuivre...) et organiques de synthèse, répandues pour lutter contre les organismes jugés nuisibles. Les pesticides, appartiennent à la catégorie des biocides qui comprend également les antiparasitaires, les antibiotiques et les désinfectants. Ils sont classés suivant leur cible d'action.

Ainsi, on distingue de façon non exhaustive au sein des pesticides : les herbicides (action sur les adventices), les insecticides (action sur les insectes), les fongicides (action sur les champignons), les algicides (action sur les algues), les acaricides (action sur les acariens), les nématocides (action sur les nématodes), les hélicides (action sur les gastéropodes pulmonés), les rodenticides (action sur les rongeurs) et les corvicides (action sur les oiseaux ravageurs).

Les herbicides (ou désherbants, phytocides, débroussaillants), substances d'intérêt dans ce travail de thèse, sont utilisés majoritairement en agriculture, mais également pour des usages domestiques (jardins, espaces verts) et d'entretien des voiries. En 2011, en France, environ 62700 tonnes de pesticides ont été vendues².

² <http://www.epp.eurostat.ec.europa.eu>

Leur application au champ se fait sous forme de formulations commerciales, contenant 10 à 15% de matières actives (les molécules pesticides proprement dites), et le reste sous forme d'adjuvants ou de supports (type granulés), afin d'accroître leur efficacité.

Deux types d'application existent pour l'emploi des molécules herbicides :

- La pulvérisation aérienne sur les cultures ou sur le sol, utilisant les pesticides formulés sous forme liquide, appliqués à la dose agronomique recommandée (dilution de la formulation mère suivant la zone à couvrir).
- L'incorporation dans le sol sous forme de granulés enrobés des molécules phytosanitaires.

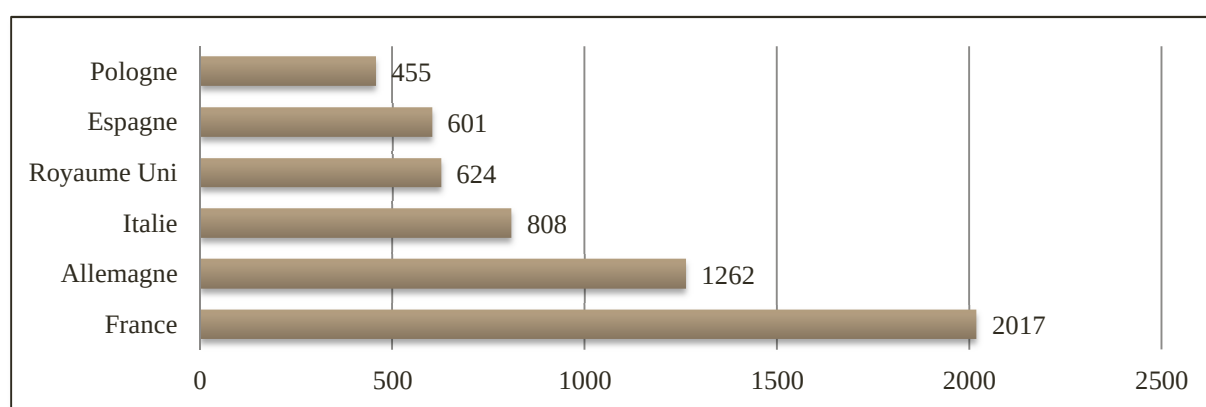


Figure 1 – Valeurs monétaires des marchés phytosanitaires européens principaux, en million d'euros (données de l'Union des Industries pour la Protection des Plantes (UIPP), 2009).

La France est le premier acheteur de pesticides en Europe (Figure 1). Cependant, compte tenu de sa surface agricole utile (SAU) qui représente 22% de la SAU de l'Union Européenne, la France est le troisième utilisateur européen de pesticides (en rapportant ces quantités à la surface cultivée). Les données monétaires placent notre pays au 3^{ème} rang mondial, derrière les Etats Unis et le Japon. Enfin, toujours selon l'UIPP, les molécules herbicides restent toujours les molécules actives les plus employées dans les traitements phytosanitaires.

1.2 - Risques pour l'environnement et la santé humaine

Souvent d'actualité et décriés, les pesticides posent problème par les risques pour l'environnement et la santé humaine qu'ils présentent, à plus ou moins long terme. Ceci est dû à des effets qui vont au-delà de leur cible d'action première.

Ce problème de premier plan a déjà été grandement décrit et étudié.

Comme exposé précédemment, le mode d'application des pesticides (par pulvérisation de solutions, ou par incorporation de granulés), entraîne un transfert des molécules dans le sol, mais également vers les systèmes atmosphériques (aérosols) et aquatiques (phénomènes de lessivage et de ruissellement). Cette **pollution multi-écosystèmes** est peu évidente à caractériser, car **multifactorielle** (propriétés intrinsèques du/des pesticide(s), dose employée, type de sol, conditions climatiques, conditions hygrométriques...). De plus, leur devenir dans l'environnement fait intervenir des mécanismes de dissipation biotiques et abiotiques (dégradation, résidus liés, minéralisation...), également dépendants des facteurs décrits ci-dessus.

La bonne qualité de l'eau, traduite en partie par l'analyse chimique des cours d'eau français, renseigne sur la présence des pesticides dans les hydro-systèmes. Au-delà du seuil de 5 µg/L, l'eau est réglementairement impropre à la production d'eau potable et au-delà du seuil de 0,5 µg/L, elle est impropre à la consommation humaine.

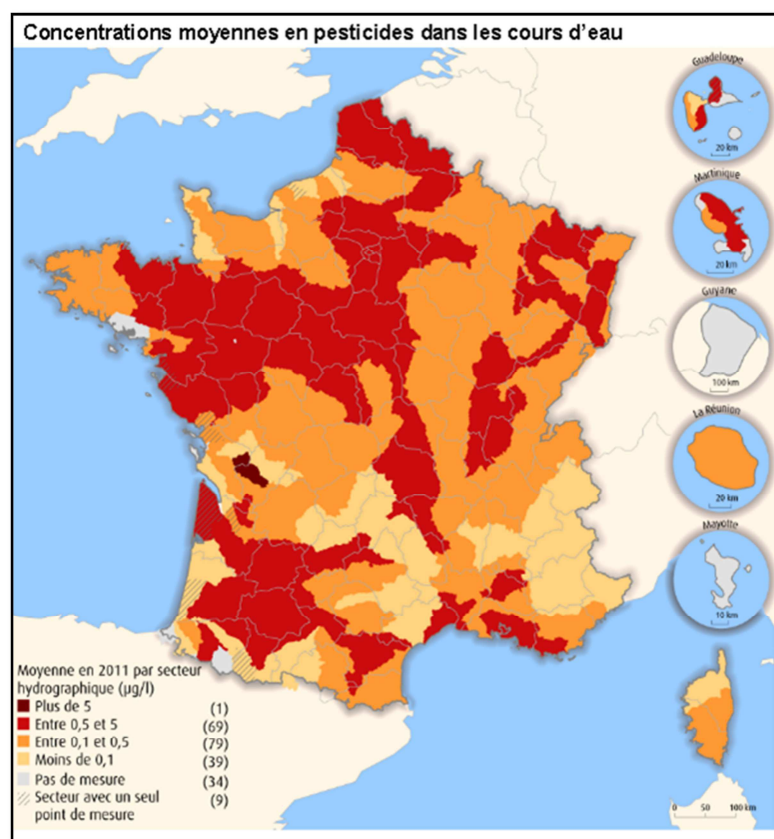


Figure 2 – Concentrations moyennes en pesticides dans les cours d'eau français en 2011 (données statistiques du gouvernement).

Sur les 176 secteurs hydrographiques de France métropolitaine (Figure 2), 69 présentent une concentration moyenne supérieure à 0,5 µg/L, dont 4 dépassent 2 µg/L. 17 secteurs présentent une moyenne annuelle supérieure à 5 µg/L. Ces points se situent dans les zones de grande culture du

nord de la France, du bassin parisien et du sud-ouest (données du Service de l'Observation et des Statistiques – SOeS, 2013). En métropole, seuls 7 % des points sont exempts de pesticides. Ils sont majoritairement situés dans les régions peu agricoles ou à agriculture peu intensive : quart Sud-Est, Auvergne.

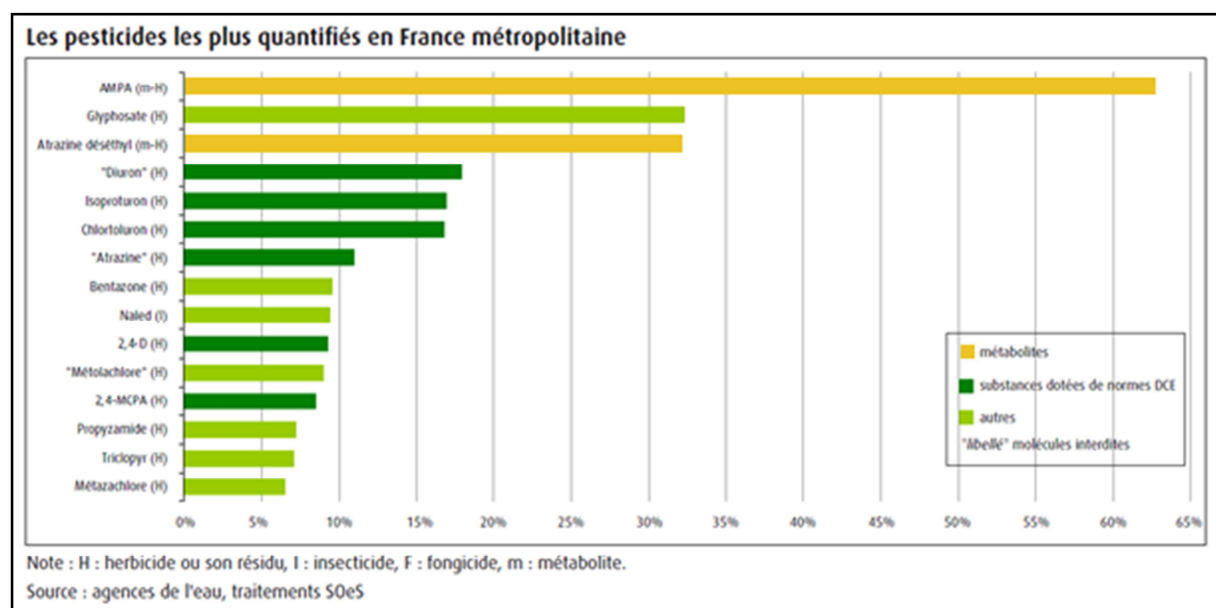


Figure 3 - Molécules pesticides les plus détectées dans les cours d'eau de métropole en 2011, en pourcentage d'analyses quantifiées de la substance (données agences de l'eau et traitements SOes).

Les herbicides sont les substances majoritairement retrouvées dans les cours d'eau (Figure 3). Parmi eux, le glyphosate et son métabolite AMPA (acide amino-méthylphosphonique), devançant l'atrazine et son métabolite déséthylé. Ces deux dernières molécules sont toujours retrouvées dans certains cours d'eau, malgré l'interdiction effective de l'atrazine en France, depuis 2003.

Les pesticides provoquent des effets de deux types ecotoxicologiques : **chroniques** et **aigus**.

Les effets chroniques découlent directement de l'accumulation et de la rémanence des substances dans l'environnement, comme le soulignent en partie les données présentées (Figures 2 et 3). En conséquence, ces molécules ont tendance à s'accumuler dans le biotope et au sein des réseaux trophiques, et peuvent donc être retrouvées chez l'Homme. Elles peuvent entraîner à terme des cancers, des perturbations du système endocrinien, du système immunitaire, du développement embryonnaire et des capacités de reproduction (Alavanja and Bonner, 2012; Kamel and Hoppin, 2004).

Les effets aigus sont de deux ordres. Ils apparaissent lorsque la concentration en pesticide est très importante sur un laps de temps très court, impactant des organismes qui n'auraient pas été touchés à faible dose. Ils découlent également de la présence chez des organismes non-cibles de processus métaboliques proches de ceux existants chez un organisme cible, et qui pourront donc être ciblés par un pesticide donné. Tel est le cas par exemple des organismes

phototrophes au métabolisme photosynthétique proche de celui des plantes, et qui de ce fait, peuvent être impactés par certains herbicides, à des doses environnementales.

1.3 - Règlementation

La prise de conscience de la problématique « pesticide » n'est pas chose nouvelle et bien qu'une diminution des quantités de pesticides employées soit observée dans certains pays d'Europe à l'heure actuelle, tout ceci ne s'est fait que progressivement.

— Très tôt, dans les années 1970, une prise de conscience concernant les problèmes humains et environnementaux découlant de la mauvaise utilisation des pesticides a conduit à la création de l'**IPM** (Integrated Pest Management program) par la commission des communautés européennes. Le but de l'IPM est d'encadrer l'utilisation des pesticides, afin de permettre leur régulation et leur contrôle, leur bonne application et assurer leur sûreté d'utilisation. Un de ses objectifs principaux est de réduire les résidus issus des pesticides dans l'environnement.

— En 1992, la Commission Européenne a lancé un programme pour initier un processus de révision de toutes les molécules actives utilisées pour la protection des plantes (phytosanitaires) au sein de l'UE. Dans ce processus de révision basé sur des expérimentations scientifiques, chaque molécule doit prouver son innocuité à l'égard d'un set de critères comprenant la santé humaine, l'environnement, l'écotoxicité et les résidus dans la chaîne alimentaire.

- Si un pesticide est approuvé par la directive cadre sur les pesticides **91/414/CEE**³, il est placé en **Annexe I** et peut être utilisé parmi les pays membres. Il peut néanmoins être assujéti de dérogations pour « usages essentiels » sur certaines cultures.
- Si un pesticide est désapprouvé par cette directive, la substance est bannie ou soumise à de sévères restrictions, sans dérogations possibles pour des « usages essentiels ».

A titre d'exemple, en avril 2008, sur 1218 substances (incluant 136 nouvelles), 320 restent en attente de révision. Un total de 708 substances ont été bannies, sous réserve de dérogations, ou ont leur enregistrement sous réserve. A l'heure actuelle, 190 substances ont été autorisées.

³ <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31991L0414:fr:HTML>

— En octobre 2007, le Parlement Européen a approuvé de nouvelles règles très strictes sur l'acceptation de pesticides de l'UE, proposées par la Commission, qui ont eu des conséquences commerciales pour les firmes produisant les produits phytosanitaires, mais qui constituent une étape importante pour la protection des utilisateurs et de l'environnement.

Le Parlement Européen a voté l'interdiction de l'épandage aérien des pesticides et a prohibé leur utilisation dans les zones tampons aux alentours des cours d'eau. Il a aussi approuvé des démarches d'interdiction, ou au moins de restriction, des pesticides dans les parcs et les terrains de sport et l'interdiction totale des substances génotoxiques, carcinogènes, neurotoxiques, immunotoxiques et toxiques pour la reproduction, ou perturbatrices du système endocrinien.

La Commission Européenne a proposé que la plupart des nouvelles substances soient approuvées initialement pour 10 à 15 ans en fonction du risque potentiel qu'elles présentent. Celles qui pourraient être remplacées par des substances moins toxiques seraient approuvées pour seulement 5 années. Leur renouvellement peut être fait « une à plusieurs fois, pour une période ne dépassant pas 10 ans ».

— En Juin 2007, le programme « **Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals** » (REACH, 2009) est entré en vigueur. Ce nouveau programme Européen a pour objectif de protéger la santé humaine et l'environnement, en empêchant tout dommage qui pourrait découler de la production, de l'utilisation ou de l'élimination des produits chimiques industriels dangereux. En conséquent, le programme REACH a besoin de se baser sur des méthodes analytiques solides dans le but d'identifier et de permettre l'élimination progressive des composés les plus dangereux et ainsi préserver l'environnement.

La responsabilité des expérimentations sur la toxicité pour l'environnement est progressivement passée des autorités à l'industrie. Le programme REACH est proposé pour couvrir les substances existantes et nouvelles, et exige des organisations industrielles qui fabriquent ou importent plus d'une tonne par an de produits chimiques, d'enregistrer ces produits dans une base de donnée centrale. La plus-part des pesticides étant produits en grandes quantités, ils sont donc soumis à ce programme.

Cependant, les substances utilisées uniquement pour la protection des plantes et incluses par ailleurs dans l'Annexe I de la Directive 91/414/EEC, les réglementations EEC 3600/92, 703/2001,

1492/2002 ou la décision 2003/565/EC, sont considérées comme étant enregistrées et ne sont donc pas soumises à la ré-immatriculation dans le cadre du programme REACH.

Au final, on note qu'actuellement l'accent est mis sur l'amélioration des données d'analyse concernant la présence de contaminants organiques dans les différents compartiments de l'environnement. A présent, un grand nombre de publications rapportent les avancées sur les analyses des pesticides, motivées aussi par d'autres règlements et lignes directrices que celles du programme REACH :

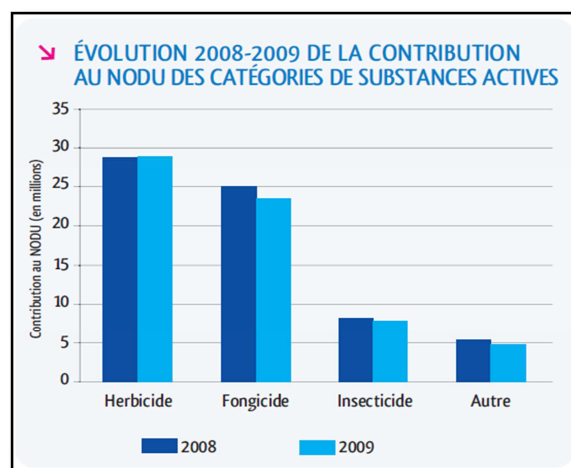
— Le **Grenelle de l'Environnement** qui a eu lieu en 2007, vise une réduction de 50% des quantités de matières actives utilisées d'ici l'horizon 2018.

— Découlant directement du Grenelle de l'Environnement, le plan **Ecophyto 2018** a été créé dans le but d'atteindre cet objectif. Il constitue l'engagement des parties prenantes – qui l'ont élaboré ensemble – à réduire de 50% l'usage des pesticides au niveau national dans un délai de dix ans, si possible. Le plan Ecophyto 2018 vise notamment à réduire la dépendance des exploitations agricoles aux produits phytopharmaceutiques, tout en maintenant un niveau élevé de production agricole, en quantité et en qualité.

La première note de service parue en 2010⁴ qui compile les données de 2008 et 2009, sert de ligne de base et permet d'apprécier les tendances à venir au travers du Nombre de Doses Unitaires (NODU), indicateur retenu, relatif à la quantité de substance vendue par dose unitaire de substance active.

Des quatre grands groupes de pesticides, seuls les herbicides connaissent une légère hausse entre 2008 et 2009 (Figure 4).

Figure 4 – Evolution de la contribution au NODU des pesticides entre 2008 et 2009 (adapté de la première note de service Ecophyto 2018).

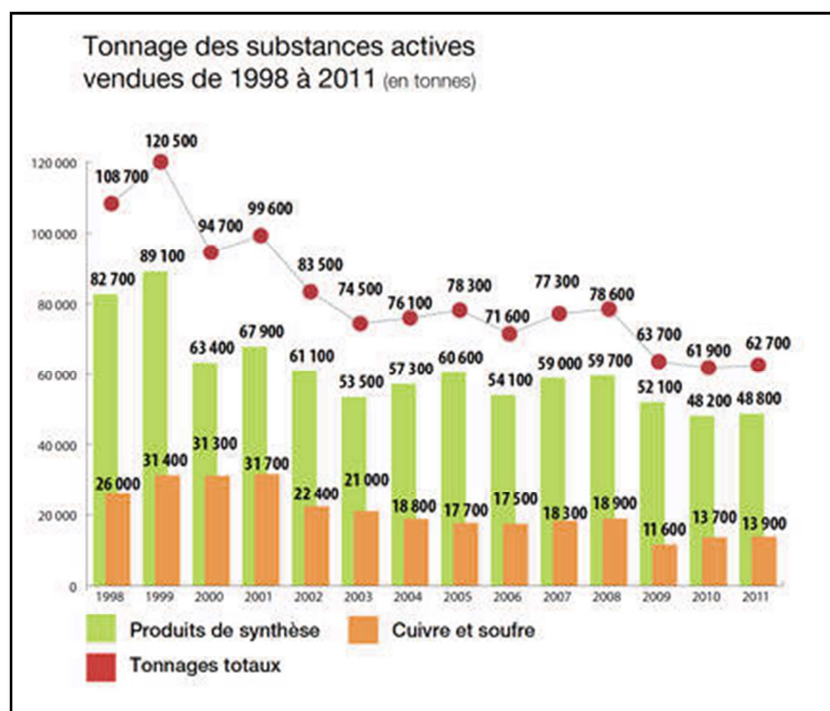


Le NODU général semblait amorcer une légère baisse, de 67 millions en 2008 à 65 millions en 2009. Cette tendance reste cependant stable depuis 2008.

⁴ <http://agriculture.gouv.fr/ecophyto>

Figure 5 – Evolution des tonnages des substances actives de pesticides vendues en France entre 1998 et 2011 (UIPP, 2011).

Le suivi des tonnages de molécules actives vendues en France (Figure 5) témoigne de la diminution effective (environ 4% par an) du tonnage général de pesticides vendus. Cette évolution peut s'expliquer par la hausse des prix des



intrants, l'instabilité des marchés et l'amélioration des pratiques agricoles. On remarque cependant une légère hausse dans les dernières données communiquées entre 2010 et 2011, de 61900 à 62700 tonnes.

Toutefois, le tonnage est un indicateur peu significatif lorsqu'il y a substitution de molécules par d'autres à des doses plus faibles, ce qui explique la stabilité du NODU depuis 2008. Ceci étant, à dose ou poids égal, les molécules utilisées de nos jours sont bien plus efficaces dans leurs cibles d'action que les molécules des précédentes générations (IUPP).

1.4 - De la molécule seule aux mélanges de pesticides

Due à leur toxicité élevée pour l'environnement, de nombreuses molécules pesticides se sont vues progressivement interdites et remplacées par d'autres molécules, existantes, ou dites de nouvelle génération. Ces remplacements entraînent l'utilisation de molécules aux actions similaires, ou dont l'effet combiné équivaut à celui des molécules interdites (les molécules interdites ayant bien souvent une action systémique), à des doses moindres (Zhang et al., 2013).

Parmi les molécules couramment utilisées par le passé et désormais interdites en France, on retrouve les herbicides tels que l'atrazine, la simazine, le diuron et le paraquat, le fongicide captafol et les insecticides lindane et naled.

A titre d'exemple, jusqu'en 2002, les herbicides organo-azotés de la famille des triazines (atrazine, simazine) constituaient les produits phytosanitaires les plus utilisés en France, et permettaient le traitement de 80% en termes de surface du maïs conventionnel. Depuis juin 2003, après 41 années d'utilisation, cette famille de molécules est totalement interdite en France (Graymore et al., 2001; Miquel, 2003). Pour remplacer ces herbicides, un ensemble de 307 spécialités sont disponibles et autorisées pour le désherbage du maïs en France⁵ (données Août 2013). Il en va de même pour la diversité des préparations remplaçant les autres molécules interdites.

Les produits phytosanitaires qui remplacent les molécules interdites sont nombreux, et utilisés suivant les nécessités agricoles (prétraitement, traitement en cours de saison culturale en réponse aux nuisibles, respect du délai avant récolte...). **Il est donc impossible de définir une molécule ou un mélange de molécules comme remplaçant direct d'un pesticide interdit, mais plutôt comme un ensemble de candidats potentiels, en temps qu'outils disponibles pour l'agriculteur, afin d'assurer le rendement des cultures. De ce fait, une multitude de molécules peuvent potentiellement se retrouver dans le sol et interagir avec ses différents constituants.**

⁵ <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

SOUS-CHAPITRE 1.2 : PESTICIDES ET SOL

Le sol est la résultante de l'altération de la roche mère sous l'influence du climat, de la végétation et des organismes. Il est constitué d'une matrice poreuse et hétérogène, composée d'agrégats organo-minéraux de tailles variables (Gobat et al., 1998). L'eau (solution du sol) et l'air circulent dans le sol entre les agrégats (macroporosités) et dans les agrégats (microporosités). L'eau du sol est le vecteur des pesticides au sein de cette matrice complexe et se présente sous deux formes : liée, sous forme de pellicule à la surface des agrégats et donc peu mobile, et libre, circulant dans la porosité du sol.

Les molécules de pesticides épandues sont transférées sous forme particulaire ou dissoute dans les sols. Leur distribution au sein de la matrice organo-minérale ainsi que leur répartition entre les phases liquide et solide varient suivant leur affinité propre (solubilité, sorption) et les conditions pédoclimatiques. De cette répartition dépendra leur devenir, notamment leur biodisponibilité, facteur essentiel qui détermine les effets potentiels des molécules sur les communautés du sol (macro et microfaune), le fonctionnement de l'écosystème et également leur dissipation (minéralisation). Ces différents paramètres influent *in fine* sur la capacité de transfert de ces molécules vers d'autres écosystèmes (Figure 6).

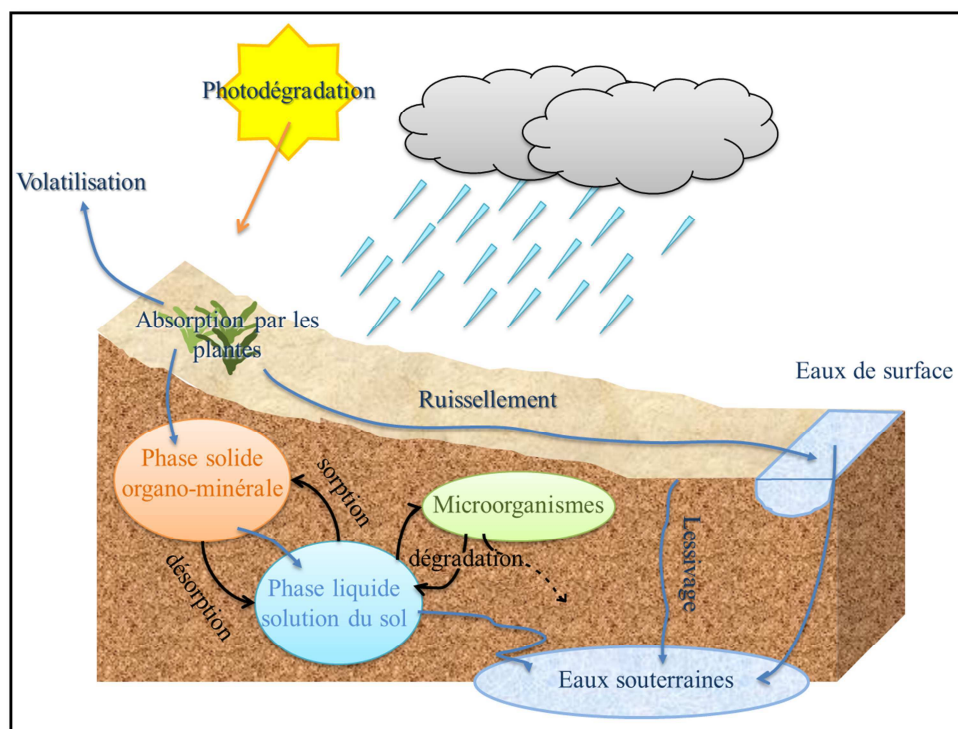


Figure 6 – Ensemble des processus contrôlant le devenir des pesticides suite à leur épandage.

2.1 - Temps de résidence des pesticides dans le système sol

Le devenir des pesticides dans le sol et donc le temps qu'ils vont passer dans ce système, dépend des propriétés intrinsèques de chaque molécule, mais également des caractéristiques propres à chaque sol. Le processus de rétention est sous le contrôle direct des interactions de sorption-désorption qui s'exercent entre les molécules organiques en solution et les composantes du sol. Le partage entre la phase aqueuse et la phase solide varie suivant la solubilité dans l'eau de chaque molécule herbicide et les caractéristiques de rétention des constituants du sol (quantité et qualité de la matière organique, composition de la fraction minérale, présence de métaux). D'autres facteurs tel que l'humidité, le pH et la structure du sol influent sur la distribution des molécules pesticides dans le sol (Arias-Estévez et al., 2008).

2.1.1 - Mécanismes de sorption-désorption

Le terme **sorption** regroupe les phénomènes d'**adsorption** (phénomène de surface dans lequel des atomes, des molécules de gaz ou de liquides se fixent à des surfaces solides) et de **diffusion** (phénomène de passage des molécules à l'intérieur de l'adsorbant), qui régissent le partage entre la phase liquide et la phase solide du sol. Les phénomènes de sorption sont dépendants de la solubilité, de la polarité, de la masse moléculaire et du temps de résidence des pesticides dans les sols (Gevao et al., 2000; Thompson and Goyne, 2012). Un phénomène d'équilibre dynamique des mécanismes de sorption-désorption s'opère entre les fractions adsorbées et en solution, suivant des constantes propres à chaque produit phytosanitaire. Plusieurs coefficients de partage permettent de caractériser la rétention des molécules de pesticide.

Le coefficient K_d (partage sol-eau) d'une part, caractérise la **rétention** d'un sol pour une molécule donnée, suivant l'équation $K_d = A / C$, avec A la concentration du pesticide fixé et retenu par le sol, et C la concentration du pesticide en solution dans l'eau du sol.

Le coefficient K_{oc} (partage carbone organique-eau) d'autre part, dérive du calcul du K_d , et permet l'estimation de l'**adsorption due à la matière organique**, suivant l'équation $K_{oc} = (K_d / \%OC) * 100$, avec %OC le pourcentage de carbone organique du sol.

L'utilisation du K_d et du K_{oc} permet d'estimer théoriquement la biodisponibilité d'un produit défini.

Toutefois, l'équilibre des phénomènes de sorption-désorption est rarement atteint du fait de la fluctuation des taux d'humidité dans les sols, entraînant des modifications de la teneur hydrique dans la macroporosité. Ce phénomène instaure un gradient de concentrations entre la solution du sol et la phase solide où sont adsorbées les molécules, pouvant entraîner la désorption de ces dernières au niveau de la macroporosité. Au niveau de la microporosité à l'inverse, la désorption des molécules est plus difficilement observée du fait des forces d'interaction plus importantes et du faible renouvellement de l'eau (Figure 7).

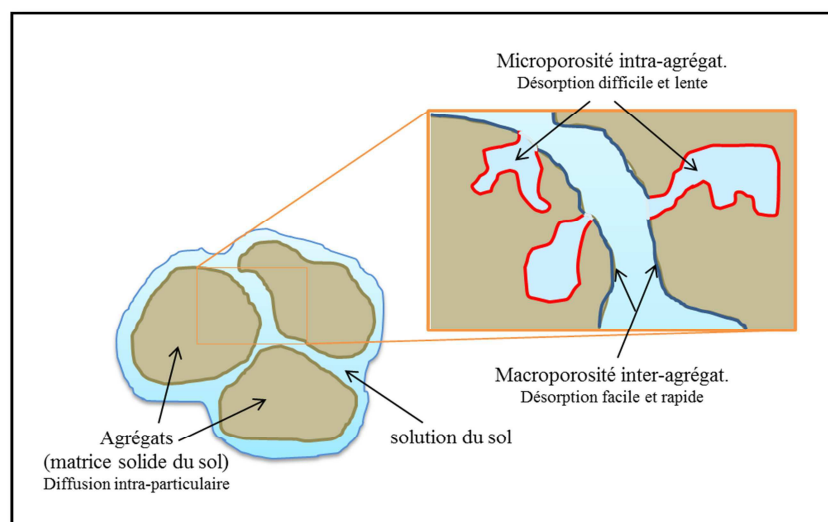


Figure 7 – Représentation des sites de sorption des pesticides au niveau des agrégats du sol. La macroporosité est symbolisée en **bleu foncé**, et la microporosité (mésoporosité $> 0,2\mu\text{m}$ et nanoporosité $< 0,2\mu\text{m}$) en **rouge**.

L'évolution temporelle des phénomènes de sorption-désorption est donc fonction des propriétés physico-chimiques des pesticides et également des caractéristiques pédoclimatiques.

2.1.2 - Facteurs influençant les mécanismes de sorption-désorption

2.1.2.1 - Les propriétés physico-chimiques des pesticides

Les pesticides possèdent des propriétés chimiques propres (potentialité d'ionisation, solubilité et polarité), qui sont déterminées par la nature et la position des groupements chimiques de la molécule. Les interactions de sorption-désorption et de diffusion vont dépendre directement de ces propriétés chimiques (Barriuso et al., 2008). La grande diversité des familles de molécules induit une grande variabilité de comportement des molécules dans le sol. Les molécules ionisées vont interagir avec les surfaces minérales et organiques, tandis que les molécules non-ionisées s'adsorbent majoritairement à la matière organique (Thompson and Goyne, 2012). Les molécules très solubles verront leur passage facilité dans la porosité, ce qui n'est pas le cas des molécules peu solubles, à grande capacité de sorption à la matrice solide du sol (Beulke et al., 2004; Loiseau, 2001).

2.1.2.2 - Les fractions minérales et organiques du sol

La matière organique du sol et sa fraction minérale argileuse constituent les deux facteurs pédologiques principaux impliqués dans le phénomène de rétention des pesticides. Ainsi, leur part relative dans la constitution de la matrice sol va directement influencer sur la capacité de ce dernier à retenir les pesticides (Thompson et Goyne, 2012).

En tant qu'acteur principal dans l'adsorption, la matière organique (MO) varie dans sa composition en termes de qualité et de quantité. Issue de la décomposition des différents éléments du vivant qui peuplent et jonchent le sol, la MO se présente sous forme particulière insoluble (MOP) et dissoute (MOD). La structure très hydrophobe de la MO lui confère une forte affinité pour les molécules peu solubles (Schnitzer and Khan, 1975). La MOP, majoritaire, se décline en deux types : la matière organique fraîche (MOF) et la matière organique humifiée (MOH). La MOF est composée de sucres simples et complexes (cellulose, lignine, chitine), de protéines, de lipides et d'acides organiques. La MOH est constituée d'acides fulviques et humiques, solubles dans l'eau, et d'humines insolubles. Cette fraction humifiée possède la plus forte affinité pour les pesticides, qui sont généralement des molécules hydrophobes (Qiu et al., 2009). Elle crée des relations de forte sorption difficilement réversibles avec les pesticides, dont la formation de résidus liés non extractibles (Gevao et al., 2000).

Les minéraux du sol ont un faible impact sur la rétention des pesticides. Les pesticides ayant une affinité plus forte pour la fraction organique, la fraction minérale interviendra principalement dans le cas de sols pauvres en composés organiques (Calvet, 2005). Cependant, dans le cas de pesticides ionisables, un phénomène d'adsorption est observé pour les argiles (particules de taille $< 2\mu\text{m}$), mais ce phénomène reste toutefois plus réversible que les interactions hydrophobes rencontrées dans le cas de la MOH. La formation d'un complexe adsorbant composé du mélange entre argiles et composés organiques (complexe argilo-humique) peut se créer dans le sol *via* l'activité biologique et augmenter ainsi la rétention des pesticides en favorisant l'importance de la microporosité et donc le phénomène de sorption (Laird et al., 1994).

2.1.2.3 - Le pH du sol

Le pH du sol va directement influencer sur l'état d'ionisation des molécules et indirectement sur les constituants du sol, modifiant ainsi les mécanismes de sorption-désorption (Sheng et al., 2005; Yang et al., 2004). La MO favorisant les interactions hydrophobes de forte énergie, une

augmentation du pH va entraîner l'ionisation des molécules pesticides et donc leur solubilité et leur biodisponibilité. Cette ionisation des molécules favorise également leur sorption via des interactions de faible énergie, qui sont donc facilement réversibles.

L'action du pH sur les constituants du sol s'effectue au niveau de leur agrégation et de leurs caractéristiques physico-chimiques, modifiant ainsi les interactions de sorption-désorption.

2.1.2.4 - L'humidité, la structure et le type de sol

L'humidité du sol va agir sur la dispersion des molécules pesticides au sein de la matrice et sur leur distribution au niveau des surfaces adsorbantes. En fonction de la taille des agrégats de la matrice et de la teneur en macro et microporosités, la circulation de l'eau sera modifiée, tout comme la distribution des molécules pesticides (Beulke et al., 2004). Une diminution de la taille des agrégats augmente la surface d'échange et la quantité de sites de sorption, ce qui accroît la rétention de certaines molécules pesticides.

Les sols agricoles sont régulièrement soumis au labour, action mécanique qui déstructure le sol (tout comme les cycles de gel-dégel et l'action de la macrofaune du sol), permettant ainsi l'accession à l'eau du sol aux sites de sorptions jusqu'alors inaccessibles, et favorisant la désorption des pesticides et la libération des résidus liés (Loiseau, 2001).

2.1.3 - Passage à l'état de résidus liés

On nomme résidus liés les pesticides (molécules mères et métabolites) qui avec le temps de résidence dans le sol, vont lentement diffuser vers des sites de sorption de forte énergie au sein de la microporosité (voir dans les agrégats) et être séquestrés dans le sol, au point de ne plus pouvoir être extraits par les méthodes chimiques conventionnelles (Gevao et al., 2000). Ce statut spécial de résidu lié, fait qu'il est difficile de quantifier ces molécules si ce n'est par l'utilisation de molécules marquées (Barriuso et al., 2008; Gevao et al., 2000) ou de techniques d'immunolocalisation (Dankwardt and Hock, 2001).

Actuellement les résidus liés sont considérés comme une forme « transitoire » de stabilisation des molécules (Barriuso et al., 2008; Loiseau, 2001), progressivement relarguées dans le sol et donc à nouveau biodisponibles (Figure 8).

2.1.4 - Etat de biodisponibilité des pesticides

L'ensemble des mécanismes et des facteurs décrits précédemment influent sur la quantité de pesticide disponible en solution dans le sol (Calvet, 2005; Loiseau, 2001) et donc sur leur

transfert vers les écosystèmes aquatiques. Cette fraction disponible l'est aussi pour les organismes. La biodisponibilité conditionne l'efficacité des molécules en tant que phytosanitaire, mais aussi leur potentielle dégradation et leur toxicité vis-à-vis des organismes du sol. La biodisponibilité des molécules est donc au cœur des processus écotoxiques et de dégradation des molécules dans le sol.

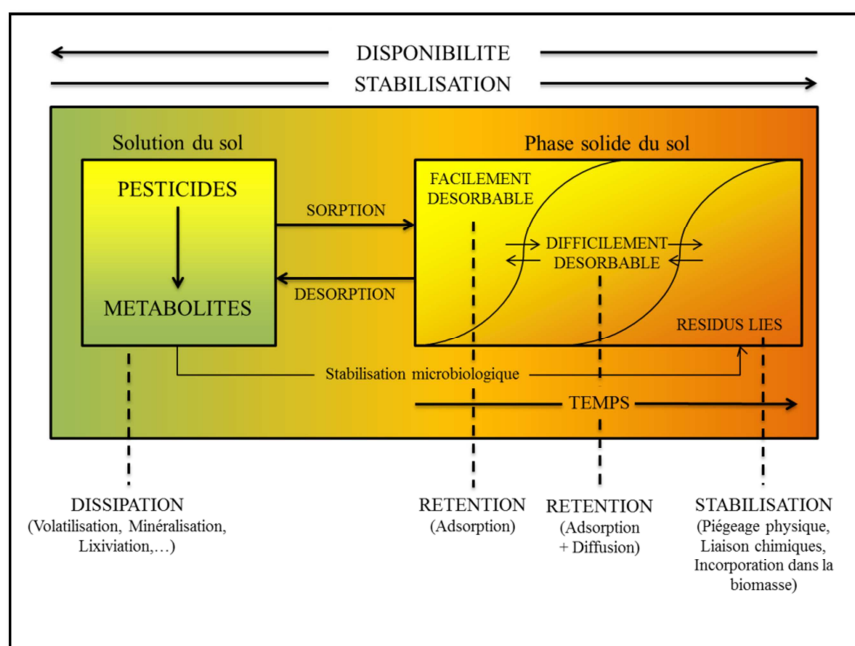


Figure 8 – Evolution des interactions des pesticides entre la phase solide et la phase liquide du sol. D'après Loiseau (2001).

2.2 - Dégradation des pesticides dans les sols

Les phénomènes de dégradation conditionnent le devenir des molécules pesticides dans l'environnement. Les processus engagés pour minéraliser progressivement les molécules sont étroitement liés aux processus de sorption-désorption présentés précédemment, qui conditionnent l'accession des molécules aux communautés microbiennes ou aux phénomènes de dissipation abiotique (Gevao et al., 2000; Guo et al., 2000). Les transformations chimiques et biologiques vont progressivement simplifier les structures des molécules mères, soit partiellement en éliminant un groupement fonctionnel, soit totalement, aboutissant à la production de molécules minérales (minéralisation complète). Les produits intermédiaires de dégradation possèdent une toxicité propre qui peut différer de celle de la molécule mère et également des propriétés physico-chimiques variables, pouvant influencer sur les processus de rétention des molécules dans le sol (Barriuso et al., 2008; Bonnet et al., 2008; Tixier et al., 2002).

De plus, les molécules ne sont jamais appliquées en tant que telles dans l'environnement, mais associées à divers adjuvants et produits qui constituent une formulation commerciale du pesticide. Ces composés ajoutés modifient les propriétés des molécules pesticides (solubilité, pénétration dans la plante...) et influent de fait sur leur dégradation. La compréhension des phénomènes de dégradation, du devenir et de l'évolution de la toxicité des composés dans l'environnement est donc un enjeu de premier plan.

2.2.1 - Processus de dégradation abiotique

2.2.1.1 - Photolyse

La structure d'une molécule va déterminer ses propriétés spectroscopiques, c'est-à-dire d'absorption du rayonnement lumineux. Les molécules possédant un noyau aromatique sont capables d'absorber dans le rayonnement UV (10-400nm), responsable majeur des phénomènes de photolyse. Le rayonnement lumineux étant bloqué dès les premiers millimètres de l'horizon de surface du sol, ce phénomène aura donc lieu principalement à la surface du sol et des plantes, mais également dans les écosystèmes aquatiques et aériens récepteurs (Katagi, 2004).

2.2.1.2 - Oxydo-réduction et hydrolyse

Dans le sol, les particules (matière organique, argiles, métaux) interviennent en tant que catalyseur servant à l'hydrolyse acide de certaines familles de pesticides (carbamates, organochlorés ; Thompson and Goynes, 2012). Les mécanismes d'oxydo-réduction quant à eux, sont dépendants de molécules actives d'oxygène (O_2 moléculaire, H_2O_2). Leur action se fera principalement sur les pesticides halogénés (Calvet, 2005). D'autres facteurs entrent en jeu dans ces phénomènes de dégradation abiotique : le pH du sol qui modifie l'ionisation des molécules, la température et le taux d'humidité, qui agissent sur leur solubilité (Calvet, 2005).

2.2.2 - Processus de dégradation biotique

Les processus de dégradation biotique regroupent l'ensemble des mécanismes biologiques qui permettent la minéralisation progressive des molécules pesticides. Ils sont étroitement liés à la localisation des molécules et à l'accessibilité de ces dernières par les organismes vivants. Cette dégradation peut s'opérer par les plantes (phytodégradation) capables d'absorber les composés puis de les dégrader à l'aide d'enzymes adaptées, ou grâce à l'activité des communautés microbiennes présentes au niveau de leur rhizosphère. Autres acteurs majeurs de cette biodégradation, les communautés microbiennes du système sol (bactéries,

champignons, protozoaires...) constituent un pool de diversité génétique important, en mesure de conférer potentiellement des capacités de dégradation (Kumar et al., 1996).

2.2.2.1 - Action de la microflore

L'activité de la biomasse microbienne dans les processus de dégradation va influencer sur les cinétiques de dissipation des pesticides dans le sol. Différentes études mettent en avant la coopération des communautés microbiennes dans la dégradation des molécules, favorisée par des fortes teneurs en matière organique et une biomasse importante (Bending et al., 2007). D'autre part, la présence de communautés adaptées va grandement favoriser la dégradation des pesticides, sans pour autant être dépendante d'une biomasse importante.

On distingue ainsi deux voies de dégradation des pesticides dans les sols (Figure 9 ; Calvet, 2005) :

— **Le métabolisme direct**, où les pesticides représentent la source unique d'énergie pour les microorganismes adaptés. Cette voie entraîne la minéralisation complète de la molécule, dissipant ainsi son pouvoir polluant dans le système. Cependant, seules quelques souches pures isolées *in vitro* ont montré la possibilité de minéraliser totalement certains pesticides, les différentes étapes de dégradation nécessitant bien souvent une coopération entre les différentes communautés microbiennes.

— **Le co-métabolisme**, où la source énergétique essentielle à la croissance des communautés microbiennes n'est pas la molécule pesticide, mais un autre substrat, tel que la matière organique. La transformation du pesticide se fera donc dans ce cas-là en présence de cet autre substrat, résultant en l'accumulation de produits de dégradation qui seront à leur tour dégradés ou stabilisés dans le sol. Il s'agit de la voie principale de dégradation des molécules dans le sol.

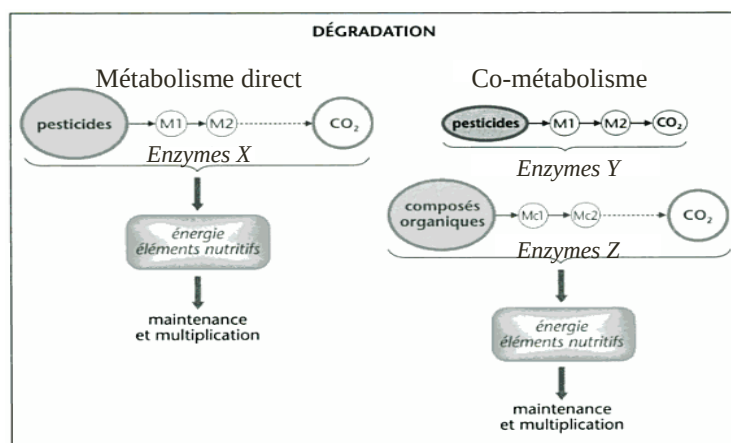


Figure 9 – Comparaison des phénomènes de dégradation microbienne de métabolisme direct et de co-métabolisme, d'après Calvet (2005).

Les microorganismes réalisant les processus de biodégradation nécessitent une phase d'acclimatation à la présence du pesticide afin d'initier leur activation. La durée nécessaire à la mise en route des voies de dégradation est dépendante des quantités de molécules disponibles, des facteurs pédoclimatiques et des interactions entre organismes. De plus, la réponse à la présence d'un polluant sera fluctuante à l'échelle parcellaire, du fait de la forte hétérogénéité spatiale et temporelle rencontrée dans le sol (qualité de la MO, diversité microbienne...).

L'entrée et le devenir des pesticides dans le sol est donc dépendante de facteurs multiples (type de pesticide, variation des phénomènes de sorption-désorption, efficacité des processus de dégradation abiotique et biotique). Des études ont montré que l'application répétée de molécules pesticides peut conduire à la sélection de communautés microbiennes développant des métabolismes spécifiques à l'utilisation de ces molécules (Rhine et al., 2003; Sørensen et al., 2001; Yang et al., 2008). Les produits de dégradation formés sont parfois plus toxiques que la molécule mère et/ou moins biodisponibles pour les communautés microbiennes (formation de résidus liés), ce qui pose le problème de pollution durable au fil des années (Bonnet et al., 2008). L'atrazine, le diuron et d'autres molécules pesticides interdites depuis plusieurs années, en partie pour ces problèmes de rémanence, sont toujours retrouvées dans l'eau de nos jours (*Cf.* Sous-Chapitre 1.1). Bien que les études *in situ* peinent à établir clairement les paramètres qui régissent la dégradation des pesticides, l'activité de la biomasse microbienne et la teneur en matière organique du sol seraient vraisemblablement les facteurs principaux conditionnant leur devenir ; de leur dissipation, à leur transfert vers d'autres écosystèmes. D'autre part, un facteur souvent négligé dans l'appréciation de ces processus de dégradation reste l'effet mélange et la présence d'adjuvants dans les diverses formulations commerciales, qui vont potentiellement modifier le comportement des molécules dans l'environnement et donc leur devenir.

2.2.3 - Effets des formulations et des mélanges de pesticides sur les processus de dégradation

2.2.3.1 - Effets de la formulation et des adjuvants

Les adjuvants contenus dans les formulations commerciales influent sur le devenir des molécules pesticides. Ils permettent d'avoir des dosages plus importants en termes de matière active, que ce soit sous forme liquide ou solide (Beigel et al., 1999), et peuvent être ajoutés extemporanément avec les molécules de pesticides dans la cuve de préparation (Figure 10).

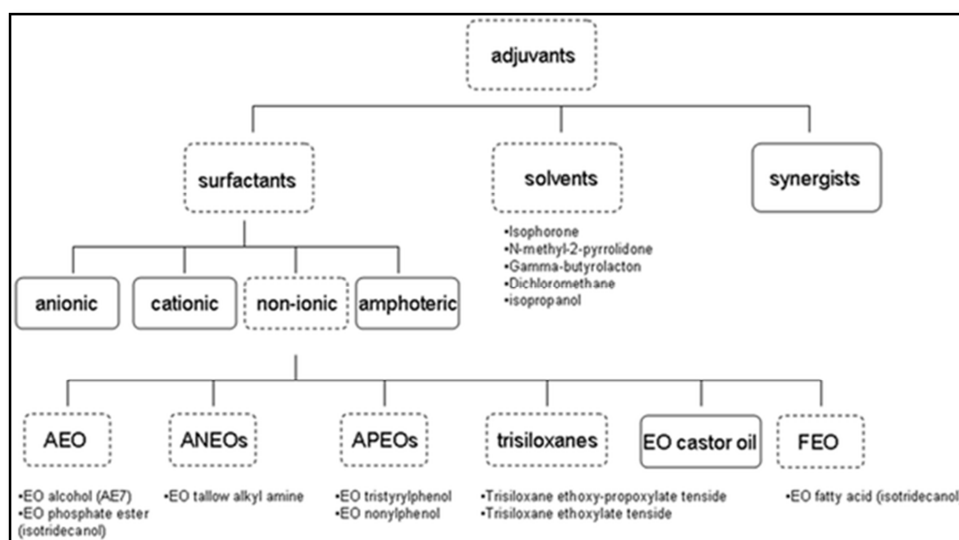


Figure 10 – Présentation des grandes classes d'adjuvants. AEO : Ethoxylates d'alcool ; ANEO : Ethoxylates d'alkylamine ; APEO : Ethoxylates d'alkylphénol ; AEO : Ethoxylates d'acides gras. D'après (Nobels et al., 2011).

Les adjuvants peuvent agir sur la biodisponibilité des molécules pesticides et donc sur leur dégradation (Krogh et al., 2003). Les mécanismes de photodégradation sur les herbicides mésotrione et la sulcotrione en formulation, seront beaucoup plus efficaces que sur les matières actives seules, les adjuvants permettant une plus grande photoinduction des molécules (Ter Halle et al., 2010). A l'inverse, une étude sur le fongicide triticonazole, seul ou formulé, n'a montré aucune variation en terme de dégradation ou d'évolution en résidus-liés (Beigel et al., 1999). Dans le sol, seule l'étude de Li et al. (2008) montre une diminution du temps de latence et une augmentation de la dissipation en présence d'un surfactant (Tween-20) pour un mélange de bentazone et d'atrazine formulés, comparativement à un mélange identique sans surfactant.

2.2.3.2 – Photodégradation des mélanges de pesticides

Ter Halle et al. (2010) se sont intéressés au devenir photochimique de deux herbicides, la mésotrione et le nicosulfuron formulés, seuls ou en mélanges, sur une surface de cire mimant une matrice feuille. Leur étude révèle que le mélange des deux herbicides accélère le processus de photodégradation, supposant soit un effet additif des adjuvants permettant une meilleure distribution des molécules sur la surface de cire et donc une plus grande photodégradation, soit une action de photosensibilisation entre les deux matières actives.

2.2.3.3 – Biodégradation des mélanges de pesticides

Dans le sol, les effets des mélanges sur la biodégradation sont multiples, et grandement dépendants des molécules, de la dose employée et du type de sol.

Ainsi, pour un même mélange de pesticides (isoproturon et chlorothalonile), Fogg et al. (2003) ont observé des différences sur leur vitesse de dégradation entre un sol de Biobac (avec une vitesse identique à celle des molécules seules) et un sol de surface (avec une augmentation du temps de demi-vie d'un facteur 4). Le Biobac est un sol recevant les fonds de cuves de pesticides après épandage sur les cultures, et qui est donc régulièrement soumis à de multiples molécules et à des doses dépassant les doses environnementales. Leurs observations soutiennent l'hypothèse d'une sélection de souches microbiennes capables de dégrader les pesticides dans le sol de Biobac, où les pesticides et les adjuvants stimulent ces communautés adaptées en servant d'apport de nutriments. En effet, des études mettent en avant l'augmentation de la vitesse de dégradation des pesticides en mélanges (molécule mère et/ou produit de dégradation), et expliquent cet accroissement par l'apport supplémentaire de substrat et de source carbonée que représentent de multiples molécules (Ogunseitán and Olson, 1993; Stojanovic et al., 1972; White et al., 2010).

A l'inverse, d'autres études réalisées sur des consortia microbiens isolés de sols contaminés révèlent que la présence de multiples molécules diminue les capacités des souches microbiennes à dégrader les pesticides (Grigg et al., 1997; Pino and Peñuela, 2011). Cet effet d'inhibition s'expliquerait cette fois-ci par l'absence de sélection de communautés adaptées à la présence de multiples pesticides. Toutefois dans l'étude de Pino and Peñuela (2011), la présence de glucose en source de carbone supplémentaire permet le développement et le maintien des communautés microbiennes assurant la dégradation ce qui rétablit pour le mélange une vitesse de dissipation identique à celle mesurée pour les molécules seules. Ces études soulignent l'importance des nutriments et donc à plus grande échelle de la richesse nutritive du système dans les processus de dégradation.

Pour un même mélange (chlorpyrifos et chlorothalonile), Chu et al. (2008) n'ont observé aucune différence de vitesse de dégradation par rapport aux molécules séparées alors que Singh et al. (2002) ont observé une forte inhibition des capacités de dégradation des microorganismes. Bien que l'on puisse expliquer cette différence de résultat notamment par la dose employée (dix fois supérieure dans la seconde étude par rapport à la première) et donc par de potentiels effets toxiques directement liés aux molécules ou aux métabolites, il est à

noter que ces études ont été réalisées sur des sols différents. On peut donc supposer, comme pour l'étude de Fogg et al. (2003), que les apports en nutriments des sols étaient également différents, tout comme la diversité et l'activité des communautés microbiennes (adaptées, sélection de souches résistantes,...), ce qui influe *in fine* sur leur stimulation et donc sur le devenir des molécules.

Enfin concernant la diversité des communautés microbiennes, Swarcewicz et Gregorczyk (2012) se posent la question de l'importance des communautés fongiques dans la dégradation des pesticides. Leur étude révèle qu'en présence de mancozèbe (un fongicide), l'augmentation du temps de demi-vie dans le sol de l'herbicide pendiméthaline augmente fortement, tout comme dans l'étude de White et al. (2010) avec le fongicide chlorothalonile et l'herbicide métolachlore. Dans ces études, le fongicide pourrait éliminer les champignons et/ou les microorganismes dégradants du sol, ou tout simplement perturber l'équilibre microbien. Cette importance de la communautés fongique est également soulignée par l'étude de Fragoeiro et Magan (2008), où l'ajout de souches fongiques dans un sol stérilisé, traité par un mélange de trois pesticides, augmente la dissipation des molécules.

Par rapport aux pesticides employés seuls, il semblerait que les mélanges de pesticides modifient les temps de biodégradation, avec des temps de demi-vie généralement plus longs (Fogg et al., 2003; Rama Krishna and Philip, 2011; Swarcewicz and Gregorczyk, 2012; Tejada, 2009) et des taux de minéralisation moins importants (Karanth et al., 1984). Ces effets découleraient d'une diminution de la diversité microbienne et métabolique, causant la persistance des molécules dans le système. En tête de liste des responsables pour expliquer ces perturbations, on retrouve les produits de dégradation des pesticides dont la toxicité peut dépasser celle des molécules mères (Karanth et al., 1984; Tejada, 2009; White et al., 2010).

2.3 - Mécanismes de transfert des pesticides du sol vers d'autres écosystèmes

Les conditions pédoclimatiques déterminent la distribution des pesticides dans l'environnement, dépendamment du type de produit appliqué. Une fois épandue sur la surface agricole (sol et/ou plante), la molécule pesticide est confrontée aux conditions citées précédemment qui détermineront son devenir et son transfert potentiel au niveau aérien ou aquatique.

2.3.1 - Transfert aérien

La présence de produits phytosanitaires dans l'atmosphère est avérée, comme en témoignent plusieurs études montrant la présence de ces composés dans l'atmosphère en de nombreux endroits (Chernyak et al., 1996; Pozo et al., 2009; Scheyer et al., 2005, Atmo France). Les produits phytosanitaires peuvent rejoindre le système aérien par deux mécanismes distincts : la volatilisation et l'érosion éolienne.

Les pesticides peuvent passer dans l'atmosphère par volatilisation spontanée, exception faite des certains produits métalliques, non concernés par ce phénomène (hors mercure et sélénium). La volatilisation dépend des caractéristiques propres au composé telles que la pression de vapeur (Rüdel, 1997), la solubilité dans l'eau et les conditions environnementales (*i.e.* température du sol et de l'air, humidité et composition en matière organique du sol) (Berg et al., 1999).

Les pesticides peuvent aussi être transférés dans l'atmosphère par érosion des particules de sol sur lesquelles ils sont adsorbés. Ce phénomène est surtout valable pour les produits fortement adsorbés et les métaux. Globalement, la masse de produits déposée par l'intermédiaire des eaux de pluie est estimée à environ 2% de la masse totale de produit appliqué (Vogel et al., 2008).

2.3.2 - Transfert aquatique

L'eau est le vecteur principal des molécules pesticides, capable de transférer en tous sens. Sous nos latitudes (climat tempéré), les précipitations permettent une migration descendante des molécules. En climat sec, l'inverse est également vrai et profite donc au transfert aérien. Les transferts latéraux quant à eux dépendent des conditions locales telles que la pente et la perméabilité du sol (Gobat et al., 1998).

2.3.2.1 - Processus de lessivage

Le lessivage correspond au phénomène de transport des molécules, en solution ou sous forme particulaire, par infiltration de l'eau de surface dans le sol. Sa résultante conduit à l'exportation hors du sol des molécules, dans le lixiviat, puis vers les nappes phréatiques. La quantité de pesticide lessivée décroît suivant le temps entre l'application et le premier évènement pluvieux induisant le lessivage. La structuration de la matrice sol va clairement conditionner l'importance du phénomène de lessivage, suivant l'importance des flux d'eau préférentiel et matriciel (Novak et al., 2003). Le flux **préférentiel** désigne le cheminement de

l'eau dans la matrice sol qui s'effectue selon des axes privilégiés (le long des racines, galeries de vers, fissures...) en évitant la filtration naturelle résultant de la porosité du sol. A l'inverse, le flux **matriciel** emprunte la porosité du sol, ce qui permet des échanges entre la solution du sol et l'eau liée aux particules. Ce flux contribue donc à la remobilisation continue des molécules adsorbées et à leur persistance dans les eaux de drainage.

2.3.2.2 - *Processus de ruissellement*

Suivant les caractéristiques du sol, telles que de fortes teneurs en argiles créant une couche imperméable de surface, l'eau peut s'accumuler dans les premiers millimètres de profondeur. Cette eau superficielle peut mobiliser les pesticides adsorbés au niveau des pores du sol ainsi que ceux précipités et/ou adsorbés en surface, puis les entraîner latéralement suivant le bassin versant vers les compartiments aquatiques de surface (cours d'eau, rivière, lac...). Les premiers événements pluvieux peuvent ainsi être responsables de plus de 80% des pertes totales des pesticides épandus (Leu et al., 2004; Wauchope, 1978).

2.4 - *Conclusion*

Suivant les caractéristiques des pesticides (famille de molécules, adjuvants, produits de dégradation) et les caractéristiques du sol (fractions minérales et organiques, pH, humidité, structure...), des mécanismes complexes de sorption-désorption s'opèrent et déterminent la biodisponibilité des molécules ainsi que leur mobilité dans le sol. Les molécules biodisponibles seront alors potentiellement dégradées, partiellement ou totalement. La littérature sur les pesticides et leur devenir dans le sol est assez importante, mais vue la complexité des facteurs à prendre en compte (caractéristiques pesticides/sol, facteurs climatiques, capacités de dégradations du sol), il est difficile de généraliser leur devenir *in situ*. Les études menées jusqu'alors ont permis de comprendre quelles sont les relations entre le sol et les molécules pesticides, et de préciser les facteurs sur lesquels il est nécessaire de s'appesantir afin d'enrichir les connaissances dans ce domaine, comme la prise en compte de la problématique liée à l'utilisation des mélanges de pesticides. L'ensemble de ces données permet progressivement d'établir et de contribuer au fonctionnement de modèles de prédiction de transfert des molécules dans l'environnement (tel que Footways⁶). **L'un des enjeux majeurs reste la compréhension des effets entraînés par l'ensemble des molécules (molécules actives, produits de dégradation, adjuvants), sur les communautés dites non-**

⁶ <http://www.footways.fr/>

cibles, telles que les microorganismes, capitaux pour le bon fonctionnement des écosystèmes.

SOUS-CHAPITRE 1.3 : LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL ET LEURS REPONSES AUX PERTURBATIONS PHYTOSANITAIRES

Le sol abrite de nombreux organismes qui participent à son maintien ainsi qu'à la vie des êtres vivants qui en dépendent. On peut distinguer deux types de communautés : la **pédofaune** (vers de terre, larves d'insectes, acariens...) qui par leurs mécanismes de vie (déplacement, nourrissage, excrétion...) vont modifier la structuration du sol et contribuer à la fragmentation et au mélange de la matière organique dans le système, et les **microorganismes** de la microflore (bactéries, champignons, archées, protozoaires et virus) qui interviennent dans les cycles biogéochimiques (minéralisation de la matière organique, précipitation de minéraux...) et également dans la structuration du sol (formation de micro-agrégats *via* notamment les humines microbiennes). Ces travaux de thèse étant ciblés sur l'impact des phytosanitaires sur les communautés microbiennes, ce sous-chapitre se focalise de fait sur les communautés microbiennes du sol, leurs rôles et leurs réponses aux stress phytosanitaires de manière générale.

3.1 - Diversité des communautés microbiennes du sol

Les microorganismes du sol occupent un rôle primordial au sein de la boucle microbienne détritique où ils assurent plus de 90% du recyclage des nutriments avant passage dans les maillons supérieurs des chaînes trophiques. Ce rôle de recycleur les place au cœur de la distribution des nutriments et donc de la fertilité et de la qualité des sols (Gobat et al., 1998). La structuration très hétérogène du sol fait varier les conditions environnementales (nutriments, oxygènes, pH, humidité...) au sein des agrégats de telle sorte que certains « hot-spots » favorables à la diversité et l'activité microbienne se mettent en place à leur surface. Ces micro-habitats particuliers sont sous l'influence de la variation de ces conditions environnementales et ne sont donc pas figés dans le temps (Kennedy, 1999). La répartition des communautés microbiennes au sein de la matrice sol est donc très variable, et dépendante des mêmes facteurs environnementaux que ceux qui permettent la distribution des pesticides.

Une perturbation de ces communautés, par la présence de phytosanitaires entre-autres, peut avoir des conséquences désastreuses sur l'homéostasie du système. Cependant, les microorganismes présentent une diversité importante, permettant de réagir à ces différents stress. La diversité microbienne à proprement parler décrit la variabilité génétique et fonctionnelle des communautés (Hunter-Cevera, 1998) : « **La diversité microbienne**

comprend la composition génétique des microorganismes, leur environnement ou l'habitat dans lequel ils se trouvent et leur rôle écologique ou fonctionnel dans l'écosystème ». Génétiquement, la diversité décrit le nombre et la distribution des différents niveaux d'organisation (OTU : Operational Taxonomic Unit, espèces, taxons...) et celle des gènes fonctionnels présents et partagés dans les différentes communautés. Les différentes variabilités génétiques pour une même espèce sont également prises en compte. La diversité fonctionnelle des communautés quant à elle, s'intéresse aux métabolismes microbiens présents au sein des communautés microbiennes, qui contribuent aux processus écologiques et donc au fonctionnement de l'écosystème. La diversité fonctionnelle est de fait intimement liée à la diversité génétique sans toutefois suivre une parfaite corrélation. En effet, les microorganismes présentent une grande variété de mécanismes enzymatiques (minéralisation de la matière organique, les étapes d'ammonification, de nitrification et de dénitrification, la méthanotrophie...) couplée à une forte redondance pour certaines fonctions clés, leur permettant de s'adapter plus ou moins efficacement aux perturbations. De plus, cette adaptabilité s'exprime également à travers leur potentiel de transferts horizontaux de gènes, possible suivant le degré de plasticité de leur génome. Les études d'impact sur les communautés microbiennes permettent ainsi d'estimer dans quelle mesure ces dernières peuvent résister et répondre aux différents stress et, en cas d'effets, évaluer leur potentiel de résilience (retour à l'état initial d'une communauté ou d'une fonction donnée).

La diversité des microorganismes du sol est depuis longtemps étudiée, des premières techniques culturales, aux études de métagénomique multipliant les extractions ADN afin d'être le plus exhaustif possible (Delmont et al., 2011). Cependant, en dépit de ces progrès techniques, les connaissances sont encore incomplètes et l'étude du « Terragenome » n'en est qu'à ses prémices. Les travaux de Kirk et al., (2004) décrivent les problèmes actuels pour évaluer la diversité microbienne et identifient quatre domaines de préoccupation : la distribution spatiale des microorganismes dans les sols, l'incapacité à cultiver la plupart des microorganismes du sol, les défis physiques et chimiques de l'extraction d'ADN ou d'ARN, et la difficulté globale pour classifier les microorganismes.

3.1.1 - La communauté bactérienne

Les bactéries du sol représenteraient la communauté la plus diversifiée, devant celle des Archaea et des Champignons (excepté en sol forestier, (Fierer et al., 2005)), avec des estimations comprises entre 5.10^3 et 5.10^4 espèces par gramme de sol et des abondances

variant de 10^6 à 10^{11} cellules par gramme de sol (Atlas and Bartha, 1981; Torsvik et al., 2002). Cette grande variabilité s'explique par la forte hétérogénéité qui existe entre les différents types de sol, mais également à une imprécision générale quant à la notion d'espèce (études ADNr 16S *versus* études sur fragments moins conservés). Les groupes bactériens les plus retrouvés, tous sols confondus, sont les Acidobactéries et les α -Protéobactéries, devant les Actinobactéries, les β -Protéobactéries, les Firmicutes et les Bacteroïdètes (Fierer et al., 2005). Comparativement aux écosystèmes aquatiques où la diversité ne dépasse pas quelques centaines d'espèces bactériennes par millilitres (Torsvik et al., 2002), la diversité bactérienne du sol semble infiniment plus conséquente de par son hétérogénéité spatiale, énergétique et donc fonctionnelle. Les bactéries assurent des fonctions clés dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du soufre notamment, mais restent une « boîte noire » dont l'étude est d'intérêt majeur, principalement pour la découverte et la compréhension de nombreux potentiels métaboliques inconnus (Delmont et al., 2011).

3.1.2 - La communauté archéenne

La structure de la communauté archéenne du sol et les facteurs qui régulent leur diversité et leur abondance font l'objet de travaux récents. Une étude sur 146 sols très diversifiés (Bates et al., 2011) indique que les archées représentent 0 à 10% de la totalité des séquences d'ARNr 16S. Le clade des Crenarchaeota (dans lequel on retrouve les archées nitrifiantes) semble dominer dans le sol, parmi la totalité des séquences archéennes décrites (Bates et al., 2011; Bintrim et al., 1997). La communauté archéenne dans son ensemble est très sensible aux variations de pH, suggérant l'adaptation d'espèces dans les sols acides, et d'autres dans des sols légèrement alcalins (Bengtson et al., 2012). De plus, par rapport aux communautés bactérienne et fongique, la diversité archéenne semble beaucoup plus fluctuante au cours du temps dans les sols agricoles et dépendante des variations en nutriments, notamment l'azote (Pereira e Silva et al., 2012).

3.1.3 - Les groupes fonctionnels du cycle de l'azote

Plusieurs groupes fonctionnels (composés de différents phyla bactérien, archéen et fongique) assurent la minéralisation et la fixation de l'azote dans le sol. Le suivi de ces différentes communautés peut s'effectuer par l'utilisation de marqueurs fonctionnels (Buscot and Varma, 2006; Philippot et al., 2007).

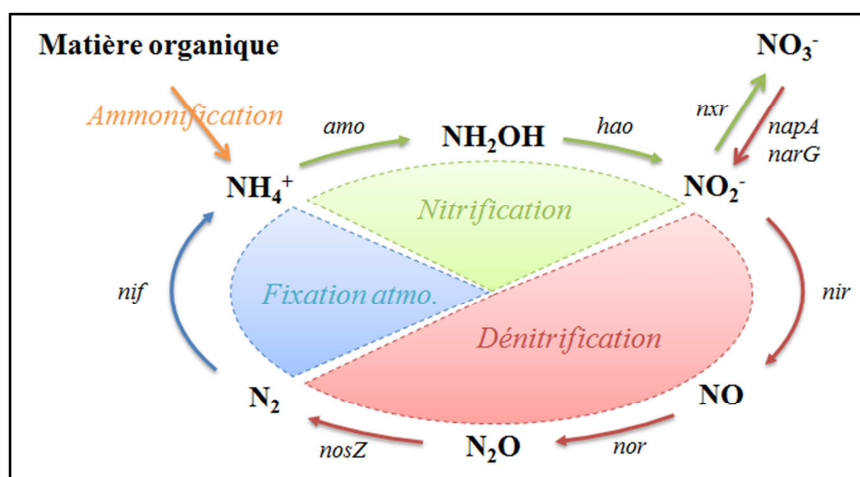


Figure 11 – Schéma simplifié décrivant les étapes du cycle de l'azote dans le sol avec le détail des produits intermédiaires (**en gras**) et des enzymes décrites (*en italique*). Inspiré des travaux de Phillipot et al. (2007).

Les microorganismes sont essentiels pour maintenir la balance entre les formes réduites et oxydées de l'azote (Figure 11). Dans certains systèmes sols, l'azote est souvent le nutriment limitant pour la croissance des plantes et est continuellement perdu par dénitrification, érosion du sol, lessivage et volatilisation de l'ammonium.

— **La fixation de l'azote atmosphérique** est réalisée par les bactéries possédant la nitrogénase (codée par les gènes *nif*). On distingue trois types d'organismes fixateurs d'azote : les bactéries symbiotiques (genre *Rhizobium*), les bactéries fixatrices libres (genres *Azotobacter*, *Frankia*...) et certaines cyanobactéries (ordre des *Nostocales*).

— **L'ammonification** correspond à l'assimilation aérobie de molécules organiques complexes par de nombreux phyla microbiens (bactéries à Gram positif, à Gram négatif et champignons), résultant en la production d'ammonium inorganique.

— **La nitrification** correspond aux premières étapes d'oxydation de l'ammonium en nitrates. Ces deux composés peuvent être utilisés par la plupart des organismes vivants pour produire des formes organiques d'azote, tel que les protéines et les acides aminés. La nitrification est réalisée principalement par les organismes autotrophes (nombre limité de genres bactériens et archéens aérobies) ainsi que par certains taxons bactériens et fongiques hétérotrophes. La nitrification autotrophe se décompose en deux étapes : la **nitritation** et la **nitratation**.

La **nitritation** est l'étape d'oxydation de l'ammonium en nitrite (NH_4^+ en NO_2^-) en passant par l'intermédiaire hydroxylamine (NH_2OH). La nitritation bactérienne est assurée dans les

sols par les genres *Nitrosospira* et *Nitrosomonas*, distribués dans 3 groupes phylogénétiques, les α -, γ - et δ -Proteobacteries (Bock and Wagner, 2006; Rose and Tempest, 1989). Pour les archées, le genre *Crenarchaea* réalise principalement l'oxydation de l'ammonium (Treusch et al., 2005). L'enzyme clé codant le processus de nitrification est l'enzyme Amo. Le gène *amoA*, codant la sous-unité catalytique est couramment utilisé comme marqueur fonctionnel des bactéries (*amoA* AOB) et des archées (*amoA* AOA) nitrifiantes (Leininger et al., 2006; McTavish et al., 1993; Treusch et al., 2005). Il semblerait dans les sols, que les archées réalisant le processus d'oxydation de l'ammonium soient 2 à 3000 fois plus abondantes que les bactéries (Adair and Schwartz, 2008; Boyle-Yarwood et al., 2008; Chen et al., 2008; He et al., 2007; Leininger et al., 2006). Les contributions relatives à la nitrification entre les deux domaines varient suivant les sols avec une dominance archéenne plutôt marquée dans les sols pauvres en azote (Alves et al., 2013), et une dominance bactérienne plutôt dans les sols riches (Di et al., 2009).

La **nitrification** est l'étape d'oxydation de nitrite en nitrate (NO_2^- en NO_3^-). A l'heure actuelle, seul un mécanisme bactérien a été identifié. Les bactéries oxydant le nitrite (NOB) dans les sols appartiennent aux genres *Nitrobacter* (α -Proteobacteria) et *Nitrospira* (Nitrospiraea). Cette réaction est assurée par la nitrite oxydo-reductase (NXR). Ce mécanisme moléculaire est moins détaillé à l'heure actuelle que celui de l'oxydation de l'ammonium. Des travaux récents suggèrent que NXR agirait au niveau de la partie externe de la membrane cytoplasmique des bactéries (Woznica et al., 2013). Toutefois, le mécanisme moléculaire complet de l'oxydation des nitrites reste une question ouverte. Aucun mécanisme archéen réalisant cette étape n'a été référencé à l'heure actuelle.

— **La dénitrification**, contrairement à la nitrification, est un processus anaérobie de réduction des nitrates et des nitrites en des formes oxydées d'azote. Sa résultante est donc une perte d'azote minéral et la production potentielle de gaz à effets de serre (NO et N_2O). La dénitrification est assurée majoritairement par les bactéries (Firmicutes, Actinomycetes, α -, γ - et δ -Proteobacteria, Bacteroides...), mais également par quelques genres archéens et fongiques (Cf. pour revue Philippot et al., 2007). La cascade de réactions enzymatiques permettant la réduction de nitrate en nitrite (gènes *napA* et *narG*), de nitrite en oxyde nitrique (gènes *nir*) d'oxyde nitrique en oxyde nitreux (gènes *nor*) et d'oxyde nitreux en dioxyde d'azote (gènes *nos*) est bien décrite et sert de marqueur fonctionnel pour le suivi de la communauté dénitrifiante. Il est à noter que certaines Crenarchaeota oxydant l'ammonium possèdent également le gène *nirK* codant pour la nitrite réductase (Treusch et al., 2005) ce qui

suggère que ces communautés sont capables de réaliser au moins une étape de la dénitrification.

Le N_2O , produit des mécanismes conjoints de nitrification et de dénitrification, présente un potentiel de réchauffement climatique environ 300 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone et contribue jusqu'à 6% dans le phénomène d'effet de serre (Cicerone, 1989). Il participe également à la déplétion de la couche d'ozone par la production de NO stratosphérique. Les réponses fonctionnelles liées au cycle de l'azote représentent donc un sujet d'étude particulièrement pertinent dans les enjeux actuels de compréhension des mécanismes liés à la santé de l'environnement.

3.1.4 - La communauté fongique

Dans le sol, les champignons sont considérés comme la principale composante de la biomasse devant les bactéries (Gobat et al., 1998). Cependant, ce ratio de biomasse champignons/bactéries varie suivant les conditions propres au milieu, de pH, de nutriments et de gestion agronomique. Tout comme la communauté bactérienne, l'étude de la communauté fongique est rendu possible grâce au développement de nombreux outils de biologie moléculaire adaptés (Anderson and Cairney, 2004). La diversité fongique des sols varie suivant le milieu (forêt, prairial...), en corrélation avec la complexité des substrats organiques présents (Grayston et al., 2004), et peut se révéler importante en nombre d'espèces (Lim et al., 2010). Les champignons jouent un rôle prépondérant dans le recyclage des nutriments et leurs caractéristiques métaboliques leur permettent de se développer sur des substrats pauvres en énergie.

Bien que l'on considère comme majoritaire dans les sols les espèces fongiques saprophytiques (qui dégradent la matière organique), il est à noter l'existence également de champignons pathogènes pour les plantes (mildiou, fusariose...) et d'autres en association symbiotique avec les racines de ces dernières (mycorrhisation) leur permettant un meilleur accès aux nutriments.

3.1.5 - La communauté des phototrophes

La communauté photoautotrophe de surface est répartie au sein des trois principaux groupes eucaryotes Chlorophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae et du groupe bactérien des Cyanobacteria. D'autres phototrophes eucaryotes mais pluricellulaires de petite taille de la famille des Bryophyta (mousses et sphaignes) sont également présents (Csotonyi et al., 2010).

Dans les environnements extrêmes, tel que les déserts arides et glaciaux où les plantes ne peuvent pas se développer, les microalgues et les cyanobactéries peuvent représenter les acteurs principaux dans les cycles du carbone et de l'azote (Cockell and Stokes, 2004). L'activité photosynthétique de ces microorganismes contribue partiellement à l'enrichissement des sols en carbone. Ils participent également à la structuration de la surface des sols par la production d'exopolymères (Bailey et al., 1973). Leur biomasse représente entre 5 et 10% de la biomasse microbienne des sols et contribue à une production primaire de 15 à 20% de la production microbienne totale (Shimmel and Darley, 1985).

Le métabolisme phototrophe de ces communautés microbiennes en fait des candidats idéaux en tant qu'indicateurs de pollution des sols, notamment par des herbicides (Bérard et al., 2004; Cullimore and McCann, 1977).

3.2 - Effets des pesticides sur les communautés microbiennes du sol et leurs réponses

3.2.1 - Effets des pesticides sur les communautés microbiennes

Les communautés microbiennes sont des communautés non-cibles de l'effet des pesticides, mais qui peuvent être impactées à plus ou moins long termes (soit directement, soit indirectement) par les molécules phytosanitaires. Ces effets vont dépendre de la famille du produit pesticide et de sa formulation, de la sensibilité propre de chaque organisme (métabolisme proche des cibles d'action des pesticides) et également de l'influence des facteurs environnementaux sur la distribution des molécules.

3.2.1.1 - Effets directs

Les effets touchant directement les communautés microbiennes sont de deux ordres :

- Les communautés microbiennes peuvent être stimulées par les pesticides si ces derniers ont la capacité de servir de source de nutriments complémentaires (carbone, azote, phosphore...). Ce type d'effet explique en partie des modifications au niveau de l'abondance et de la structure (augmentation de la richesse spécifique) des communautés microbiennes, avec la libération de niches écologiques vacantes par les communautés impactées (*Cf.* effets indirects) et la mise en compétition de certaines communautés.
- Les communautés microbiennes peuvent à l'inverse être inhibées par la présence de pesticides ayant une toxicité à leur égard. Si le pesticide impacte un groupe fonctionnel

primordial (communautés nitrifiantes, celles responsables de la dégradation de la matière organique...), l'équilibre du système sol peut se retrouver bouleversé. En ligne de mire des effets non-cibles des herbicides : les organismes photosynthétiques qui peuplent la surface du sol (bryophytes, micro-algues, cyanobactéries) et qui ont un métabolisme proche de celui des végétaux ciblés. D'autre part, certains pesticides touchent des voies beaucoup plus généralistes (synthèse d'acide gras, synthèse d'acides aminés...) partagées par les microorganismes, ce qui peut directement limiter leur activité. Il faut cependant considérer que ces effets directs dépendent des propriétés intrinsèques des molécules (mode d'action, métabolisme ciblé), de la dose d'application, de la formulation du pesticide, des propriétés propres au système sol et de la sensibilité et la physiologie de chaque organisme (Domsch et al., 1983).

3.2.1.2 - Effets indirects

Les effets indirects sur les communautés microbiennes concernent les changements intervenant pour une communauté donnée suite à un impact touchant une autre communauté. Ces effets indirects sont eux aussi de deux ordres :

- Les communautés microbiennes non concernées par la toxicité des molécules peuvent être stimulées par l'apport de matière organique provenant des communautés sensibles (apports de carbone et d'azote), et également croître dans les niches écologiques laissées vacantes (Wardle and Parkinson, 1990). Ces modifications peuvent donc à terme entraîner des dérèglements au sein de la boucle microbienne dans les flux de matière et d'énergie, dans les relations trophiques (proies/prédateurs, compétition), mais également à plus grande échelle au niveau du système sol dans son ensemble (cycles biogéochimiques et productivité).
- Les communautés microbiennes dont le métabolisme dépend de celui d'autres communautés (co-métabolisme) peuvent à l'inverse être indirectement inhibées par des impacts collatéraux découlant d'effets sur les communautés auxquelles elles sont associées.

3.2.2 - Réponses des communautés microbiennes du sol aux pressions phytosanitaires

3.2.2.1 – Suivi de la biomasse, de l'activité et de la structure des communautés microbiennes

Les travaux de synthèse de Puglisi (2012) ont permis grâce à des recherches systématiques au sein de la littérature, couplés à un screening manuel, de référencer 234 études sur le sol

apportant 3405 données concernant des réponses de communautés microbiennes aux pesticides (mesure pour une molécule, à une dose spécifique, d'un paramètre biologique donné). La diversité des paramètres microbiens suivis au sein du système terrestre et l'importance des caractéristiques microbiennes dans l'évaluation des risques liés aux pesticides, tendent à regrouper les réponses microbiennes en trois catégories (**biomasse, activité et structure**), permettant ainsi d'identifier les tendances qui peuvent être potentiellement utilisées afin d'évaluer les risques auxquels sont confrontés les microorganismes.

La **biomasse** des microorganismes totaux ou de classes spécifiques de microorganismes est le plus souvent évaluée par des techniques de mesure du carbone microbien (MBC, quantification du carbone microbien total dans un échantillon de sol ; dosage des pigments). L'abondance des communautés microbiennes peut également servir d'estimation de la biomasse après application de facteurs de conversion. Elle est obtenue, de façon non exhaustive (Figure 12), par comptage du nombre d'individus ou de colonies viables pouvant se former en milieu gélosé (CFU), par dénombrement par dilutions (MPN, nombre le plus probable de microorganismes d'un échantillon) ou par des analyses de marqueurs spécifiques de groupes microbien (qPCR).

Les études traitant d'effets des pesticides sur la biomasse microbienne montrent que dans 55% des cas pour les herbicides, 38% pour les insecticides et 25% pour les fongicides, aucun effet significatif n'est retrouvé. Des diminutions de biomasse significative sont notées pour les fongicides (45%), alors que pour les deux autres classes de pesticides les effets sont plus faibles : dans 27% des cas pour les herbicides et 15% des cas pour les insecticides.

L'**activité** fait référence aux mesures des différentes activités généralistes des communautés microbiennes ainsi qu'aux mesures d'activités spécifiques à certains groupes de microorganismes. Le nombre de paramètres pouvant être considéré est donc très important (Figure 12), allant du suivi d'activités enzymatiques, à la quantification de dégradation de substrats, la colonisation fongique, la production de molécules spécifiques, la respiration, ou l'expression de gènes. Les mesures d'activités microbiennes représentent des informations essentielles puisqu'elles permettent de se référer aux fonctions écologiques et de production des microorganismes.

Dans le système sol, des diminutions significatives des activités microbiennes sont retrouvées dans 35% des études pour les herbicides, 32% pour les fongicides et 25% pour les

insecticides. Beaucoup d'études montrent des absences d'effets : 45% pour les insecticides et les fongicides, 40% pour les herbicides. Le reste des études témoigne d'augmentations significatives liées à un potentiel effet positif des pesticides par stimulation des activités microbiennes. Ces cas représentent cependant une minorité (Figure 12).

La **structure** fait référence aux mesures de la composition et/ou de la diversité des microorganismes. La structure d'une communauté microbienne peut être appréciée par des techniques de *fingerprinting* (analyse sur la base des séquences ADN), de dosage et de composition en acides gras phospholipidiques des membranes (PLFA), d'utilisation de plaques Biolog (identification par criblage d'utilisation de sources carbonées et de sensibilité chimique), ou par séquençage d'amplicons 16S.

Les données au niveau de la structure sont beaucoup moins fournies que celles concernant les activités et la biomasse (Figure 12). Elles indiquent, dans la plupart des études, que les pesticides induisent des modifications dans la structure des communautés microbiennes. Toutefois, pour 5% des études sur les insecticides et les fongicides et 13% des études sur les herbicides aucun effet n'a été recensé. Dans un nombre limité d'études (11% pour les herbicides et 7% pour les fongicides) ces modifications étaient transitoires (*i.e.* à la fin de l'expérimentation, les communautés microbiennes retournent à une structure similaire à celle qu'elles avaient avant l'application de pesticides).

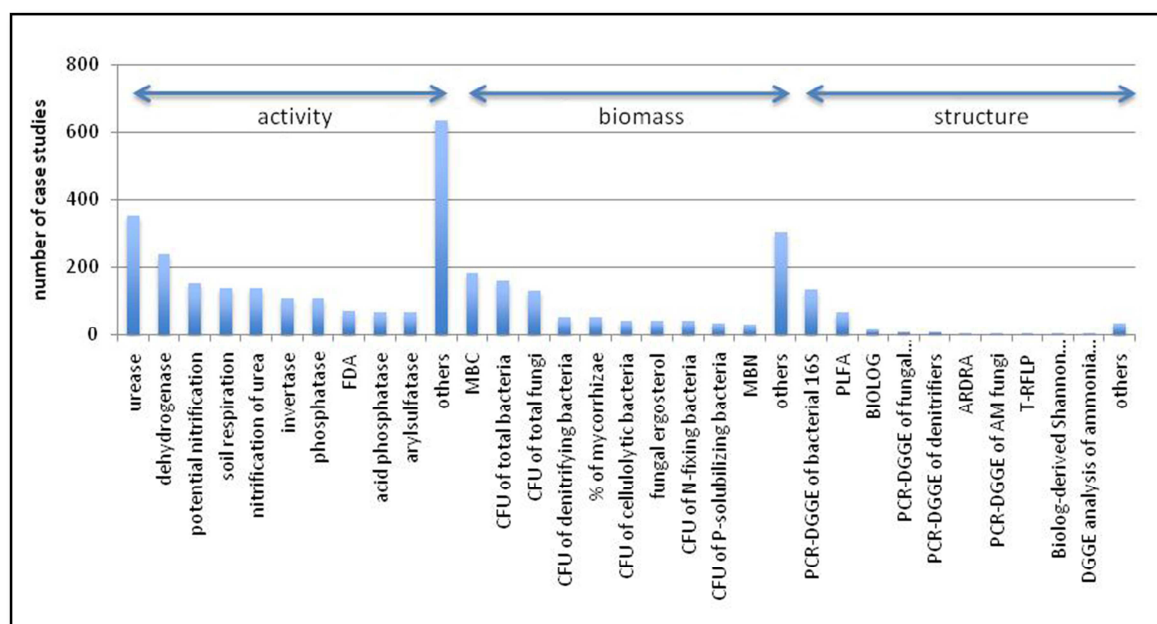


Figure 12 - Fréquence de données recueillies concernant les méthodes utilisées dans les études d'impact de pesticide sur les communautés microbiennes du sol. D'après Puglisi (2012).

Les différents travaux menés jusqu'alors montrent que sur l'ensemble des paramètres suivis, ce sont les études d'activités qui prédominent suivies des études de biomasse et de structure. D'après la figure 12, les mesures d'activités sont dominées par des suivis enzymatiques liés aux cycles du carbone et de l'azote. Les mesures de biomasse sont dominées par les mesures de carbone microbien et les comptes CFU des bactéries et champignons. Enfin, la structure des communautés microbiennes est majoritairement étudiée par *fingerprinting*.

Toutes ces études prises séparément ne permettent cependant pas d'apporter des réponses complètes en termes d'impacts des pesticides sur les communautés microbiennes. Un choix d'outils adaptés permettant de balayer l'ensemble des paramètres biomasse, activité et structure (tri parmi l'ensemble des types de mesures), couplé à des comparaisons multiples (en terme de molécules, de doses, de mélanges, de sols) est nécessaire afin d'uniformiser les études et d'aider aux choix raisonnés des pesticides à utiliser.

3.2.2.2- Effets des mélanges de pesticides sur les communautés microbiennes

Ces travaux de thèse s'orientant dans une optique réaliste par rapport aux modalités actuelles d'épandage, à savoir l'application des molécules en mélange, la fin de ce sous-chapitre s'intéresse de fait aux effets recensés de mélanges de pesticides sur les communautés microbiennes. Cette problématique d'effets des mélanges a été prise en compte plus tardivement que celle des effets des molécules seules, ce qui explique la faible littérature à son sujet.

Concernant les effets sur la **biomasse** microbienne, l'étude menée par Martikainen et al., (1998) montre peu de changement (analyse de la biomasse par le contenu en ATP), avec seulement une augmentation significative en fin d'expérimentation, pour des microcosmes traités par un mélange de diméthoate (insecticide) et de bénomyl (fongicide), à dix fois la dose agronomique recommandée. Aucun impact sur la biomasse microbienne n'est relevé dans les études de White et al. (2010) et Niemi et al. (2009), qui ont toutes deux utilisé des mélanges de formulations herbicides et fongicides à la dose agronomique recommandée. A l'inverse, Tejada (2009) a comparé les effets de deux herbicides formulés, le glyphosate et le diflufenican, appliqués seuls (respectivement Round Up[®] et Brodal[®]) ou en mélange (Zarpa[®]), à la dose agronomique, sur les communautés microbiennes de deux sols contrastés (argileux, pH 8,6 et sableux, pH 6,9). Les résultats révèlent que la formulation des deux herbicides mélangés augmente l'inhibition de la biomasse microbienne et que cet effet

inhibiteur est plus marqué dans le sol sableux, où les herbicides, persistent plus longtemps. L'étude de Pampulha et Oliveira (2006) quant à elle met en avant des effets d'une combinaison d'herbicides (3% bromoxynil et 60% prosulfuron), transitoires (à faible dose) ou permanents (à forte dose), sur la biomasse microbienne. Les doses croissantes utilisées dans ce mélange (1ppm, 10ppm et 100ppm) inhibent les communautés fongiques totales, alors qu'une augmentation significative des abondances des bactéries totales, des bactéries oxydant les nitrites (NOB) et des champignons cellulolytiques est observée. Inversement, il existe une diminution significative des abondances d'Actinomycètes, des bactéries cellulolytiques et des bactéries oxydant l'ammonium (AOB). Leurs analyses révèlent donc de nombreux effets des mélanges, pouvant être temporaires, notamment sur les communautés bactériennes (un retour aux valeurs contrôle après 40 jours). Ils montrent également que certains groupes microbiens sont capables d'utiliser les herbicides comme source d'énergie (biodégradation) alors que d'autres sont sensibles à leurs présences.

Concernant les effets sur les **activités** microbiennes, Martikainen et al. (1998) sont les seuls à montrer que des microcosmes traités par un mélange de diméthoate (insecticide) et de bénomyl (fongicide) ne sont pas sujets à des variations de leur activité respiratoire. Par contre, de façon plus globale, de nombreuses activités enzymatiques hydrolytiques sont inhibées dans le cas de mélanges. L'étude de Pampulha et Oliveira (2006) citée ci-dessus, montre que même à faible dose de mélange (1ppm), l'activité déshydrogénase (indice global de l'activité du sol) diminue de 80%, sans amorcer de récupération significative avec le temps. Tejada (2009) montre qu'une formulation des deux herbicides mélangés (Zarpa[®]) augmente l'inhibition d'activités déshydrogénase, β -glucosidase, uréase, phosphatase et arylsulfatase, comparativement à l'action des deux formulations mono-herbicide. Cet effet inhibiteur est également mis en avant dans le travail de Niemi et al. (2009), dans des systèmes d'étude réalistes de type mésocosme et plein champ, avec des inhibitions plus importantes des activités enzymatiques (sept activités enzymatiques diminuées : arylsulfatase, α - et β -glucosidase, β -xylosidase, leucine amino-peptidase, cellobiosidase et pectine méthylestérase) pour un mélange de pesticides (herbicides linuron et métribuzine ; fongicide fluazinam). L'explication avancée est une diminution de la rhizosphère, connue pour ses effets stimulant au niveau des activités enzymatiques microbiennes. Cet effet est moindre dans le cas d'applications séparées ce qui diffère des observations faites par Schuster et Schröder (1990), qui à l'inverse observaient des effets plus importants dans le cas d'applications séquentielles des pesticides.

Concernant les effets sur la **structure** des communautés microbiennes, comme pour les études sur les pesticides employés seuls, les données sont peu nombreuses. On peut cependant noter l'étude de White et al. (2010) où les auteurs n'ont pas observé de modification de la diversité microbienne (suivi des PLFA : Phospholipid-derived fatty acids) dans un sol traité par du métolachlore formulé (Dual Magnum[®]) et un fongicide formulé (tébuconazole – Folicur[®], ou cyproconazole – Alto[®] 100 SL, ou chlorothalonile – Bravo[®] WeatherStick 720F, ou flutriafol – Topguard[®] 1.04 DC), à la dose agronomique. Au plus proche des réalités environnementales (étude en plein champ et utilisation de formulations commerciales de pesticides), l'étude de Niemi et al. (2009) souligne l'absence (et donc l'importance) des analyses de diversité qui auraient pu compléter leurs résultats.

Ainsi, bien que certains résultats permettent de minimiser l'effets de leurs mélanges de pesticides (Martikainen et al., 1998; White et al., 2010), ces derniers peuvent provoquer des effets délétères sur les activités et l'équilibre des communautés microbiennes du sol (Niemi et al., 2009; Pampulha and Oliveira, 2006; Tejada, 2009) et, de ce fait, nécessitent d'être étudiés plus avant afin de statuer sur les précautions nécessaires à leur utilisation. Dans le cas de mélanges multi-pesticides, les fongicides semblent impacter de façon bien plus importante les communautés microbiennes que les autres classes (herbicides et insecticides).

Le manque évident d'études sur cette thématique des mélanges de pesticides permet difficilement de se prononcer quant à leur utilisation, d'autant qu'il est impossible de généraliser les quelques effets observés dans un sol donné, à l'ensemble du système. De plus, il est intéressant de noter que les données sur les métabolismes réputés « sensibles » tel que ceux de l'azote (nitrification et dénitrification) et de la photosynthèse ne sont, à ma connaissance, pas étudiés. Les quelques travaux récents tendent cependant à se rapprocher des réalités environnementales en termes d'épandage mais peinent à apporter des informations complètes en termes de structure, d'abondance et d'activités des communautés microbiennes et donc sur le fonctionnement global du système. De telles études paraissent essentielles de nos jours afin d'alimenter les modèles prédictifs d'écotoxicologie.

3.2.3 - Conclusion

Il est impossible de généraliser quant à l'impact des pesticides sur les communautés microbiennes du sol puisque tout est décrit dans la littérature, de la stimulation à l'inhibition, en termes de biomasse, d'activité ou de structure. Il ressort quand même que les effets des pesticides sur les communautés microbiennes sont bien souvent dose-dépendants, avec

d'avantage d'effets significatifs retrouvés pour des doses dépassant celles qui sont normalement recommandées (10X et 100X ; Puglisi, 2012). Toutefois, puisque l'utilisation de pesticides à l'heure actuelle est incontournable dans les pratiques agricoles, le suivi des bonnes pratiques d'utilisation des pesticides est primordial. Il ne semble donc pas judicieux de travailler à des doses « irréalistes », mais bien en suivant les réalités d'épandage, c'est à dire de **dose recommandée et de mélange**. Les études actuelles permettent de mettre l'accent sur les composés qui provoquent le plus de dommages et ainsi d'apporter des réponses appropriées quant à leur utilisation (restriction, délais entre des épandages multiples, interdiction). En cas d'impact, les taxons microbiens les plus sensibles semblent supplantés par les plus résistants, provoquant soit le maintien, soit la modification du niveau d'activité des communautés, en fonction des caractéristiques métaboliques des espèces atteintes. Certaines communautés spécialisées suite à l'application répétée de pesticides peuvent se développer et donc être favorisées à chaque nouveau traitement (Rhine et al., 2003; Vischetti et al., 2008). De même, suivant les caractéristiques pédoclimatiques et les communautés présentes, les réponses à la pression phytosanitaire vont varier et modifier les paramètres biomasse, activité et structure des microorganismes. Il est donc essentiel **d'étudier ces trois aspects et leurs inter-relations** pour caractériser cette « boîte noire » microbienne afin de conclure quant aux effets des pesticides sur les processus écologiques du sol.

Dans le contexte actuel des problématiques d'écotoxicologie traitant de l'impact des pesticides, l'accent doit être porté sur des cas extrêmes de pollution aux pesticides (justifiant les dépassements de la dose agronomique) et sur les réalités actuelles d'épandage (utilisation à la dose agronomique recommandée, mélange de molécules, traitements séquentiels, différés durant la saison culturale). Malgré ce constat, les études sur les mélanges de pesticides ne sont pas légion et font appel à un questionnement récent de remaniement des pratiques agricoles, et donc de l'utilisation de ces molécules. Ces études sont cependant essentielles afin de statuer sur leur utilisation, en particulier sur les interactions possibles dans l'environnement entre molécules. Des outils au service de l'écotoxicologie microbienne permettent ainsi différentes approches en fonction des objectifs fixés.

3.3 - Approches multi-échelles en écotoxicologie

L'impact de composés xénobiotiques sur les organismes peut être étudié à différents niveaux d'organisation, de l'organisme seul, aux communautés totales au sein de leur écosystème, en intégrant les relations trophiques. Le choix du type d'expérimentation, du test de toxicité

monospécifique type bioessais en laboratoire, aux études *in situ*, fait augmenter les degrés de complexité et de représentativité, mais également diminuer la simplicité et la reproductibilité de l'étude. Il est donc primordial d'établir le choix de l'échelle d'étude en fonction du questionnement scientifique mais surtout en intégrant les limites proposées par le modèle prédictif choisi et de bien définir les paramètres à étudier (Figure 13; Caquet et al., 1989).

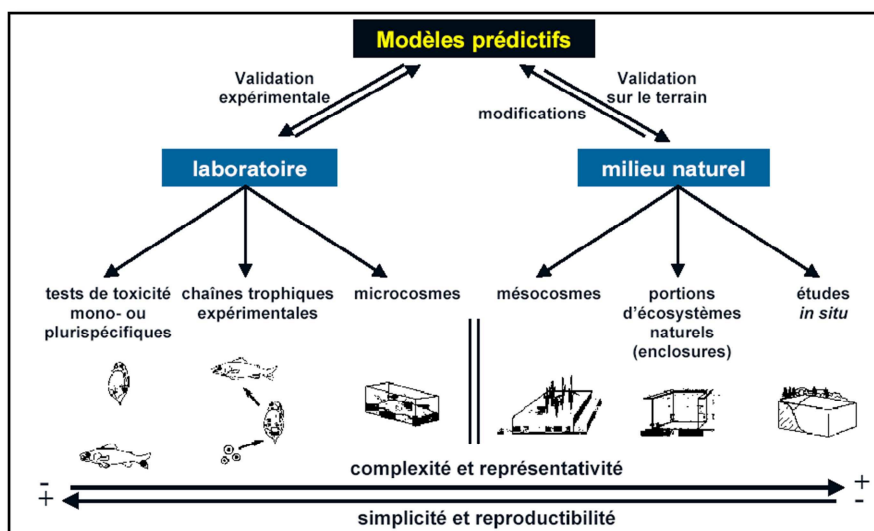


Figure 13 – Présentation des différents modèles prédictifs utilisés dans les études d'écotoxicologie, avec l'intégration des notions de complexité, de représentativité, de simplicité de mise en œuvre et de reproductibilité. D'après Caquet et al. (1989).

Les principaux modèles se définissent et se caractérisent comme suit :

— **Les tests de toxicité monospécifiques** permettent une première estimation des risques potentiels des agents toxiques. Leur facilité d'utilisation et leur reproductibilité ont permis d'élaborer des tests standardisés utilisés pour la mise sur le marché des nouvelles substances. De nombreux tests de toxicité monospécifique existent ; sur les oiseaux, les poissons, les insectes, les crustacés, les microalgues, les protistes, etc. Au niveau des bactéries, existe le test Microtox® (ISO 11348-3) qui utilise l'atténuation de la bioluminescence naturelle de *Vibrio fischeri* comme indicateur de toxicité (Bond and Martin, 2005). Cependant, de par leur faible complexité, les résultats de ces tests ne peuvent aucunement être transposables au niveau de l'écosystème. Ils sont cependant de bons outils au service de la réglementation et constituent un panel d'approches standardisées très utile pour apprécier de prime abord la toxicité de nouvelles molécules mises sur le marché.

— **Les tests d'écotoxicité en microcosmes et mésocosmes** permettent d'augmenter la complexité des systèmes et d'étudier par une approche autécologique ou synécologique les organismes. En effet, tout en contrôlant tout ou partie des facteurs environnementaux (température, humidité, cycles jour/nuit, apports de pollution...) on peut étudier les communautés dans leur milieu naturel en intégrant les relations intra- et interspécifiques. Ils constituent donc des modèles d'étude pertinents en écotoxicologie microbienne. Ces systèmes ont l'avantage de permettre de disposer d'échantillons proches des « écosystèmes » naturels afin d'évaluer les effets sur les communautés (au niveau structural et fonctionnel), tout en incluant les flux de nutriments (carbonés, azotés...) et le suivi du devenir des polluants. La différence entre microcosme et mésocosme se joue au niveau de leur localisation, en laboratoire pour le premier et sur le terrain pour le second.

— **Les études *in situ***, traduisent des effets réels observés suite à l'apport de xénobiotiques. Cependant, les difficultés dans la mise en œuvre de ce type d'expérimentation sont nombreuses. Afin de limiter les différences liées aux facteurs climatiques, les études au champ s'effectuent sur des parcelles contiguës, séparées par des zones tampons, permettant de réaliser plusieurs lots témoins et traités. Ainsi, les variations pédoclimatiques sont contrôlées au maximum. Un échantillonnage aléatoire important reste toutefois nécessaire du fait de la forte hétérogénéité du sol. De plus, ces études *in situ* devraient s'intéresser uniquement à des situations réelles d'épandage et/ou de mélange de produits phytosanitaires, les doses exagérées que l'on rencontre souvent (10X, 100X la dose agronomique recommandée), n'étant plus adaptées aux problématiques écotoxicologiques actuelles.

La complexité du modèle *in situ*, fortement influencé par les facteurs abiotiques qui conditionnent le devenir des polluants dans l'écosystème, fait que ce modèle, bien qu'étant le plus complet et le plus représentatif, ne se suffit pas en lui-même pour comprendre l'impact et le devenir des polluants. Les différents niveaux d'intégration, de l'organisme isolé à l'écosystème complexe, sont des approches complémentaires qu'il est nécessaire de lier afin d'apprécier pleinement les effets des polluants dans l'environnement.

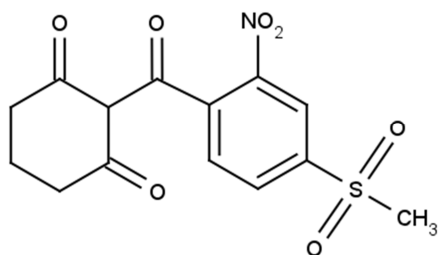
SOUS-CHAPITRE 1.4 : DONNEES SUR LES MOLECULES UTILISEES DANS CETTE ETUDE

Les molécules actives d'herbicides qui ont été choisies pour ces travaux de thèse, sont toutes autorisées et utilisées en France, sur les cultures de maïs, en remplacement de l'atrazine (molécule interdite à l'utilisation depuis 2003, de par ses propriétés de rémanence dans les sols et les écosystèmes aquatiques, et sa forte toxicité sur de nombreux organismes (Graymore et al., 2001)). Le choix des molécules et des mélanges réalisés s'est fait sur plusieurs critères :

- Premièrement, notre attention s'est portée sur le caractère réaliste de l'étude, en choisissant de mélanger des formulations commerciales de pesticides (molécules pesticide + adjuvants), puisque c'est sous cette forme que les molécules actives sont utilisées. Les molécules choisies devaient de plus être réellement employées ensemble sur les cultures, et ce, à la dose agronomique réelle d'épandage.
- Deuxièmement, le choix des molécules s'est fait sur la nature de leurs formulations commerciales, à savoir que nous avons choisi uniquement des pesticides en solution qui peuvent être appliqués par épandage aérien sur le sol. Cette stratégie permet un contrôle et une homogénéité dans l'application, excluant donc toutes molécules sous forme de poudre ou d'enrobage de semences.
- Troisièmement, les formulations commerciales choisies pour l'étude ne devaient contenir qu'un seul et unique pesticide en qualité de molécule active, avec des modes d'action différents, ceci afin de dissocier de potentiels effets lors d'applications séparées.
- Quatrièmement, le protocole expérimental a été développé en se basant sur l'expertise et les compétences existantes dans le laboratoire de recherche LMGE, et au sein de l'équipe CMES, privilégiant ainsi le choix de la mésotrione comme molécule à utiliser dans les mélanges (Travaux de thèse d'Olivier Crouzet, 2007-2010).

Bien que notre choix se soit porté originellement de façon préférentielle sur un mélange de pesticides multiples (herbicide(s) + fongicide(s)), tous les critères évoqués précédemment ont finalement restreint notre choix à trois herbicides : la **mésotrione**, le **S-métolachlore** et le **nicosulfuron**. Une quatrième molécule, le **bénoxacor**, est également présentée en qualité de phytoprotecteur associé au S-métolachlore.

4.1 - La mésotrione



La mésotrione (2-[4-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzoyl]-cyclohexane 1,3-dione), herbicide de la famille des tricétones est un analogue synthétique de la leptospermone, phytotoxine naturelle produite par *Callistemon citrinus* (Mitchell et al., 2001).

4.1.1 - Mode d'action

La mésotrione inhibe la p-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase (HPPD), une enzyme essentielle à la biosynthèse des caroténoïdes, et plus précisément dans la synthèse de ses précurseurs : les plastoquinones et l' α -tocophérol. Son action entraîne une chlorose des feuilles chez les plantes sensibles, qui sont incapables de détoxifier rapidement l'herbicide. La dose maximale d'application de cet herbicide au champ est de 150 grammes de matière active (m.a).ha⁻¹, et à des doses comprises entre 25 et 150 g de m.a.ha⁻¹, il montre une bonne sélectivité parmi les adventices sans dommage pour les rendements de maïs (Pannacci and Covarelli, 2009; Sutton et al., 2002).

La mésotrione est appliquée sous forme formulée dans diverses préparations (Syngenta), seule (Callisto[®], mésotrione 100 g.L⁻¹) ou associée à d'autres produits phytosanitaires (Elumis[®], mésotrione 75 g.L⁻¹ et nicosulfuron 30 g.L⁻¹; Camix[®], S-métolachlore 400 g.L⁻¹, mésotrione 40 g.L⁻¹ et bénomexacor 20g.L⁻¹). La formulation commerciale Callisto[®] s'emploie principalement en post-levée du maïs et offre un très large spectre d'efficacité sur les dicotylédones et les graminées. Son mode d'action est triple : foliaire, racinaire et anti-germinative, avec un contrôle des levées échelonnées des adventices sensibles : chénopode, amarante, renouée... (données Syngenta).

4.1.2 - Comportement et devenir dans l'environnement

4.1.2.1 - Caractéristiques physico-chimiques et processus de rétention

La dissolution de la mésotrione dans l'eau induit une acidification de la solution. Une solution à 1% de mésotrione pure présente un pH voisin de 4 et une solution à 1% de mésotrione formulée (Callisto[®]) présente un pH voisin de 3.

Les données de l'Union Européenne disponibles dans la base de données Agritox⁷ lui attribuent une forte solubilité dans l'eau (160 mg.L^{-1} à 20°C) qui augmente avec le pH (2200 mg.L^{-1} à 20°C au pH de 9). Des travaux cherchant à caractériser la sorption de la mésotrione dans des sols aux caractéristiques différentes (en termes de pH et de pourcentage de matière organique), concluent sur le fait que l'augmentation du pH fait diminuer la valeur du K_d tandis que l'herbicide passe de sa forme moléculaire à sa forme ionisée, augmentant ainsi sa mobilité et sa biodisponibilité (Chaabane et al., 2008; Dyson et al., 2002). La sorption de la mésotrione est donc principalement due au pH et de manière moins importante, à la teneur en matière organique.

Ainsi, avec un pKa de 3,12 à 20°C (donnée Agritox), des valeurs de solubilité importantes et une faible capacité de sorption, on peut donc affirmer que la mésotrione est assez mobile dans les sols et donc facilement biodisponible.

4.1.2.2 - Processus de dégradation

4.1.2.2.1 - Dégradation abiotique

Les données d'absorption dans le spectre UV-visible ($\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$) montrent que la mésotrione est peu sensible à la photodégradation dans des conditions environnementales normales. Les données Agritox établissent une DT50 de photolyse comprise entre 81 et 97 jours pour une lumière solaire estivale comprise entre 40° et 50° N de latitude. Cependant une étude utilisant des surfaces mimant la surface des feuilles, a montré un temps de demi-vie très court pour la mésotrione formulée, de $2,2 \pm 0,1$ heures (Ter Halle et al., 2010), supposant une action photo-sensibilisante des adjuvants. La mésotrione est également considérée comme très stable par rapport aux phénomènes d'hydrolyse dans une large gamme de pH (de 4 à 9), à 25°C et 50°C (données Agritox).

4.1.2.2.2 - Dégradation biotique

L'herbicide mésotrione présente la capacité d'être biotransformée, ce qui lui confère un temps de demi-vie dans le sol plutôt court (4,5 à 32 jours, selon Dyson et al., 2002). Une étude, menée sur deux sols contrastés quant à leurs teneurs en matière organique et à leur pH, montre que ces deux facteurs influent sur la dégradation de la mésotrione par les communautés microbiennes (Chaabane et al., 2008), avec une dissipation plus rapide pour des teneurs élevées en MO et sous sa forme moléculaire (favorisée en pH acides). Des souches de

⁷ <http://www.agritox.anses.fr/>

Bacillus sp. isolées d'un agrosystème et d'eau de nuage, ont montré une capacité à biodégrader rapidement et complètement la mésotrione, résultant en l'accumulation d'un de ses produit de dégradation : l'acide 2-amino-methylsulfonylbenzoïc (AMBA) (Batisson et al., 2009; Durand et al., 2006). Des études approfondies sur ces souches bactériennes ont menées à l'élaboration de modèles illustrant les voies potentielles de transformation ou dégradation de cet herbicide (Figure 14 ; Durand et al., 2010).

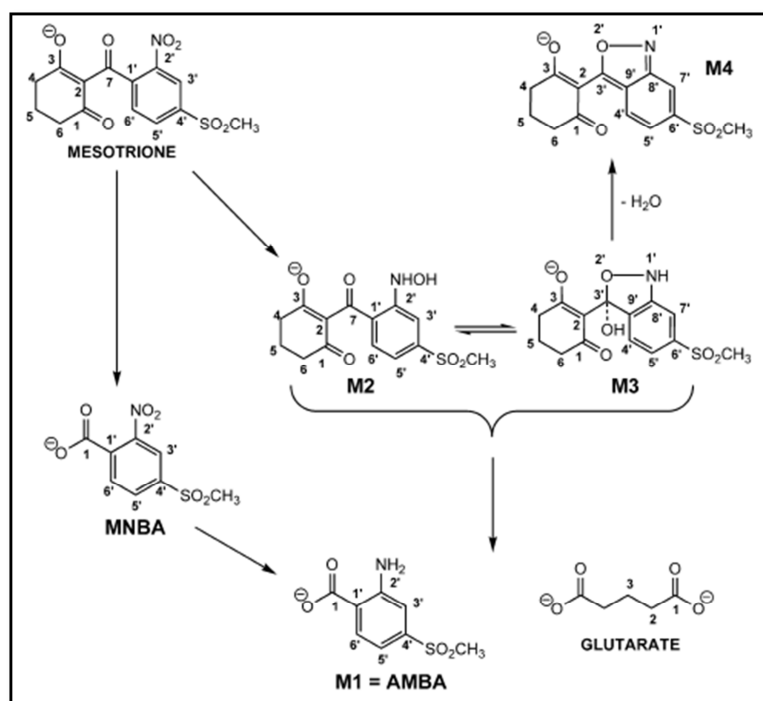


Figure 14 - Proposition de voies de biodégradation de la mésotrione par une souche bactérienne isolée d'eau de nuage (*Bacillus* sp. 3B6). D'après Durand et al. (2010).

Plus récemment une autre bactérie, *Pantoea ananatis*, isolée d'un écosystème aquatique s'est révélée capable de dégrader la mésotrione par des processus de co-métabolisme utilisant le glucose comme autre source de carbone, entraînant la production de produits intermédiaires différents de l'AMBA et du MNBA. Cependant, cette souche est incapable de croître en présence de fortes concentrations en Callisto®, ce qui limite son utilisation dans un contexte de bioremédiation (Pileggi et al., 2012). Dans un contexte de bioremédiation, il est donc d'un intérêt majeur de caractériser des souches capables de dégrader la mésotrione en présence d'autres pesticides, adjuvants et/ou produits de dégradation.

4.1.2.3 - Impact sur les écosystèmes

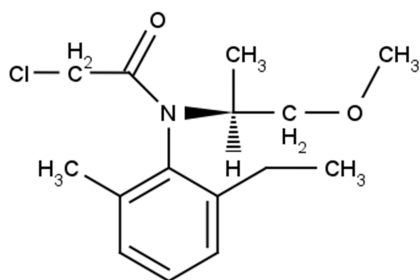
Des études de toxicologie sur cette molécule ont montré que les métabolites secondaires majoritaires issus de sa dégradation (AMBA et MNBA) peuvent être plus toxiques que la molécule mère, sur l'organisme modèle bactérien de référence, *Vibrio fischeri* (Bonnet et al., 2008). Sa toxicité sur microalgues est faible et nécessite des quantités importantes pour

provoquer un effet (56,1 mg.L⁻¹ pour la chlorophycée *Ankistrodesmus fusiformis* et 13,1 mg.L⁻¹ pour la diatomée *Amphora coffeaeformis*, (Moro et al., 2012)). De plus, à faible dose (0,2 mg.L⁻¹), un effet d'hormèse est observable, avec une stimulation de la croissance d'*A. fusiformis* et une augmentation du contenu pigmentaire de *Pediastrum tetras*.

Des travaux réalisés dans notre équipe de recherche ont souligné la toxicité de l'herbicide mésotrione formulé ou non, sur les microorganismes édaphiques, à 10 et 100 fois la dose agronomique recommandée, lorsqu'il est employé seul (Crouzet et al., 2010, 2013; Joly et al., 2012).

Dans l'environnement, des études récentes ont montré que la mésotrione est indétectable dans le sol et les plants de maïs après une saison agricole, suggérant que cet herbicide peut être utilisé de façon sûre, avec un dosage et un mode d'application approprié (Chen et al., 2012; Sun et al., 2013). Néanmoins, dans un contexte de rotation de cultures, les produits de dégradation résiduels peuvent avoir des effets délétères, entraînant une réduction significative des rendements de certaines cultures de légumineuses (chou, poivron, tomate, concombre, haricot...) et ceci encore 1 an après application de la mésotrione à la dose agronomique (Felix et al., 2007; Soltani et al., 2007).

4.2 - Le S-métolachlore



Le S-métolachlore ((S)-2-chloro-N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(1-methoxypropan-2-yl)acetamide, forme énantiomérique active de l'herbicide métolachlore, est un herbicide de la famille des chloroacétanilides. Il a progressivement remplacé le métolachlore racémique (métolachlore ou *rac*-

métolachlore, mélange composé à 50% de R- et 50% de S-métolachlore) qui est interdit en France depuis 2003. Les progrès en synthèse chimique assurent désormais la production de S-métolachlore, pur à plus de 80% (et donc contenant moins de 20% de la forme énantiomérique R, inactive en tant qu'herbicide) et efficace à dose plus faible (O'Connell et al., 1998; Shaner et al., 2006).

4.2.1 - Mode d'action

Le S-métolachlore inhibe la formation des très longues chaînes d'acides gras (VLCFA), ce qui interfère avec le développement normal des cellules et inhibe à la fois l'accroissement et la division cellulaire. Son action anti-germinative sur les graminées estivales s'effectue par une absorption principale au niveau du coléoptile. La dose maximale d'application de cet herbicide au champ est de 1921,5 g de m.a.ha⁻¹ sur les cultures de maïs.

Le S-métolachlore est appliqué sous forme formulée dans diverses préparations en solution, seul (Dual Gold[®], S-métolachlore 960 g.L⁻¹) ou associé à d'autres produits phytosanitaires (Camix[®], S-métolachlore 400 g.L⁻¹, mésotrione 40 g.L⁻¹ et bénoxacor 20g.L⁻¹; Dual Gold Safeneur[®], S-métolachlor 915 g.L⁻¹ et bénoxacor 45 g.L⁻¹). La formulation commerciale Dual Gold Safeneur[®] s'emploie aussi bien en pré- qu'en post-levée et permet d'éviter les salissements tardifs des cultures (action longue durée sur graminées et dicotylédones ; données Syngenta).

4.2.2 - Comportement et devenir dans l'environnement

4.2.2.1 - Caractéristiques physico-chimiques et processus de rétention

Le S-métolachlore dispose d'une forte solubilité dans l'eau (480 mg.L⁻¹ à 25°C au pH de 7,3, Agritox). Une étude basée sur 51 sols aux caractéristiques différentes, établit le *Kd* du S-métolachlore à une moyenne de 3,0 L.kg⁻¹ et met en avant une corrélation positive entre sa sorption et la teneur en matière organique du sol (Alletto et al., 2013). L'indice GUS (Ground

Ubiquity Score, indiquant le potentiel de lixiviation) classe le métolachlore dans les composés transitoires. En effet, de multiples estimations du *Koc* de la molécule donnent des valeurs comprises entre 110 mg.L⁻¹ (limon fin, %CO : 0,986) et 369 mg.L⁻¹ (argile, %CO : 1,276), la définissant donc comme une molécule à la sorption modérée sur les particules du sol. Barra Caracciolo et al., (2005) ont ainsi montré que certains sols présentant de faibles capacités de sorption et de minéralisation de cet herbicide pouvaient conduire à son transfert dans le compartiment aquatique

4.2.2.2 - Processus de dégradation

4.2.2.2.1 - Dégradation abiotique

Les données Agritox établissent une DT50 de photolyse dans l'eau du S-métolachlore de 75 jours à pH 7. Cet herbicide est stable face au phénomène d'hydrolyse dans une gamme de pH allant de 5 à 9, à une température de 25°C.

4.2.2.2.2 - Dégradation biotique

Des tests de dégradation, réalisés en laboratoire, dans différents sols en conditions aérobies, établissent une DT50 de la molécule pure de S-métolachlore comprise entre 13,9 et 41,3 jours (dose de S-métolachlore appliquée non précisée, données Agritox). Une autre étude au champ utilisant 6 sols montre, qu'avec des pourcentages en carbone organique allant de 1,4 à 3,5%, et un pH compris entre 7,4 et 7,9, la DT50 de la molécule varie entre 11 et 31 jours (Agritox). En effet, la minéralisation du S-métolachlore est négativement corrélée avec le pourcentage de carbone organique du sol, et positivement corrélée avec le pH du sol (Alletto et al., 2013) et la biomasse fongique (Vryzas et al., 2012). Cependant, il est à noter que la dégradation du S-métolachlore par les communautés microbiennes s'est révélée plus efficace que celle du *rac*-métolachlore dans l'étude de MA et al. (2006), facteur non négligeable quand on sait que cet herbicide remplace désormais la forme racémique. De nombreux métabolites sont décrits dans la littérature, dont trois ont été mis en évidence dans le sol après biodégradation du S-métolachlore : OXA (N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-oxalamic acid), CGA 357704 ([2-ethyl-6-methyl-phenyl)-oxalyl-amino]propionic acid) et un dérivé par perte du Cl (N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamide) (données Union Européenne).

4.2.2.3 - Impact sur les écosystèmes

Le métolachlore (mesure indifférenciée des énantiomères S- et R-) fait partie des 10 molécules pesticides les plus retrouvées dans les cours d'eau français et responsables de leur

classement en qualité « mauvaise » (Rapport Scientifique de l'OPR : Observatoire des Résidus de Pesticides⁸). Le fait qu'il soit retrouvé en milieu aquatique a conduit au développement de dispositifs d'épuration tels que les PMO (Periodic Mesoporous Organosilicas), capables d'adsorber le S-métolchlore plus efficacement que les argiles ou la matière organique (Otero et al., 2013). Une récente étude allemande, se focalisant sur les produits de dégradation des herbicides retrouvés dans l'eau de surface et dans les nappes phréatiques, révèle la présence de métabolites dérivés du métolachlore : ESA, NOA, OXA, CGA 357704 et CGA 368208 (Reemtsma et al., 2013). Dans les échantillons de nappes phréatiques positifs pour la présence de métabolites, ESA, NOA et OXA dépassent fréquemment la concentration de 0,1 µg.L⁻¹ (limite pour la potabilité de l'eau⁹ et l'appellation de « bon statut chimique » pour les nappes phréatiques¹⁰). ESA et NOA occupent, quantitativement parlant, les premières places des métabolites les plus retrouvés dans l'étude pré-citée. A l'heure actuelle, ces métabolites ne sont cependant pas recherchés systématiquement dans l'évaluation de la potabilité de l'eau.

La forme racémique du métolachlore est classée comme plus toxique que la forme S seule, sur le cladocère aquatique *Daphnia magna* (Liu et al., 2006) et le lombric *Eisenia foetida* (Xu et al., 2010). Le S-métolachlore présente par contre une toxicité environ deux fois plus importante (CE50 comprise entre 0,068 et 0,116 mg.L⁻¹) sur la micro-algue *Chlorella pyrenoidosa* et diminue significativement son contenu pigmentaire en chlorophylles *a* et *b*, comparativement au R-métolachlore (Liu and Xiong, 2009). Une étude de l'effet du S-métolachlore sur des racines de maïs et de riz a montré un effet supérieur à celui du *rac*-métolachlore sur la paroi cellulaire et donc une plus grande efficacité en tant qu'herbicide (Liu et al., 2012). Cet effet peut sembler inconvenant, cette molécule étant utilisée pour la protection des cultures de maïs, d'où son emploi avec la molécule phytoprotectrice benoxacor présentée ci-après.

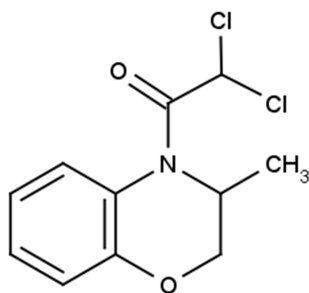
Les quantités de S-métolachlore dans le sol, mais également dans les tiges et les grains de maïs après une saison culturale, sont inférieures à 0,1 mg.kg⁻¹ (limite fixée par l'USA Environmental Protection Agency), ce qui permet de considérer cet herbicide comme sans danger pour l'alimentation et l'environnement (Cao et al., 2007, 2008; Sikkema et al., 2009).

⁸ <http://www.observatoire-pesticides.fr/>

⁹ European Commission, 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off. J. Eur. Union L330, 32e54.

¹⁰ European Union, 2006. Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration. Off. J. Eur. Union L372, 19e31.

4.3 - Le bénomaxacor



Le bénomaxacor (RS)-4-dichloroacetyl-3,4-dihydro-3-méthyl-2H-1,4-benzoxazine, est une substance phytosanitaire qualifiée de phytoprotectrice ou herbicide safeneur, appartenant à la famille des dichloroacétamides. Il est utilisé en combinaison dans des préparations commerciales à base de métolachlore (*rac*- ou *S*) et n'a pas d'activité herbicide.

4.3.1 - Mode d'action

L'action complète du bénomaxacor n'est pas connue, mais il semblerait qu'il augmente l'activité de la glutathion S-transférase dans le plant de maïs, afin de protéger la plante des dégâts potentiels causés par le métolachlore (*rac*- ou *S*-), (Fuerst et al., 1993; Miller et al., 1994; Wu et al., 2000).

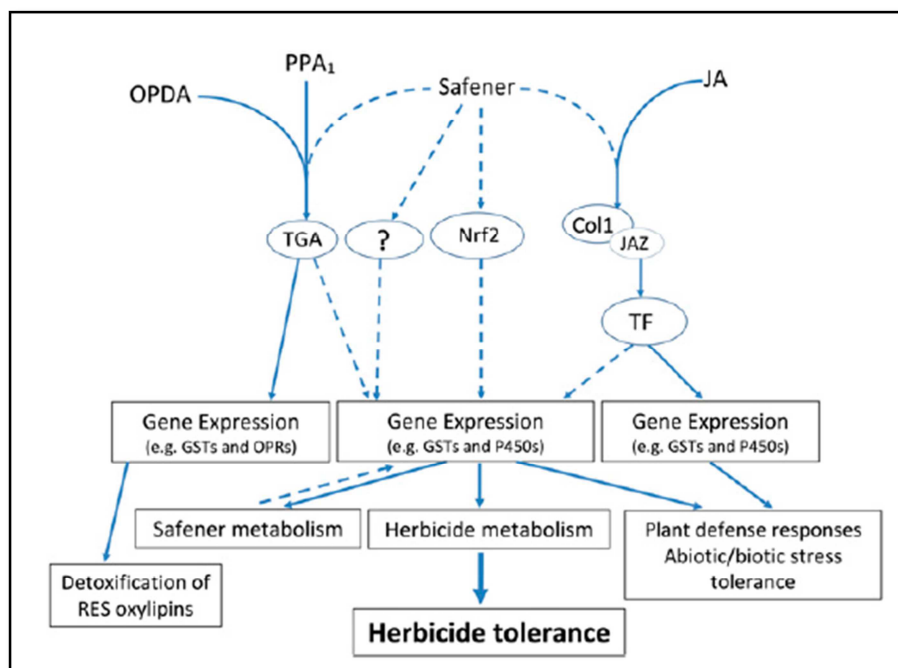


Figure 15 – Présentation des possibles voies de signalisation de gènes de défense et d'activation des voies de détoxification chez les plantes, par les herbicides safeneurs. D'après Riechers et al. (2010). Les lignes pointillées indiquent des voies de signalisation possibles mais non prouvées, contrairement aux lignes pleines. Les herbicides safeneurs pourraient agir sur des espèces électrophiles réactives (RES) contrôlées par de l'oxylipine (tel que OPDA et PPA₁) et qui régulent positivement les facteurs de transcription TGA, une voie de signalisation Nrf2-Keap1 régulée, et/ou

une voie de signalisation JA régulée, pour induire l'expression protéique impliquée dans la détoxification de la plante. Col1, Coronatine-insensitive protein1 ; JAZ, transcriptional repressor protein ; TF, transcription factor/activator.

On qualifie donc le bénomexacore d'herbicide safeneur, car il permet de façon simple et efficace d'augmenter la sélectivité de l'herbicide avec lequel il est associé en activant les voies de détoxification de la plante (Abu-Qare and Duncan, 2002; Riechers et al., 2010) ; Figure 15). En France, il est uniquement appliqué en mélange formulé avec le S-métholachlore (Camix[®], S-métholachlore 400 g.L⁻¹, mésotrione 40 g.L⁻¹ et bénomexacore 20g.L⁻¹ ; Dual Gold Safeneur[®], S-métholachlor 915 g.L⁻¹ et bénomexacore 45 g.L⁻¹).

4.3.2 - Comportement et devenir dans l'environnement

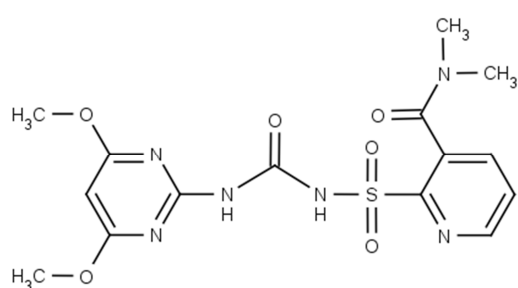
N'étant pas utilisé comme un herbicide à part entière, peu de données sont disponibles sur le bénomexacore dans la littérature. Il est peu soluble dans l'eau, de l'ordre de 20 mg.L⁻¹, à 20°C (Agritox). Les études de Koc lui attribuent des valeurs très variables dans le sol, allant de 155 mL.g⁻¹ (limon-sableux, %MO : 2,2, pH 5,2) à 643 mL.g⁻¹ (sable limoneux, %MO : 0,7, pH 8). Sa sorption est donc modérée et va être fortement dépendante des caractéristiques du sol.

Le bénomexacore est très sensible à la photodégradation avec une DT50 de 6,8 jours pour une lumière naturelle (surface de sol limon-sableux), et sensible à l'hydrolyse (DT50 > 14 jours à pH 11 et > 28 jours à pH 3, à 25°C). Dans le sol, sa DT50 est plus importante, avec des valeurs comprises entre 21,6 et 48,7 jours (limon sableux, %MO : 1,1, pH : 6,4, 25°C).

La CL50 sur le lombric *Eisenia foetida* est supérieure à 1000 mg.kg⁻¹ (Agritox). Dans le sol, à la dose de 333g.ha⁻¹, qui est donc plus de 6 fois supérieure à la dose maximale applicable en formulation, aucun impact sur la minéralisation du carbone et de l'azote n'est observé (Agritox).

Du fait du manque d'études sur le bénomexacore, il est difficile de conclure quant à son effet dans l'environnement. Cependant, le peu de données disponibles (Agritox), indiquent qu'il semblerait sensible aux phénomènes de dégradations biotiques et abiotiques, tout en ayant un impact extrêmement modéré sur le fonctionnement du sol.

4.4 - Le nicosulfuron



Le nicosulfuron (2-(4,6-diméthoxypyrimidin-2-ylcarboylsulphanoyl)-N,N-diméthyl-nicotinamide), est un herbicide de la famille des sulfonylurées. Absorbé principalement par les feuilles des adventices, il est transporté par le phloème et le xylème et bloque la synthèse d'acides aminés

ramifiés. Son action induit des jaunissements ou rougissements qui se transforment en nécroses et provoquent ainsi la destruction progressive des adventices.

4.4.1 - Mode d'action

Le nicosulfuron est un herbicide sélectif systémique agissant sur les graminées et les dicotylédones jeunes, absorbé par le feuillage et les racines des plantes, et rapidement transporté au niveau des méristèmes. Il agit par inhibition de l'acétolactate synthase (ALS), ce qui conduit à un arrêt de la division cellulaire et de la croissance de la plante (Tomlin, 1994). La dose maximale d'application de cet herbicide au champ est de 60 g m.a.ha⁻¹ et il montre une bonne action sélective dans les cultures de maïs (Damalas et al., 2012; Zhang et al., 2013).

Le nicosulfuron est appliqué sous forme formulée dans diverses préparations en solution, sous forme de granulés ou d'huiles, seul (Milagro[®] et près de 40 autres préparations similaires, nicosulfuron 40 g.L⁻¹ ; Nisshin Premium[®], nicosulfuron 60 g.L⁻¹ ; Innovate[®], nicosulfuron 240 g.L⁻¹ ; Accent 75 WG[®], nicosulfuron 750 g.kg⁻¹) ou associé à d'autres produits phytopharmaceutiques (Elumis[®], mésotrione 75 g.L⁻¹ et nicosulfuron 25 g.L⁻¹ ; Cursus Duo[®], nicosulfuron 300 g.kg⁻¹ et rimsulfuron 150 g.kg⁻¹ ; Principal[®], nicosulfuron 429 g.kg⁻¹ et rimsulfuron 107g.kg⁻¹).

4.4.2 - Comportement et devenir dans l'environnement

4.4.2.1 - Caractéristiques physico-chimiques et processus de rétention

Le nicosulfuron a une solubilité dans l'eau importante, croissante en fonction du pH : 250 mg.L⁻¹ à pH 5 ; 7,5 g.L⁻¹ à pH 6,5 et 76,4 g.L⁻¹ à pH 9 (données Agritox à 20°C). Son pKa de 4,6 à 25°C et ses faibles valeurs de sorption (Kearney, 1988) indiquent que le nicosulfuron est une molécule plutôt mobile dans les sols et donc facilement biodisponible.

4.4.2.2 - Processus de dégradation

4.4.2.2.1 - Dégradation abiotique

Les données de l'Union Européenne ne renseignent pas quant au comportement du nicosulfuron face aux phénomènes d'hydrolyse et de photolyse. L'étude de Ter Halle et al. (2010) attribue une DT50 de photolyse du nicosulfuron pur et formulé, sur des surfaces de cire mimant la surface foliaire, respectivement de 51 ± 11 jours et de $32,3 \pm 2,5$ jours.

4.4.2.2.2 - Dégradation biotique

Les études sur la dissipation du nicosulfuron font état de temps de demi-vie très court dans l'environnement, compris entre 3 et 13,5 jours (Ashburn Poppell et al., 2002; Wu et al., 2010).

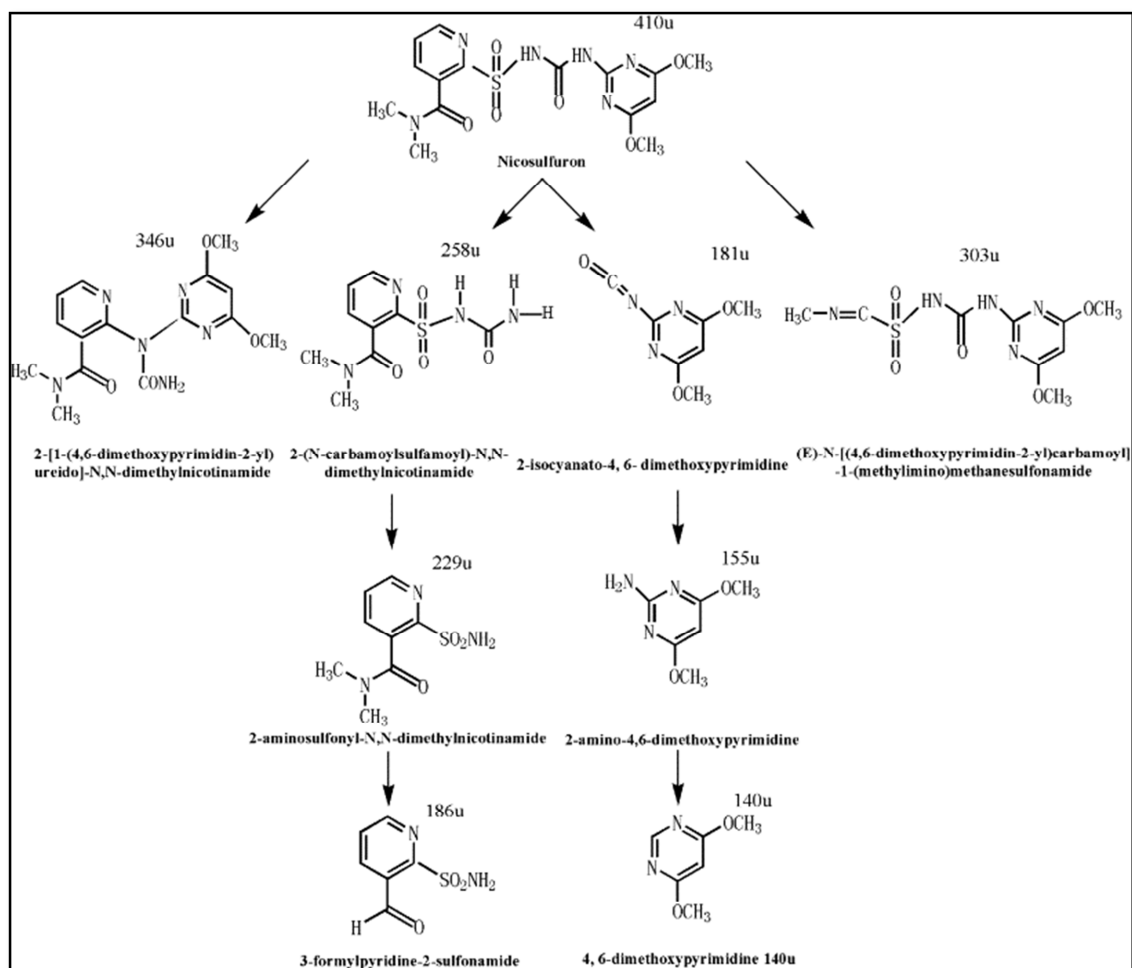


Figure 16 - Proposition de de biodégradation du nicosulfuron par une souche fongique isolée de boues activées (*Talaromyces flavus* LZM1). D'après Song et al. (2013).

Plusieurs souches, bactériennes et fongiques, présentent la capacité d'utiliser le nicosulfuron comme seule source de carbone, azote et nutriments (Kang et al., 2012; Song et al., 2013; Yang et al., 2008). *Talaromyces flavus* LZM1, une souche fongique isolée de boues activées, dégrade totalement le nicosulfuron en moins de 5 jours (pH 6,1 ; 29°C ; 100 mg.L⁻¹ de nicosulfuron). Les auteurs soutiennent l'idée que cette souche peut utiliser le nicosulfuron comme seule source azotée, car les métabolites prédits par leur analyse sont tous issus de clivages dans des liaisons –N (Figure 16).

4.4.2.3 - Impact sur les écosystèmes

Des tests de toxicité *in vitro* sur micro-algues indiquent des effets modérés du nicosulfuron (inhibition principalement sur le groupe des Diatomées) comparativement à la molécule qu'il remplace : l'atrazine (Leboulanger et al., 2001; Nélieu et al., 2005).

Le nicosulfuron pur, appliqué à 1, 5 et 10 fois la dose agronomique recommandée, sur un sol type Chernozem, ne modifie pas la balance des cycles biogéochimiques (Radivojević et al., 2012). Seules quelques modifications transitoires sont observées directement après traitement pour les doses 5 et 10 (diminution de la DHA et du carbone microbien ; augmentation de l'activité respiratoire).

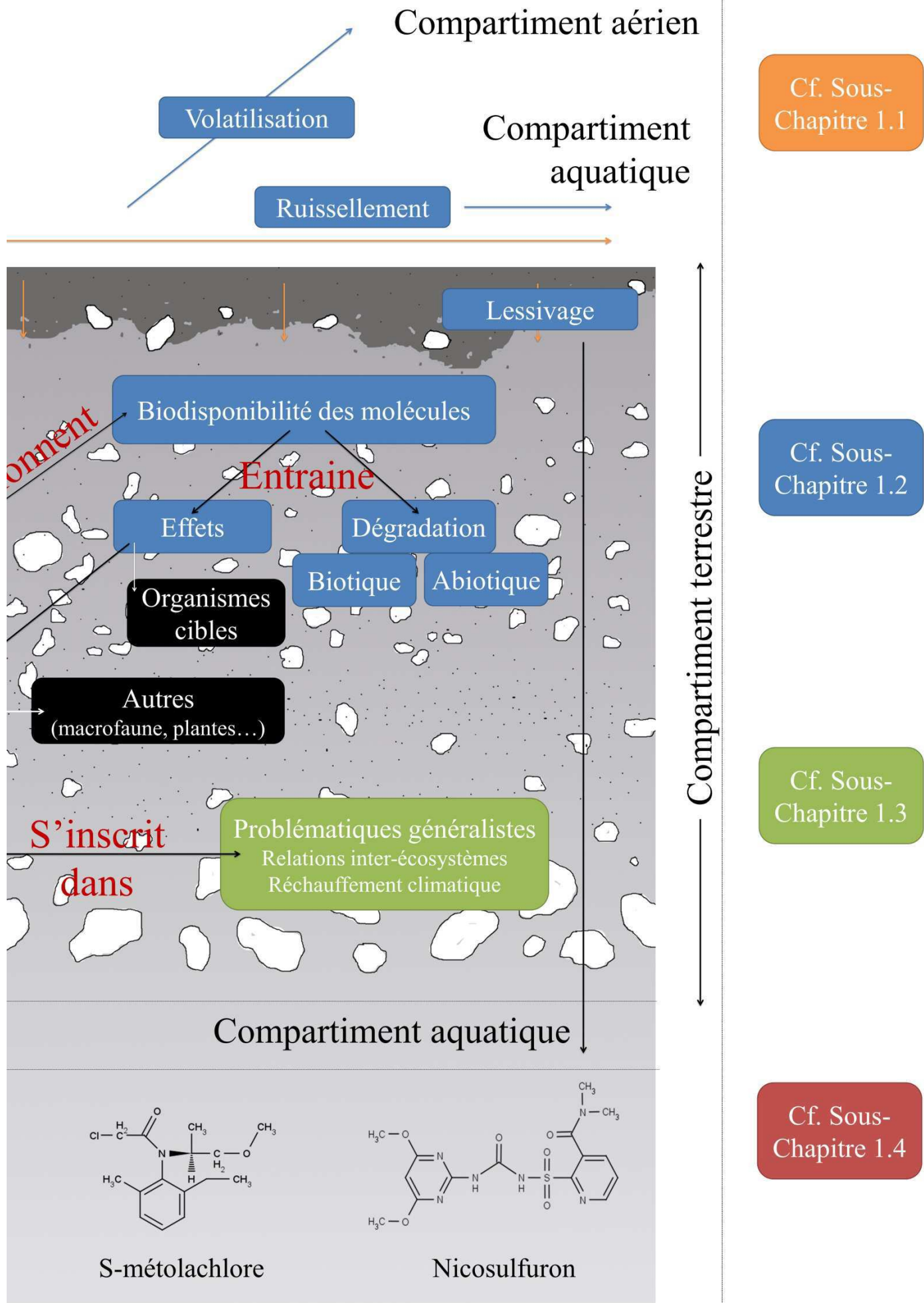
Des dosages dans des plants de maïs traités à la dose recommandée en nicosulfuron indiquent que cet herbicide a un temps de demi-vie dans le plant très court (< 1 jour), et les quantités de résidus retrouvées suggèrent qu'il peut être utilisé de façon sûre pour l'alimentation (Wu et al., 2010).

SCHEMA RECAPITULATIF DE LA SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La double page qui suit est une figure récapitulative reprenant les principaux points importants de la synthèse bibliographique permettant d'appréhender au mieux les effets des phytosanitaires sur les communautés microbiennes et le fonctionnement de l'écosystème (Figure 17). Le code couleur utilisé permet de se guider dans les différents sous-chapitres.



Figure 17 – Schéma de synthèse reprenant les points clefs du travail bibliographique



QUESTIONNEMENT DECOULANT DE CETTE SYNTHÈSE

La très faible quantité d'informations disponible quant aux effets de l'usage des pesticides en mélange motive la réalisation de ces travaux de thèse et ceci pour deux raisons principales : les pratiques d'utilisation de mélanges sont de plus en plus répandues et la persistance de certaines molécules dans le sol font qu'elles se retrouvent en présence d'autres molécules.

Les études menées jusqu'alors concernant les effets des pesticides sur les microorganismes du sol, étaient souvent limitées en termes de lien entre la structure génétique, l'abondance et les métabolismes réalisés par les communautés microbiennes. Nous avons donc décidé de mener nos travaux en prenant en compte ces différents aspects, à savoir le suivi de communautés microbiennes dans leur globalité (bactériennes et fongiques) et spécifiques d'intérêt (impliquées dans le cycle de l'azote et phototrophes), en terme de diversité, d'abondance et d'activités, dans le cadre d'utilisation de mélanges réalistes de pesticides. Puisqu'il existe un nombre extrêmement important de paramètres à prendre en compte dans ce type d'études, nous avons préalablement réalisé une approche prospective (**Chapitre 2**), pour nous permettre de définir les expérimentations à réaliser pour cette nouvelle étude d'impacts des mélanges d'herbicides.

Nous avons ainsi retenu les formulations commerciales de trois herbicides : le S-métolachlore (Dual Gold Safeneur[®]), la mésotrione (Callisto[®]) et le nicosulfuron (Milagro[®]), employées à la dose agronomique recommandée et appliquées en microcosmes suivant un planning agricole, sur un sol de Limagne, afin de :

- Suivre les cinétiques de dissipation des molécules dans le sol, identifier de potentiels effets « mélanges » sur leur devenir et déterminer la durée de la pression de pollution
- Analyser la toxicité des molécules seules et en mélange pour mettre en évidence d'éventuels effets synergiques ou antagonistes des molécules
- Analyser les effets induits par les herbicides, seules et en mélange, sur les communautés microbiennes que ce soit au niveau de leurs biomasses, de leurs fonctions ou de leurs structures
- Cibler des communautés spécifiques pouvant être sensibles et statuer sur l'effet des mélanges herbicides

CHAPITRE 2 : ETUDE PROSPECTIVE

L'étude prospective a été initiée durant mon Master 2 et conclue durant les premiers mois de ce travail de thèse.

Les résultats antérieurement acquis au laboratoire nous ont conduits à porter notre intérêt sur la mésotrione associée au S-métolachlore.

Ces deux herbicides, aux cibles d'action différentes, sont effectivement utilisés en mélanges sur les cultures de maïs (*Cf.* Sous-Chapitre 1.4).

Différents points clés ont été abordés au cours de cette étude :

- La maîtrise des expérimentations en microcosmes (Figure 18), permettant un contrôle de nombreux paramètres au laboratoire (humidité, cycle jour/nuit, température).
- L'utilisation des formulations commerciales (Syngenta®) de la mésotrione et du S-métolachlore, respectivement le Callisto® et le Dual Gold®.
- L'emploi des formulations seule ou en mélange, afin de dissocier les effets observés.
- L'expérimentation à 1X et 10X les doses agronomiques recommandées par le fournisseur, représentant des conditions réelles d'épandage.



Figure 18 - Photographie du dispositif expérimental de type microcosme, utilisé lors de l'étude prospective. (Photographie personnelle).

Cette étude prospective a fait l'objet d'une publication dans la revue **ISRN Ecology**, en 2012.

Research Article

Impact of Maize Formulated Herbicides Mesotrione and S-Metolachlor, Applied Alone and in Mixture, on Soil Microbial Communities.

Pierre Joly,^{1,2} Pascale Besse-Hoggan,^{3,4} Frédérique Bonnemoy,^{1,2} Isabelle Batisson,^{1,2} Jacques Bohatier,^{1,2} and Clarisse Mallet^{1,2}

¹LMGE, Clermont Université, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France

²UMR 6023, CNRS, and Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France

³SEESIB, Clermont Université, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France

⁴UMR 6504, CNRS, and Laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, 63177 Aubière, France

Correspondence should be addressed to Pierre Joly, pierre.joly@univ-bpclermont.fr

Received 19 September 2011; Accepted 14 November 2011

Academic Editors: G. Berg and D. C. Moon

Copyright © 2012 Pierre Joly et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In order to reduce the amounts of pesticides used, and thereby their associated risks, new generations of less environmentally dangerous molecules with lower weight are currently being used in the mixtures sprayed on crops. Few studies have been made, however, to analyse their impact on the soil, and more particularly on the microorganisms living in the soil which maintain the essential functions of this ecosystem. By taking a microcosmic approach, we were able to assess the impact of the maize herbicides “cocktail” Mesotrione and S-metolachlor on global soil microbial activity, biomass, and structures, by using the formulated compounds, respectively, Callisto and Dual Gold (both registered brands of Syngenta). Our results highlighted a synergetic effect in “cocktail” microcosms resulting in an increase in the Mesotrione herbicide dissipation time and in an impact on the microbial community at onefold field rate equally to more than a single herbicide used at tenfold field rate.

1. Introduction

For several decades herbicides have been used in spray form to reduce unwanted vegetation in crops. However, the main indirect casualty of these pesticides, following their spraying, is the soil, and, more particularly, the microorganisms it contains which are essential to maintain the functions of the soil ecosystem [1, 2]. So nowadays, European laws are converging to reduce the amounts of pesticides (Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE, <http://www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32000L0060:fr:html>. Directive Cadre sur les pesticides 91/414/CEE, <http://www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31991L0414:fr:html>. Plan Ecophyto 2018, <http://www.agriculture.gouv.fr/ECOPHYTO-2018/>) used, and, in doing so, reduce their associated risks. The lack of controls in pesticides targets has caused the revaluation of many first-generation molecules and their replacement with new generations of molecules

with lower weight, which, therefore, are less dangerous to the environment [3]. To ensure the efficiency of these new pesticides, the trend is to multiply the molecules used for the same crop in combinations called “cocktails.” Unfortunately, comparing to data on single pesticides (e.g., [1]), there are few studies concerned with the impact of these “cocktails” on the environment, particularly regarding their indirect impact on soil microbial communities. Some studies [4, 5], however, showed that when two herbicides were used simultaneously, their persistence in the soil was generally prolonged, and the environmental contamination potential increased. Among others [5, 6], Tejada showed an increased toxic effect of “cocktails” on biological microbial activity. In order to better understand the impact of pesticides, it is essential that the potential synergetic effects of combined herbicide mixtures on soil microbial communities are investigated further.

In this context, to replace the herbicide Atrazine, which was banned in 2003 [7], the triketone herbicide Mesotrione

(2-[4-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzoyl]-1,3-cyclohexanedione) is often used in combination with the chloroacetanilide herbicide S-metolachlor (2-chloro-*N*-(2-ethyl-6-methylphenyl)-*N*-[(1*S*)-2-methoxy-1-methylethyl] acetamide) on maize crops.

Mesotrione is a chemical derivative of a natural phyto-toxin produced by *Callistemon citrinus* [3] which inhibits a critical enzyme, p-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase (HPPD), in carotenoid biosynthesis [8]. It was recently shown that it could have some impact on soil microbial communities when used alone [9] and that some of these metabolites could be more toxic than the parent molecule [10].

S-metolachlor is classified as an inhibitor of very long chain fatty acid (VLCFA) formation (HRAC (2007), <http://www.hracglobal.com/>). It interferes with normal cell development and inhibits both cell division and cell enlargement [8]. The choice of S-metolachlor among the other herbicides sprayed together with Mesotrione, was made mainly because of its known difficult biodegradation [8] and because of its targets, which differ from those of Mesotrione.

Although we may know the impact of such pesticides when they are applied alone [1], it is necessary to study the “cocktails” used on fields to evaluate the real impact of pesticides on soil microbial communities. No studies were found in the literature which made reference to the effects of the combined application of Mesotrione+S-metolachlor on soil microorganisms. The objective of this paper, therefore, was to study the effect of the combination of these two molecules on soil microbial communities and ecological processes through the use of two herbicides commonly used for maize crops, being the formulated compounds Callisto and Dual Gold.

We assessed the impacts of the herbicide “cocktail” on global soil microbial activity, biomass, and structures. We also focused on the effect of the “cocktail” on potentially sensitive communities, such as phototrophic microorganisms and those involved in the nitrogen cycle. Our work was carried out using these herbicides at onefold field-rate, being the normal conditions of spraying, and at a tenfold field-rate, to replicate the higher pressure of pollution encountered sometimes in the first millimetres of soil after spraying. To conduct this study we privileged a microcosm approach as a reliable substitute for field research into the effects of pesticides on soil ecosystems [11].

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design. Topsoil (0–5 cm) was collected in January 2010 from a fallow chernozem soil (determined using standard protocols of Arras Soil Analysis Laboratory, INRA, France; and according to FAO classification) located in the Limagne plain near Clermont-Ferrand (France). The soil was then sieved (mesh size 2 mm) and preincubated under experimental conditions for two weeks, in large polyvinyl chloride (PVC) tanks.

The effects of Mesotrione and S-metolachlor herbicides on soil microbial communities when applied alone or in a

“cocktail,” were studied using two different doses: onefold field rate: 1 ×FR and tenfold field rate: 10 ×FR of formulated Mesotrione (0,45 mg·kg⁻¹ soil_{dry weight (dw)} of active ingredient (a.i.) for 1 ×FR and 4,5 mg·kg⁻¹ soil_{dw} (a.i.) for 10 ×FR of Callisto, 100 g·L⁻¹ Mesotrione, Syngenta Crop Protection) and formulated S-metolachlor (5,4 mg·kg⁻¹ soil_{dw} (a.i.) for 1 ×FR and 54 mg·kg⁻¹ soil_{dw} (a.i.) for 10 ×FR of Dual Gold, 915 g·L⁻¹ S-metolachlor, Syngenta Crop Protection). The formulated herbicides were diluted in distilled water, and soil pH was measured after herbicide application to ensure a nonoccurrence of pH effects.

Each treatment (C1 and C10 for Callisto applied at 1 ×FR and 10 ×FR, respectively; DG1 and DG10 for Dual Gold applied at 1 ×FR and 10 ×FR, resp., M1 (C1 + DG1) and M10 (C10 + DG10) for the Callisto/Dual Gold Mix applied at 1 ×FR and 10 ×FR, resp.) was carried out on different soil subsamples in separate PVC tanks, by spraying and then mixing in the herbicides with a small rake. The control soil (T) was sprayed with distilled water only. Each soil subsample was divided into 20 microcosms (190 g of soil in PVC cylinders, height = 8 cm, diameter = 10 cm), leading to a total of 140 microcosms. Soil water content was adjusted to 35% of maximum water holding capacity (WHC), making it comparable to field moisture, and was monitored throughout the experiment by weighing the soil of each microcosm every week. The microcosms were covered with porous plastic film allowing air exchange while limiting soil dehydration and incubated in an experiment room with a day/night cycle (14:10) at 20°C ± 2°C for 93 days. Five randomly chosen microcosms from each treatment set were sacrificed on days 2, 8, 42, and 93. For each microcosm, microbial biomass, microbial respiration, N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ (except at day 93), and photosynthetic pigments were obtained from fresh soil aliquots. The remaining soils were stored at -20°C for DNA analysis, herbicide quantification, enzymatic activity analysis, and carbohydrate and protein measurements.

2.2. Herbicide Dissipation. At the beginning of the experiment, soil samples were checked for the absence of Mesotrione, S-metolachlor, and other pesticides (multiresidues117 scan, LDA 26 Laboratory). In order to check the amount of herbicide initially spread on the soil and track its dissipation, Mesotrione and S-metolachlor concentrations were monitored for each treatment for three out of five replicate microcosms on every sacrificing day. Mesotrione was extracted and concentrations were quantified, as described by Crouzet et al. [9]. S-metolachlor was extracted by adding 10 mL of MeOH/H₂O (4/1) onto 5 g of fresh soil, and stirring for 24 h using an orbital shaker at 50 rpm and at room temperature. Herbicide concentration of soil liquid extracts was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an Agilent Series 1100 chromatograph (Courtaboeuf, France) equipped with a reverse-phase column (C18 Zorbax Eclipse column, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 22°C and a diode array detector set at λ = 254 nm for Mesotrione and λ = 220 nm for S-Metolachlor. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and aqueous H₃PO₄ (0.01% v/v, pH = 2.9) (B) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. Gradient: 0–5 min: 5% A;

TABLE 1: PCR primers and amplification programs used in this study.

Target genes and microbial groups	PCR primers	Sequences (5'-3')	Uses	PCR/amplification program	References
Bacterial-16S rDNA	968f ^a 1401r	AACGCGAAGAACC ^a TTAC CGGTGTGTACAAGGCC	DGGE 463 bp	5 min. at 95°C, followed by 30 cycles of (1 min. at 95°C, 1 min. at 58°C, 1 min. at 72°C); a final extension step for 7 min. at 72°C	[21]
Fungal-5,8S rDNA/ITS	ITS5 ^a ITS2	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG GCTGCGTTCTTCATCGATGC	DGGE 280–600 bp	15 min. at 95°C, followed by 35 cycles of (30 sec. at 95°C, 45 sec. at 55°C, 30 sec. at 72°C); a final extension step for 7 min. at 72°C	[22]

^aFor DGGE, a GC clamp (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') was attached to 5' end.

5–30 min: 5–70% A (linear); 30–32 min 70–95% A; 32–33 min: 95–5% A; 33–36 min: 5% A.

2.3. Soil Chemical Analysis. Physicochemical characteristics of Limagne soil have already been described in a previous study [9] and checked in this study for any evolutions since the last analyses.

Evolutions of carbohydrates and proteins in soil samples were followed, according to Dubois et al. [12] and Lowry et al. [13], respectively, to estimate the availability of the principal organic compounds which ensure microbial development. Results were read spectrophotometrically on a SFM 25 (Kontron Instruments).

Measurements of ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) concentrations were performed within hours following the sampling. For NH_4^+ , 2 g of soil were mixed with 10 mL of 1 M KCl and stirred for 1 h at 250 rpm at room temperature. For NO_3^- , 10 g of soil were mixed with 50 mL of deionized water at 40°C and stirred for 1 h at 250 rpm at room temperature. After centrifugation at 4000 $\times$ g during 10 min, supernatants were filtered on a cellulose filter (Whatman 42). NH_4^+ measurements were performed spectrophotometrically on a SFM 25 (Kontron Instruments), directly after filtration, following the Berthelot reaction method [14]. NO_3^- measurements were performed by ionic chromatography [15]. Samples were run in a Waters 501 HPLC pump (Millipore) at 0.5 mL·min⁻¹ and conductivity was followed by a Waters 431 detecting device (Millipore). Data was recorded and analysed by TotalChrom Navigator software (PerkinElmer).

2.4. Estimated Soil Microbial Activity and Biomasses. The estimated activity of soil microbial communities was quantified using the substrate-induced respiration (SIR) method. SIR was measured according to Crouzet et al. [9] with 6 mg glucose g⁻¹ soil as performed by Lin and Brookes [16], using a gas chromatograph (Agilent 3000 μ GC, Agilent Technology). SIR results were not converted into biomass values [17] and used as a proxy of the activity level of the heterotrophic active microbial communities.

The total soil microbial biomass was quantified using the fumigation/extraction method described by Vance

et al. [18] with slight modifications. Briefly, 10 g of fresh soil was fumigated in a bell jar vacuum system containing 250 mL of CHCl_3 stabilized with 0.6% EtOH at 37°C during 24 h. The total carbon (TC) extraction from fumigated and nonfumigated soil samples was performed by adding 40 mL of 30 mM K_2SO_4 and stirring for 40 min at 250 rpm at room temperature. After centrifugation at 4000 $\times$ g during 10 min, supernatants were filtered on 1.2 μ m glass microfiber filters (GF/C Whatman). Analyses of TC and inorganic carbon (IC) were performed on a total organic carbon analyzer TOC-5050A (Shimadzu). Each sample was run a minimum of 6 times to get correct values (P value < 0.05). Indirect microbial biomass was obtained by using Lin and Brookes general formula: $B_c = 2,22 \times E_c$ (with B_c , the microbial C. and E_c the K_2SO_4 -extracted C. in fumigated soil less the K_2SO_4 -extracted C. in nonfumigated soil) [16].

The photosynthetic microbial biomass was quantified by photosynthetic pigment extraction and measurement (chlorophyll *a*, active chlorophyll *a*, and carotenoids). Pigments were extracted within hours following the sampling, according to Tsujimura et al. [19]. The concentrations of pigments were measured spectrophotometrically from absorbance readings (480, 630, 645, 663, and 750 nm) on a CE 2021-2000 series (CECIL Instruments) using the equation described by SCOR-UNESCO Working Group 17 [20].

2.5. Soil Microbial Structures

2.5.1. Bacterial Genetic Structure by PCR-DGGE. Bacterial community structure from each microcosm was investigated on genomic DNA extracted and purified from 1 g of soil using the Ultra Clean Soil DNA isolation kit extraction (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's instructions for maximum yields. The quality of DNA extractions was checked on NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). The amplification was run with the primers 968f-GC and 1401r (Table 1) targeting the V6–V8 regions of bacterial 16S rDNA [21]. The PCR reaction (50 μ L) contained 1 $\times$ PCR buffer (Bioline), 2.5 mM MgCl_2 (Bioline), 200 μ M of each dNTP (Promega), 0.3 μ M of each primer, 500 ng· μ L⁻¹ of bovine serum albumin (BSA, Sigma), 1.5 units of BIOTAQ

DNA polymerase (Bioline), and 40 ng of soil DNA extract. The samples were amplified in MJ Research thermocycler (PTC-200). PCR products were checked by 0.8% (wt/v) agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and quantified with the DNA quantitation Kit (Sigma) using a Kontron spectrofluorometer (Kontron Instruments) at wavelength of 360 nm (excitation) and 460 nm (emission). 500 ng of each bacterial PCR product was loaded into 7.5% polyacrylamide (w/v) denaturing gels with linear gradients of 50–60% (100% denaturant contains 7 M urea and 40% formamide) and run in 1X TAE buffer at a temperature of 60° C at 80 V for 21 h on a TTGEK-2401-220 (CBS Scientific).

2.5.2. Fungal Genetic Structure by PCR DGGE. Fungal community structure was investigated on genomic DNA extracted and purified from a pool of 7.5 g of soil from the five randomly chosen microcosms for each treatment with PowerMax Soil DNA isolation kit extraction (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's instructions for maximum yields. Quality of DNA extractions was checked on NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). The amplification was run with the primers ITS5-GC and ITS2 (Table 1) targeting the ITS and 5.8S rDNA region [22]. The PCR reaction (50 μ L) contained 1 $\times$ PCR buffer (Qiagen), 2.5 mM MgCl₂ (Qiagen), 200 μ M of each dNTP (Promega), 0,3 μ M of each primer, 500 ng $\cdot$ μ L⁻¹ of bovine serum albumin (BSA, Sigma), 1.25 units of HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen), and 40 ng of soil DNA extract. The samples were amplified in UnoCycler thermocycler (VWR). PCR products were checked as for bacteria. 500 ng of each fungal PCR product was loaded into 7.5% polyacrylamide (w/v) denaturing gels with linear gradients of 25–50% (100% denaturant contains 7 M urea and 40% formamide) and run in 1X TAE buffer at a temperature of 59° C at 70 V for 16 h on the same apparatus as for the bacterial PCR products.

After electrophoresis, the DGGE gels were stained in 1X TAE buffer containing 1/20000 dilution of Gel Star (Lonza, Rockland, ME-USA) and digitized using a BioSpectrumAC Imaging System (UVP).

2.6. Statistical Analyses. All soil microbial measurements were calculated on the basis of oven-dried soil weight and expressed as the mean values ($\pm$ SEM) of five replicates per treatment and per date, except for bacterial DGGE results, where only three replicates were analysed, and for fungal DGGE results. Statistical procedures were carried out using PAST software [23]. Normality distribution and homogeneity of variances were checked for all data. One-way ANOVA was used to test treatment effects on the microbial activities and biomasses, for a given date after herbicide application. Differences between individual means were then compared using Tukey's honest significant difference (HSD) post hoc test. Significance was set at $P \leq 0.05$. Gel analyses were performed using Gel ComparII software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). According to Fromin et al. [24], total band intensity for each lane was normalized among lanes and each DNA band was considered in the analysis if its relative intensity accounted for more than 0.5% of

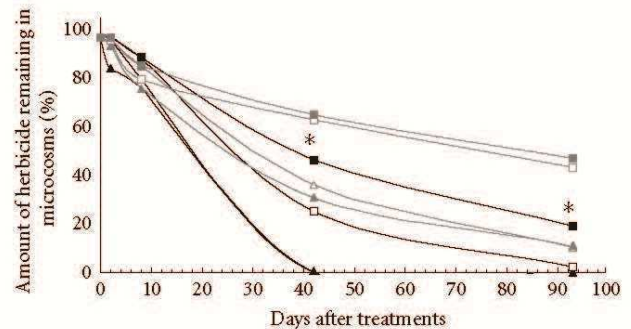


FIGURE 1: Dissipation of Mesotrione (in black) and S-metolachlor (in grey) (in percentage compared to the initial input) applied at 1 $\times$ FR (triangle) and 10 $\times$ FR (square), alone (empty figure) or in “cocktail” (full figure) in the Limagne soil microcosms, during the 93 days of the experiment. Significant differences between dissipation of molecules applied alone and in “cocktail” (labelled by * for $0.01 < P \leq 0.05$) were observed using one-way ANOVA analyses.

total lane intensity. Data obtained was compared to control results for each sampling date, using the Student's *t*-test for two samples. Based on band position and band relative intensity analysis, the diversity of the microbial communities was analysed by the richness (*R*) estimated as the number of bands, the Shannon-Weaver index (*H*) according to the following equation: $H' = - \sum P_i (\ln P_i)$ [25], where P_i is the ratio between specific band intensity and total intensity of all bands in a lane sample.

3. Results

3.1. Herbicide Dissipation. Soil herbicide concentrations just after contamination were very similar to the expected values for all treatments (data not shown). Herbicide dissipation was strongly dependent on application rates. At the same field rate, soil dissipation kinetics of S-metolachlor were similar between microcosms containing Dual Gold applied alone or in a “cocktail” (Figure 1), with a DT₅₀ of $\approx$ 28 days at 1 $\times$ FR and $\approx$ 85 days at 10 $\times$ FR. Cumulative losses at day 93 represented around 89% and 53% of the initial S-metolachlor input for 1 $\times$ FR- and 10 $\times$ FR-treated soils, respectively. At day 42, microcosms containing Callisto showed Mesotrione concentration at 1 $\times$ FR to be under the detection limit of the device used for the analyses, in both application methods. For the Callisto at 10 $\times$ FR, Mesotrione concentrations at days 42 and 93 were statistically lower in microcosms where herbicides had been applied alone. Cumulative losses at day 93 represented around 97.5% and 80% of the initial Mesotrione 10 $\times$ FR input for single application and “cocktail” treated soils, respectively. The “cocktail” increased the DT₅₀ of Mesotrione (DT₅₀ of $\approx$ 40 days in “cocktail” against $\approx$ 28 days in alone application).

3.2. Effects on Edaphic Parameters. Among the initial physicochemical soil characteristics, organic matter (OM) concentration was at 29.9 g $\cdot$ kg⁻¹ with a pH value of 6.5 (supplementary data 1).

NH_4^+ concentrations increased during the first 42 days of experimentation (Figure 2). Two days after the treatment, NH_4^+ concentrations were statistically higher in C10 microcosms, compared to T, M1, and M10. The results evolved at day 8 and 42, with statistically higher concentrations of NH_4^+ in DG10, M1, and M10 microcosms, compared to T and C1.

Whatever the treatment or the sampling date, no effect was observed on NO_3^- (average values ranged from 62.3 to 107.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$) and proteins concentrations (average values ranged from 0.67 to 1.33 $\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$) in microcosms (data not shown).

Carbohydrate concentrations stayed quite similar, whatever the treatment and the sampling date (ranging from 2.18 to 2.62 $\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$), except at day 8 where statistical increases of glucose equivalent in DG10, M1, and M10 microcosms were observed, compared to control microcosms (Figure 3).

3.3. Effects on Microbial Biomasses and Activity. A statistical decrease of microbial carbon was observed between day 2 (values ranged from 385 to 449 $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$) and day 93 (values ranged from 319 to 384 $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$) (supplementary data 2). At each sampling date, the total soil microbial carbon value showed no statistical differences between treatments.

The general pattern observed for the SIR experiment was a global increase in CO_2 of 0.015% per hour for all microcosms. No difference was observed between control and treatments, whichever day was considered (data not shown).

The photosynthetic microbial biomass, assessed by measuring photosynthetic pigments, showed no statistical difference between treatments until the 42nd day of experimentation, where total chlorophyll, active chlorophyll *a*, and carotenoid concentrations displayed similar patterns of responses for the different treatments. At day 93 (Figure 4), whereas chlorophyll *a* concentrations in T and C1 microcosms were statistically higher than other treatments, carotenoid concentrations in T microcosms were only statistically higher than the DG10 and M10 microcosms. Active chlorophyll *a* was monitored to give an estimation of active biomass of autotrophic communities and showed statistically less active chlorophyll *a* in C10, M1, and M10 microcosms compared to T. Moreover, in C1 microcosms, active chlorophyll *a* was always higher than other treatments whereas carotenoid was different to DG1, DG10, M1, and M10 microcosms.

3.4. Effects on Microbial Community Structures. The diversity of the results obtained from DGGE gels showed a large band number, with 24 to 53 for bacterial gels and from 34 to 48 for fungal gels. Community structures showed a complex diversity with major bands commonly found in all microcosms and a lot of minor bands. Some communities, therefore, seemed to be stimulated by the presence of herbicides in microcosms with one or both herbicides (supplementary data 3).

At day 2, the bacterial diversity results (Table 2) showed that richness in C10 microcosms was much higher than

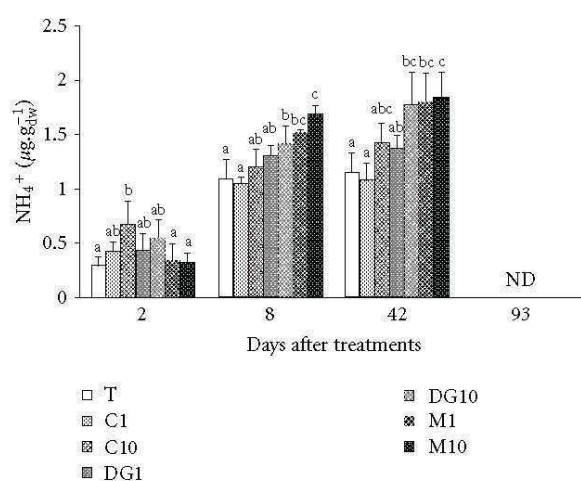


FIGURE 2: Ammonium (NH_4^+) content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$), depending on soil treatments: control (T), Callisto 1 $\times$ FR (C1) and 10 $\times$ FR (C10), Dual Gold 1 $\times$ FR (DG1) and 10 $\times$ FR (DG10), and Callisto/Dual Gold Mix 1 $\times$ FR (M1) and 10 $\times$ FR (M10), and sampling dates. No data was obtained for day 93 (ND). Different letters above the bars (mean $\pm$ standard deviation; $n = 5$) show treatments significantly different for a given sampling date using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test ($P < 0.05$).

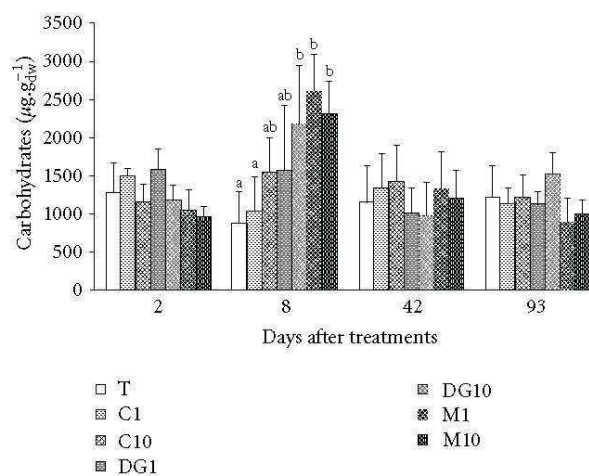


FIGURE 3: Carbohydrate content (glucose equivalent, $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$), depending on soil treatments: control (T), Callisto 1 $\times$ FR (C1) and 10 $\times$ FR (C10), Dual Gold 1 $\times$ FR (DG1) and 10 $\times$ FR (DG10), and Callisto/Dual Gold Mix 1 $\times$ FR (M1) and 10 $\times$ FR (M10), and sampling dates. Different letters above the bars (mean $\pm$ standard deviation; $n = 5$) show treatments significantly different for a given sampling date using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test ($P < 0.05$).

control (T). At the same day, however, the Shannon-Weaver index (H') showed a decrease of overall diversity in C1 microcosms and an increase in C10, DG10, and M1 microcosms. The only differences observed at days 8 and 42 were a decrease of DG1 band numbers. At day 93, C10 and M1 microcosms presented poor richness compared to T microcosms, and in M1 and M10 microcosms the diversity indicator (H') was statistically lower.

TABLE 2: Richness (N) and the Shannon-Weaver (H') index, estimated from DGGE fingerprints of bacterial 16S rDNA and fungal rDNA (ITS) genes, respectively. Comparisons were made between control and treatments for a given sampling date. Bacterial results were reported as means ($\pm$ SEM) ($n = 3$).

Soil treatments	Day 2		Day 8		Day 42		Day 93	
	N	H'	N	H'	N	H'	N	H'
Estimated by analysis of bacterial DGGE fingerprints								
T	32,7 $\pm$ 1,8	2,99 $\pm$ 0,05	38,7 $\pm$ 1,8	3,24 $\pm$ 0,12	47,7 $\pm$ 3,1	3,58 $\pm$ 0,10	38,3 $\pm$ 1,6	3,41 $\pm$ 0,04
C1	31,7 $\pm$ 1,8	2,77 $\pm$ 0,05*	35,3 $\pm$ 2,2	3,21 $\pm$ 0,05	47,3 $\pm$ 4,4	3,60 $\pm$ 0,13	34,0 $\pm$ 2,0	3,31 $\pm$ 0,07
C10	43,0 $\pm$ 2,0**	3,30 $\pm$ 0,09*	33,3 $\pm$ 2,4	3,17 $\pm$ 0,06	42,0 $\pm$ 4,0	3,55 $\pm$ 0,07	34,0 $\pm$ 1,3*	3,33 $\pm$ 0,04
DG1	34,0 $\pm$ 1,3	3,02 $\pm$ 0,03	33,0 $\pm$ 1,3*	3,11 $\pm$ 0,07	38,0 $\pm$ 2,0*	3,37 $\pm$ 0,05	35,0 $\pm$ 1,3	3,35 $\pm$ 0,04
DG10	36,3 $\pm$ 0,4	3,24 $\pm$ 0,03**	30,3 $\pm$ 4,2	2,93 $\pm$ 0,17	41,3 $\pm$ 1,8	3,42 $\pm$ 0,05	32,3 $\pm$ 3,6	3,14 $\pm$ 0,14
M1	33,3 $\pm$ 0,9	3,19 $\pm$ 0,03*	33,0 $\pm$ 3,7	3,02 $\pm$ 0,01	42,7 $\pm$ 4,9	3,47 $\pm$ 0,11	35,0 $\pm$ 0,0*	3,28 $\pm$ 0,02*
M10	31,0 $\pm$ 0,0	3,11 $\pm$ 0,07	32,7 $\pm$ 3,6	2,96 $\pm$ 0,19	48,0 $\pm$ 3,3	3,51 $\pm$ 0,09	35,0 $\pm$ 1,3	3,31 $\pm$ 0,02*
Estimated by analysis of fungal DGGE fingerprints								
T	48	3,55	40	3,29	47	3,54	35	3,27
C1	47	3,49	42	3,41	39	3,39	38	3,46
C10	47	3,42	39	3,33	38	3,34	40	3,51
DG1	47	3,45	35	3,16	42	3,45	36	3,39
DG10	45	3,34	45	3,33	39	3,4	37	3,41
M1	48	3,56	43	3,25	40	3,38	34	3,26
M10	48	3,48	38	3,06	41	3,44	37	3,33

Means followed by *are significantly different ($P \leq 0.05$), and **highly significantly different ($P \leq 0.01$) from control (T) for a given sampling date using the Student's t -test for two samples.

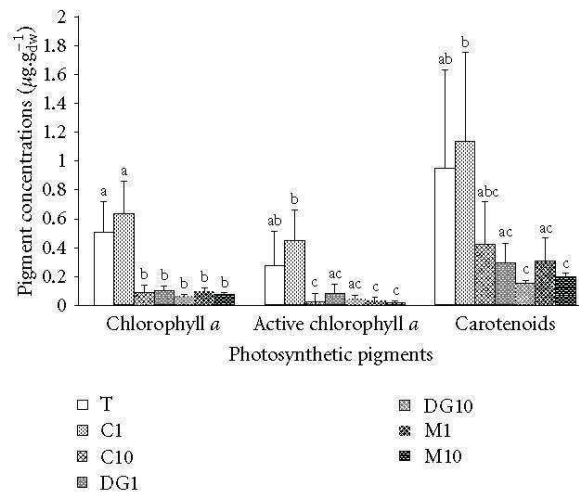


FIGURE 4: Pigment concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$) at day 93, depending on soil treatments: control (T), Callisto 1 $\times$ FR (C1) and 10 $\times$ FR (C10), Dual Gold 1 $\times$ FR (DG1) and 10 $\times$ FR (DG10), and Callisto/Dual Gold Mix 1 $\times$ FR (M1) and 10 $\times$ FR (M10). Different letters above the bars (mean $\pm$ standard deviation; $n = 5$) show treatments significantly different for a given sampling date using one-way ANOVA followed by the Tükey post hoc test ($P < 0.05$).

A global decrease of richness in fungal communities was observed between day 2 and day 93 ($P \leq 0.05$), but there was no change in the H' index.

4. Discussion

This study focused on analysing the unknown effects on soil microbial diversity and activities of a “cocktail” of herbicides

used for maize crops. As far as we know, it is the first study using the Mesotrione+S-metolachlor mixture, despite the fact that these molecules are recommended in many pesticide applications to control undesirable vegetation. The effects recorded may have resulted from the combined impact of herbicides, adjuvants, and degradation products.

4.1. Herbicides Fate in Soil. Despite the fact that nonwater extractable residues have not been quantified in this study, the known Koc values of both herbicides led us to consider that there was little possibility of such formations occurring [26, 27] (Agritox, <http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php/>). Furthermore, as Mesotrione and S-metolachlor have little sensitivity to photodegradation [28] (Agritox, <http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php/>), we can conclude that biodegradation could explain their decreasing concentration in soil microcosms (Figure 1). Moreover, the 35% of maximum WHC represented optimal conditions for microbial growth and allowed a good distribution of herbicides in the soil for biodegradation. Mesotrione decrease was faster than S-metolachlor decrease, which complies with Crouzet et al. [9] DT₅₀ results for Mesotrione, and Ma et al. [29] for S-metolachlor. Mesotrione dissipation was longer when associated with S-metolachlor and its adjuvants at 10 $\times$ FR. This observation has already been noted by other authors who have demonstrated that the combined use of herbicides in a “cocktail” [4, 5], or the association of herbicides and fungicides [30], could increase their persistence in soil. We can subsequently conclude that the S-metolachlor and/or additive compounds (adjuvants) contained in Dual Gold, which were certainly different from those in Callisto, could act on Mesotrione availability by modifying solubility or sorption parameters [31] and/or impact microorganisms

potentially capable of Mesotrione degradation, resulting in herbicide persistence in the soil. Additional compounds, however, may be responsible for the effects observed in the “cocktail” microcosms: for example, alcohol ethoxylates (AEOs) and alkylamine ethoxylates (ANEOS) pesticide adjuvants have demonstrated their toxicity on small eukaryotes and bacteria [32] even at low concentrations.

4.2. How do Microbial Communities Respond to Herbicide Applications? Herbicides were originally designed for their effects on plants. They are, however, potentially capable of directly or indirectly altering soil microbial communities which include organisms sensitive to the parent molecule and/or degradation products [1, 33]. In this study, the pollution pressure, in terms of active ingredients, was found to remain until the end of the experiment for all the treated microcosms, except for C1 (Figure 1).

When applied alone and at the recommended field rate, Callisto (C1) showed no statistical differences compared to the control microcosms, except for a small decrease in bacterial diversity assessed using the Shannon-Weaver index (Table 2). These results are close to those observed by Crouzet et al. [9], who concluded that this herbicide when applied at the recommended field rate, had a nonsignificant impact on soil microbial communities. The soil used in our microcosms was different to that used by Crouzet et al. in terms of percentage of sand and silt and pH values (supplementary data 1). The increase of the porosity (37% of sand against 23% in 2007) could have modified the retention properties of molecules in the soil by increasing the Mesotrione access to microorganisms, thereby ensuring faster degradation and short-term impacts. The results obtained for Dual Gold treatment (DG1) with the same application dose, showed a higher impact on microbial communities, with a decrease of bacterial richness at days 8 and 42, and a decrease of chlorophyll *a* concentrations at day 93. We can conclude, therefore, that these herbicides, when applied at the recommended field rate, acted differently on microbial communities and produced undesired effects. Dual Gold impacted microbial communities longer than Callisto, however; at the end of the experimentation, C1 and DG1 (except for chlorophyll *a* concentration) were similar to T microcosms.

According to the SIR results, microbial communities were equally active in control and treated microcosms throughout the whole experiment. The SIR results showed the same pattern as the one observed in the Zabaloy et al. study [34] for 2,4-D and metsulfuron-methyl at 10 ×FR, but differed from others [9, 35], where pesticide supplementation increased the respiration activity. Currently, no general pattern of microbial responses can be inferred regarding pesticide identity, doses applied, exposure time, soil type, or other environmental factors [36–38]. Moreover, the total microbial biomass and protein concentrations showed no statistical differences between treatments during the experimentation at any given sampling date.

The absence of effects in SIR, microbial carbon, and protein measurements could be explained by the hypoth-

esis submitted by Wardle and Parkinson [39], whereby a microbial community under the effects of herbicides was presumably in a considerable state of flux, with susceptible microbes being killed and others, thereby, having a readily available source of carbon.

With reference to the results concerning carbohydrates (Figure 3), herbicides in “cocktail” microcosms (M1 and M10) at day 8 could produce such an effect by killing microorganisms, such as bacteria and fungi, which would result in a decrease of bacterial richness and diversity (Table 2) and an increase in sugar concentrations. Moreover, increases of labile substrates and organic matter could be used by the resistant population (supplementary data 3) and influence the nitrogen cycle, which would explain the increase in ammonium found in “cocktail” microcosms at days 8 and 42. Similar results were observed with C10 treatments as early as day 2, where a short-term effect on bacterial communities had been noticed, with increases in some populations (Table 2) and ammonium concentrations (Figure 2). This could not be considered, however, as a general effect of pesticides, as underlined by Lo in his review [1], where pesticides produced both increases and decreases in nitrogen activities.

Another explanation for this increase in ammonium concentration could be an inhibition of the nitrification process resulting in a reduced use of ammonium by microbial communities. Notwithstanding the above, herbicide treatments did not modify the amounts of nitrates. This leads us to consider the possibility of small effects made by ammonium shifts, not recorded by our analyses, given the high values of nitrate measured, equivalent to 10^2 to 10^3 superior than ammonium concentrations. Additional data would be necessary, however, to link this increase in ammonium to a specific community. Although it was not one of the objectives of this study, it would be prudent to use specific primers to target those microbial communities involved in the nitrogen cycle to provide data to confirm this hypothesis [40, 41].

At the end of the experimentation, bacterial structure results (Table 2) showed a decrease in microbial diversity for “cocktail” microcosms. This is not linked to microbial abundance results and might be masked by the global effects on microbial communities [39]. It underlined, however, a long-term synergetic effect of the application of “cocktails.”

Another impact is clearly recorded (Figure 4) on the same day, being the colonization of the surface of “cocktails” and C10 microcosms by phototrophic communities. The impact of Callisto on photosynthetic pigments, particularly on the HPPD enzyme, in some phototrophic microbial communities, inhibited the colonization of such communities throughout the experimentation period. The “cocktail” affects total and active chlorophyll *a* in ideal growth conditions [19], primarily because of the duality of the targets covered by the two herbicides for phototrophic communities.

These results underlined the fact that a simple “cocktail” at 1 ×FR can impact the microbial community as much as a single molecule used at 10 ×FR. Furthermore, “cocktail”

results are closer to those obtained for 10 ×FR Dual Gold applications (DG10) than to 10 ×FR Callisto applications (C10).

5. Conclusion

The results obtained in this study clearly showed that when applied alone at the recommended field rate doses, the herbicides Callisto and Dual Gold exert only few consistent minor effects on soil microbial communities. The study confirmed, however, that a “cocktail” of such herbicides applied at 1 ×FR, has an effect on microbial communities also confirmed at 10 ×FR.

The results of this study show the deleterious effect of even low quantities of herbicide “cocktails” on soil microbial communities and must be used with caution despite the supposedly low dangerousness of these new molecules for the environment. Knowing that pesticide “cocktails” of herbicides, fungicides, insecticides, and many other molecules are the current trend in agricultural practices, it is essential that we investigate more precisely their impact with more sensitive methodologies and approaches, and focus on specific microbial communities which ensure key functional steps in biogeochemical cycles. Functional communities involved in N-cycling provide good microbial ecology models to study the role of size and structure of microbial communities on corresponding process rates and ecosystem functions [40, 42]. Moreover, phototrophic communities could be used as bioindicator of pesticide “cocktails” stresses. Any further studies should not underestimate the number of pesticides which can be applied in combinations or “cocktails,” and must focus on specific parameters and specific microbial communities to obtain an overall understanding of their potential impact.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank D. Tottey, English native translator, for the English review of this paper, B. Debote from Crouël INRA (Institut National de la Recherche Agroalimentaire) for providing soil samples, G. Maillot from LPMM (Laboratoire Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire) for technical assistance on carbon measurements, J. Lavedrine from UBP (Université Blaise Pascal) Chemistry Department for technical assistance on nitrate measurements, R. Nouaille from LMGE for technical assistance on the SIR measurements, and S. Fontaine from Crouël INRA for technical assistance on fumigation/extraction experiments.

References

- [1] C. C. Lo, “Effect of pesticides on soil microbial community,” *Journal of Environmental Science and Health—Part B Pesticides*, *Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, vol. 45, no. 5, pp. 348–359, 2010.
- [2] B. C. M. Guimarães, J. B. A. Arends, D. van der Ha, T. van de Wiele, N. Boon, and W. Verstraete, “Microbial services and their management: recent progresses in soil bioremediation technology,” *Applied Soil Ecology*, vol. 46, no. 2, pp. 157–167, 2010.
- [3] G. Mitchell, D. W. Bartlett, T. E. M. Fraser et al., “Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize,” *Pest Management Science*, vol. 57, no. 2, pp. 120–128, 2001.
- [4] K. B. Li, J. T. Cheng, X. F. Wang, Y. Zhou, and W. P. Liu, “Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils,” *Pedosphere*, vol. 18, no. 2, pp. 265–272, 2008.
- [5] M. Tejada, “Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides,” *Chemosphere*, vol. 76, no. 3, pp. 365–373, 2009.
- [6] G. Muyzer, E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden, “Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 3, pp. 695–700, 1993.
- [7] IFEN, “Les pesticides dans l’eau, données 2003 et 2004,” 2006.
- [8] C. D. S. Tomlin, “The e-pesticide manual,” in *Council TBCP*, 12th edition, 2002.
- [9] O. Crouzet, I. Batisson, P. Besse-Hoggan et al., “Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 42, no. 2, pp. 193–202, 2010.
- [10] J. L. Bonnet, F. Bonnemoy, M. Dusser, and J. Bohatier, “Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*,” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 55, no. 4, pp. 576–583, 2008.
- [11] L. A. Burrows and C. A. Edwards, “The use of integrated soil microcosms to predict effects of pesticides on soil ecosystems,” *European Journal of Soil Biology*, vol. 38, no. 3–4, pp. 245–249, 2002.
- [12] M. Dubois, K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “A colorimetric method for the determination of sugars,” *Nature*, vol. 168, no. 4265, p. 167, 1951.
- [13] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [14] E. D. Rhine, G. K. Sims, R. L. Mulvaney, and E. J. Pratt, “Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water,” *Soil Science Society of America Journal*, vol. 62, no. 2, pp. 473–480, 1998.
- [15] M. A. Murcia, A. Vera, R. Ortiz, and F. García-Carmona, “Measurement of ion levels of spinach grown in different fertilizer regimes using ion chromatography,” *Food Chemistry*, vol. 52, no. 2, pp. 161–166, 1995.
- [16] Q. Lin and P. C. Brookes, “Comparison of methods to measure microbial biomass in unamended, ryegrass-amended and fumigated soils,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 28, no. 7, pp. 933–939, 1996.
- [17] N. C. Banning and D. V. Murphy, “Effect of heat-induced disturbance on microbial biomass and activity in forest soil and the relationship between disturbance effects and microbial community structure,” *Applied Soil Ecology*, vol. 40, no. 1, pp. 109–119, 2008.

- [18] E. D. Vance, P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson, "An extraction method for measuring soil microbial biomass C," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 19, no. 6, pp. 703–707, 1987.
- [19] S. Tsujimura, H. Nakahara, and N. Ishida, "Estimation of soil algal biomass in salinized irrigation land: a comparison of culture dilution and chlorophyll a extraction methods," *Journal of Applied Phycology*, vol. 12, no. 1, pp. 1–8, 2000.
- [20] SCOR-UNESCO, *Determination of Photosynthetic Pigments in Sea Waters*, Center UP, New York, NY, USA, 1966.
- [21] H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. H. Wellington, "Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 8, pp. 3233–3241, 1997.
- [22] T. J. White, T. D. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*, Academic Press, New York, NY, USA, 1990.
- [23] O. Hammer, D. A. T. Harper, and P. D. Ryan, *PAST: Palaeontological Statistics Software Package for Education and Data Analyses*, P. Electronica, 2001.
- [24] N. Fromin, J. Hamelin, S. Tarnawski et al., "Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns," *Environmental Microbiology*, vol. 4, no. 11, pp. 634–643, 2002.
- [25] C. E. Shannon and W. Weaver, *The Mathematical Theory of Communication*, University of Illinois Press, Champaign, Ill, USA, 1963.
- [26] J. S. Dyson, S. Beulke, C. D. Brown, and M. C. G. Lane, "Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications," *Journal of Environmental Quality*, vol. 31, no. 2, pp. 613–618, 2002.
- [27] S. M. Novak, J. M. Portal, and M. Schiavon, "Effects of soil type upon metolachlor losses in subsurface drainage," *Chemosphere*, vol. 42, no. 3, pp. 235–244, 2001.
- [28] S. Durand, P. Amato, M. Sancelme, A. M. Delort, B. Combourieu, and P. Besse-Hoggan, "First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 43, no. 2, pp. 222–228, 2006.
- [29] Y. MA, W. P. LIU, and Y. Z. WEN, "Enantioselective degradation of Rac-metolachlor and S-metolachlor in soil," *Pedosphere*, vol. 16, no. 4, pp. 489–494, 2006.
- [30] P. M. White, T. L. Potter, and A. K. Culbreath, "Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics," *Science of the Total Environment*, vol. 408, no. 6, pp. 1393–1402, 2010.
- [31] C. Beigel, M. P. Charnay, and E. Barriuso, "Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 31, no. 4, pp. 525–534, 1999.
- [32] K. A. Krogh, B. Halling-Sørensen, B. B. Mogensen, and K. V. Vejrup, "Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review," *Chemosphere*, vol. 50, no. 7, pp. 871–901, 2003.
- [33] K. Johnsen, C. S. Jacobsen, V. Torsvik, and J. Sørensen, "Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review," *Biology and Fertility of Soils*, vol. 33, no. 6, pp. 443–453, 2001.
- [34] M. C. Zabaloy, J. L. Garland, and M. A. Gómez, "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*, vol. 40, no. 1, pp. 1–12, 2008.
- [35] S. K. Chen, C. A. Edwards, and S. Subler, "A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth," *Applied Soil Ecology*, vol. 18, no. 1, pp. 69–82, 2001.
- [36] Q. Lin and P. C. Brookes, "Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume measurements of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 31, no. 14, pp. 1999–2014, 1999.
- [37] R. Pal, K. Chakrabarti, A. Chakraborty, and A. Chowdhury, "Degradation and effects of pesticides on soil microbiological parameters—a review," *International Journal of Agricultural Research*, vol. 1, pp. 240–258, 2006.
- [38] D. A. Wardle and D. Parkinson, "Relative importance of the effect of 2,4-D, glyphosate, and environmental variables on the soil microbial biomass," *Plant and Soil*, vol. 134, no. 2, pp. 209–219, 1991.
- [39] D. A. Wardle and D. Parkinson, "Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity," *Plant and Soil*, vol. 122, no. 1, pp. 21–28, 1990.
- [40] D. Chèneby, A. Brauman, B. Rabary, and L. Philippot, "Differential responses of nitrate reducer community size, structure, and activity to tillage systems," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 10, pp. 3180–3186, 2009.
- [41] S. Henry, D. Bru, B. Stres, S. Hallet, and L. Philippot, "Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 8, pp. 5181–5189, 2006.
- [42] G. A. Kowalchuk and J. R. Stephen, "Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology," *Annual Review of Microbiology*, vol. 55, pp. 485–529, 2001.

Supplementary data 1. Physicochemical properties of the Limagne basin soil (chernozem soil according to FAO classification), determined using standard protocols of the Arras Soil Analysis Laboratory (INRA, France).

Year	sand (%)	silt (%)	clay (%)	CEC ^a (cmol ⁺ .kg ⁻¹)	pH	OM ^b (g.kg ⁻¹)	C org ^c (g.kg ⁻¹)	N tot ^d (g.kg ⁻¹)	Ratio C/N
2010	37	27	36	24.5	6.5	29.9	17.3	1.56	11.1

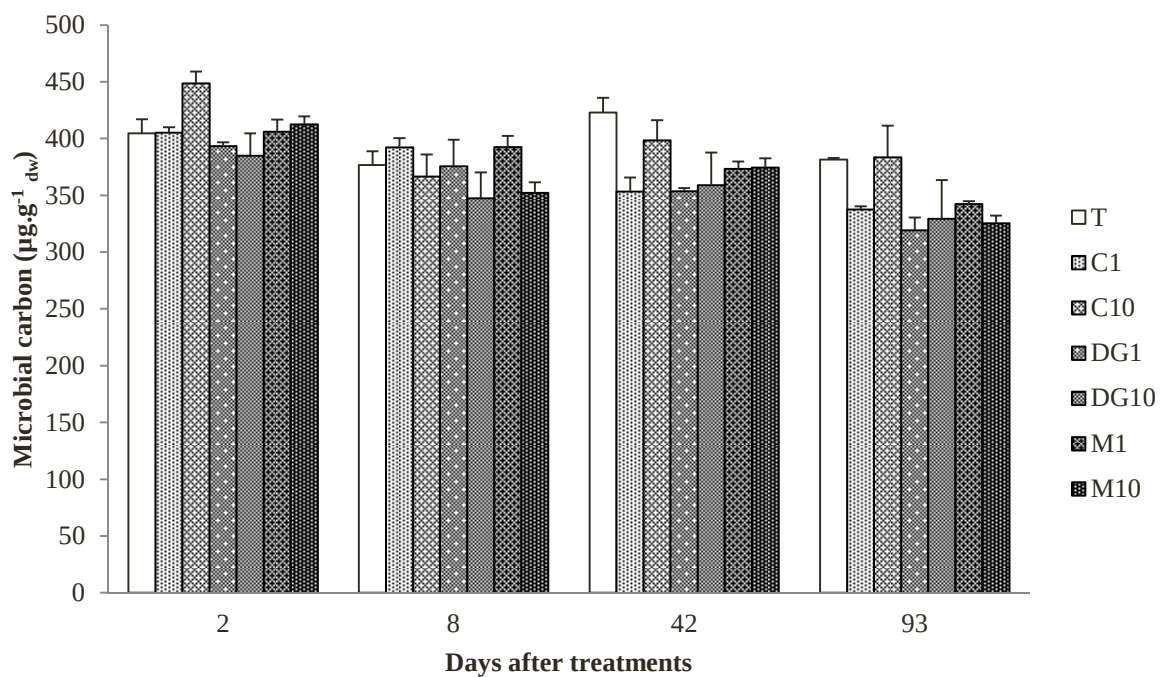
a Cation Exchange Capacity.

b Organic matter.

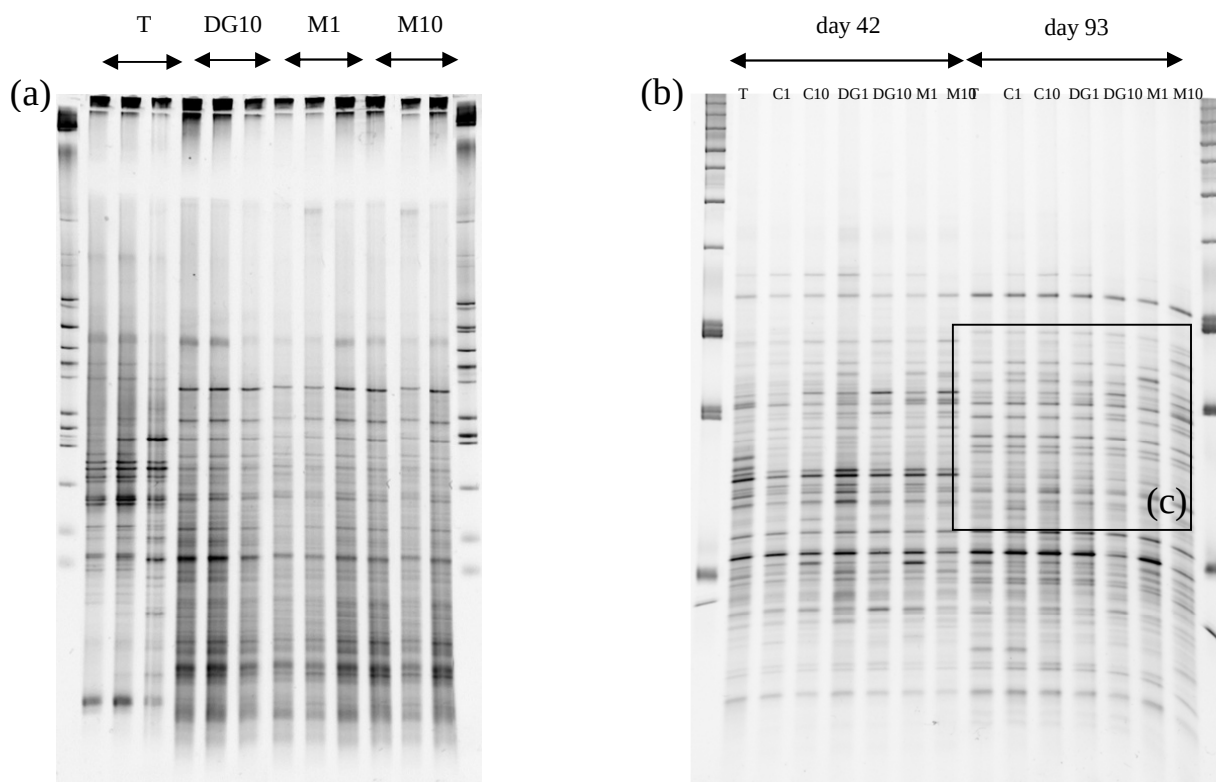
c Organic carbon.

d Total nitrogen

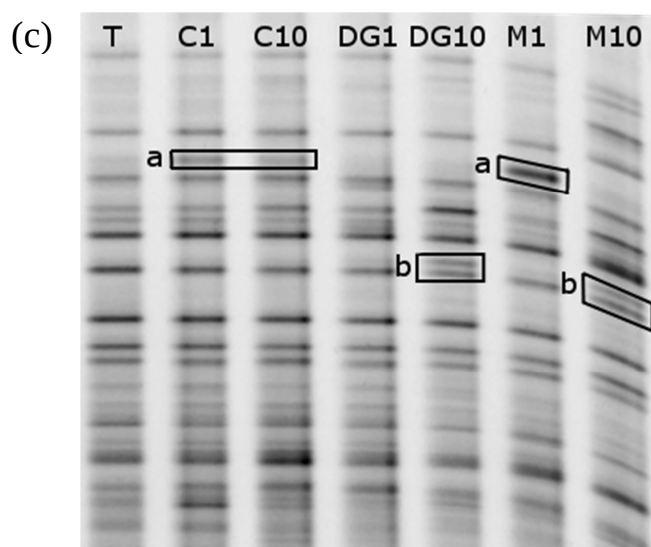
Supplementary data 2. Carbon from soil microbial biomass ($\mu\text{g.g}^{-1}_{\text{dw}}$), according to Lin and Brookes formula, depending on soil treatments: control (T), Callisto® 1×FR (C1) and 10×FR (C10), Dual Gold® 1×FR (DG1) and 10×FR (DG10), and Callisto®/Dual Gold® Mix 1×FR (M1) and 10×FR (M10) and sampling dates.



Supplementary data 3. DGGE gels of (a) bacterial communities (n=3) at 2 days after treatment: control (T), Dual Gold® 10×FR (DG10), and Callisto®/Dual Gold® Mix 1×FR (M1) and 10×FR (M10), and (b) fungal communities at 42 and 93 days after treatment: control (T), Callisto® 1×FR (C1) and 10×FR (C10), Dual Gold® 1×FR (DG1) and 10×FR (DG10), and Callisto®/Dual Gold® Mix 1×FR (M1) and 10×FR (M10).



(c) Scale up of a part of (b) gel at day 93 to show bands stimulated by the presence of herbicides.



CHAPITRE 3 : MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE

L'état de l'art concernant les effets des mélanges de pesticides sur les communautés microbiennes étant loin d'être exhaustif, nous avons basé notre mise en œuvre expérimentale sur ce qui est actuellement réalisé dans les études classiques d'écotoxicologie incluant les relations pesticide/sol. Les résultats de notre étude prospective mettent en avant qu'un mélange d'herbicides formulé, à 1 fois la dose agronomique recommandée, peut avoir des effets sur les communautés microbiennes du sol, sur les teneurs en nutriments (carbohydrates et ammonium), la diversité des communautés bactériennes et l'abondance des communautés phototrophes. De plus, il semble essentiel de continuer les études sur les fonctions clés et les métabolismes sensibles du sol (tel que le cycle de l'azote et les communautés phototrophes), sans mésestimer le nombre de molécules pouvant être appliquées simultanément. Ainsi, nous avons décidé de travailler en adéquation avec ces premières conclusions, en utilisant un mélange encore plus complexe dans le nombre de molécules (et donc plus réaliste), à la dose agronomique recommandée. De plus, nous avons décidé d'élargir notre investigation (en termes d'analyses) afin de caractériser les impacts éventuels au niveau structurel et fonctionnel, sur les communautés microbiennes impliquées dans le cycle de l'azote et les phototrophes.

Table 1 – Détail des caractéristiques pédologiques et physico-chimiques principales du sol de Limagne de cette étude.

% sable	% limon	% argile	Capacité d'échange cationique ($\text{cmol}^+.\text{kg}^{-1}$)	Matière organique (g.kg^{-1})	Carbone organique (g.kg^{-1})	Azote total (g.kg^{-1})	Ratio Carbone/ Azote
8,5	32,8	58,7	34,6	54,9	31,8	2,59	12,2

Concernant le dispositif expérimental, notre choix fut de poursuivre cette étude de nouveau en microcosmes compte tenu des avantages qu'ils apportent (Cf sous-chapitre 1.3.3). En date du 9 Juin 2011, du sol provenant du site atelier du Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) « Eau et agriculture en Limagne » a été prélevé afin de réaliser les expérimentations. La parcelle choisie n'avait pas reçu de traitement pesticide depuis la dernière saison culturale. Le prélèvement a été effectué sur l'horizon de surface (0-10 cm). Les caractéristiques du sol,

déterminées par les protocoles standardisés du laboratoire INRA d'Analyses des Sols d'Arras, sont décrites table 1. L'analyse complète est disponible en **Annexe 1, page 1/3**.

Suivant la classification de la FAO, ces caractéristiques classent ce sol dans la catégorie des sols à « tendance vertic » (vertisol). Des analyses complémentaires (communication personnelle d'Edith Dumas, doctorante à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand) indiquent la présence de quantité importante de carbonate de calcium qui tamponne le pH de ces sols à 8,3 et une forte teneur en argile gonflante de type montmorillonite, qui explique leur capacité à retenir fortement l'eau.

Afin de connaître les résidus de pesticides présents dans le sol, nous avons également fait réaliser l'analyse « SOL-1852 Herbicides » par le Laboratoire INRA d'Analyses des Sols d'Arras. Elle révèle la présence de résidus d'atrazine (2930 ng.kg^{-1}) et de ses métabolites déchlorés, le diethylatrazine (555 ng.kg^{-1}) et le di-isopropyl-atrazine (225 ng.kg^{-1}). Un dernier membre de la famille des « triazines » est présent à plus de 100 ng.kg^{-1} , la simazine (108 ng.kg^{-1}). D'autres substances ont également été détectées à des valeurs inférieures à 100 ng.kg^{-1} (**Annexe 1, pages 2/3 et 3/3**).

L'atrazine et la simazine sont interdites en France depuis 2003. Cependant, les analyses révèlent leur présence ainsi que celle de leurs métabolites secondaires, 8 ans après leur interdiction. Les molécules herbicides utilisées dans cette étude (S-métolachlore, bénomex, méso-trione et nicosulfuron), n'ont quant à elles pas été détectées par nos propres mesures (méthode décrite **Chapitre 5**).

SOUS-CHAPITRE 3.1 : MISE EN PLACE DES MICROCOSMES

1.1 - Choix des molécules

Le choix des molécules herbicides s'est fait suivant plusieurs critères, afin de se rapprocher aux plus de conditions réelles d'épandage. Le premier passe par l'étude des recommandations des fournisseurs de produits phytosanitaires et de la législation afin de choisir un mélange plausible de molécules, pouvant répondre à des nécessités agricoles. Toutes ces réflexions sont détaillées en introduction du Sous-Chapitre 1.4. Le second a été de discuter des différents mélanges potentiels, sur un forum agricole¹¹ avec plusieurs membres du site

¹¹ <http://www.agri-convivial.com/>

(principalement des agriculteurs), pour savoir si le choix des molécules et les temps à respecter entre chaque traitement correspondaient à des réalités d'épandage. Le choix d'appliquer tout d'abord le S-métolachlore puis la mésotrione et le nicosulfuron a été validé par les différents membres. Le seul point qui diffère légèrement des pratiques agricoles par rapport à notre choix d'utiliser les formulations commerciales de chaque ingrédient actif séparément (Dual Gold Safeneur[®] pour le S-métolachlore, Callisto[®] pour la mésotrione et Milagro[®] pour le nicosulfuron), est que les utilisateurs de produits phytosanitaires auraient privilégié l'emploi d'une formulation commerciale regroupant les deux herbicides de post-levée (type Elumis[®], mélange de mésotrione et de nicosulfuron), pour des questions évidentes de coût et de commodité d'utilisation. Cependant, le but de notre étude étant également de dissocier d'éventuels effets individuels des molécules formulées, nous avons choisi d'utiliser uniquement des formulations ne comprenant qu'un seul herbicide en qualité de molécule active (Figure 19).

 DualGold[®] Safeneur	 Callisto[®]	 Milagro[®]
• Composition : 915 g/l S-métolachlore + 45 g/l bénomaxacor • Formulation : EC Concentré émulsionnable • Classement : Xi Irritant, N-Dangereux pour l'environnement • Phrases de risque : R43, R50/53 • DAR : Maïs = 90 jours Maïs doux = 60 jours • ZNT : 5 mètres (organismes aquatiques) • DRE : 48 heures	• Composition : mésotrione 100 g/l • Formulation : SC Suspension concentrée • Classement : Xi-Irritant, N-Dangereux pour l'environnement. • Phrases de risque : R36, R50/53 • DAR : maïs grains et maïs fourrage = 60 jours maïs doux = 42 jours • ZNT : 5 mètres • DRE : 24 heures	• Composition : nicosulfuron 40 g/l. • Formulation : SC suspension concentrée de type huileux. • Classement : Xi-Irritant, N-Dangereux pour l'environnement. • Phrases de risque : R38, R50/53 • DAR : non fixé. • ZNT : organismes aquatiques : 5 mètres (Maïs). • DRE : 24 heures.
DAR : Délai Avant Récolte ZNT : Zone Non Traitée DRE : Délai de Ré-Entrée sur la parcelle R36 : Irritant pour les yeux / R38 : Irritant pour la peau / R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau R50/53 : Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique		

Figure 19 – Détail des différentes formulations commerciales employées dans cette étude (adapté des données Syngenta).

1.2 - Test de chimie de surface

Compte tenu de la quantité prévue de microcosmes à réaliser pour cette expérimentation (310) et dans un souci d'optimisation de la place nécessaire (régissant également le contrôle de l'homogénéité des facteurs abiotiques), nous avons décidé de modifier les microcosmes par

rapport à ceux de l'étude prospective (Figure 18). Nous nous sommes orientés vers un choix de microcosmes rectangulaires (Figure 20).



Figure 20 – Microcosme rectangulaire en polystyrène cristal de dimensions 90x60x50 mm (LxPxH)

Notre choix de travailler avec ces boîtes rectangulaires en polystyrène cristal (PS) permet de répartir notre matrice sur une colonne de sol de 50 mm, tout en ayant assez de matériel pour réaliser nos expérimentations. Avant de confirmer le choix du PS comme matériau à utiliser pour les microcosmes, nous avons vérifié l'absence d'interactions entre les molécules herbicides et la chimie de surface du PS.

Nous sommes partis sur la base d'une solution d'herbicides à une fois la dose agronomique recommandée, utilisable pour traiter 1 kg de sol sec. En se basant sur les quantités de molécules déterminées lors de la réalisation de notre étude prospective (Cf. **Chapitre 2**), nous avons préparé 100 mL d'une solution mélange de Dual Gold Safeneur[®], Callisto[®] et Milagro[®], contenant au final 0,45 mg de mésotrione, 5,4 mg de S-métolachlore et 0,17 mg de nicosulfuron. Cette solution a été mise dans un microcosme PS, puis conservée à une température de 20°C, au noir, pendant trois semaines.

Trois prélèvements, un initial permettant de contrôler les concentrations des molécules apportées par le mélange, puis deux autres, après une et trois semaines, nous ont permis de contrôler d'éventuels phénomènes de sorption des molécules sur les parois du microcosme. Les concentrations en herbicides restant inchangées durant toute la durée de ce pré-test, nous avons validé le choix de ces boîtes en PS pour la réalisation de nos microcosmes.

1.3 - Traitement du sol

1.3.1 – Préparation et acclimatation

Le sol prélevé a été tamisé à 5 mm au laboratoire afin d'homogénéiser sa structure (suppression de particules type cailloux, débris végétaux, supérieurs à 5 mm), tout en gardant une certaine hétérogénéité. Le sol a ensuite été disposé dans un bac (1500x500 mm) en polyvinyl chloride (PVC). Un contrôle de la capacité de rétention en eau, la « Water Holding

Capacity » (WHC), a été effectué, permettant ainsi d'ajuster cette dernière à 50% pour la totalité du bac.

Le sol ainsi préparé a été réparti dans 310 microcosmes PS à raison de 140 g de sol humide par microcosme, puis disposés dans une enceinte de 150 mm de hauteur, recouverte de film plastique poreux, permettant les échanges gazeux avec l'air extérieur, tout en limitant la déshydratation. Une période de deux semaines d'acclimatation a été respectée, avec un contrôle de l'humidité et un réajustement hebdomadaire des microcosmes à 50% de WHC.

1.3.2 – Epannage des herbicides

Les microcosmes ont été soumis aux différentes formulations commerciales d'herbicides choisies, à une fois la dose agronomique recommandée et employées seules ou en mélanges (de 2 ou 3 formulations).

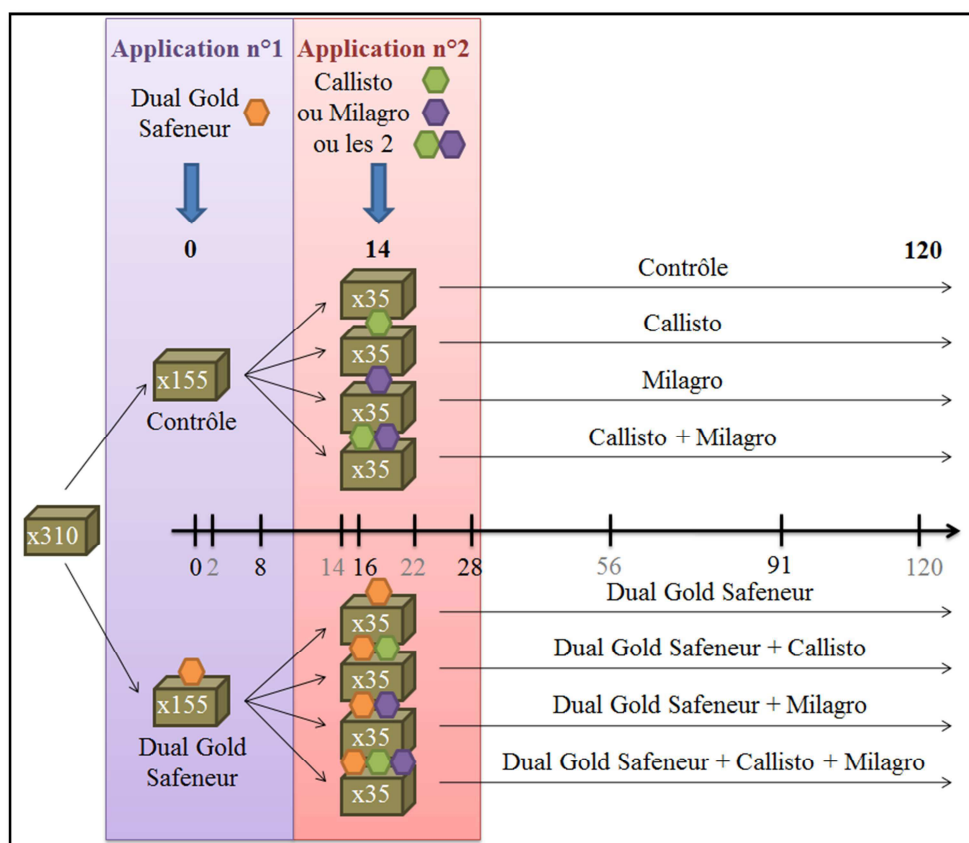


Figure 21 – Planning d'application des formulations commerciales herbicides, distinction des huit conditions de traitement (0, 1, 2 et 3 molécules) et des temps de prélèvement.

Dans l'objectif de respecter un planning agricole d'épandage, à savoir que le Dual Gold Safeneur® est employé préférentiellement en pré-émergence du maïs, alors que le Callisto® et

le Milagro[®] sont employés préférentiellement en post-émergence du maïs (stade 2-4 feuilles), nous avons distingué 2 périodes d'application des herbicides (Figure 21) afin de reproduire cette pollution séquentielle.

A l'issue de la période de deux semaines d'acclimatation, la moitié des microcosmes a été traitée au Dual Gold Safeneur[®], lors de l'application n°1. Ce premier traitement définit le premier temps d'expérimentation (jour 0). Une seconde application (application n°2), des formulations Callisto[®] et Milagro[®] a été effectuée au jour 14, afin de disposer de microcosmes traités par aucune, 1, 2, ou 3 formulations commerciales (Figure 21).

Contrairement à l'étude prospective, l'application des formulations commerciales n'a pas été effectuée en mélangeant ces dernières avec le sol, mais par traitement de surface. Ces applications ont été réalisées à l'aide d'aérographes, outils permettant de reproduire l'épandage aérien par rampe de traitement équipée de buses, employé en agriculture (Figure 22).



Figure 22 - Aérographe type TG-470 (buse de 0,3 mm de diamètre et réservoir gravitaire d'une capacité de 7 cc, Fraulein 3°8) utilisé pour cette étude.

Les calculs pour déterminer la quantité de formulation commerciale à épandre sur chaque microcosme ont été effectués en se basant sur les quantités maximales, applicables à l'hectare, pour chaque formulation. Ce choix permet de se situer dans la limite haute rencontrée pour l'application de chaque molécule, tout en étant en accord avec les limites fixées par la législation. La réalité environnementale veut que les quantités appliquées lors de mélanges soient réduites par rapport à ces limites, cependant elles varieront d'un sol à l'autre, en fonction de la richesse du sol en matière organique et des nécessités de traitement (type et quantité d'adventices à traiter). **Ainsi nous définissons dans ces travaux la dose agronomique recommandée, comme la dose maximale d'application de chaque formulation commerciale, autorisée par la législation.** Les doses maximales par hectare et les équivalents en quantités d'ingrédient actif sont décrits **Table 2**.

Table 2 – Quantités maximales d'ingrédient actif épandues par hectare.

Formulation commerciale (f.c.)	Ingrédient actif (i.a.)	i.a. par litre de f.c. (g)	Dose maximale (L/ha)	i.a. par hectare (g)
Dual Gold Safeneur [®]	S-métolachlore	915	2,1	1921.5
	benoxacor	45		94.5
Callisto [®]	mésotrione	100	1,5	150
Milagro [®]	nicosulfuron	40	1,5	60

La table 2 renseigne sur la quantité d'herbicide à appliquer pour 1 hectare. Les microcosmes ayant une surface de 5400 mm², les calculs suivants permettent d'établir les quantités à utiliser par microcosme :

- Dual Gold Safeneur[®] : 2,1 L pour 1 hectare, soit 1,134 µL pour 1 microcosme. Cette quantité représente l'équivalent de 1,038 mg de S-métolachlore et 51 µg de benoxacor.
- Callisto[®] : 1,5 L pour 1 hectare, soit 0,81 µL pour 1 microcosme. Cette quantité représente l'équivalent de 81 µg de mésotrione.
- Milagro[®] : 1,5 L pour 1 hectare, soit 0,81 µL pour 1 microcosme. Cette quantité représente l'équivalent de 32,4 µg de nicosulfuron.

Lors de l'épandage, des solutions au 10^{ème} des différentes formulations commerciales ont été réalisées pour plus de commodité dans les prélèvements (soit 11,34 µL pour le Dual Gold Safeneur[®] et 8,1 µL le Callisto[®] et le Milagro[®]). Les herbicides ont été dilués dans la quantité d'eau nécessaire pour ajuster chaque microcosme à 50% de WHC et épandus par écoulement total du volume à l'aide d'aéroglyphes.

L'expérimentation a été réalisée durant 120 jours avec les constantes suivantes : température à 20°C ± 2°C, cycle jour/nuit (14/10), WHC à 50%. Les prélèvements ont été effectués à 0, 2, 8, 14, 16, 22, 28, 56, 91 et 120 jours, avec pour chaque condition un « sacrifice » de 5 microcosmes, prélevés de façon aléatoire, pour les analyses (Figure 21).

SOUS-CHAPITRE 3.2 : PARAMETRES SUIVIS ET PRESENTATION DES RESULTATS

Les chapitres de la **Partie II** sont illustrés par la Figure 23.

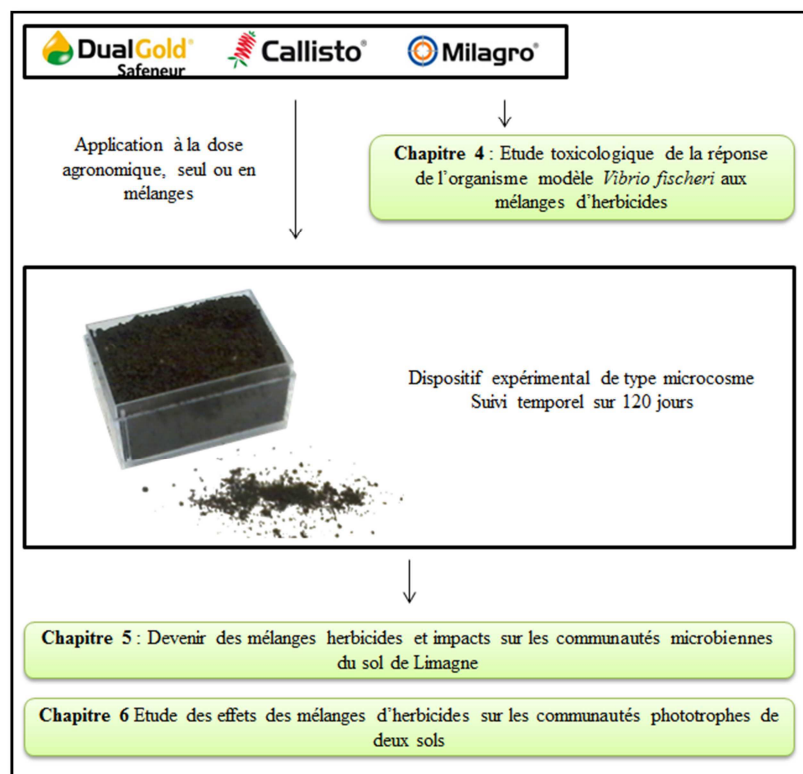


Figure 23 – Présentation des chapitres de la Partie II, suivant les stratégies expérimentales suivies.

L'un des objectifs de cette thèse était d'analyser la toxicité des molécules seules et en mélange pour mettre en évidence d'éventuels effets synergiques ou antagonistes des molécules. Le **Chapitre 4**, présente donc une étude de toxicologie des molécules herbicides et de leurs formulations commerciales par une approche de type bioessais sur un organisme modèle : la bactérie *Vibrio fischeri* (Microtox®).

Les **Chapitres 5 et 6** concernent l'approche microcosmes. Le **Chapitre 5** s'intéresse aux effets sur les communautés microbiennes du sol de Limagne, de mélanges d'herbicides formulés, appliqués à la dose agronomique et suivant un planning agricole réaliste. Les différentes mesures décrivent à la fois le devenir des molécules et les changements en termes de biomasse (technique de fumigation-extraction, suivie d'une extraction en solution et d'un dosage en analyseur TOC (Total Organic Carbon), le tout suivi d'une comparaison d'échantillons fumigés et non-fumigés) ou d'abondance (qPCR), de structure (technique de PCR-DGGE) et d'activités des communautés bactériennes, fongiques et celles impliquées

dans le cycle biogéochimique de l'azote. L'abondance des communautés impliquées dans les processus de nitrification (*amoA* – AOA et AOB) et de dénitrification (*nirK* et *nirS*) a été estimée par suivi des gènes en PCR quantitative. L'activité respiratoire potentielle a été suivie par la technique de SIR (Substrate Induced Respiration). Les activités hydrolytiques de la β -D-glucosidase (β GLU; EC: 3.2.1.21), de N-acétyl- β -glucosaminidase (NAG; EC: 3.2.1.30) et de l'uréase (URE; EC: 3.5.1.5) ont été suivies par méthodes colorimétriques en microplaques. L'activité de nitrification potentielle (NEA) a été mesurée suivant la norme standardisée ISO 15685: 2004.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un projet EC2CO (ECosphere COntinentale et COtière), initiative structurante coordonnée par le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et l'INSU (Institut National des Sciences de l'Univers). A travers la thématique ECODYN (Ecotoxicologie, Ecodynamique des contaminants) du programme EC2CO, j'ai participé au projet **Devenir et impacts d'un « cocktail » d'herbicides sur des groupes fonctionnels microbiens : élaboration de bioindicateurs de perturbation (DevImCocMic)**. L'un des points clefs de ce projet réside dans la comparaison des effets des molécules sur les communautés microbiennes de différents sols (en termes de caractéristiques physicochimiques et donc de propriétés de transfert des molécules, **Cf Sous-chapitre 1.2**).

C'est pourquoi, le **Chapitre 6** qui s'intéresse aux effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de surface ne se focalise pas uniquement sur les résultats du sol de Limagne. Début 2013, nous avons initié les travaux sur un deuxième sol (luvisol en provenance de Versailles) en réalisant exactement les mêmes expérimentations que celle décrites précédemment pour le sol de Limagne. L'abondance des communautés phototrophes a été estimée par extraction pigmentaire et dosage par HPLC, suivie d'une identification et d'une quantification des pigments majoritaires. Ce chapitre présente donc une comparaison des effets obtenus entre les deux sols.



PARTIE II

CHAPITRE 4 : ETUDE TOXICOLOGIQUE DE LA REPONSE DE L'ORGANISME MODELE *VIBRIO FISHERI* AUX MELANGES D'HERBICIDES DE CETTE ETUDE

Disposant au laboratoire d'un dispositif de type Microtox[®] (Figure 24) nous avons décidé de mettre en place une expérimentation visant à caractériser la toxicité des herbicides choisis, mais également des différents mélanges, sur l'organisme modèle procaryote *Vibrio fischeri*. Cette approche repose sur la diminution de la bioluminescence naturelle de *Vibrio fischeri* en présence d'agents perturbateurs, permettant ainsi d'établir les valeurs de Concentration Inhibitrice provoquant x% de diminution de luminescence (CI_x). On détermine ainsi classiquement la CI₅₀ de molécules, concentration provoquant une diminution de 50% de la luminescence bactérienne.

L'originalité de cette approche repose sur plusieurs points :

- La comparaison de toxicité entre les molécules herbicides pures (S-métolachlore et bénomexor, mésotrione et nicosulfuron) et leurs formulations commerciales (Dual Gold Safeneur[®], Callisto[®] et Milagro[®]).
- Le mélange des différentes molécules en respectant les ratios rencontrés lors de mélanges pour le traitement des cultures de maïs.
- La comparaison des valeurs de CI₅₀ obtenues pour les mélanges, avec les modèles théorique de prédictions de toxicité : de Concentration Addition (CA) et d'Independent Action (IA).



Figure 24 – Microtox M 500 toxicity analyzer utilisé pour la réalisation des tests de toxicité sur *Vibrio fischeri* dans cette étude (Photographie personnelle).

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue **Chemosphere**, en 2013.



Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox[®] test



Pierre Joly^{*,1}, Frédérique Bonnemoy¹, Jean-Christophe Charvy, Jacques Bohatier, Clarisse Mallet

Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, F-63000 Clermont Ferrand, France
CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63177 Aubière, France

HIGHLIGHTS

- Realistic maize herbicides mixtures were tested with Microtox[®] test.
- Formulated compounds are more toxic than active ingredients.
- High toxicity toward *Vibrio fischeri* occurs for recommended agricultural mixtures.
- A study to assess the use of chemicals as preconized by the REACH regulation.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2012
Received in revised form 26 August 2013
Accepted 30 August 2013
Available online 26 September 2013

Keywords:

Herbicides mixtures
Microtox[®]
Toxicological study
Formulated compounds

ABSTRACT

The Microtox[®] test, using the prokaryote *Vibrio fischeri*, was employed to assess the toxicity of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their formulated compounds: Dual Gold Safeneur[®], Callisto[®] and Milagro[®]; alone and in mixtures. For each compound we obtained original IC₅₀ values, with consistent higher toxicities for formulated compounds compared to active ingredients alone. Mixtures of the four herbicides, prepared according to application doses encountered in agriculture, were found to be toxic at a lower concentration than single molecules. Mesotrione and nicosulfuron mixture appeared to be highly toxic to *V. fischeri*, however, this recommended post-emergence combination for maize crops got its toxicity decreased in formulated compound mixtures, suggesting that chemical interactions could potentially reduce the toxicity. Data comparisons to theoretical models showed a good prediction of mixture toxicity by Concentration Addition concept. Results seemed to exclude any synergistic effects on *V. fischeri* for the tested herbicide mixtures. Additional work coupling these bioassay data to ecosystemic level studies (aquatic and soil compartments) and data on additives and degradation products toxicity, will help to fill the gap in our knowledge of the environmental impact of these xenobiotics and in the choice of a more sustainable use of pesticides.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chemical risk assessment remains one of the major challenges to answer the problem raised by agriculture and especially intensive production. Herbicides are used in large amounts in agriculture but also in urban and domestic applications, and represent potential pollutants which need to be investigated. In 2011 in France, 62 700 tons of pesticides were sold, including a major part of herbicides.² These compounds are now well described, and some

of them have the capacity to pollute aquatic ecosystems after their application and also lead to potential non-target effects (DeLorenzo et al., 2001; Fleege et al., 2003).

To screen the potential toxicity of xenobiotics in aquatic ecosystems, different biotests have been developed. Among them, Microtox[®] is an *in vitro* test system which uses the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* for the detection of pure chemicals, mixtures or natural samples toxicity (Bond and Martin, 2005). Therefore, significant interspecies correlations have been obtained for some classes of substances, between bacteria test data with *V. fischeri* and bioassay data for other organisms (Kaiser, 1998).

In 2003, atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-iso-propylamino-1,3,5-triazine), was banned due to its high toxicity on numerous organisms (Graymore et al., 2001) and also its persistence and its transfer capacities in environment. To replace atrazine, new

* Corresponding author. Address: Université Blaise Pascal, Les Cézeaux, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France. Tel.: +33 4 73 40 74 53; fax: +33 4 73 40 76 70.

E-mail address: pierre.joly@univ-bpclermont.fr (P. Joly).

¹ These authors contributed equally to this work.

² <http://www.epp.eurostat.ec.europa.eu>

selective herbicides have been developed and applied in mixtures in maize crops. In France, mesotrione, one of these recent selective herbicides, is often use in combination with S-metolachlor, benoxacor and nicosulfuron, to ensure maize crops yields. These molecules belong to different families and differ in their herbicidal mode of action (Table 1).

S-metolachlor is the active enantiomere of the metolachlor molecule, banned in 2003 in France. It is one of the best-selling herbicides for maize crops. It was developed by Ciba-Geigy (metolachlor) and marketed under the name Dual Gold® (Syngenta Agro S.A.S.). However, this first commercial product is not sold, neither authorized, in France.³ S-metolachlor is now use in combination with a phytoprotector molecule named benoxacor and sold by Syngenta Agro S.A.S. under the marketed product Dual Gold Safeneur®.

Mesotrione is a selective pre- and post-emergence herbicide, which controls the growth of most broadleaf and some weed grass in maize crops. It was developed by Syngenta Agro S.A.S., marketed under the commercial name Callisto®. Increased toxicity of the commercial formulation compared to the single mesotrione molecule has already been found in *V. fisheri* bioassay (Bonnet et al., 2008). The metabolite 4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid (MNBA) and the 2-amino-4-methylsulfonyl-benzoic acid (AMBA), two degradation products of mesotrione, are found with the parent molecule in soil and water, and AMBA was found to be more toxic than the parent molecule to *V. fisheri* (Bonnet et al., 2008). Other metabolites have been described but no complete pathway for the total dissipation of mesotrione has been identified so far (Batisson et al., 2009; Durand et al., 2010).

Nicosulfuron has been developed by ISK Bioscience Corporation and is used as a selective post-emergence control herbicide in maize of annual grass, broad-leaved and perennial weeds. Nicosulfuron is marketed by Syngenta Agro S.A.S. under the commercial name Milagro®. Its toxicity has already been evaluated using freshwater microalgae (Leboulanger et al., 2001), but so far there is no toxicity data available on Milagro® toxicity to *V. fisheri*.

These four herbicides are classified by the GHS hazard statement as very toxic to aquatic life (H400) and very toxic to aquatic life with long lasting effects (H410) in the environmental hazards index. Extensive studies on separate compounds and mixture of such chemicals are a priority, as underlined by the REACH regulation, which addresses production and use of chemicals in the EU (The REACH baseline study: A tool to monitor the new EU policy on chemicals – REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals), 2009).

Despite the fact that numerous studies have been done on separate herbicide compounds in bioassays (Osano et al., 2002), or in environmental compartments (Lo, 2010), the current trend in agriculture is the use of herbicide mixtures, raising therefore the need to assess their toxicity. S-metolachlor is mainly used as a pre-emergence herbicide on maize and its action is often completed by post-emergence herbicides like mesotrione and nicosulfuron. By choosing these herbicides, we reproduced realistic conditions in terms of mixture ratios and application rates encountered in agriculture.

The aim of this study was to consider *V. fisheri*, used in the Microtox® test, as a model of a non-target environmental prokaryote, (i) to determine the potential toxicity of S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, alone and in mixture; (ii) to determine the toxicity of the commercial herbicidal products Dual Gold Safeneur®, Callisto® and Milagro® (active ingredient formulated with various additives); and (iii) to measure the toxicity of a realistic mixture of these formulated compounds on this

Table 1
General data on herbicides used in this study.

Active ingredient	Family	IUPAC name	Mode of action	Commercial formulation (Syngenta®)	References
S-metolachlor	Chloroacetanilide	(S)-2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(1-methoxypropan-2-yl)acetamide	Inhibits the very long chain fatty acid (VLCFA) formation, which interferes with normal cell development and inhibits both cell division and cell enlargement	Dual Gold Safeneur®	http://www.plantprotection.org/hrac/
Benoxacor	Dichloroacetamide	(RS)-4-dichloroacetyl-3,4-dihydro-3-methyl-2H-1,4-benzoxazine	Increases the glutathione S-transferase activity in maize crops, in order to protect the plant from potential injuries caused by S-metolachlor	Dual Gold Safeneur® (915 g L ⁻¹ S-metolachlor; 45 g L ⁻¹ benoxacor)	Fuerst et al., 1993, Abu-Qare and Duncan, 2002
Mesotrione	Triketone	2-[4-(Methylsulfonyl)-2-nitrobenzoyl]cyclohexane-1,3-dione	Inhibits a critical enzyme, p-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase (HPPD), in carotenoid biosynthesis	Callisto® (100 g L ⁻¹ mesotrione)	Mitchell et al., 2001
Nicosulfuron	Sulfonyleurea	2-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl]-N,N-dimethylpyridine-3-carboxamide	Prevents synthesis of isoleucine, leucine, and valine by inhibition of acetolactate synthase (ALS), which results in cessation of cell division and plant growth	Milagro® (40 g L ⁻¹ nicosulfuron)	http://www.iskbc.com/

³ <http://www.e-phy.agriculture.gouv.fr/>

Table 2
Syngenta® data of active ingredient and maximum dose applications.

Formulated compound (f.c.)	Active ingredient (a.i.)	a.i. per liter of f.c. (g)	Maximum doses (L ha ⁻¹)	a.i. per hectare (g)
Dual Gold Safeneur®	S-metolachlor	915	2.1	1921.5
	Benoxacor	45		94.5
Callisto®	Mesotrione	100	1.5	150
Milagro®	Nicosulfuron	40	1.5	60

microorganism and to compare it to theoretical toxicity models values, in order to evaluate potential synergistic toxic effects.

2. Materials and methods

2.1. Chemical compounds

S-metolachlor (33859; Pestanal; purity, 98.4%), benoxacor (46001; Pestanal; purity, 99.0%), mesotrione (33855; Pestanal; purity, 99.9%), and nicosulfuron (34210; Pestanal; purity, 99.8%) were purchased from Fluka Riedel-de-Haën (Buchs, SG, Switzerland). The commercial products Dual Gold Safeneur® (concentrated suspension containing 915 g of S-metolachlor and 45 g of benoxacor per liter), Callisto® (concentrated suspension containing 100 g of mesotrione per liter) and Milagro® (concentrated suspension containing 40 g of nicosulfuron per liter) were manufactured by Syngenta Crop Protection (Table 2). They were obtained from a regular agricultural supplier.

2.2. Mixtures ratios

Mixtures of formulated compounds were realized according to Syngenta recommendations for the maximum dose of application in maize cultures (Table 2). Ratios of active ingredients were kept

(Table 3) for both active ingredients and formulated compound mixtures. By doing so, measured IC₅₀ values (X mg L⁻¹) in Section 3 (see below), correspond to the sum of the relative part of each active ingredient contained in the mixture ($x_1 + \dots + x_n$ mg L⁻¹). Tested concentrations of the active ingredients were prepared by dilutions of stock solutions, with a final amount in DMSO of less than 0.5% (v/v), which has no effect on *V. fischeri* (Bogaerts et al., 2001). The commercial products were diluted with distilled water.

2.3. Microtox® assays

The *V. fischeri* bioluminescence inhibition observed in the presence of xenobiotic was measured after three exposure times (5, 15, and 30 min). All the materials for analysis (test reagent, diluents, osmotic adjusting solution, and reconstitution solution) were supplied by Azur Environmental (Carlsbad, CA, USA). For each compound, four independent experiments were performed according to the normalized procedure with a Microbics M 500 toxicity analyzer coupled to a PC using 500 DOS software for Microtox® (AZUR-Environmental, 1996). The aim of this test was to determine the median inhibitory concentration (IC₅₀), which is the concentration required to induce a 50% decrease in bioluminescence compared with the untreated bacteria after 5, 15 and 30 min.

2.4. Mixture toxicity models

Well described models of Concentration Addition (CA) and Independent Action (IA) were used to predict expected toxicity values of the different mixtures (Berenbaum, 1985).

CA, the model presented as a general solution for mixture toxicity analysis, is expressed mathematically as

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1$$

where n is the number of mixture components, ECx_i is the concentration of the i th mixture component that provokes $x\%$ effect when

Table 3
Ratios of each active ingredient (in percentage of total active ingredients) in formulated compounds and related active ingredient mixtures.

	S-metolachlor (%)	Benoxacor (%)	Mesotrione (%)	Nicosulfuron (%)
Dual Gold Safeneur®	95.31	4.69		
Dual Gold Safeneur® + Callisto®	88.71	4.36	6.93	
Dual Gold Safeneur® + Milagro®	92.56	4.55		2.89
Dual Gold Safeneur® + Callisto® + Milagro®	86.32	4.25	6.74	2.69
Callisto® + Milagro®			71.43	28.57

Table 4
Toxicity values of the different chemicals towards *V. fischeri*.

Active ingredients	Microtox® 15 min IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	Formulated compounds
Atrazine	196.7 ± 28.5 ^a	
S-metolachlor	178.4 ± 22.8	
Benoxacor	93.3 ± 7.3	
S-metolachlor + benoxacor	174.5 ± 20.1	20.5 ± 2.0
Mesotrione	43.6 ± 2.4 ^b	1.1 ± 0.1 ^b
Nicosulfuron	167.8 ± 21.8	4.1 ± 0.7
S-metolachlor + benoxacor + mesotrione	157.9 ± 32.2	10.4 ± 1.4
S-metolachlor + benoxacor + nicosulfuron	202.7 ± 20.3	22.1 ± 3.9
S-metolachlor + benoxacor + mesotrione + nicosulfuron	119.8 ± 24.9	14.1 ± 3.7
Mesotrione + nicosulfuron	61.4 ± 10.6	4.8 ± 1.2
		Dual Gold Safeneur®
		Callisto®
		Milagro®
		Dual Gold Safeneur® + Callisto®
		Dual Gold Safeneur® + Milagro®
		Dual Gold Safeneur® + Callisto® + Milagro®
		Callisto® + Milagro®

IC₅₀ = Inhibitory Concentration 50%.

^a Bogaerts et al. (2001).

^b Bonnet et al. (2008).

applied singly and c_i is the concentration of the respective component in the mixture. If at a total concentration of the mixture provoking $x\%$ effect, the sum of toxic units equals one, concentration addition holds. For that reason, the sum of toxic units has been frequently used as a measure for comparing the observed toxicity with the predictions made by concentration addition.

IA, the model based on the assumption that the compounds of a given mixture act independently in a statistical sense, is expressed mathematically as

$$E(c_{Mix}) = E(c_1 + \dots + c_N) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$

where $E(c_{Mix})$ denotes the predicted effect (scaled to 0–1) of an n -compound mixture, c_{Mix} is the total concentration in the mixture, c_i is the concentration of the i th compound, and $E(c_i)$ is the effect of that concentration if the compound is applied singly. As $E(c_{Mix})$ values are scaled to 0–1, multiplication by 10^2 gives direct expected IC values for the considered mixture concentration (IC scaled to 0–100).

In this study, for both models, the effect E refers to the bioluminescence inhibition of *V. fischeri*.

2.5. Statistical analyses

Toxicity comparisons were performed between active ingredients and related formulated compound mixtures IC_{50} , using the Student's t -test for two samples. One-way ANOVA analyses followed by Tükey post hoc test, were performed to compare toxicity values of active ingredients IC_{50} on one hand, and formulated com-

pounds IC_{50} on another hand. All statistical analyses were done with $n = 4$ (with n = the number of measurements).

$E(c_i)$ values for IA model were obtained from logarithmic regression curves of single compounds toxicity, and used to calculate the concentration–response relationships.

3. Results

The IC_{50} toxicity values (in $mg\ L^{-1}$ equivalent of active ingredient) obtained with the active ingredients and the formulated compounds are reported in Table 4. The values of IC_{50} obtained at 5, 15 and 30 min were similar in most cases (13 of 14 tests), thus we only reported results for 15 min measurements. Significant differences between active ingredients and related formulated compounds toxicity ($P < 0.01$) were consistently observed, using Student t -test analyses (Fig. 1).

3.1. Toxicity assessment of active ingredients

The technical grade S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron showed a non-negligible toxicity compared to atrazine molecule (Table 4, $IC_{50} = 196.7 \pm 28.5\ mg\ L^{-1}$). IC_{50} values were not statistically different for S-metolachlor ($178.4 \pm 22.8\ mg\ L^{-1}$) and nicosulfuron ($167.8 \pm 21.8\ mg\ L^{-1}$), and significantly lower for benoxacor ($93.3 \pm 7.3\ mg\ L^{-1}$) and mesotrione ($43.6 \pm 2.4\ mg\ L^{-1}$).

Benoxacor did not change the toxicity of S-metolachlor molecule with an IC_{50} for S-metolachlor + benoxacor ($174.5 \pm 20.1\ mg\ L^{-1}$) similar to the toxicity of S-metolachlor alone.

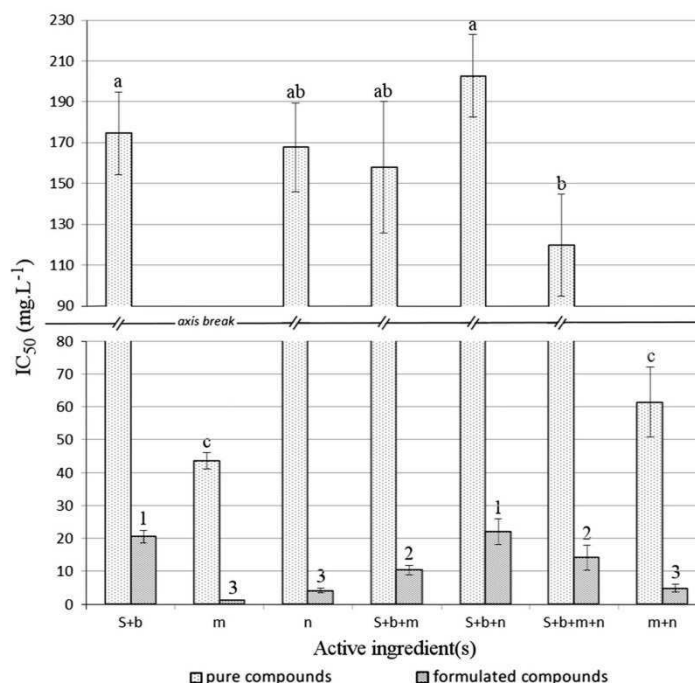


Fig. 1. IC_{50} values ($mg\ L^{-1}$ of active ingredients content), for pure compounds (light gray) and formulated compounds (dark gray), used alone or in mixture. Herbicides: S-metolachlor (S), benoxacor (b), mesotrione (m) and nicosulfuron (n). Significant differences between pure compounds toxicity (labeled by a, b and c letters, P value: 9.164×10^{-9}) and formulated compounds toxicity (labeled by 1, 2 and 3 numbers, P value: 6.54×10^{-11}) were observed using one-way ANOVA analyses followed by Tükey post hoc test.

Table 5
Predicted toxicity values according to Concentration Addition (CA) and Independent Action (IA) models.

Mixture	Experimental data IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	Concentration Addition (CA)		Independent Action (IA) Expected inhibitory concentration (IC) ^c
		Raw CA values for IC ₅₀ ^a	Expected IC ₅₀ values (mg L ⁻¹) ^b	
Active ingredients				
S-metolachlor + benoxacor	174.5 ± 20.1	1.02	171.1 ± 19.7	IC ₅₀ [52–65]
S-metolachlor + benoxacor + mesotrione	157.9 ± 32.2	1.11	142.3 ± 29.0	IC ₅₀ [51–77]
S-metolachlor + benoxacor + nicosulfuron	202.7 ± 20.3	1.19	171.0 ± 17.1	IC ₅₀ [56–68]
S-metolachlor + benoxacor + mesotrione + nicosulfuron	119.8 ± 24.9	0.84	142.9 ± 29.7	IC ₅₀ [43–65]
Mesotrione + nicosulfuron	61.4 ± 10.6	1.11	55.3 ± 9.5	IC ₅₀ [44–62]
Formulated compounds				
Dual Gold Safeneur® + Callisto®	10.4 ± 1.4	1.13	9.2 ± 1.2	IC ₅₀ [57–74]
Dual Gold Safeneur® + Milagro®	22.1 ± 3.9	1.2	18.4 ± 3.2	IC ₅₀ [49–70]
Dual Gold Safeneur® + Callisto® + Milagro®	14.1 ± 3.7	1.58	8.9 ± 2.3	IC ₅₀ [53–91]
Callisto® + Milagro®	4.8 ± 1.2	3.45	1.4 ± 0.3	IC ₅₀ [90–100]

^a Direct results obtained from CA model calculation.

^b Expected results obtained by applying raw CA value coefficient on experimental data.

^c Expected results obtained from IA model calculation, including confident interval values.

Mesotrione showed the highest toxicity alone (43.6 ± 2.4 mg L⁻¹) and in presence of nicosulfuron, (61.4 ± 10.6 mg L⁻¹).

The IC₅₀ evolution (Fig. 1) showed the toxic cumulative effect of the mixture (applied following Table 3 ratios) of the four active ingredients (i.e. S + b + m + n), compared to the mixtures S + b and S + b + n.

3.2. Toxicity assessment of formulated compounds

All of the formulated compounds presented toxicity increased by 8.5 times for Dual Gold Safeneur®, 39.6 times for Callisto® and 40.9 times for Milagro®, compared to their respective active ingredients (Table 4).

The toxicity of Dual Gold Safeneur® (20.5 ± 2.0 mg L⁻¹) is equivalent to the toxicity of the Dual Gold Safeneur® + Milagro® mixture (22.1 ± 3.9 mg L⁻¹), whereas the mixtures including Callisto® increased significantly the toxicity (10.4 ± 1.4 mg L⁻¹ for Dual Gold Safeneur® + Callisto® mixture and 14.1 ± 3.7 mg L⁻¹ for the three formulated compound mixtures).

Considering Table 3 ratios, Callisto®, the most toxic formulated compound (1.1 ± 0.1 mg L⁻¹) when used alone, shows a decreased toxicity when combined with Milagro®, with a total IC₅₀ of 4.8 ± 1.2 mg L⁻¹. However, this result is non-significant according to one-way ANOVA analysis.

3.3. Predictability of mixture toxicity

Results of predicted toxicity according to CA and IA models are presented Table 5.

CA model predicted IC₅₀ values accurately for all mixtures excepted for Callisto® + Milagro®, where the expected toxicity was more than 3 times higher than the experimental data (1.4 ± 0.3 mg L⁻¹ vs. 4.8 ± 1.2 mg L⁻¹).

IA model was used to obtain expected IC values from the concentration–response logarithmic regression curves of single compounds, accordingly to Table 3 ratios. Compared to experimental IC₅₀ values, IA appeared to generally over-estimate the IC of the mixtures (except for S-metolachlor + benoxacor + mesotrione + nicosulfuron mixture, mesotrione + nicosulfuron mixture and Dual Gold Safeneur® + Milagro® mixture, where IC scaled respectively from 43 to 65, 44 to 62 and 49 to 70).

4. Discussion

This work presents original data concerning the potential toxicity of S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, four herbicides used in maize cultures, towards *V. fischeri*, a model organism in ecotoxicology bioassays. To our knowledge, no comparable assessment of toxicity, with realistic field mixtures ratios, has been done on both active ingredients and formulated compounds (Deneer, 2000).

To evaluate toxicity of chemicals, it is necessary to assess their effects on different communities which can play a key role in ecosystem functions, as prokaryotic communities. This underlines the choice of Microtox® assay, using *V. fischeri*.

As Microtox® assay cannot take into account interaction between microorganisms occurring at the community level, toxicity results presented thereafter will not reflect realistic impact of pollutants in environment. However, Microtox® assay provides a useful technique for the determination and the comparison of the potential toxicity of various contaminants as well as for the assessment of toxicity interactions.

We did not neutralized the pH of both active ingredients and formulated compounds solutions as it has been observed that *V. fischeri* bioluminescence occurs between pH 4.5 and 10.5 (Scheerer

et al., 2006). Moreover, pH lower than 9.7 (as in this study) do not decrease the bioluminescence of *V. fischeri* (data not shown).

The commercial products Dual Gold Safeneur®, Callisto® and Milagro® have a higher toxicity compare to their corresponding active ingredients. We did not have any detailed information on additives added in formulated compounds but we can link them as major actors responsible for the acute toxicity observed. Nevertheless, safety data are now available for Callisto®⁴ and describe two alcohol additives in the formulation, the poly(oxy-1,2-ethanediyl), alphasodecyl-omegahydroxy- and the octan-1-ol, present respectively at 20–30% and 5–10% (w/w). Octan-1-ol IC₅₀ is reported on *V. fischeri* at 46.2 mg L⁻¹ (Villa et al., 2012). Its high toxicity associated to mesotrione and other adjuvants toxicities could explain the high IC₅₀ value obtained for Callisto® (1.1 ± 0.1 mg L⁻¹, Table 4). Additives molecules are different among the formulated compounds and intensive studies should be carried out as soon as their identity will be revealed.

As a main result of this study, the very low IC₅₀ observed for the mixture of mesotrione and nicosulfuron raised potential questions on the use of these two chemicals together as post-emergence herbicides, as it is actually recommended. However, this effect seems to be minimized in the mixture of formulated compounds (Callisto® + Milagro®) with an increase of the mesotrione concentration responsible for the IC₅₀ (1.1 ± 0.1 mg L⁻¹ alone, in contrast with 3.4 ± 0.8 mg L⁻¹ in m + n mixture, for mesotrione active ingredient toxicity part, obtained from Table 3 ratios). This surprising result of decrease of the mixture toxicity could be due, in that specific case, to interactions between active ingredients and/or additives contained in the both formulated compounds (i.e. chelation, sequestration, etc.). These results lead to potential interactions hypotheses, which could be interesting to study, in parallel to other herbicides parameters (i.e. transfer properties, toxicity of degradation products, impact on soil/water communities, impact on biochemical cycles etc.), in order to minimize the toxicity of molecules applied alone by coupling them with other molecules able to reduce their global toxicity for environment, while taking in account the agricultural necessities.

Ecotoxicology studies on the impact of herbicides mixtures on soil system have been done in our research team (Joly et al., 2012) and further analysis using the same mixtures are in progress.

This study underlined the strength of CA model (Table 5) to predict the mixtures toxicity, despite the fact that the compounds have different molecular acceptor sites (Table 1) and may act on different physiological systems within *V. fischeri*, which suppose a better prediction by IA model. Nevertheless, both models overestimated the Callisto® + Milagro® mixture toxicity (Table 5), which confirm the usefulness of the experiment to corroborate models predictions.

However, our study, in accordance with other studies using these models (Berenbaum, 1985; Altenburger et al., 2000; Faust et al., 2003; Villa et al., 2012), assumes the fact that CA model may be considered as a pragmatic and realistically acceptable worst case, capable to ensure an adequate level of protection. In so, synergistic effects seemed to be excluded for the tested mixtures.

To draw a more detailed picture of the impact and fate of these four herbicides on the environment, it would be necessary to perform bioassays similar to the Microtox® test on all newly identified degradation products. Indeed the high toxicity values presented in this work could be even higher for *V. fischeri* with degradation products, as it has been observed with mesotrione and its metabolite AMBA (Bonnet et al., 2008) or with 2-ethyl-6-methylamine, a metabolite of metolachlor (Osano et al., 2002). Another issue

could be the use of extracted and purified active ingredients and degradation products from contaminated soil or slurry, to test them as a true exposition mixture.

The understanding of the impact of herbicides mixtures, leads to large studies in term of models, from bioassay to field experiments, by dissociating the molecules responsible for the toxicity (active ingredients, degradation products and additives), and by taking in account the application ratios encountered in agriculture or found in receptor ecosystems. In that way, new automated tools for *in situ* aquatic toxicity determination using *V. fischeri* are currently developed and can be used on-line to obtain automatic alerts on abnormal concentrations of toxic compounds (Lopez-Roldan et al., 2012). Further investigations will be necessary and are still in progress to fill the gap in our knowledge of the environmental impact of these xenobiotics, in order to help in the choice of a more reasoned use of pesticides.

Acknowledgment

The authors would like to thank M. Giraudo for editorial advice in English.

References

- Abu-Qare, A.W., Duncan, H.J., 2002. Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. *Chemosphere* 48, 965–974.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2341–2347.
- AZUREnvironmental, 1996. Microtox users manual. AZUREnvironmental, Carlsbad, CA, USA.
- Batisson, I., Cruzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.-F., Mallet, C., Bohatier, J., 2009. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* 157, 1195–1201.
- Berenbaum, M.C., 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* 114, 413–431.
- Bogaerts, P., Bohatier, J., Bonnemoy, F., 2001. Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure – activity relationships of xenobiotics: comparison with the Microtox test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 293–301.
- Bond, G.P., Martin, J., 2005. Microtox. In: *Encyclopedia of Toxicology*, second ed. Elsevier, New York, pp. 110–111.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2008. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 576–583.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 84–98.
- Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Manage. Sci.* 56, 516–520.
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P., Combourieu, B., 2010. Biodegradation pathway of mesotrione: complementarities of NMR, LC-NMR and LC-MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* 81, 372–380.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43–63.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207–233.
- Fuerst, E.P., Irzyk, G.P., Miller, K.D., 1993. Partial characterization of glutathione S-Transferase Isozymes Induced by the Herbicide Safener Benoxacor in Maize. *Plant Physiol.* 102, 795–802.
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26, 483–495.
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J., Mallet, C., 2012. Impact of maize formulated herbicides mesotrione and S-Metolachlor, applied alone and in mixture, on soil microbial communities. *ISRN Ecol.* 2012, 1–9.
- Kaiser, K.L., 1998. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environ. Health Perspect.* 106, 583–591.
- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ. Int.* 26, 131–135.
- Lo, C.-C., 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Sci. Health B* 45, 348–359.
- Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Riva, M.C., González, S., Cortina, J.L., 2012. Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for *in situ* aquatic toxicity determination. *Sci. Total Environ.* 440, 307–313.

⁴ <http://www.syngenta-crop.co.uk>

- Chapitre 4 : Etude toxicologique de la réponse de l'organisme modèle *Vibrio fischeri* aux herbicides de cette étude -

2450

P. Joly et al./Chemosphere 93 (2013) 2444–2450

- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., Wichert, R.A., 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manage. Sci.* 57, 120–128.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D., Bleeker, E.A.J., 2002. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* 119, 195–202.
- Scheerer, S., Gomez, F., Lloyd, D., 2006. Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *J. Microbiol. Meth.* 67, 321–329.

- The REACH baseline study: A tool to monitor the new EU policy on chemicals – REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals), European Communities, 2009, European Communities.
- Villa, S., Migliorati, S., Monti, G.S., Vighi, M., 2012. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). II: Response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 93–100.

DES BIOESSAIS AUX MICROCOSMES DE SOL : LES APPORTS DES TESTS DE TOXICITE

Afin d'évaluer la toxicité des produits issus de synthèse chimique, il est essentiel d'étudier leurs effets sur les communautés pouvant jouer un rôle dans le fonctionnement de l'écosystème, telles que les communautés procaryotes. Toutefois, des tests comme celui du Microtox[®] ne sont pas en mesure d'évaluer les interactions entre les communautés microbiennes et ne témoignent donc pas de l'impact environnemental des molécules. Cependant, le Microtox[®] apporte un outil utile pour la détermination et la comparaison des toxicités potentielles de nombreux contaminants ainsi que l'évaluation des interactions de toxicité entre molécules.

Les résultats de cette étude mettent en avant l'importante toxicité des molécules herbicides formulées comparativement aux molécules actives d'herbicides seules, ce qui souligne la part de toxicité que prennent les adjuvants contenus dans les formulations commerciales. La question sur la toxicité des adjuvants est cependant ouverte, du fait que la recette propre à chaque formulation reste la propriété du fabricant, ce qui limite les informations à leur égard (en termes d'identité et de toxicité).

Concernant la toxicité des mélanges, cette étude permet d'exclure toute interaction synergique de toxicité pour *V.fisheri*, lors d'applications simultanées de ces herbicides. Parmi les deux modèles mathématiques testés, celui de Concentration Addition (CA) prédit mieux la toxicité des mélanges malgré le fait que les herbicides de l'étude aient des cibles d'action différentes, ce qui suggérerait une meilleure prédictibilité par le modèle d'Independent Action (IA). Toutefois, ces deux modèles ont échoué dans la prédiction de la toxicité d'un des mélanges (Callisto[®]+Milagro[®]), indiquant que les modèles ne se suffisent pas à eux même pour apporter les réponses de toxicité découlant de l'emploi de molécules en mélanges.

Cette étude nous a permis d'apporter les réponses de toxicité d'un organisme « normé » et couramment employé pour l'autorisation de mise sur le marché de nombreux composés chimiques. Cette approche présente des limites de représentativité environnementales évoquées ci-dessus. L'approche en microcosmes développée au chapitre suivant cherche à combler ces limites afin de s'approcher au plus près des interactions environnementales et ainsi permettre d'apporter des réponses qui, en complément de l'approche Microtox[®], permettront d'aider au choix raisonné de l'emploi de ces molécules herbicides.

CHAPITRE 5 : DEVENIR DES MELANGES HERBICIDES ET IMPACTS SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL DE LIMAGNE

Ce chapitre regroupe la quasi-totalité des résultats de l'étude en microcosmes mise en place et décrite au **Chapitre 3**. Pour rappel, nous avons retenu trois formulations commerciales d'herbicides : **le S-métolachlore (Dual Gold Safeneur[®])**, **la mésotrione (Callisto[®])** et **le nicosulfuron (Milagro[®])**, appliquées à la dose agronomique recommandée sur des microcosmes de sol (**Figure 21**), en suivant un planning agricole. Les différentes analyses permettent de décrire à la fois le devenir des molécules et les changements en termes de biomasse, de structure et d'activités des communautés bactériennes et fongiques, prises dans leur globalité, mais aussi celles plus spécifiques, impliquées dans le cycle biogéochimique de l'azote.



Figure 25 – Mise en place des microcosmes de sol, avant la pré-incubation de deux semaines précédant le début de l'expérimentation (Photographie personnelle).

La mise en place de cette étude s'est faite en 2011 et l'ensemble des données n'a pour l'heure pas été totalement recueilli. Toutefois, les données obtenues permettent de donner une première conclusion quant à l'effet des mélanges herbicides sur le sol de Limagne.

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes
du sol de Limagne -

Responses of Limagne “organic/clay-rich” soil microbial communities, to realistic formulated herbicide mixtures, including S-metolachlor, mesotrione and nicosulfuron.

Pierre Joly^{ab*}, Frédérique Bonnemoy^{ab}, Pascale Besse-Hoggan^{cd}, Fanny Perrière^{ab}, Olivier Crouzet^e, Florence Donnadiou^{ab}, Jacques Bohatier^{ab} and Clarisse Mallet^{ab}.

a : Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, F-63000 Clermont Ferrand, France

b : CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, F-63177 Aubière, France

c : Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, F-63000 Clermont Ferrand, France

d : CNRS, UMR 6504, Institut de Chimie de Clermont Ferrand, F-63177 Aubière, France

e : INRA, UR-251 Pessac, F-78026 Versailles Cedex, France

*Corresponding author : Pierre Joly, CNRS-UMR 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand II, 63177 Aubière, France.

Phone : (+33)-4-73-40-74-53 Fax : (+33)-4-73-40-76-70

Email : pjoly@gmail.com

INTRODUCTION

Pesticides (i.e. herbicides, fungicides, insecticides, nematocides, fumigants...) are organics and inorganics chemicals, widely spreads over the world. They are used in agriculture to improve the yield and the quality of crops, mainly for economic reasons. A large proportion of any pesticide application reaches the soil where it interacts with organic and mineral constituents. In this respect, some properties, like pH, humidity, soil texture, predominant clay and or organic matter (OM) etc. can influence directly the herbicides transfert and biodisponibility and so effects and degradation (Bending et al., 2006). A serious concern about their effects on non-target organisms, such as microorganisms, leads many research teams to get an overview on these compounds. Complete reviews, linking soil microbial communities and single pesticide use, underlined the fact that those molecules applied at recommended field rates could exert only minor or transient effects on the functioning of soil system (Lo, 2010; Puglisi, 2012). However, the revaluation of many first-generation molecules caused their replacement with new generations of molecules with lower weight, which, therefore, are less dangerous to the environment. To ensure the efficiency of these new pesticides, the trend is to multiply the molecules used for the same crop in mixture combinations.

This context is well illustrated by the atrazine case, a widely sprayed maize herbicide, banned in 2003 in Europe due to its high toxicity on numerous organisms, its persistence properties and its capacities to be transferred to other ecosystems (Graymore et al., 2001). To replace atrazine, maize cultures are now treated, depending of the weeds encountered, by mixtures of other herbicide molecules, such as S-metolachlor, mesotrione and nicosulfuron. These three herbicides have different target of action. S-metolachlor ((S)-2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(1-methoxypropan-2-yl)acetamide) inhibits the very long chain fatty acid (VLCFA) formation, which interferes with normal cell development and inhibits both cell division and cell enlargement (Tomlin, 1994). Mesotrione (2-[4-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzoyl]cyclohexane-1,3-dione) inhibits a critical enzyme, p-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase (HPPD), in carotenoid biosynthesis (Mitchell et al., 2001). Nicosulfuron (2-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl]-N,N-dimethylpyridine-3-carboxamide) prevents synthesis of isoleucine, leucine, and valine by inhibition of acetolactate synthase (ALS), which results in cessation of cell division and plant growth (Tomlin, 1994). Ecotoxicological studies are now evolving to these considerations, leading to carry on studies

dealing with these mixtures, but also at recommended field rates application, knowing that both factors are rarely taken in account in ecotoxicological studies (Luiz et al., 2013). In a prospective study, we showed that a mixture of formulated S-metolachlor (Dual Gold®) and mesotrione (Callisto®) could have as much effect than a single molecule used at 10-fold the recommended dose on the bacterial diversity, the phototrophic abundance and the soil nutrients content (Joly et al., 2012). Knowing the lack of knowledge on the pesticides mixtures problematic (both on direct application and on natural mixture formation with persisting molecules in soils), this overview decided us to go further on the understanding of realistic mixtures on microbial communities. Thus, in the present study, we added another herbicidal formulation in the mixture (Milagro®, containing nicosulfuron) to the previously studied molecules (formulated S-metolachlor and mesotrione), we respected the sequential herbicide applications encountered in agricultural practices, we applied them at the realistic field rate doses and we followed a whole set of parameters in order to assess which modifications occurred in terms of diversity, abundance and activities of microbial communities (prokaryotes and fungi). The aims of this study were to investigate the fate of these realistic herbicides mixtures in a Limagne organic/clay-rich soil, and their potential impacts on soil microbial communities. A particular attention was given to the key microbial communities involved in the nitrogen cycle (N-cycle; nitrifying and denitrifying communities), which are of major concern regarding the ecosystemic services they ensure.

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL DESIGN

Table 1 - Physicochemical properties of the Limagne soil, determined using standard protocols of the Arras Soil Analysis Laboratory (INRA, France)

% sand	% silt	% clay	Cationic exchange capacity (cmol ⁺ .kg ⁻¹)	Organic matter (g.kg ⁻¹)	Organic carbon (g.kg ⁻¹)	Total nitrogen (g.kg ⁻¹)	Carbon/ Nitrogen ratio
8.5	32.8	58.7	34.6	54.9	31.8	2.59	12.2

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

Topsoil (0-10 cm) was collected in June 2011 from a black soil with unique characteristics, close to vertisol (clay-rich soil, determined using standard protocols of Arras Soil Analysis Laboratory, INRA, France; and according to FAO classification) located in the Limagne plain near Clermont-Ferrand (45°47'6" N, 3°11'11" E, Alt: 320 m, Table 1).

The soil was then sieved (mesh size 5 mm) in a large polyvinyl chloride (PVC) tank, and adjusted to 50% of its maximal Water Holding Capacity (WHC). Prepared soil was then separated in crystal polystyrene (CP) microcosms (140g of prepared soil in each CP boxes, length: 90 mm, width: 60 mm and height: 50 mm), previously checked for their absence of interaction with herbicides molecules used in the study. Microcosms were randomly regrouped in a unique enclosure of 150 mm height, covered with porous plastic film allowing air exchange while limiting soil dehydration and pre-incubated for 2 weeks in an experiment room at 20°C ± 2°C, with a day/night cycle (14:10) ensured by an artificial light (Osram-L-36 W/964, 750 lux). The soil water content was adjusted weekly with deionized water thorough the experiment.

Afterward, herbicides treatments at the recommended field rates (Table 2) were performed by spraying herbicides diluted in de-ionized water on microcosms surface (5400 mm²) using a TG-470 airbrush (Fraulein 3°8).

Table 2- Herbicide doses for microcosms treatment, according to Syngenta recommendations

Formulated compound (f.c.)	Active ingredient (a.i.)	Hectare dose of f.c. (L)	a.i. per hectare (g)	Microcosm dose of f.c. (µL)	a.i per microcosm (µg)
Dual Gold Safeneur [®]	S-metolachlor	2.1	1921.5	1.134	1038
Callisto [®]	mesotrione	1.5	150	0.81	81
Milagro [®]	nicosulfuron	1.5	60	0.81	32.4

In order to respect the reality of treatments, herbicides were sprayed following a classic agricultural schedule: half of the microcosms were treated with the pre-emergence herbicide Dual Gold Safeneur[®] (day 0 of experiment) in a first application and 2 weeks later (day 14 of experiment) treatments with the post-emergence herbicides Callisto[®] and/or Milagro[®] were performed in a second application, in order to obtain a set of 8 treatments conditions: Control microcosms without herbicides (Co), Dual Gold Safeneur[®] treatment (DG), Callisto[®] treatment (C), Milagro[®] treatment (M), Dual Gold Safeneur[®]+Callisto[®] treatment (DG/C), Dual Gold Safeneur[®]+Milagro[®] treatment (DG/M), Callisto[®]+Milagro[®] treatment (C/M)

and Dual Gold Safeneur®+Callisto®+Milagro® treatment (DG/C/M). Experiment was conducted during 120 days and sampling was performed on days 0, 2 and 8 (Co and DG only), 14, 16, 22, 28, 56, 91 and 120 (8 treatments). For each sampling date, five randomly chosen microcosms from each treatment set were sacrificed (n=5). Microbial biomass, microbial respiration, N-NO_3^- and N-NH_4^+ concentrations were obtained from fresh soil aliquots. DNA analyses, herbicide quantification, enzymatic activities analyses, carbohydrate and protein concentrations measurements were obtained from -20°C frozen aliquots.

HERBICIDE DISSIPATION

Limagne soil used for this study was checked for the absence of S-metolachlor, mesotrione and nicosulfuron (multiresidues117 scan, LDA 26 Laboratory). Herbicides were extracted from 6 g of fresh soil, by adding 20 mL of MeOH/H₂O (4/1) for S-metolachlor and 20 mL of H₂O for mesotrione and nicosulfuron. Samples were stirred for 24 h using an orbital shaker at 50 rpm and at room temperature. Mesotrione and nicosulfuron extracts were concentrated using 6 cc Oasis® HLB cartridges (Waters® ; conditioned with 5 mL MeOH, equilibrated with 10 mL H₂O pH 3.6, loaded with 20 mL sample solution, washed with 5 mL H₂O, dried 10 min at 10 in. of Hg, eluted with 5 mL MeOH, evaporated and reconstituted with 1 mL of pure H₂O). Herbicides concentrations of soil liquid extracts were quantified by high-performance liquid chromatography (Courtaboeuf, France) equipped with a reverse-phase column (C18 Zorbax Eclipse column, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 22°C and a diode array detector set at $\lambda = 220$ nm for S-metolachlor and nicosulfuron, and $\lambda = 254$ nm for mesotrione. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and aqueous H₃PO₄ (0.01 % v/v, pH = 2.9) (B) at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. Gradient: 0-5 min: 5% A; 5-30 min: 5-70% A (linear); 30-32 min: 70-95% A; 32-33 min: 95-5% A; 33-36 min: 5% A.

SOIL CHEMICAL ANALYSES

Evolutions of carbohydrates and proteins concentrations in soil samples were followed, according to Dubois et al. (1956) and Lowry et al. (1951) respectively, to estimate the availability of the principal organic compounds which ensure microbial development. Results were read spectrophotometrically on an Ultrospec 10 (Amersham biosciences).

Ammonium (NH_4^+) concentrations measurement was performed as described by Joly et al. (2012) and nitrates (NO_3^-) concentrations measurement was performed by using a

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

Spectroquant NO_3^- kit (Merks $\text{\textcircled{R}}$), accordingly to the manufacturer's instructions. All these concentrations are expressed per gram of dry soil.

ESTIMATED SOIL MICROBIAL ACTIVITIES AND BIOMASS

Substrate-induced respiration (SIR) was quantified according to Lin and Brookes (1996), to estimate the global activity of soil microbial communities. To quantify the total soil microbial biomass fumigation/extraction method was used, according the slightly modified method of Vance et al. (1987), as described in Joly et al. (2012). Soil potential nitrification activity was assessed according to the ISO standard 15685:2004. Soil potential enzymatic activities of β -D-glucosidase (β GLU; EC:3.2.1.21), N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG; EC:3.2.1.30) and urease (URE; EC:3.5.1.5) were performed in 96 well microplates (Eivazi and Tabatabai, 1988; Kandeler and Gerber, 1988). Briefly, hydrolases were measured in triplicates in 4 g soil samples mixed during 10 min at 250 rpm with 25 ml water. For β GLU and NAG activities, soil solutions were incubated respectively with 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside 0.05 M (Sigma, 301.3 g.mol⁻¹) and 4-N-acetyl- β -D-glucosaminide 0.01M (Sigma, 342.3 g.mol⁻¹). Reaction was stopped with 0.5 M CaCl_2 and 0.1 M Tris at pH 12. For URE activity, soil solutions were mixed with 0.4 M urea. NH_4^+ formed was revealed with ammonium salicylate and ammonium cyanurate (Hach reagents). After the reactions, each plate was centrifuged 5 min at 2000 g, and absorbance was measured on a microplate reader Genius (SAFAS). The amounts of p-nitrophenol (PNP) and NH_4^+ formed were obtained by measuring the absorbance at $\lambda = 405$ nm and $\lambda = 610$ nm with comparison to calibration curve.

ABUNDANCE OF NITRIFYING AND DENITRIFYING COMMUNITIES

Soil total genomic DNA extraction and purification were obtained from 0.5 g of fresh soil using the FastDNA $\text{\textcircled{R}}$ SPIN Kit for Soil (MPBio) according to the manufacturer's instructions for maximum yields. The quality of DNA extractions was checked on NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR (qPCR) were performed to quantify the different genes (Table 3), using the MESA GREEN qPCR for SYBR $\text{\textcircled{R}}$ Assay (Eurogentec). All qPCR experiments were performed on Mastercycler ep Realplex with software version 1.5 (Eppendorf), in non-squirted high profile white plates cover with cap strips (Eurogentec). Melting curve analyses (denaturation step by a linear increase from 65°C to 95°C with a rate of 1.5°C.min⁻¹) were performed at the end of all qPCR runs to survey the specificity of

amplification. Free-DNA water was added instead of DNA extracts as a non-template control. All qPCR data presented were the means of five independent soil DNA extracts from the five microcosms sampled for each treatments (n=5), and each sample was analysed in triplicates.

Table 3 - Primer sets used for qPCR in this study

Target genes and microbial groups	PCR primers	Sequences (5'-3')	qPCR amplification program	References
AOA – archeal <i>amoA</i>	amo196F	GGWGTKCCRGGRA CWGCMAC	5 min. at 95°C, followed by 40 cycles of [15 sec. at 95°C, 45 sec. at 55°C, 30 sec. at 72°C], and a melting curve	(Treusch et al., 2005)
	amo277R	CRATGAAGTCRTA HGGRTADCC		
AOB – bacterial <i>amoA</i>	<i>amoA</i> 1F	GGGGHTTYTACTG GTGGT	5 min. at 94°C, followed by 40 cycles of [30 sec. at 94°C, 60 sec. at 53°C, 60 sec. at 70°C], and a melting curve	(McTavish et al., 1993)
	<i>amoA</i> 2R	CCCCTCKGSAAAGC CTTCTTC		
bacterial <i>nirK</i>	F1aCu	ATCATGGTSCTGCC GCG	5 min. at 94°C, followed by 40 cycles of [30 sec. at 94°C, 60 sec. at 57°C, 60 sec. at 72°C], and a melting curve	(Throbäck et al., 2004)
	R3Cu	GCCTCGATCAGRTT GTGGTT		
bacterial <i>nirS</i>	Cd3aF	G TSAACG TSAAGG ARACSGG	5 min. at 94°C, followed by 40 cycles of [30 sec. at 94°C, 60 sec. at 53°C, 60 sec. at 70°C], and a melting curve	(Djigal et al., 2010)
	R3Cd	GASTTCGGRTGSGT CTTGA		

Quantification of nitrifiers

The functional *amoA* genes were quantified using the primer set amo196F/277R for ammonia-oxidizing archaea AOA and *amoA*1F/*amoA*2R for ammonia-oxidizing bacteria AOB (Table 3). Quantification of *amoA* genes fragments were performed in a 25 µL volume containing 10 ng soil DNA, 6.25 µg BSA, 0.1 µM of AOA or AOB primers and 12.5 µL of MESA GREEN qPCR MasterMix (Eurogentec).

Quantification of denitrifiers

The functional *nirK* and *nirS* genes were quantified using the primer set F1aCu/R3Cu for bacterial *nirK* and Cd3aF/R3Cd for bacterial *nirS* (Table 3). Quantification of *nirK* and *nirS* genes fragments were performed as for *amoA* genes, except that F1aCu in the *nirK* reaction was added at 0.4 µM.

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

All qPCR programs are described Table 3. Standard curves were generated with an equimolar mix of known amount of linearized plasmids containing *amoA* (AOA or AOB), *nirK* or *nirS* genes inserts isolated from the soil of the study, cloned into pGEM®-T Easy Vector System (Promega), sequenced and checked for their accuracy. Dilution series over seven orders of magnitude from 10^9 to 10^2 copies per assay were used.

SOIL MICROBIAL STRUCTURES

Both bacterial and fungal genetic structures were obtained by the PCR-DGGE technique (Muyzer et al., 1993). Primers, PCR conditions, DGGE conditions and gel analyses were described in Joly et al. (2012).

STATISTICAL ANALYSES

All soil microbial measurements were calculated on the basis of soil dry weight (dw) and expressed in mean values of five replicates per treatment and per date. Statistical procedures (including linear r correlations) were carried out using PAST software (PAleontological Statistics, Hammer and Harper, 2008). Normality of data were checked in order to choose accurately the adapted parametric (one-way ANOVA analysis followed by a Tuckey's pairwise comparison) or non-parametric (Kruskal and Wallis analysis followed by a Mann and Whitney pairwise comparison) test. Precision on the tests used are given in figures captions.

RESULTS

HERBICIDE DISSIPATION

Concentrations of herbicides retrieved at the first day of sampling corresponded to the theoretical values expected from our experimental design (Table 2) and represent the initial input of each herbicide (100%). Herbicide dissipation kinetics showed differences between molecules and treatments (Figure 1).

Compared to single herbicide treatment, S-metolachlor dissipation kinetic went faster in presence of Callisto® and slower in presence of Milagro®, with at the end of the experiment, twice more S-metolachlor remaining in the DG/M treated microcosms (around 38% of the

initial input) compared to the DG/C microcosms (around 17% of the initial input). These effects were not retrieved in the microcosms treated with the three herbicides, where the dissipation kinetic of S-metolachlor fitted perfectly with the one observed for the single Dual Gold Safeneur treatment (around 25% of the initial input at day 120). Whatever the considered treatment, S-metolachlor was not totally dissipated at the end of the experiment.

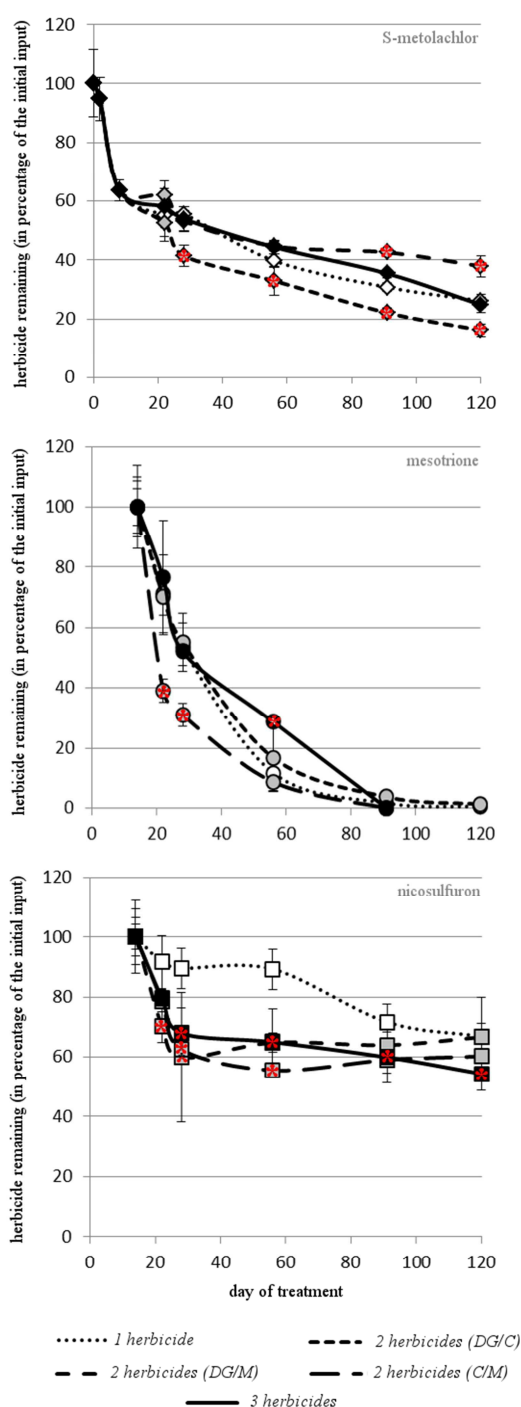


Figure 1 - Herbicide dissipation kinetics for S-metolachlor (top graphic, diamond dots), mesotrione (middle graphic, circle dots) and nicosulfuron (bottom graphic, square dots). The different lines represent the treatments, with DG for Dual Gold Safeneur[®] (formulated S-metolachlor), C for Callisto[®] (formulated mesotrione) and M for Milagro[®] (formulated nicosulfuron). Dots labeled with a * are different from single herbicide treatment value at a given sampling date ($p < 0.05$), according to one-way ANOVA analysis.

Mesotrione dissipation kinetic went faster than for other molecules with at the end of the experiment always less than 2% of the initial input remaining (and no detection of mesotrione in C/M and triple treatment microcosms). Mesotrione dissipation went faster for C/M treatment at the beginning of the experiment (significant speed increase at day 22 and 28 compare to single herbicide treatment) whereas its dissipation rate decreased between day 28 and day 56 for triple treatment microcosms (DG/C/M).

Nicosulfuron dissipation differed between single treatment and mixture treatments. Fourteen days after its application (day 28), nicosulfuron concentration in mixture treatments reached a plateau at around 60% of

the initial input and remained unchanged until the end of the experiment. Its dissipation

kinetics in mixtures microcosms went faster than in the single treatment microcosms, furthermore for the triple treatment microcosms, from day 22 to the end of the experiment.

Production of degradation products was confirmed for the three herbicides and their presence occurred until the end of the experiment whatever the considered treatment (data not shown).

SOIL CHEMICAL ANALYSES

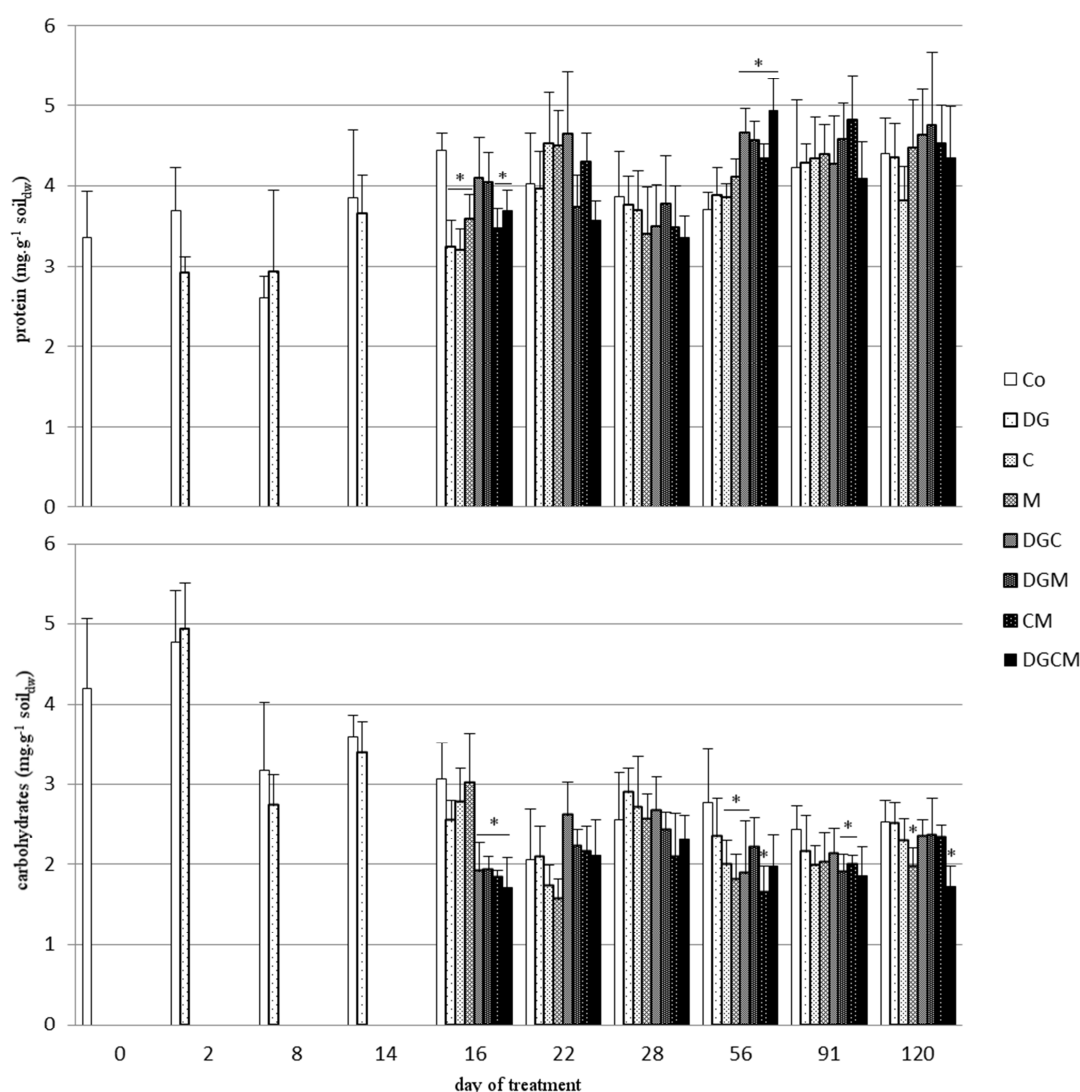


Figure 2 - Proteins and carbohydrates content in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$), according to one-way ANOVA analysis.

Proteins content (Figure 2) showed few differences at days 16 and 56, with at day 16 significantly less proteins in single treatments (DG, C and M), C/M and DG/C/M compared to

control microcosms and at day 56, more proteins in mixture treatments (of 2 or 3 molecules) compared to control microcosms.

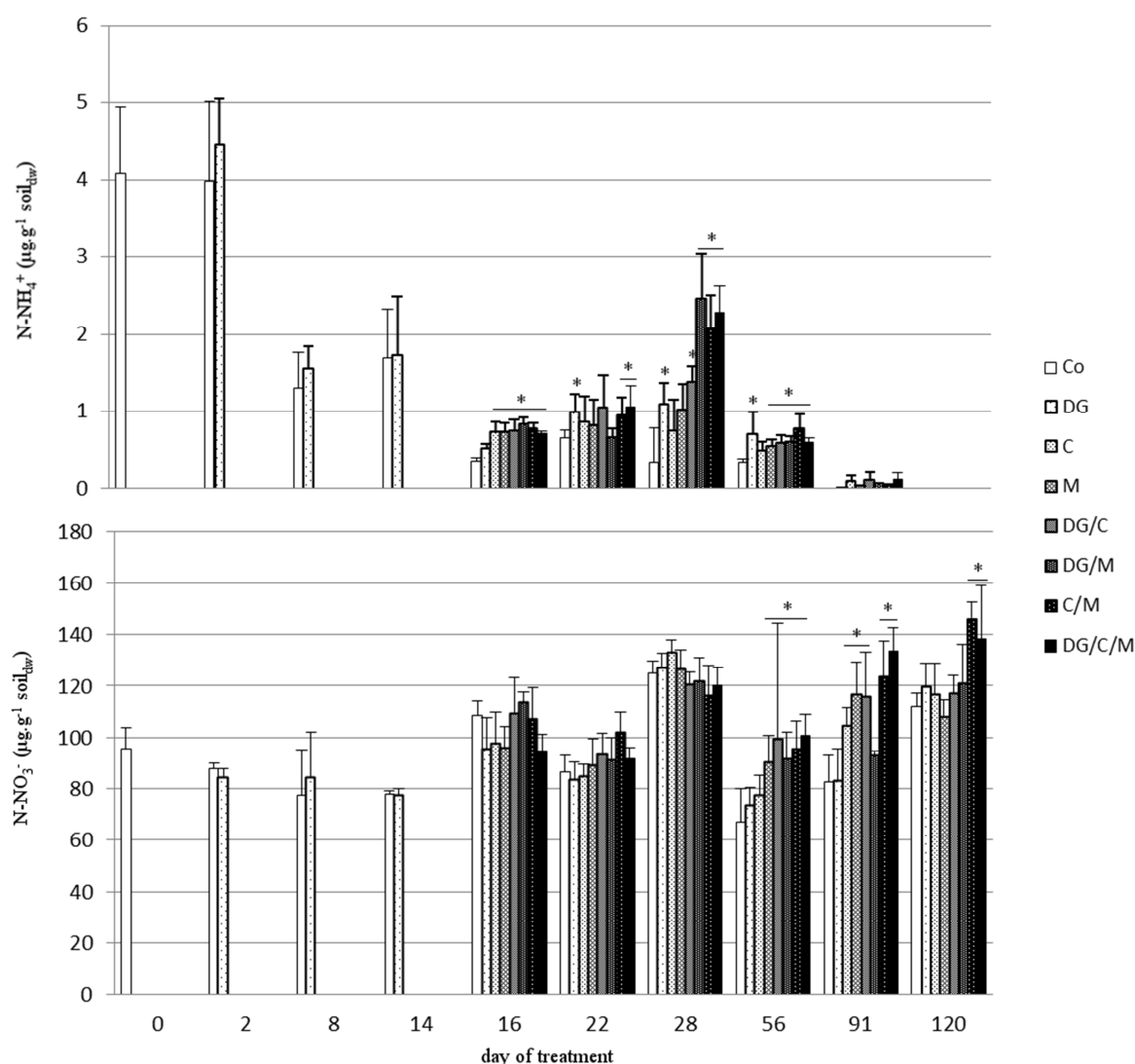


Figure 3 – $N-NH_4^+$ and $N-NO_3^-$ content in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$), according to one-way ANOVA analysis.

Carbohydrates content (Figure 2) showed significant decreases in treated microcosms compared to control microcosms during the experiment: at day 16 for all mixture treatments, at day 56 for C, M, DG/C and C/M microcosms, at day 91 for DG/M and C/M microcosms, and at day 120 for M and DG/C/M microcosms.

Ammonium ($N-NH_4^+$) content (Figure 3) in control microcosms decreased during all the experiment and is not retrieved at day 120. However, for treated microcosms, increases of

ammonium occurred from day 16 to day 56 in many treatments, especially for the triple treatment microcosms, where the increase is always significant compared to control. A peak of ammonium is therefore observed at day 28.

Nitrates (N-NO_3^-) content (Figure 3) remained stable during the 28 first days of experiment. However at day 56, 91 and 120, significant nitrate increases are observed in treated microcosms (for mixture treatments at day 56, for M, DG/C, C/M and DG/C/M at day 91, and for C/M and DG/C/M at day 120).

RESPONSES OF MICROBIAL COMMUNITIES

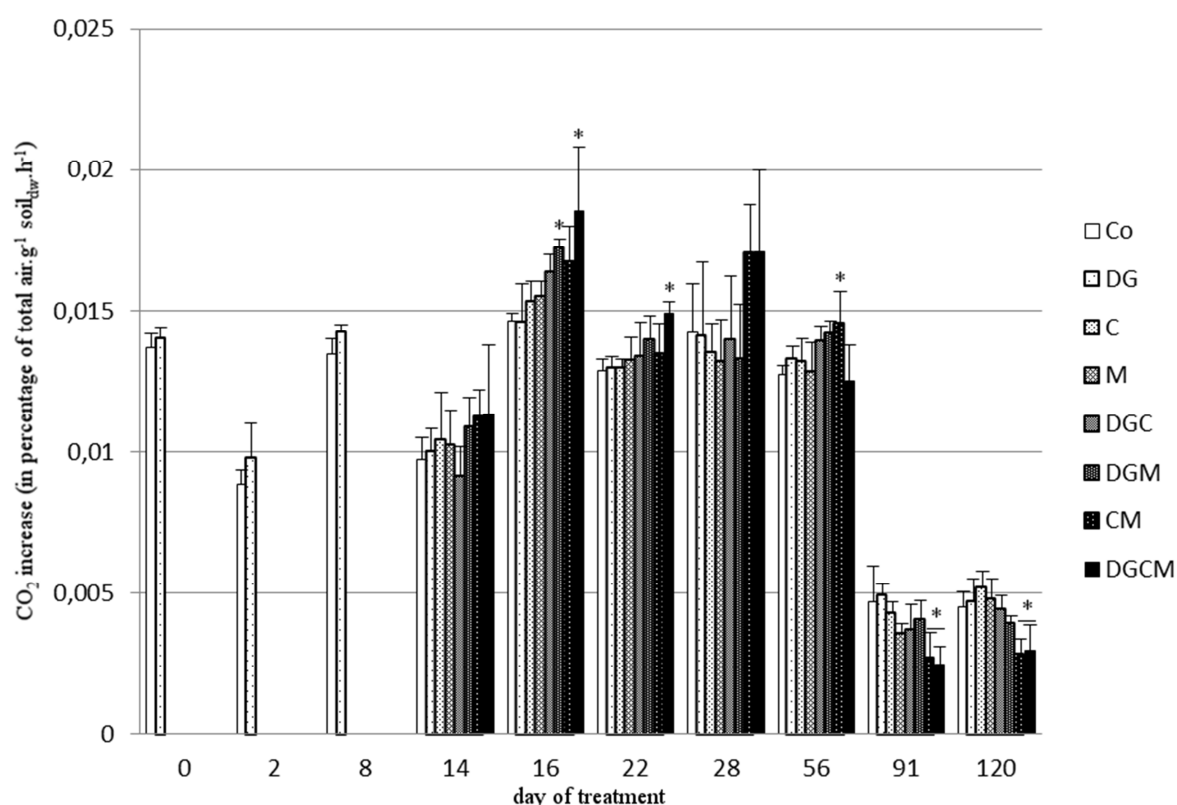


Figure 4 - CO₂ increase during SIR kinetics in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$), according to one-way ANOVA analysis.

Substrate Induced Respiration (SIR) kinetics (Figure 4) showed significant increases of CO₂ production in treated microcosms for DG/M and DG/C/M treatments at day 16, DG/C/M treatment at day 22 and C/M treatment at day 56, compared to control microcosms. The overall SIR is greatly reduced at day 91 and 120 with CO₂ increases under 0.07% of total air

per hour, whatever the considered treatment, and significantly less CO₂ produced for C/M and DG/C/M treatments.

Soil microbial carbon content remained the same throughout the experiment for each considered date and whatever the treatment (Supplementary data 1), such as potential nitrification activity (Supplementary data 2), potential β -D-glucosidase activity and potential N-acetylglucosaminidase activity (Supplementary data 3). Transient significant decreases in potential urease activity were noticed at day 22 for DG/C microcosms and at day 28 for DG/C/M microcosms, compared to control microcosms (Supplementary data 3).

The abundance of archeal *amoA* genes was estimated at around $1.9 \cdot 10^4$ *amoA*-AOA gene copies per ng of soil total DNA (Figure 5, A). Significant differences were retrieved only at day 28, with significant copies decreases in DG/C, DG/M and DG/C/M microcosms compared to control microcosms.

The abundance of bacterial *amoA* genes was rather low with around $0.7 \cdot 10^3$ *amoA*-AOB gene copies per ng of soil total DNA (Figure 5, B). The abundances remained quite constant during the experiment and differences were retrieved at day 56 only, with significant copies increases in DG/C microcosms and significant decreases in C/M and DG/C/M microcosms, compared to control.

Quantification of denitrifiers was estimated by measuring the abundance of *nirK* and *nirS* gene copies (Figure 6). Their abundance increased during time for both *nirK* (from around $1.3 \cdot 10^3$ gene copies per ng of soil total DNA at day 0, to around $2.6 \cdot 10^3$ gene copies per ng of soil total DNA at day 120) and *nirS* (from around $2.5 \cdot 10^2$ gene copies per ng of soil total DNA at day 0, to around $7.2 \cdot 10^2$ gene copies per ng of soil total DNA at day 120) gene copies. Significant differences were observed for *nirK* abundance with gene copies increases for DG at day 2 and for C/M and DG/C/M at day 56, compared to control microcosms. Concerning *nirS* abundance, significant increases compared to control microcosms were observed at day 22 for C, M, DG/C and DG/C/M microcosms, at day 56 for C/M and DG/C/M microcosms and at day 120 for DG/C microcosms. The only case of decrease compared to control was observed at day 28 for C, M, DG/C and DG/M microcosms and was not retrieved thereafter.

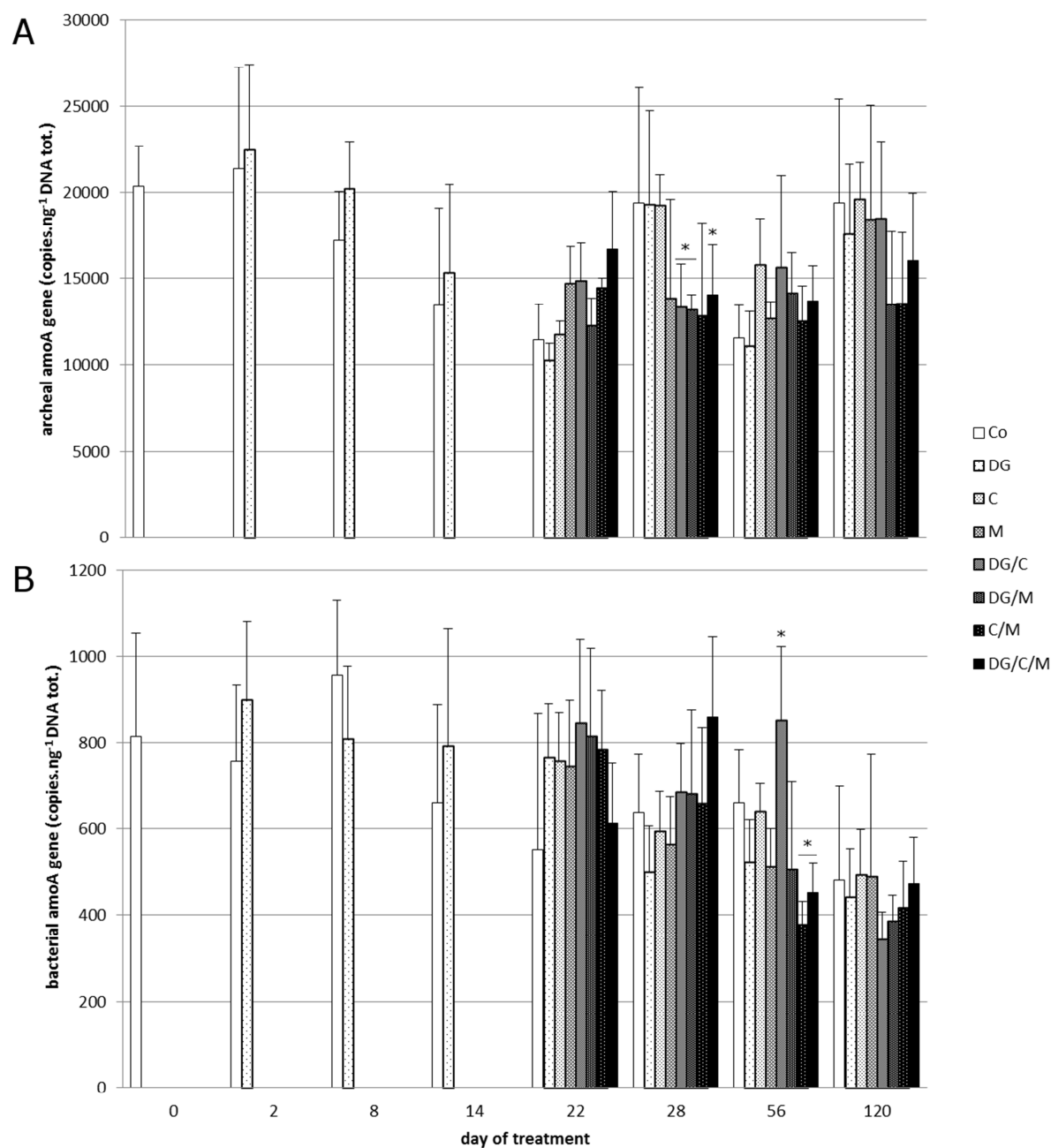


Figure 5 - Sizes of the (A) ammonia oxidizing archaea (AOA) community and (B) ammonia oxidizing bacteria (AOB) community in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). The abundances were estimated by quantitative PCR targeting the functional genes *amoA*, expressed as gene copy numbers per ng of soil total DNA. Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$,) according to Kruskal and Wallis analysis. Values for days 16 and 91 were not determined.

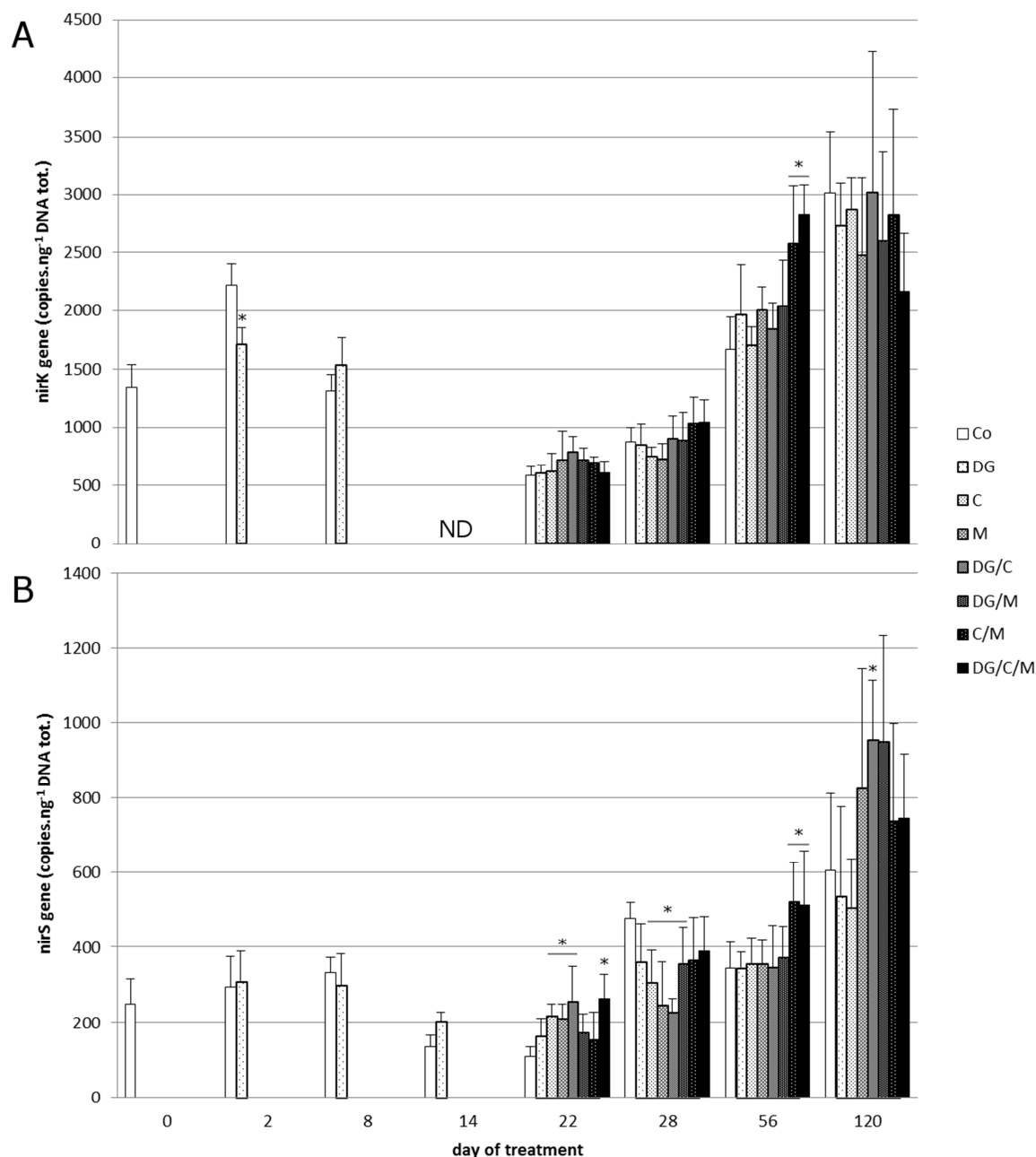


Figure 6 - Sizes of the nitrite reducer community in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). The abundances were estimated by quantitative PCR targeting the functional nitrite reductase genes *nirK* (A) and *nirS* (B), expressed as gene copy numbers per ng of soil total DNA. Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$,) according to Kruskal and Wallis analysis. Values for days 16 and 91 were not determined. ND = not determined.

Soil bacterial and fungal diversity based on DGGE *fingerprinting* analyses revealed a highly conserved structure of these communities, with no differences observed in term of band content and relative intensity, and similar profiles whatever the considered date or treatment

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

(see Supplementary data 4 as an example). These observations were confirmed by the ARISA method (Ranjard et al., 2001), targeting the IGS located between the rRNA genes small- and large- subunits (data not shown).

DISCUSSION

This study aimed to present the most exhaustive responses of Limagne soil microbial communities exposed to realistic herbicides mixtures, in term of structure, abundance and activities. The experimental procedure chosen allowed us to link the recorded effects directly to the corresponding herbicide/mixture of herbicides and their associated adjuvants and degradation products. The microcosm presents also its limits, principally of long-term system depletion which could induce effects not related to herbicides treatments. This observation is underlined by the SIR results at days 91 and 120, with a radical drop of the global respiration activity compared to the rest of the experiment which could be linked to the decrease of nutrients (due to the total consumption of NH_4^+ and the natural decrease of the organic matter contained in the microcosms). In their study, Salminen et al. (2002) recommended to perform soil microcosms studies long enough to observe the long term responses of pesticides contaminations. However, we suggest to mitigate this recommendation and to take precautions in order to conclude on the terminal points of this study.

MODIFICATIONS IN DISSIPATION KINETICS OF THE HERBICIDES

The soil used in this study was different from the one used in our previous work (Joly et al., 2012) with a decrease of porosity (8.5% of sand in this study against 37% in 2010), a higher content of organic matter (54.9 g.kg^{-1} against 29.9 g.kg^{-1}) and thus a higher cationic exchange capacity. These differences could explain in the present study the increase of time needed to degrade mesotrione (>91 days in this study and <42 days in the former one) and S-metolachlor (around 25% of the initial input at day 120 in this study against less than 20% of the initial input after 93 days in the former one). Clay and organic matter of this Limagne soil have been identified as the major responsables of the adsorption of these molecules (personal communication of Ms. Besse-Hoggan), but desorption studies showed the reversibility of these interactions, leading to an eventual transfert of these molecules in ground water. We also suggest that the microbial communities could be different between the two soils, explaining these differences in herbicides degradation. Moreover, this study showed for the

first time differences in dissipation kinetics of herbicides used at the realistic application rate. Compared to Joly et al. (2012), where this effect for close formulated compound has been described only at 10-fold field rate, the present results suggest modification in the microbial metabolisms in charge of the degradation of the different herbicides, even at 1-fold field rate (Figure 1). The differences in the application procedures of the molecules and in the soil composition could be identified as the major responsables of these different dissipation kinetics. For the S-metolachlor in mixture with another commercial formulation (*i.e.* Callisto[®] or Milagro[®]), we suggest that the molecules contained in the different commercial formulation and the degradation products formed during biodegradation processes could act positively (dissipation went faster with Callisto[®]) or negatively (dissipation went slower with Milagro[®]) on the microbial communities involved in the herbicide degradation. This emphasizes effects of stimulation on resisting/degrading communities favoured by the presence of molecules, with both addition of potential substrates by formulated molecules and modulation of the toxicity they induced. Interestingly, these effects were lost when the three herbicide formulations were combined, which however did not exclude any effects on the microbial communities. In the case of nicosulfuron, degradation rate after spraying went faster in mixtures, suggesting also a positive effect of additional compounds on its biodegradation.

SOIL MICROBIAL COMMUNITIES RESISTANCE TO HERBICIDE MIXTURES

Even if the pollution pressure is maintained throughout the experiment (by herbicides, adjuvants, and/or degradation products), the Limagne soil microbial communities appeared to be quite resistant to the different treatments, from a global point of view. At our analysis scale, the bacterial and fungal diversity estimated by *fingerprinting* analyses remained unchanged, such as microbial biomass estimated by the microbial carbon measurements. Potential enzymatic activities dealing with carbon and nitrogen cycles remained also stable, even if transient decrease for urease activity were observed (Supplementary data 3). This absence of effects, already shown by other authors at low doses of pesticides (e.g. Accinelli et al., 2002; Bending et al., 2007; Wainwright, 1978) could be explained by a real absence of effect and by the hypothesis of functional redundancy submitted by Wardle and Parkinson (1990), whereby microbial communities under the effect of herbicides were presumably in a considered state of flux, with susceptible microbes being killed and others, thereby, having a readily available source of carbon, explaining a balance in the microbial parameters.

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

However, as a short term impact, respiration activity shortly increased in Limagne soil in presence of triple herbicide treatments which suggests that the presence of herbicides could transitory stimulate the microbial respiration activity without modifying their abundance and diversity. Two hypotheses are advanced to explain this stimulation:

- There may have been an indirect stimulation of saprophytic microbial communities promoted by dead biomass from sensitive organisms (a readily available source of organic matter) alongside a concomitant stimulation of resistant microbial population (Thirup et al., 2000). A decrease in the abundance of nitrifying archaea occurred in microcosms treated by herbicides mixtures and we also reported effects on phototrophic communities, mainly in Dual Gold Safeneur[®] (alone or in mixture) treated microcosms (Joly et al., *in prep*). These particular communities could then explain this transient increase of respiration activity without modifying the general abundance and diversity data.

- The use of herbicides as a supplementary source of nutrients by degrading communities (Kanissery and Sims, 2011). Our results highlighted the quick decrease of each herbicide just after their spraying (Figure 1), making this hypothesis highly consistent, furthermore in the multiple treatment microcosms where the herbicides represented the highest exogenic contribution. This has furthermore already been observed for other herbicides (Jones and Ananyeva, 2001).

It is also possible that both hypotheses acted together to explain this transient increase in the respiration potential. Moreover, concentrations of carbohydrates and proteins contents at day 16 showed a significant decrease, which made us highlight a better use of these nutrients, certainly explained by some co-metabolism processes due to the different contributions cited previously.

N-CYCLE COMMUNITIES EXPRESSED TRANSIENTS REACTIONS TO HERBICIDES MIXTURES

N-cycle communities seemed to react at the presence of herbicides and more particularly in the presence of mixtures. As no amendements were performed, the overall microbial activity could lead to a depletion of the availability of easily assimilable substrates with increasing exposure time. Thereby, ammonium was preferentially uptaken over nitrates by numerous microbial communities (Jansson et al., 1955; Rice and Tiedje, 1989). In this regard,

ammonium decreased over time in control microcosms, while increases of this nutrient occurred for mixtures from day 16 to 56, especially in DG/C/M microcosms. These results fits with our previous study (Joly et al., 2012), where significant ammonium increases for DG/C microcosm were also recorded after treatments. Moreover, a positive correlation ($p = 0.036$) could be done between this ammonium increase at day 28 and the increase of nitrates content (known to be highly leachable in the soil system) in mixture microcosms at day 56 (Supplementary data 5, D). Thus, we could suggest 3 hypotheses of mixtures effects on N-cycle communities:

- As for the potential respiration increase, effects on sensitive communities and the use of herbicides as nutrient sources, could have contributed to the increase of a pool of organic matter, explaining the increase of ammonium after herbicides applications (Jones and Ananyeva, 2001). This hypothesis is therefore highly regarded.

- AOA *amoA* genes appeared to predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes of the soil, as already noticed by Leininger et al. (2006). The decrease of AOA-*amoA* gene copies observed in mixture microcosms at day 28 could explain the peak of ammonium observed the same day, as a result of a lack in nitrification processes. This effect as already been observed for the s-triazine herbicide simazine, in a soil microcosms study (Hernández et al., 2011). However, no significant correlations could be made between AOA-*amoA* gene copies and ammonium at day 28, even if a trend occurred (Supplementary data 5, A). Moreover, the *amoA*-AOB gene copies decreased at day 56, which could also partially explain that ammonium concentrations increased the same day. Activities based on direct RNA analyses would be necessary to assay this hypothesis; unfortunately we were unable to extract the mRNA fraction of this soil to confirm it and potential nitrification experiment (Supplementary data 2) shown no differences to strengthen this result.

- Abundance of denitrifying communities appeared to increase over time, with at day 56 more *nirK* and *nirS* copies in C/M and DG/C/M microcosms compared to control microcosms. These results are therefore correlated to the nitrates increase (Supplementary data 5, B and C) which made us conclude that the abundance of denitrifying communities risen as an answer to the increase of nitrates (Cavigelli and Robertson, 2001). This increase of nitrates could be mainly due to the closed microcosm system we used to perform our experiments, leading to an accumulation of this nutrient and also to an increase of the abundance of denitrifying communities. The use of herbicide and degradation products could be one another reason

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

explaining this potential abundance increase of denitrifiers, as underlined by Carlisle and Trevors (1986). Nitrates are known to be highly leachable components with a strong pollution potential in aquatic ecosystems (Camargo and Alonso, 2006; Damin and Trivelin, 2011). Intensive studies should be carrying on at the field level to conclude on this potential nitrates accumulation in order to confirm if this production also occurred in field treated with herbicides mixtures and, check if it exceeds the crops need.

CONCLUSION

The present study highlighted the responses of a Limagne “organic-clay-rich” soil microbial communities exposed to realistic herbicide mixtures including S-metolachlor, mesotrione and nicosulfuron. From a global point of view, these communities appeared to be quite resistant to 1-fold field rate doses of these herbicides regardless the number of molecules, as underlined by many authors for single molecules use (Accinelli et al., 2002; Crouzet et al., 2010; Wainwright, 1978). The only recorded effects were transients and mainly related to the N-cycle communities, already known to be sensitive to certain class of herbicides (*e.g.* Damin and Trivelin, 2011; Hernández et al., 2011), with firstly an increase of ammonification and an inhibition of nitrification followed by an increase of denitrification. However, the lack of activities information restricted our conclusions on these communities, which highlighted the need to deepen the studies on N-cycle activities. Agricultural soils receiving herbicides mixtures differ in their mineral and organic composition: essential factors in the herbicides sorption, biodisponibility and degradation processes, which prevent us to conclude at a larger scale on the safety of the use of this three herbicides mixture. Emphasis on sensitive parameters needs to be done and performed on a largest number of soils in order to bring conclusions on the use of such mixtures (Luiz et al., 2013).

ACKNOWLEDGMENTS

The work of P. Joly was supported by a MENRT doctoral fellowship from the French Ministère de l'Education, de la Recherche et de la Technologie. The authors would like to thank I.Batissou, for her wise advices on the numerous *fingerprinting* tools and the INRA Genosol Plateforme for their technical assistance with the ARISA procedure.

BIBLIOGRAPHY

- Accinelli, C., Screpanti, C., Dinelli, G., and Vicari, A. (2002). Short-Time Effects of Pure and Formulated Herbicides on Soil Microbial Activity and Biomass. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82, 519–527.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., and Edmondson, R.N. (2006). Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 139, 279–287.
- Bending, G.D., Rodríguez-Cruz, M.S., and Lincoln, S.D. (2007). Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69, 82–88.
- Camargo, J.A., and Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32, 831–849.
- Carlisle, S.M., and Trevors, J.T. (1986). Effect of the herbicide glyphosate on nitrification, denitrification, and acetylene reduction in soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 29, 189–203.
- Cavigelli, M., and Robertson, G. (2001). Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 33, 297–310.
- Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J., and Mallet, C. (2010). Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biol. Biochem.* 42, 193–202.
- Damin, V., and Trivelin, P. (2011). Herbicides Effect on Nitrogen Cycling in Agroecosystems. In *Herbicides and Environment*, (Dr Andreas Kortekamp),.
- Djigal, D., Baudoin, E., Philippot, L., Brauman, A., and Villenave, C. (2010). Shifts in size, genetic structure and activity of the soil denitrifier community by nematode grazing. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 112–118.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). A Colorimetric Method for the Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

Eivazi, F., and Tabatabai, M.A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 601–606.

Graymore, M., Stagnitti, F., and Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26, 483–495.

Hammer, Ø., and Harper, D.A.T. (2008). *Paleontological Data Analysis* (John Wiley & Sons).

Hernández, M., Jia, Z., Conrad, R., and Seeger, M. (2011). Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 511–519.

ISO 15685:2004. Soil quality -- Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification -- Rapid test by ammonium oxidation.

Jansson, S.L., Hallam, M.J., and Bartholomew, W.V. (1955). Preferential utilization of ammonium over nitrate by micro-organisms in the decomposition of oat straw. *Plant Soil* 6, 382–390.

Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J., and Mallet, C. (2012). Impact of Maize Formulated Herbicides Mesotrione and S-Metolachlor, Applied Alone and in Mixture, on Soil Microbial Communities. *ISRN Ecol.* 2012, 1–9.

Jones, W.J., and Ananyeva, N.D. (2001). Correlations between pesticide transformation rate and microbial respiration activity in soil of different ecosystems. *Biol. Fertil. Soils* 33, 477–483.

Kandeler, E., and Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72.

Kanissery, R.G., and Sims, G.K. (2011). Biostimulation for the Enhanced Degradation of Herbicides in Soil. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011.

Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., and Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806–809.

Lin, Q., and Brookes, P.C. (1996). Comparison of methods to measure microbial biomass in unamended, ryegrass-amended and fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.* 28, 933–939.

Lo, C.-C. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Sci. Health B* 45, 348–359.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Luiz, V., Grossi, R., de Toledo Alves, P.A., Janice, E., and Henrique, S. (2013). Pesticide Tank Mixes: An Environmental Point of View. In *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*, A. Price, ed. (InTech),.

McTavish, H., Fuchs, J.A., and Hooper, A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175, 2436–2444.

Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., and Wichert, R.A. (2001). Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57, 120–128.

Muyzer, G., Waal, E.C. de, and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.

Puglisi, E. (2012). Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides (European Food Safety Authority).

Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.-C., Mougel, C., Thioulouse, J., and Nazaret, S. (2001). Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4479–4487.

Rice, C.W., and Tiedje, J.M. (1989). Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 21, 597–602.

Salminen, J., Liiri, M., and Haimi, J. (2002). Responses of microbial activity and decomposer organisms to contamination in microcosms containing coniferous forest soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 93–103.

- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -

Thirup, L., Ekelund, F., Johnsen, K., and Jacobsen, C.S. (2000). Population dynamics of the fast-growing sub-populations of *Pseudomonas* and total bacteria, and their protozoan grazers, revealed by fenpropimorph treatment. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1615–1623.

Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, A., and Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 401–417.

Tomlin, C. (1994). *The Pesticide Manual* - 10th Edition (Clive Tomlin).

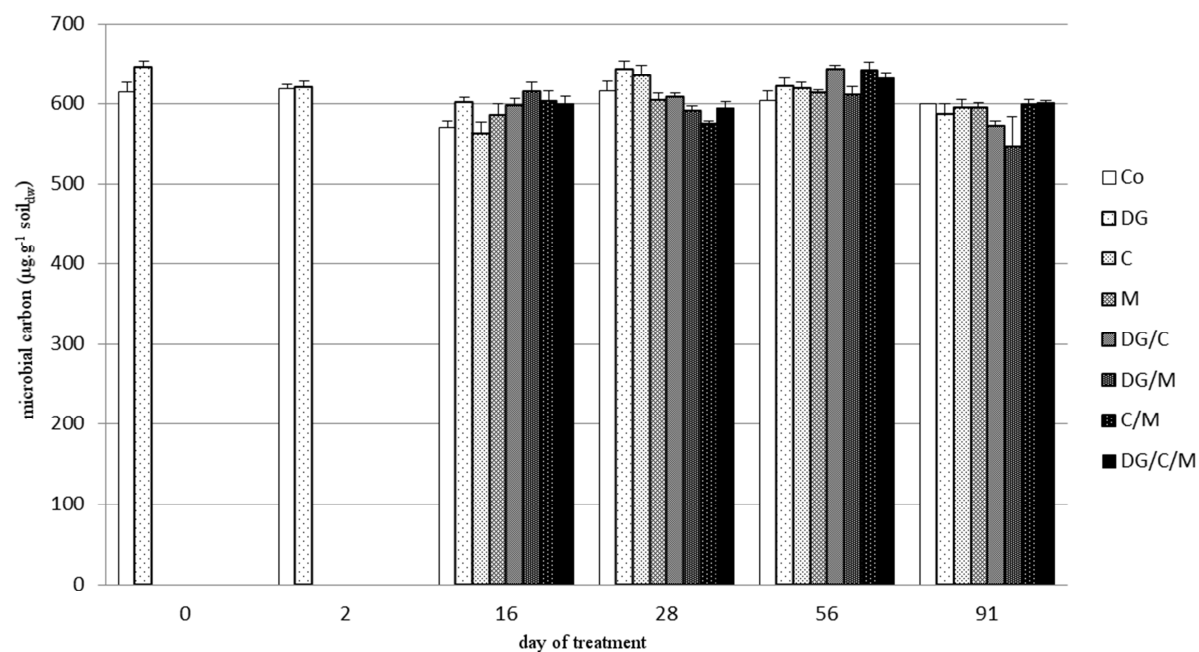
Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.-P., and Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 7, 1985–1995.

Vance, E.D., Brookes, P.C., and Jenkinson, D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703–707.

Wainwright, M. (1978). A Review of the Effects of Pesticides on Microbial Activity in Soils. *J. Soil Sci.* 29, 287–298.

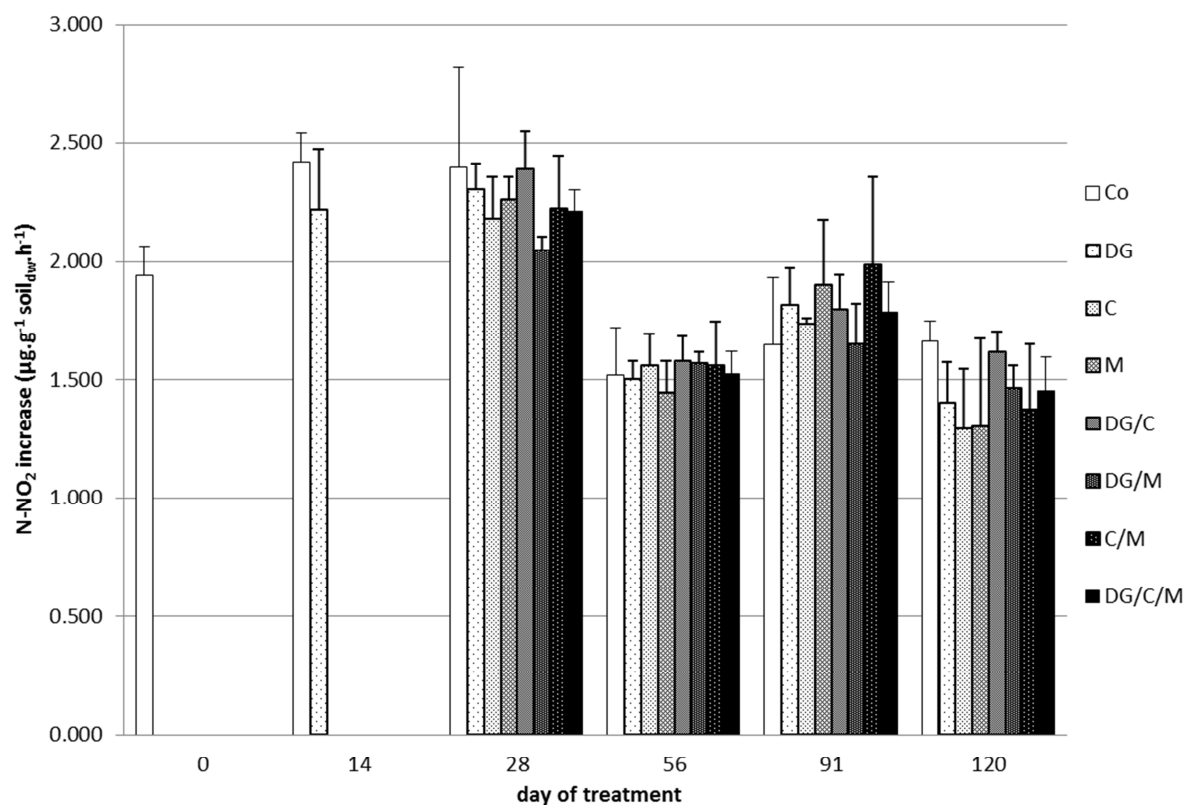
Wardle, D.A., and Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant Soil* 122, 21–28.

SUPPLEMENTARY DATA

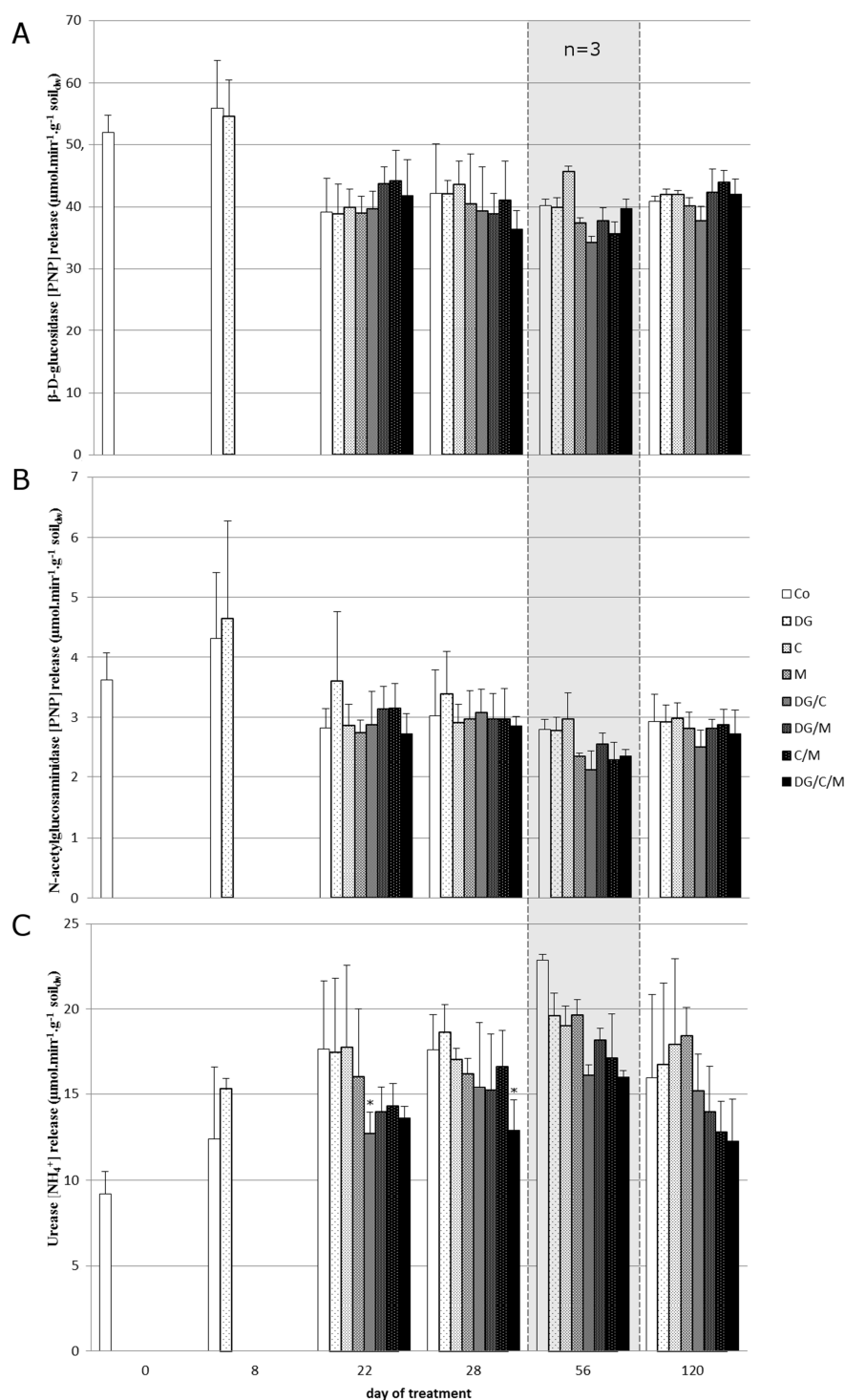


Supplementary data 1 - Microbial carbon content in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$,) according to one-way ANOVA analysis. Values for days 14, 22 and 120 were not determined.

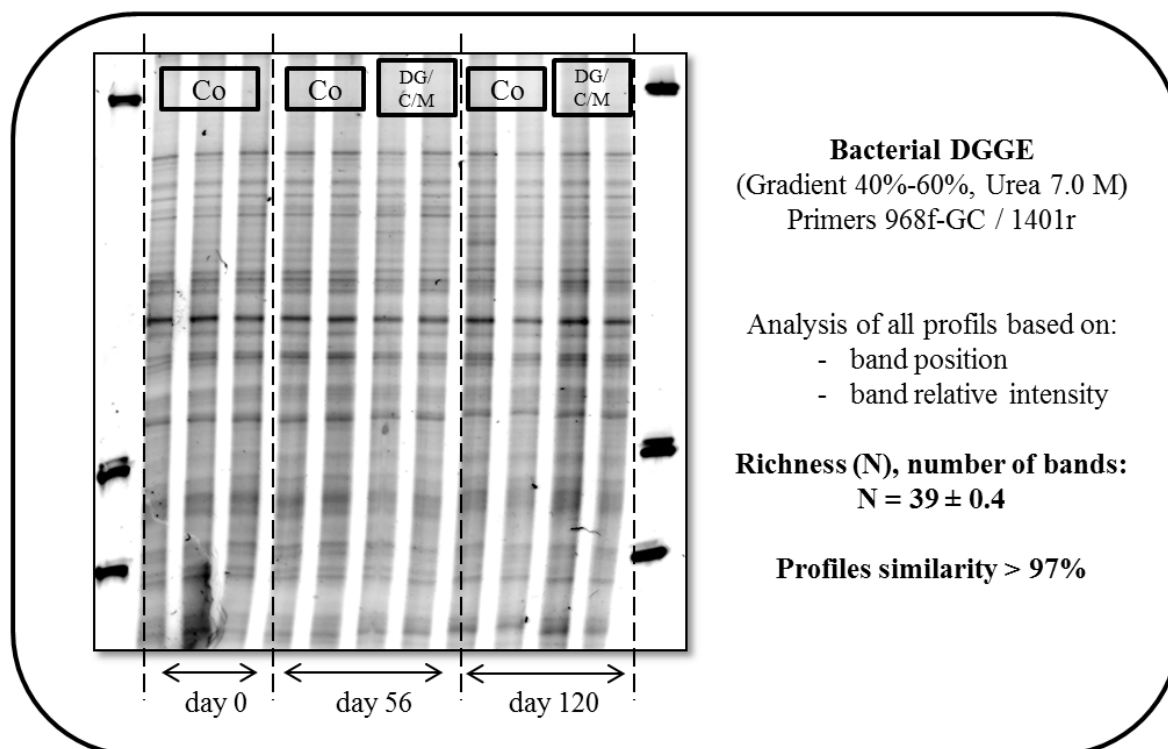
- Chapitre 5 : Devenir des mélanges herbicides et impacts sur les communautés microbiennes du sol de Limagne -



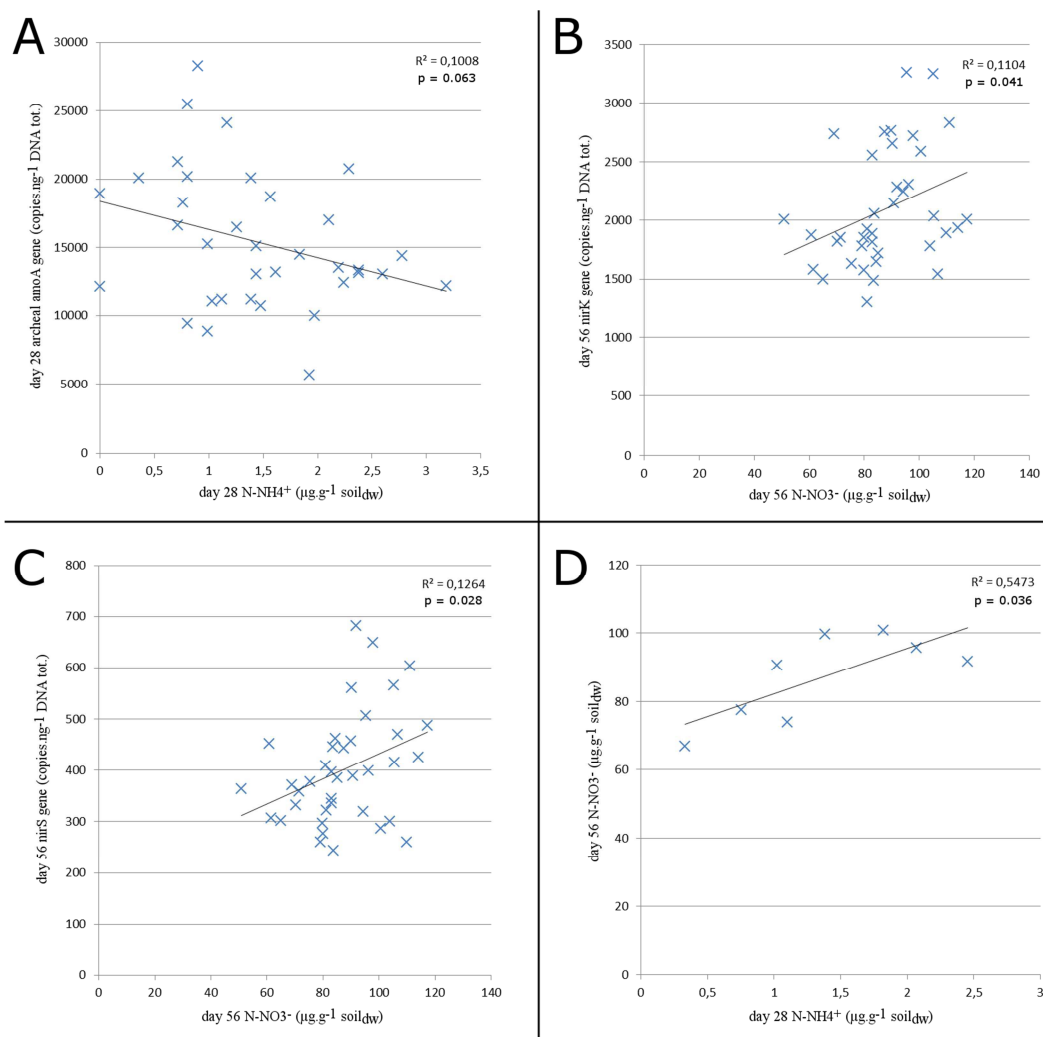
Supplementary data 2 - N-NO₂ increase during potential nitrification kinetics in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$), according to one-way ANOVA analysis. Values for days 2, 8, 16 and 22 were not determined.



Supplementary data 3 – Soil potential enzymatic activities in control (Co) and treated microcosms (1 herbicide; Dual Gold Safeneur: DG, Callisto: C, Milagro: M, 2 herbicides; DG/C, DG/M, C/M, 3 herbicides; DG/C/M). Activities were estimated by [PNP] release kinetics for β -D-glucosidase activity (A) and N-acetylglucosaminidase activity (B), and by [NH_4^+] release kinetics for urease activity (C). Bars labeled with a * are different from control value at a given sampling date ($p < 0.05$), according to one-way ANOVA analysis. Values for days 2, 14, 16 and 91 were not determined. Only 3 replicates per treatments were used for day 56 analyses ($n=3$).



Supplementary data 4 – Example of bacterial diversity analysis using bacterial DGGE primers: 968f-GC and 1401r. Samples were taken from control (Co) and triple treatment (DG/C/M) microcosms, at days 0, 56 and 120. Profiles similarity was assessed on the basis of an UPGMA construction based on the Pearson's correlation.



Supplementary data 5 – Correlations between N-cycle related parameters. A: Correlation between N-NH₄⁺ content at day 28 and archeal amoA gene copies at day 28. B: Correlation between N-NO₃⁻ content at day 56 and nirK gene copies at day 56. C: Correlation between N-NO₃⁻ content at day 56 and nirS gene copies at day 56. D: Correlation between N-NH₄⁺ content at day 28 and N-NO₃⁻ content at day 56.

DES REPONSES POUR LE SOL DE LIMAGNE : QUID D'UNE GENERALISATION DES EFFETS OBSERVES ?

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude nous permet de conclure à un effet modéré des mélanges herbicides dans le sol de Limagne. Afin de confirmer les observations actuelles, des analyses sont en cours, notamment la diversité génétique des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes. Toutefois, le manque de résultats sur les activités de ces communautés représente une limite majeure à nos futures conclusions.

Une autre limite de cette étude réside dans le fait que nous sommes en mesure d'apporter des réponses uniquement pour un sol donné : le sol de Limagne. Ce sol présente des caractéristiques très particulières, avec des fortes teneurs en argile et en matière organique. Or, l'action de ces différentes composantes sur les pesticides, mais également sur les communautés microbiennes (*Cf. Chapitre 1*) ne nous permettra jamais de généraliser ces effets à l'ensemble des sols agricoles pouvant recevoir les molécules herbicides de cette étude. Cependant, l'ensemble de nos études (Chapitres 2 et 5, Crouzet et al., 2010, 2013) pourrait à terme apporter des conclusions à une échelle plus locale (plaine de la Limagne).

Comme évoqué en fin de **Partie I**, ces travaux de thèse font partie d'un projet (DevImCocMic) au sein du programme EC2CO, qui vise à caractériser le devenir et les impacts des mélanges d'herbicides sur les communautés microbiennes du sol, en proposant **une comparaison inter-sols**. L'étude sur le second sol ayant été initiée début 2013, les résultats et leurs analyses sont en cours.

L'un des objectifs de ce programme est de caractériser des indicateurs de pollution aux herbicides. Parmi les communautés candidates, les microorganismes phototrophes représentent des cibles de choix, de par leur métabolisme proche des cibles d'actions des molécules herbicides présentes chez les plantes. Ayant pu réaliser et mener à terme ce travail sur les communautés phototrophes des deux sols, ces résultats sont présentés dans le chapitre qui suit.

CHAPITRE 6 : ETUDE DES EFFETS DES MELANGES D'HERBICIDES SUR LES COMMUNAUTES PHOTOTROPHES DE DEUX SOLS

En tant qu'organismes non-cibles des herbicides, mais partageant des caractéristiques communes avec les plantes supérieures (appareil photosynthétique), les communautés phototrophes représentent des candidats idéaux pour l'évaluation de la toxicité des molécules herbicides.

Durant ces travaux de thèse, nous avons initié à l'aide d'échantillons du sol de Limagne entres autres, la mise au point d'outils moléculaires plus adaptés dans la caractérisation des communautés phototrophes du sol (**Annexe 2**).

L'étude qui suit compare les effets des mélanges herbicides composés de S-métolachlore (Dual Gold Safeneur[®]), mésotrione (Callisto[®]) et nicosulfuron (Milagro[®]) sur la recolonisation par les communautés phototrophes de surface, de microcosmes de sols provenant de la Limagne (type vertisol) et de Versailles (type luvisol, Figure 26). Nous avons pour ce faire privilégié une analyse exhaustive du contenu pigmentaire par HPLC.

Les résultats obtenus nous renseignent en termes de biomasse et de diversité des phototrophes de ces sols et permettent de conclure de façon plus robuste, grâce à cette comparaison inter-sols, sur les risques écotoxicologiques de ces mélanges herbicides.



Figure 26 – Communautés phototrophes de surface du sol de Versailles d'un microcosme contrôle, après 56 jours d'expérimentation.

Ces travaux ont fait l'objet d'une soumission dans la revue **Ecotoxicology**.

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

Soil surface colonization by phototrophic indigenous organisms, in two physicochemically contrasted soils treated by formulated maize herbicide mixtures, including S-metolachlor, mesotrione and nicosulfuron.

Pierre Joly^{ab}, Benjamin Misson^{ab}, Fanny Perrière^{ab}, Frédérique Bonnemoy^{ab}, Muriel Joly^{cd}, Florence Donnadiou-Bernard^{ab}, Jean-Pierre Aguer^{ab}, Jacques Bohatier^{ab} and Clarisse Mallet^{ab}

a : Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, F-63000 Clermont Ferrand, France

b : CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, F-63177 Aubière, France

c : Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, F-63000 Clermont Ferrand, France

d : CNRS, UMR 6504, Institut de Chimie de Clermont Ferrand, F-63177 Aubière, France

*Corresponding author : Pierre Joly, CNRS-UMR 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand II, 63177 Aubière, France.

Phone : (+33)-4-73-40-74-53 Fax : (+33)-4-73-40-76-70

Email : pjoly@gmail.com

ABSTRACT

Soil phototrophic microorganisms, contributors to soil health and food webs, share common characteristics with plants. Current agricultural practices employ mixtures of pesticides to ensure the crops yields and can potentially impair these non-target organisms. However despite this environmental reality, studies dealing with pesticides mixtures, moreover on soil phototrophic microorganisms, are scarce. We designed a three months microcosms study to assess the ecotoxicity of realistic herbicide mixtures of formulated S-metolachlor (Dual Gold Safeneur[®]), mesotrione (Callisto[®]) and nicosulfuron (Milagro[®]) on phototrophic communities of two soils (Limagne vertisol and Versailles luvisol), by using a simple HPLC method. The soils presented different colonizing communities, with Diatoms and Chlorophyceae dominating communities in Limagne soil and Cyanobacteria and Bryophyta communities in Versailles soil. The results highlighted the strong impairment of Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms on the biomass and the diversity of both soil phototrophic communities, with no resilience after a delay of three months. This study also excluded any significant mixture effect on these organisms for Callisto[®] and Milagro[®] herbicides. We strongly recommend to carry on extensive soil studies on S-metolachlor and its commercial formulations, in order to reconsider its use from an ecotoxicological point of view.

INTRODUCTION

Soil is a complex matrix with a high richness in term of microbial diversity, including small Eukaryote, Bacteria and Archaea. Its top-layer can be colonized by phototrophic microorganisms such as Chlorophyceae, Diatomeae, Xanthophyceae and Cyanobacteria (Buscot and Varma, 2006; Metting, 1981; Zancan et al., 2006) which can play major roles in carbon and nitrogen cycle, such as certain Cyanobacteria which can fix atmospheric nitrogen. These organisms are thus well anchored in soil health and food webs according to the above-cited specificities, and their contribution to primary production can reach up to 10 % of total microbial biomass in farmland soils (Reisser, 2007; Shimmel and Darley, 1985). Moreover, microbiotic crusts of soil surfaces (assemblages of non-vascular plants including mosses, algae, lichens, fungi, bacteria) stabilize the soil against water and wind erosion, increasing landscape stability (Eldridge and Greene, 1994). Thus, impacts on soil surface phototrophic communities can indirectly act on soil functioning and needs to be properly investigated. Due to their metabolic pathway close to higher plants, microalgae and cyanobacteria are major targets of herbicides molecules compared to the often studied bacteria and fungi, in microbial ecotoxicology studies. Acquisition of knowledge on the diversity and the functioning of soil phototrophic communities and their responses to herbicides contaminations represent a major issue in order to identify good pollution indicators in soil (Bérard et al., 2004; Zancan et al., 2006).

In an evolution context of agricultural practices we assist nowadays to the use of herbicide mixtures applied at low rates compared to the past banned molecules. One example is the case of atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-iso-propylamino-1,3,5-triazine), a member of the triazine class of herbicides, banned due to its high toxicity on numerous organisms (Graymore et al., 2001), and replaced by herbicides mixtures, like S-metolachlor (a maize pre-emergence herbicide) associated with mesotrione and nicosulfuron (two maize post-emergence herbicides). However, compared to literature on single pesticide impacts in soil (see for review Lo, 2010 and Puglisi, 2012), studies dealing with pesticide mixtures are scarce. Moreover, studies dealing with herbicides impacts on phototrophic communities are mostly done on freshwater ecosystems (see for review Pesce et al., 2011) compared to soil (Bérard et al. 2004; Crouzet et al., 2013; Pipe, 1992). Non-regarding the ecosystems, these studies often use pesticides alone and at unrealistic doses. It is thus important to perform realistic studies,

regarding the soil phototrophic communities worth and the lack of knowledge in literature for this ecosystem.

In the actual ecotoxicological context, we found relevant to study the impact of herbicides mixtures, following the agronomical reality, during a 3 months microcosms study using commercial formulations of S-metolachlor (Dual Gold Safeneur[®], acting on very long chain of fatty acids synthesis), mesotrione (Callisto[®], acting on carotenoids precursors synthesis) and nicosulfuron (Milagro[®], acting on branched-chain amino-acids synthesis). We sprayed them on two different soils and analyzed the colonization of surface phototrophic organisms by assessing pigment contents, in order (i) to determine if there are any impacts on the phototrophic communities regarding to herbicides treatments, (ii) to know at which scale (biomass and/or diversity), and (iii) to state on a potential resilience of phototrophic organisms facing herbicides stresses.

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL DESIGN

Topsoil (0-10 cm) was collected (i) in June 2011 from a black soil, close to vertisol located in the Limagne plain near Clermont-Ferrand (45°47'6" N, 3°11'11" E, Alt: 320 m) and (ii) in March 2013 from a luvisol located in Versailles (48°48'14" N, 2°5'10" E, Alt: 120 m). The chosen soils present strong differences in term of texture and organic matter content (Table 1). The following experimental design description has been run directly after soil collection, in 2011 for Limagne soil and in 2013 for Versailles soil.

Table 1 - Physicochemical properties of the study soils, determined using standard protocols of the Arras Soil Analysis Laboratory (INRA, France)

Soil	% sand	% silt	% clay	pH	Cationic exchange capacity (cmol ⁺ .kg ⁻¹)	Organic matter (g.kg ⁻¹)	Organic carbon (g.kg ⁻¹)	Total nitrogen (g.kg ⁻¹)	Carbon/ Nitrogen ratio
Limagne	8	33	59	8.1	34.6	54.9	31.8	2.59	12.2
Versailles	16	63	21	7.2	9.4	16.7	9.7	0.92	10.2

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

Soil has been sieved (mesh size 5 mm) in a large polyvinyl chloride (PVC) tank, and adjusted to 50% (Limagne soil) and 40% (Versailles soil) of its maximal Water Holding Capacity (WHC). Prepared soil was then separated in crystal polystyrene (CP) microcosms (140g of prepared soil in each CP boxes, length: 90 mm, width: 60 mm and height: 50 mm), previously checked for their absence of interaction with the herbicides molecules used in the study. Microcosms were randomly regrouped in a unique enclosure of 150 mm height, covered with porous plastic film allowing air exchange while limiting soil dehydration and pre-incubated for 2 weeks in an experiment room at $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, with a day/night cycle (14:10) ensured by an artificial light (Osram-L-36 W/964, 750 lux). The soil water content was adjusted weekly with deionized water thorough the experiment.

Afterward, herbicides treatments at the recommended field rates (Table 2) were performed by spraying herbicides diluted in de-ionized water on microcosms surface (5400 mm²), using a TG-470 airbrush (Fraulein 3°8).

Table 2 - Herbicide doses for microcosms treatment, according to Syngenta recommendations

Formulated compound (f.c.)	Active ingredient (a.i.)	Hectare dose of f.c. (L)	a.i. per hectare (g)	Microcosm dose of f.c. (μL)	a.i per microcosm (μg)
Dual Gold Safeneur [®]	S-metolachlor	2.1	1921.5	1.134	1038
Callisto [®]	mesotrione	1.5	150	0.81	81
Milagro [®]	nicosulfuron	1.5	60	0.81	32.4

In order to respect the reality of treatments, herbicides were sprayed following a classic agricultural schedule: half of the microcosms were treated with Dual Gold Safeneur[®] (day 0 of experiment) in a first application and 2 weeks later (day 14 of experiment) treatments with Callisto[®] and/or Milagro[®] were performed in a second application, in order to obtain a set of 8 treatments conditions: Control microcosms without herbicides (Co), Dual Gold Safeneur[®] treatment (DG), Callisto[®] treatment (C), Milagro[®] treatment (M), Dual Gold Safeneur[®]+Callisto[®] treatment (DG/C), Dual Gold Safeneur[®]+Milagro[®] treatment (DG/M), Callisto[®]+Milagro[®] treatment (C/M) and Dual Gold Safeneur[®]+Callisto[®]+Milagro[®] treatment (DG/C/M). Experiment was conducted during 3 months and sampling was performed on days 0, 28, 56 and 91. For each sampling date, three randomly chosen microcosms from each treatment set were sacrificed and total soil surface of each microcosm (6g) was sampled. Soils

samples were then separated in two aliquots: 1g for DNA analyses stored at -80°C prior to extraction and 5 g for pigments analyses, extracted directly after sampling.

PIGMENTS EXTRACTION AND ANALYSES

Pigments were extracted directly after sampling, by mixing each 5 g with 5 mL of 90% acetone and shaking for 15 h in the dark at 4°C. After centrifugation, supernatants were collected and stored at -80°C prior to analyses. HPLC method was conducted as described by Zapata et al. (2000), using a Waters equipment, including a Waters 600 controller, a Waters in-line degasser AF, a Waters 717 Plus Autosampler (200 µl loop) and a Waters 2996 photodiode array detector. A Waters Symmetry C₈ column (150 x 4.6 mm, 3.5 µm particle size) was used as stationary phase. Mobile phase was constituted of two eluents (Table 3). Eluent A was a mixture of methanol:acetonitrile:aqueous pyridine solution (0.25 M pyridine, pH 5.0) (50:25:25 v:v:v) and eluent B was a mixture of methanol:acetonitrile:acetone (20:60:20 v:v:v). The flow rate was fixed at 1 mL.min⁻¹.

Table 3 – Gradient profile used for HPLC measurements

Time (min)	A: Methanol:acetonitrile:aqueous pyridine (50:25:25 v:v:v)	B: Methanol:acetonitrile:acetone (20:60:20 v:v:v)
	%A	%B
0	100	0
22	60	40
28	5	95
42	5	95
44	100	0

Pigments were detected by diode-array spectroscopy (350 – 750 nm), using Empower 3 software (© 2010, Waters Corporation) acquisition system. Absorbance chromatograms were extracted at 440 and 660 nm. Major pigments were identified by co-chromatography with authentic standards and by diode-array spectroscopy (wavelength range: 350 to 750 nm, 1.2 nm spectral resolution). Pigments standards (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, fucoxanthin) and pigment mixture were purchased at DHI lab products (Denmark). Results were expressed in µg.g⁻¹ of soil (dry weight).

MAIN PHOTOTROPHIC COMMUNITIES IDENTIFICATION

Fresh samples of dominant phototrophic communities were sampled for phenotypic analyses under an epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M). Additionally to white light, blue light (excitation wavelength: 470nm) was used to highlight the naturally occurring fluorescence of cells (autofluorescence).

Because of the lack of molecular tools to study terrestrial phototrophic microorganisms, we adapted, in parallel of the Limagne soil experiment a molecular method to study these microorganisms at the community level in terrestrial ecosystems (Misson et al., *in prep*). The use of molecular tools in this study were only made in the purpose of identifying the major phototrophic communities present on the two soils and potentially associate these results to microscopic identifications and pigments contents. Thus, approaches used to access these information were different between the two soils and period of analyses, with a more exhaustive approach for the Limagne soil compared to Versailles soil where we decided to target our analyses. Briefly, after classical DNA extraction of total soil surface samples in Limagne soil (FastDNA® Spin Kit For Soil ; MP Biomedicals) and on dominant phototrophic communities in Versailles soil (QIAamp® DNA Mini Kit ; Qiagen) following manufacturer's instructions, we targeted 23S plastidial rRNA gene according to Sherwood et al. (2008), using the primer set p23SrV_f1 (5'-GGACAGAAAGACCCTATGAA-3') et p23SrV_r1 (5'-TCAGCCTGTTATCCCTAGAG-3'). The size of the PCR products was checked by electrophoresis on a BET stained 1% agarose gel. For Limagne soil, DNA amplifications were cloned into pGEM-T vector system II (Promega) for producing plasmids containing the targeted plastidial p23S inserts. The correct size of the inserts of white colonies was checked by PCR and electrophoresis on a BET stained 1% agarose gel. Pure PCR products from the two soils communities were then purified by ExoSAP-It (USB) and sequenced by MWG Eurofins. Sequences affiliations were performed through the use of BLAST.

STATISTICAL ANALYSES

Quantified pigments were compared at a given sampling date between treatment conditions, after normality and homoscedasticity controls, using one-way ANOVA analyses followed by the Tükey post-hoc test (using PAST software (v. 2.17b; Hammer and Harper, 2008).

Principal component analyses (PCA) with hierarchical cluster analyses (hca) were run at each sampling date for all treatments conditions, using absorbance chromatograms signatures of the samples (R software v. 3.02; R Development Core Team, 2008).

RESULTS

SOIL COLONIZATION BY PHOTOTROPHIC ORGANISMS

Nutrients contents (*i.e.* ammonium and nitrates) remained available during all the experiment for both soils and so, were not limiting factors for the development of microcosm’s communities (data not shown). Limagne soil surface colonization was characterized by the development of “brown” and “green” mats on soil particles (Figure 1, picture A).

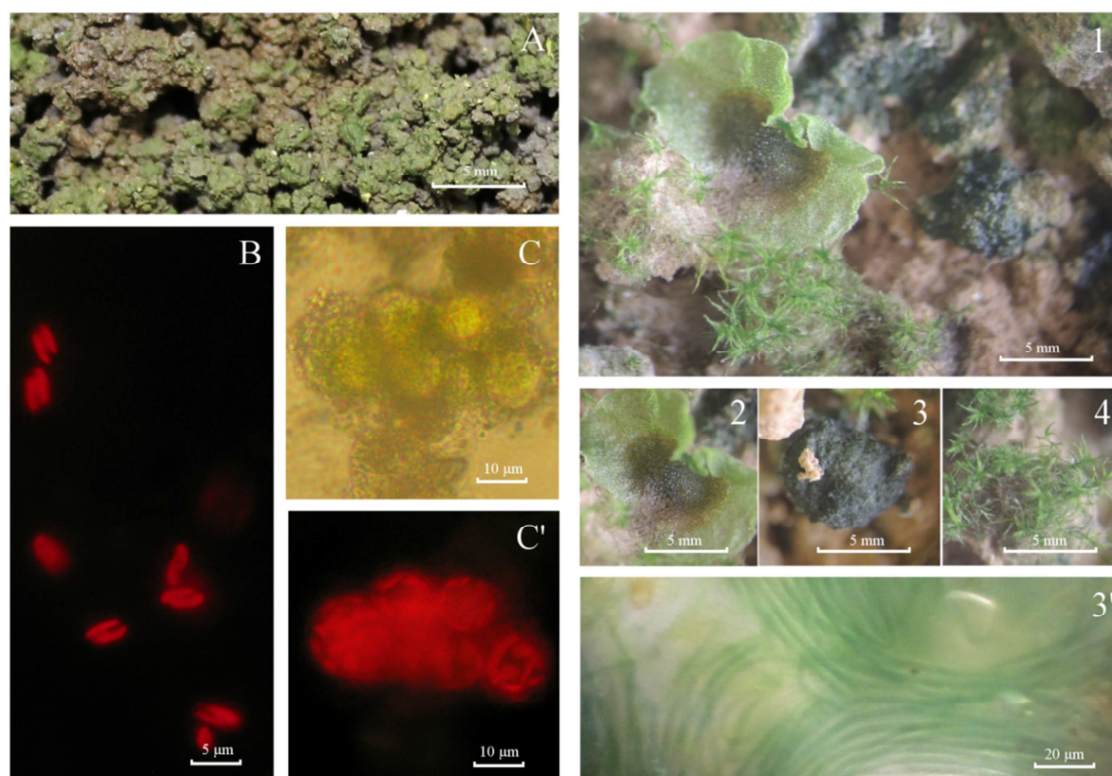


Figure 1 - Soil surface colonization by phototrophic organisms, observed on Limagne (Letters) and Versailles (Numbers) untreated soils after 91 days of experiment. General view of Limagne communities organization on soil surface with dominant “green” and “brown” mats (A). Diatoms related structures (B) from “brown mat” sample observed with epifluorescence microscope under blue light excitation (470 nm). Chlorophyceae related structures (C and C’) from “green mat” observed sample with epifluorescence microscope under white (C) or blue (C’) light excitation (470 nm). General view of Versailles communities organization on soil surface with both macroscopic structures and “dark green” mats (1). Phenotypically unidentified plant structures (2). Filamentous cyanobacteria related

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

structures (3 and 3') from "dark green mat" sample (3) observed with regular optic microscope (3'). Bryophyta related macroscopic structures (4).

Microscopic analyses revealed characteristic siliceous structures of Diatoms dominating in "brown" mats (picture B) and of Chlorophyceae in "green" mats (pictures C and C'). The presence of these communities has been molecularly confirmed (see as an example Supplementary data 1, kindly provided by Mr. Misson), whatever the considered treatment (> 90% of total clones sequences). Versailles soil surface presented a different colonization with the development of both macroscopic structures and "dark green" mats on soil particles (Figure 1, picture 1). However the molecular approaches were not discriminant enough to associate our microscopic observations to a taxonomic rank more accurate than the division or the class ranks (99% of the amplified sequences matched to multiple genus). The mats were filamentous Cyanobacterial (pictures 3 and 3') affiliated to *Anabaena cylindrica* or *Nostoc punctiforme*. The major macroscopic structures colonizing the soil surface were related to Bryophyta affiliated to *Batramia pomiformis*, *Bryum caespitium*, *Orthotrichum sordidum* or *Syntrichia rurali* (picture 4). Phenotypically unidentified plant structures were occasionally observed (picture 2) and were affiliated to Pteridophyta (*Dryopteris wallichiana*, *Thelypteris navarrensis* or *Nephrolepis biserrata*).

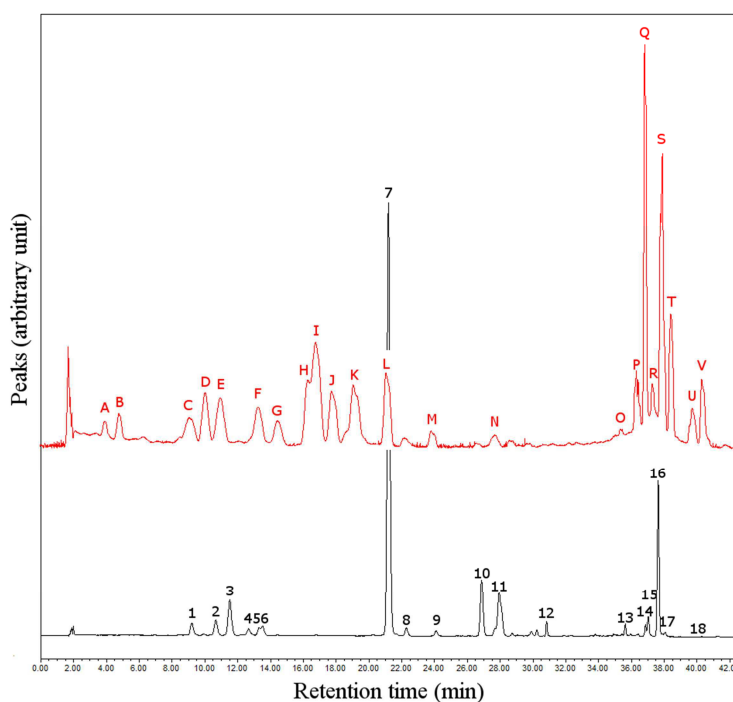


Figure 2 - Maxplot (ranging from 300 to 750 nm) chromatograms from day 91 control samples of Limagne soil (black line) and Versailles soil (red line).

Chromatograms revealed the presence of a maximum of 18 pigments for Limagne soil and 22 for Versailles soil (Figure 2). The major peaks identified were those of the fucoxanthin (7/L), chlorophyll *b* (15/Q), and chlorophyll *a* (16/S) (Figure 2). First pigments contents were measurable at day 28 for Versailles soil and day 56 for Limagne soil with principally fucoxanthin detection. Fucoxanthin dominated the pigment abundance in Limagne soil during all the experiment, whereas the importance of chlorophyll (*a* and *b*) increased with time for Versailles soil (Figure 3).

EFFECTS OF TREATMENTS ON PHOTOTROPHIC COLONIZATION

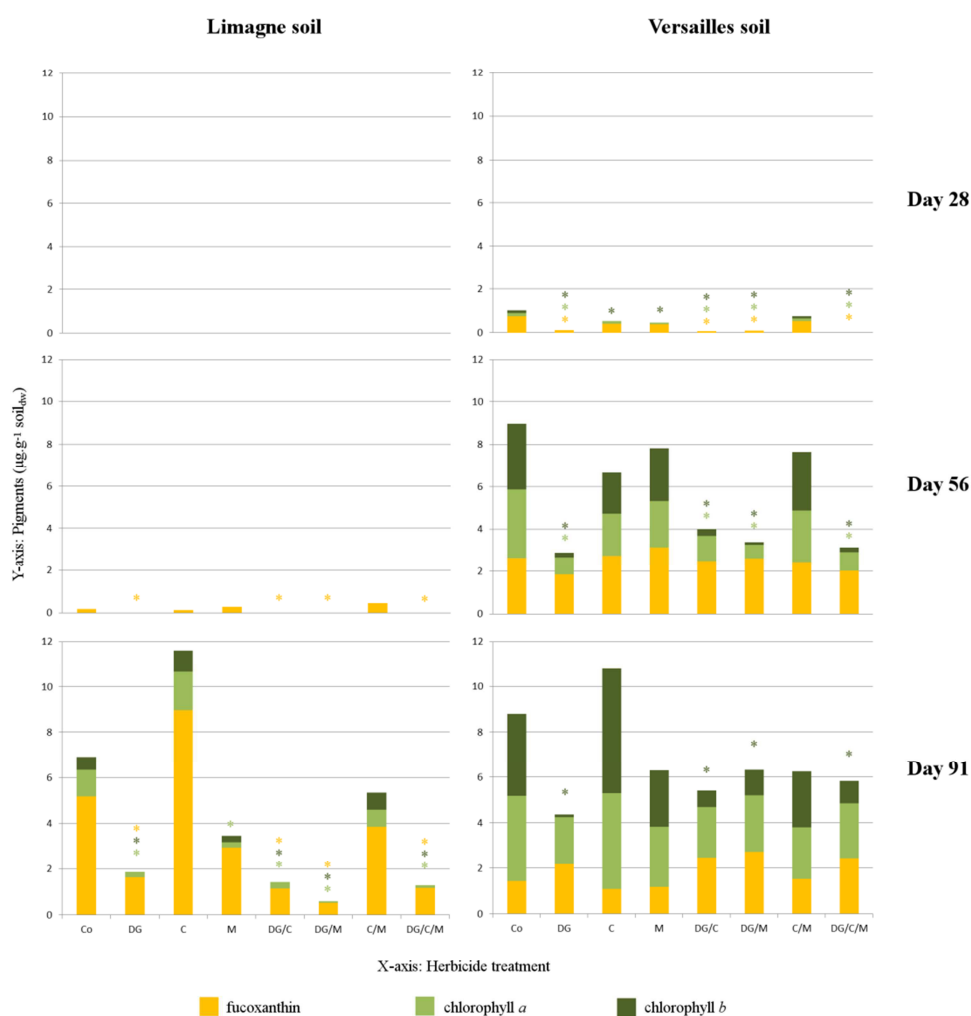


Figure 3 – Fucoxanthin (yellow bars), chlorophyll *a* (light green bars) and chlorophyll *b* (dark green bars) quantities in samples, from Limagne (left side of the figure) and Versailles soils (right side of the figure). For each sampling date pigments quantities are given following the treatment (Control microcosms without herbicides (Co), Dual Gold Safeneur[®] treatment (DG), Callisto[®] treatment (C), Milagro[®] treatment (M), Dual Gold

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

*Safeneur®+Callisto® treatment (DG/C), Dual Gold Safeneur®+Milagro® treatment (DG/M), Callisto®+Milagro® treatment (C/M) and Dual Gold Safeneur®+Callisto®+Milagro® treatment (DG/C/M)). Columns labeled by a * have significantly less pigment (color of the * is related to the corresponding pigment) compared to control samples, at a given sampling date, according to one-way ANOVA analyses followed by a Tükey post-hoc test.*

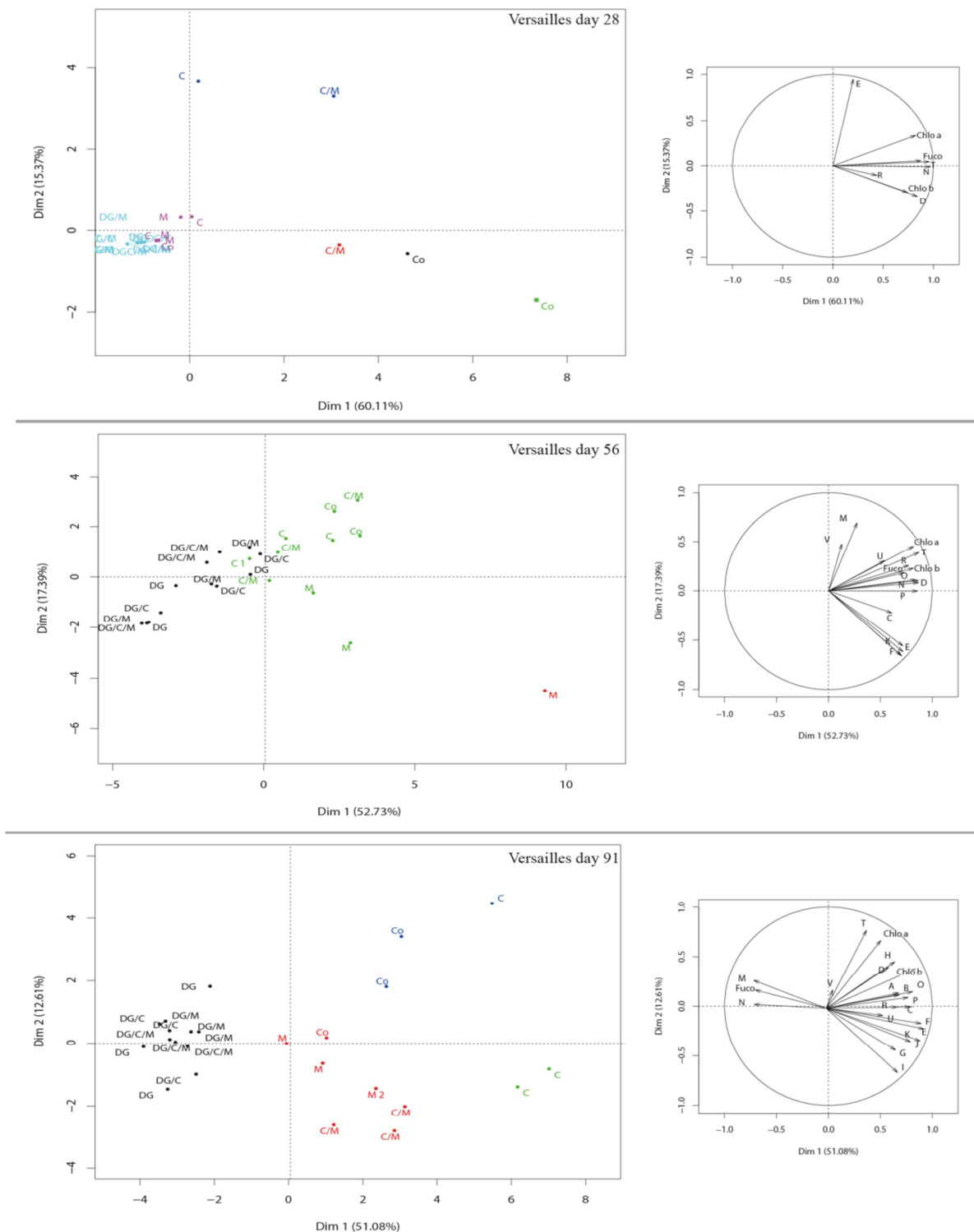


Figure 4 - PCA analysis of pigments chromatograms from Versailles soil at day 28, 56 and 91. Dots in factor maps are given following the treatment (Control microcosms without herbicides (Co), Dual Gold Safeneur® treatment (DG), Callisto® treatment (C), Milagro®

treatment (M), Dual Gold Safeneur®+Callisto® treatment (DG/C), Dual Gold Safeneur®+Milagro® treatment (DG/M), Callisto®+Milagro® treatment (C/M) and Dual Gold Safeneur®+Callisto®+Milagro® treatment (DG/C/M)). Similar samples are grouped by color following a hierarchical cluster analysis (hca).

Soil surface colonization, according to HPLC pigments measurements, occurred since day 28 only on Versailles soil, with the development of both macroscopic and microscopic structures. Pteridophyta and Bryophyta (Figure 1, pictures 2 and 4) were not observed in microcosms treated by Dual Gold Safeneur® herbicide (DG, DG/C, DG/M and DG/C/M), throughout the experiment. At day 28, the three quantified pigments appeared to be significantly lower (fucoxanthin) or absent (chlorophyll *a* and *b*) in Dual Gold Safeneur® treated microcosms compared to Co (Figure 3). Chlorophyll *b* was not quantified at the same date in C and M microcosms. Versailles PCA analysis at day 28 (Figure 4) separated microcosms treated by Dual Gold Safeneur® herbicide (light blue cluster) from other samples (other cluster). At day 56, the same clustering occurred and chlorophyll *a* and *b* were significantly lower in Dual Gold Safeneur® treated microcosms compared to Co in Versailles soil, and were absent in Limagne soil (Figure 3). In this soil, only fucoxanthin pigment was quantified in Co, C, M and C/M microcosms (quantities $< 1\mu\text{g.g}^{-1} \text{ soil}_{\text{dw}}$) and thus, not in Dual Gold Safeneur® treated microcosms.

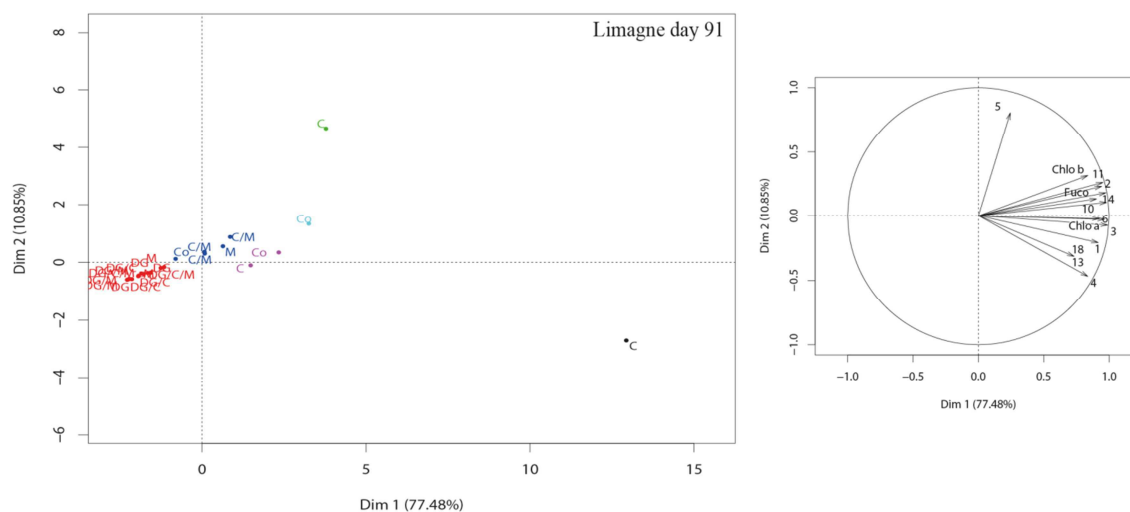


Figure 5 – PCA analysis of pigments chromatograms from Limagne soil at day 91. Dots in the factor map are given following the treatment (Control microcosms without herbicides (Co), Dual Gold Safeneur® treatment (DG), Callisto® treatment (C), Milagro® treatment (M), Dual Gold Safeneur®+Callisto® treatment (DG/C), Dual Gold Safeneur®+Milagro® treatment (DG/M), Callisto®+Milagro® treatment (C/M) and Dual Gold Safeneur®+Callisto®+Milagro® treatment (DG/C/M)). Similar samples are grouped by color following a hierarchical cluster analysis (hca).

At day 91, soil microcosms were all colonized by phototrophic microorganisms. In Limagne soil, all the pigments analyzed were significantly lower in Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms compared to Co (Figure 3). According to the whole pigment analysis (Figure 5), Co, C and C/M microcosms were well separated from Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms (red cluster) in different clusters (mainly dark blue and violet clusters). M microcosms belonged to both red and dark blue clusters. In Versailles soils, only chlorophyll *b* concentrations were significantly lower in Dual Gold Safeneur[®] treatments (Figure 3). The Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms clustering (black cluster) still occurred with a higher separation from the other treatments at this date (Figure 4).

DISCUSSION

The aim of the study was to assess if changes occurred on phototrophic communities depending on herbicides treatments, using pigments analyses by an HPLC method. We chose to identify for each soil the class of communities responsible of the major part of the phototrophic biomass, by using different microscopic and molecular tools, in order to associate pigments signatures to specific communities and try to observe at which scale (biomass and structure) the effects occurred. In so, this study did not pretend to follow the exhaustive diversity of the soil phototrophic organisms facing herbicides stresses (which would moreover need better molecular biology tools optimization).

MICROBIAL PHOTOTROPHIC COLONIZATION

The experiments in microcosms offered the possibility to work with optimal controlled conditions to study herbicide mixtures effects. They were performed identically for the two soils excepted in the choice of the WHC percentage (50% for Limagne soil and 40% for Versailles soil). This difference was due to the fact that Versailles soil at 50% of its maximum WHC was close to sludge state, and so, in order to prevent any exaggerated anaerobic conditions in the soil, we decided to lower the humidity percentage. However the two selected WHC percentages permitted the good distribution of herbicides in the soils and we assumed that the differences observed are not due to this factor, making comparison possible between the two soils. The herbicide concentrations were checked as described by Joly et al. (2012) after initial input of Dual Gold Safeneur[®] (S-metolachlor, day 0), Callisto[®] and Milagro[®]

(respectively mesotrione and nicosulfuron, day 14), and results fitted accordingly to the expected one-fold field rate theoretical concentrations (Table 2). Moreover the three herbicides were retrieved at lower concentrations at day 91, which indicated a dissipation which could be due to biodegradation (personal communication), but also a maintained pollution pressure during all the experiment.

With a comparison of two soils, microscopic and molecular observations highlighted the different diversity of phototrophic communities living on the agricultural soils. Due to the soil properties (Table 1) and these phototrophic diversity differences, the surface colonization in extremely close laboratory conditions, strongly differed between the two soils, and happened faster for Bryophyta and Cyanobacteria on Versailles soil compared to Diatoms and Chlorophyceae on Limagne soil. Surprisingly, cyanobacterial community was not found in the Limagne soil despite the fact that Crouzet et al. (2013) reported their presence in a similar soil (in term of geography and properties), but at a higher WHC (70%). We confirmed this absence by using their molecular method (data not shown), which made us highlight the different phototrophic diversity which occurred in closely related soils.

DUAL GOLD SAFENEUR[®] AS THE MAJOR STRESSOR OF MICROBIAL PHOTOTROPHIC COMMUNITIES

A strong impairment of phototrophic communities occurred in Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms, with both modifications in biomass (significantly less quantified pigments in all Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms for Limagne and Versailles soils (Figure 3), compared to control) and in structure (based on the total pigment content obtained from HPLC measurements with PCA analyses (Figures 4 et 5)). The dose of S-metolachlor active ingredient applied in the recommended field rate application (10 times higher than the doses of mesotrione and nicosulfuron (Table 2)) might be one of the reasons of such impacts. As the second phase of herbicides spraying with Callisto[®] and Milagro[®] did not add additional stresses (DG/C, DG/M and DG/C/M microcosms always regrouped with DG microcosms in PCA analyses), we can exclude any synergistic effects of the herbicides and identify the Dual Gold Safeneur[®] as the only stressor for phototrophic communities in this study. This absence of synergistic effects of these three herbicides as already been observed by using the Microtox[®] test (Joly et al., 2013).

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

In the case of Limagne soil, mainly colonized by Diatoms and Chlorophyceae, both communities were impaired by Dual Gold Safeneur[®], with at day 91 less fucoxanthin (known to be the major pigment of Diatoms) and the absence of chlorophyll *b* (a major pigment of Chlorophyceae, absent in Diatoms; Jeffrey et al., 1997) compared to control. Fucoxanthin is a pigment generally associated to the presence of Diatoms, however in an aquatic study, Ston et al. (2002) showed a small proportion of diatom cells (2%) compared to fucoxanthin pigment concentrations (22%). This suggest that fucoxanthin-containing cells may have contributed to other phototrophic communities, which was furthermore confirmed in the Versailles soil, where specific HPLC dosages of isolated Bryophyta and Cyanobacteria confirmed the presence of small quantites of fucoxanthin (data not shown). Effects of formulated S-metolachlor on soil Diatoms were coherent with already published studies (Debenest et al., 2009; Roubex et al., 2011) which have highlighted the deleterious effect of low doses of metolachlor (racemic form of S-metolachlor) on freshwater Diatoms, by temporally stopping their development.

In the case of Versailles soil, chlorophyll *b* remained statistically lower during all the experiment in Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms, indicating an impact mainly on Bryophyta community (non-exculding other minor phototrophic communities possessing chlorophyll *b* pigment), as mosses are known to possess this pigment (Marschall and Proctor, 2004) unlike the cyanobacterial community. However, important quantities of pigment measured at day 91 for Versailles soil, with equivalent amounts of fucoxanthin and chlorophyll *a* whatever the considered treatment compared to control microcosms (Figure 3), indicated that colonization by phototrophic communities occurred in all microcosms, with a resilience of phototrophic communities in term of biomass and not in term of diversity due to the lack of chlorophyll *b*. This last pigment seemed to slowly increase in Dual Gold Safeneur[®] treated microcosms, indicating a potential long-term resilience of inhibited phototrophic communities.

CALLISTO[®] AND MILAGRO[®] AS NON-SIGNIFICANT STRESSORS OF MICROBIAL PHOTOTROPHIC COMMUNITIES

Callisto[®] and Milagro[®] treated microcosms were always close to control microcosms in term of pigment diversity and content, except for Versailles soil at day 28 (Figure 3 et 4) with a short term impairment, not retrieved thereafter. A clustering for Milagro[®] treated microcosms

occurred at day 91 in Versailles soils (red cluster; Figure 4) and indicated a potential modification trend in phototrophic communities' diversity for this herbicide which was, however, irrelevant due to the presence of a control sample in this cluster.

At day 91 the means of pigments concentrations in Callisto[®] treated microcosms (Figure 3) were non-statistically higher in both soils compared to controls. This trend suggest a stimulation of some adapted phototrophic communities at the presence of this herbicide, maybe by using it as a supplementary source of nutrients, like Cáceres et al. (2008) microalgae and cyanobacterial strains with the insecticide fenamiphos. Interestingly, this increase did not occurred in microcosms treated with both Callisto[®] and Milagro[®] herbicides which underlined potential influence of Milagro[®] on the communities adapted to Callisto[®], as partially underlined by the effect of this herbicide on Limagne's chlorophyll *a*.

In their study on Callisto[®] treated soil microcosms, Crouzet et al. (2013) established at the recommended field rate the "no observable-effect concentration" for the functional and structural parameters of phototrophic community. Except for Versailles soil at day 28, our results fitted accordingly to them for both soils, with no significant modification in concentration and content of pigments in Callisto[®] treated microcosms compared to control.

CONCLUSION

The observed effects on phototrophic communities in this study were all related to the formulated S-metolachlor: Dual Gold Safeneur[®], excluding any potential mixture effects on phototrophic communities. In a delay of three months, no resilience in phototrophic community structure was observed for microcosms treated with this herbicide, whereas the considered soil. The question remained open to establish if the effects were transient or long lasting and could hardly be answered in a longer microcosms study knowing the time depletion of that kind of closed system, which could interfered on the observed effects. However, Versailles soil shown a diminution of the differences in pigments content over-time, which could let us speculate a long-term resilience of impacted microbial phototrophic communities. This study also permitted to exclude any strong effect of Callisto[®] and Milagro[®], used alone or in mixture at the recommended field rate, on the phototrophic communities of the two soils.

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

Metolachlor is known to be a major pollutant of surface water in Europe. This study shown the deleterious effects of the formulated S-metolachlor applied at the recommended field rate on soil phototrophic organisms, as previous work already highlighted it on aquatic phototrophic organisms and at low doses (Debenest et al., 2009; Liu and Xiong, 2009; Roubex et al., 2011). The review report of the European commission on S-metolachlor established in 2004 concluded that under the recommended conditions of use, no unacceptable effects on the environment were observed¹². In so, the authors support the necessity to re-evaluate the S-metolachlor toxicity by carry on extensive soil studies on this molecule, in order to reconsider its use from an ecotoxicological point of view. The development of adapted ecotoxicological field tools to study phototrophic microorganisms seems thus a way to deepen in order to investigate the potential impairment of pesticides on soil and reach the ecosystemic level and the long time monitoring already used in aquatic study (Gregorio et al., 2012). Furthermore, work on phototrophic microorganisms seems to be promising as pollution indicator, not especially by following specific communities but more by assessing the photosynthetic activity directly linked to the pigment biomass, as suggested by Bérard et al., (2004).

REFERENCES

Bérard, A., Rimet, F., Capowiez, Y., Leboulanger, C., 2004. Procedures for determining the pesticide sensitivity of indigenous soil algae: a possible bioindicator of soil contamination? Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46, 24–31.

Buscot, F., Varma, A., 2006. Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions: Roles in Genesis and Functions. Springer.

Cáceres, T.P., Megharaj, M., Naidu, R., 2008. Biodegradation of the pesticide fenamiphos by ten different species of green algae and cyanobacteria. Curr. Microbiol. 57, 643–646.

Crouzet, O., Wiszniowski, J., Donnadieu, F., Bonnemoy, F., Bohatier, J., Mallet, C., 2013. Dose-Dependent Effects of the Herbicide Mesotrione on Soil Cyanobacterial Communities. Arch Environ Contam Toxicol 64, 23–31.

¹² http://ec.europa.eu/food/plant/protection/index_en.htm

Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology* 93, 11–17.

Eldridge, D., Greene, R., 1994. Microbiotic soil crusts - a review of their roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia. *Soil Res.* 32, 389–415.

Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int* 26, 483–495.

Gregorio, V., Büchi, L., Anneville, O., Rimet, F., Bouchez, A., Chèvre, N., 2012. Risk of herbicide mixtures as a key parameter to explain phytoplankton fluctuation in a great lake: the case of Lake Geneva, Switzerland. *Ecotoxicology* 21, 2306–2318.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., 2008. *Paleontological Data Analysis*. John Wiley & Sons.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., Research, I.C. of S.U.S.C. on O., Unesco, 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO Publishing.

Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J., Mallet, C., 2012. Impact of Maize Formulated Herbicides Mesotrione and S-Metolachlor, Applied Alone and in Mixture, on Soil Microbial Communities. *ISRN Ecology* 2012, 1–9.

Joly, P., Bonnemoy, F., Charvy, J.-C., Bohatier, J., Mallet, C., 2013. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere* 93, 2444–2450.

Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquat. Toxicol.* 93, 100–106.

Lo, C.-C., 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *J Environ Sci Health B* 45, 348–359.

Marschall, M., Proctor, M.C.F., 2004. Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. *Ann. Bot.* 94, 593–603.

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes de deux sols -

Metting, B., 1981. The systematics and ecology of soil algae. *Bot. Rev* 47, 195–312.

Pesce, S., Bouchez, A., Montuelle, B., 2011. Effects of organic herbicides on phototrophic microbial communities in freshwater ecosystems. *Rev Environ Contam Toxicol* 214, 87–124.

Pipe, A.E. (1992). Pesticide Effects on Soil Algae and Cyanobacteria. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, G.W. Ware, ed. (Springer US), pp. 95–170.

Puglisi, E., 2012. Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides (EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT No. EN-359). European Food Safety Authority.

R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing., Vienna, Austria.

Reisser, W., 2007. The Hidden Life of Algae Underground, in: Seckbach, D.J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Netherlands, pp. 47–58.

Roubex, V., Mazzella, N., Méchin, B., Coste, M., Delmas, F., 2011. Impact of the herbicide metolachlor on river periphytic diatoms: experimental comparison of descriptors at different biological organization levels. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 47, 239–249.

Sherwood, A.R., Chan, Y.L., Presting, G.G., 2008. Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community. *Mol Ecol Resour* 8, 1011–1014.

Shimmel, S.M., Darley, W.M., 1985. Productivity and Density of Soil Algae in an Agricultural System. *Ecology* 66, 1439.

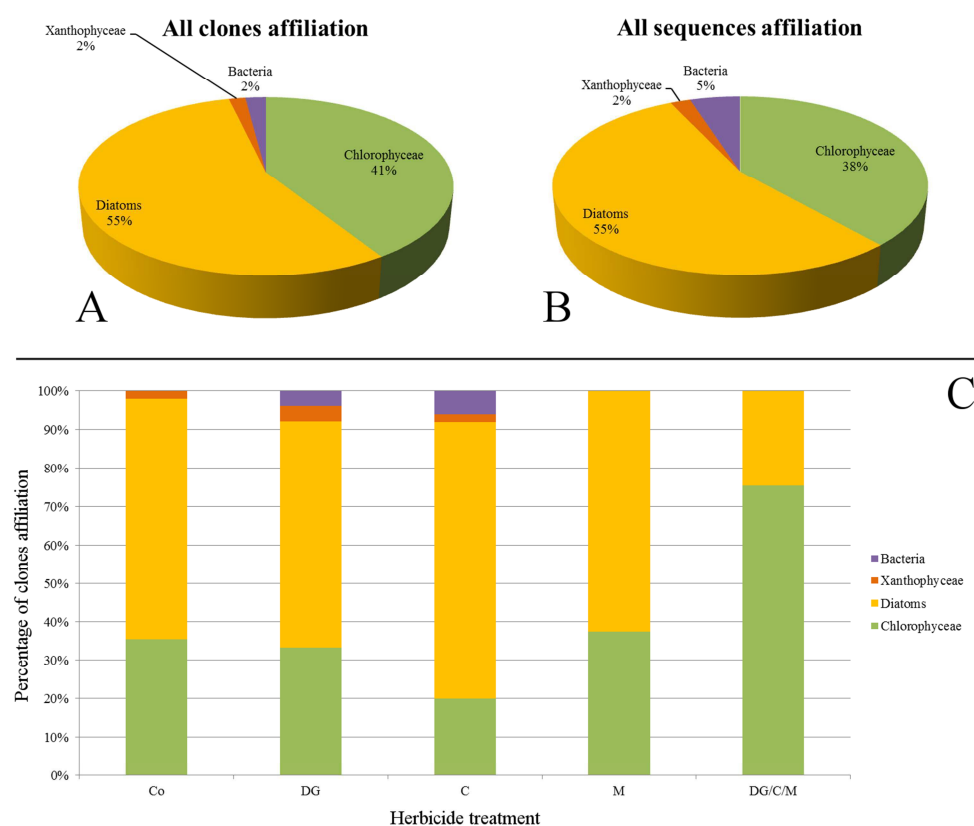
Ston, J., Kosakowska, A., Lotocka, M., 2002. Pigment composition in relation to phytoplankton community structure and nutrient content in the Baltic Sea. *Oceanologia* 44, 419–437.

Zancan, S., Trevisan, R., Paoletti, M.G., 2006. Soil algae composition under different agro-ecosystems in North-Eastern Italy. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 112, 1–12.

- Chapitre 6 : Etude des effets des mélanges d'herbicides sur les communautés phototrophes
de deux sols -

Zapata, M., Rodriguez, F., Garrido, J.L., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser* 195, 29–45.

SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary data 1 – Limagne phototrophic communities sequences diversity at day 56 of experiment, based on a 250 plastidial 23S clones analysis. Affiliations for all clones (A) and associated sequences (B) are given and clones affiliations are presented according to herbicides treatments (Co: control, without herbicide; DG: Dual Gold safeneur; C: Callisto; M: Milagro and DG/C/M: Dual Gold Safeneur/Callisto/Milagro) on the base of 50 clones per treatment (C).



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La problématique liée à l'emploi de mélanges de pesticides dans l'environnement nous a permis de penser et de réaliser des expérimentations permettant d'étayer les connaissances de telles pratiques d'un point de vue toxicologique et écotoxicologique. Les études en microcosmes, ciblant différents niveaux d'organisation des communautés microbiennes du sol (bactériennes, archéennes, fongiques) et des groupes fonctionnels particuliers (du cycle de l'azote et phototrophes), ont permis d'apporter des éléments de réponse sur les effets de mélanges d'herbicides formulés à base de S-métolachlore, mésotrione et nicosulfuron.

Au-delà de l'utilisation des mélanges d'herbicides, l'originalité de ces études réside pleinement dans le fait qu'elles prennent en compte les enjeux liés à leur application dans l'environnement : les mélanges de formulations commerciales choisis sont réalistes, les doses agronomiques sont respectées, tout comme les applications séquentielles. L'ensemble de ces aspects est trop rarement pris en compte dans les études actuelles d'écotoxicologie microbienne, et en cela, les études menées durant cette thèse apportent une réflexion novatrice dans la manière d'appréhender la problématique pesticide.

Lors de la mise en place des expérimentations nous avons fait le choix d'être le plus exhaustif possible dans nos analyses afin de caractériser les effets potentiels des mélanges herbicides dans le système sol (**Chapitre 3**). Après trois années passées à traiter et analyser l'ensemble des informations obtenues nous constatons que l'ampleur des objectifs que nous nous sommes fixés fait qu'une partie des résultats reste encore en attente.

Nous avons pu mener à terme l'analyse de la toxicité des molécules seules et en mélange par l'intermédiaire du test normalisé Microtox[®] (**Chapitre 4**) ce qui nous a permis de mettre en évidence l'importante toxicité des herbicides formulés comparativement aux molécules actives employées seules sur le procaryote *Vibrio fischeri*. Bien que ce type d'étude toxicologique ne prenne pas en compte les interactions existantes au sein du réseau trophique microbien d'un écosystème, elles donnent un aperçu de la toxicité potentielle des molécules. **De plus, nous avons pu exclure toute interaction synergique ou antagoniste des mélanges (formulés ou non) sur cet organisme modèle.** A mon sens, le plus grand apport de cette étude concerne les données de toxicité établies (de CI₅₀) permettant d'alimenter les modèles mathématiques prédictifs. Bien que ces modèles aient échoué pour établir la toxicité d'un des mélanges (Callisto[®] + Milagro[®]), ils se révèlent plutôt justes dans leurs prédictions et, dans le

cas du modèle de Concentration Addition (CA), assez robuste pour être utilisé comme un évaluateur pragmatique et réaliste de la toxicité de ces mélanges herbicides (Altenburger et al., 2000; Berenbaum, 1985). Il serait donc intéressant de réaliser une base de données de la toxicité (courbes dose-réponse) de chaque produit pesticide, dans l'optique d'identifier rapidement, par l'intermédiaire de ces modèles, les mélanges pouvant s'avérer toxique.

QUELLES REPONSES POUR LE SOL DE LIMAGNE ?

Les données obtenues sur le sol de Limagne permettent de dresser un premier compte-rendu de l'effet des mélanges herbicides. **D'un point de vue général, il est intéressant de noter que les communautés microbiennes de ce sol sont faiblement impactées par les mélanges d'herbicides (Chapitre 5), en témoignent les analyses de diversité réalisées par *fingerprinting*, d'activités potentielles (nitrification et hydrolytiques) et de biomasse microbienne.** Cette stabilité n'est pas uniquement constatée dans la comparaison microcosmes contrôles / microcosmes traités, mais également au cours du temps, ce qui sous-tend des propriétés uniques à ce sol de Limagne. En effet, lors de notre étude prospective (**Chapitre 2**) ou des travaux antérieurs à cette thèse (Crouzet et al., 2010 ; 2013), jamais une telle stabilité n'avait été observée dans un dispositif de type microcosmes pour un sol de Limagne. Quand on compare le sol utilisé durant cette thèse à ceux utilisés lors des précédents travaux, on remarque que les taux de matière organique et d'argile sont bien plus importants (54,9 g.kg⁻¹ de MO et 59% d'argile dans cette étude, contre 33,5 g.kg⁻¹ de MO et 38% d'argile pour les travaux d'Olivier Crouzet ; et 29,9 g.kg⁻¹ de MO et 36% d'argile dans l'étude prospective). Or, ces deux facteurs sont connus pour leurs fortes interactions avec les molécules organiques type pesticide, ce qui peut expliquer (i) une meilleure protection des communautés microbiennes dans la porosité du sol et/ou (ii) un effet limité des herbicides sur les communautés microbiennes par des mécanismes de sorption/désorption (diminution de la biodisponibilité) et/ou (iii) une stimulation plus importante des communautés microbiennes de par les fortes teneurs en MO, permettant une métabolisation plus efficaces des molécules.

Il est difficile de privilégier une hypothèse par rapport à une autre. Les deux premières expliqueraient très bien la forte stabilité de structure, d'activités potentielles et de biomasse microbienne. La troisième, serait en accord avec la biodégradation efficace des molécules herbicides à court terme, suggérant un métabolisme stimulé de certaines communautés, comme indiqué par la mesure de l'activité de respiration potentielle (SIR).

De plus, les données des dosages des différentes molécules (Chapitre 5) mettent en avant des modifications dans les cinétiques de dissipation, suivant les mélanges d'herbicides.

Ainsi, le nicosulfuron se dégrade mieux en mélange de trois herbicides et la mésotrione voit sa dégradation accélérée (en présence de Milagro[®]), ou ralentie (en mélange de trois herbicides), pour finalement être totalement dissipée en fin d'expérimentation. Pour le S-métolachlore, cette différence de dissipation est plus rapide en présence de Callisto[®] et plus lente en présence de Milagro[®]. Ces différences de dissipation n'avaient pour l'heure jamais été observées dans le cadre de mélanges de pesticides employés à la dose agronomique recommandée. Ces modifications peuvent s'expliquer par une meilleure distribution dans le sol des herbicides en mélange (notamment grâce à l'action des adjuvants), impliquant de ce fait un contact amplifié avec les microorganismes du sol et donc, soit une meilleure dégradation (effet +), soit des effets sur les communautés microbiennes sensibles responsables de la biodégradation (effet -), modifiant ainsi les cinétiques de dégradation. Il est difficile de statuer sur le lien qui unit les molécules d'herbicides et les effets observés. En effet, la mésotrione et le nicosulfuron formulés sont apportés en quantités proches dans les mélanges. De plus, ces molécules ne se distinguent pas spécialement au niveau du nombre d'éléments chimiques de type carbone et azote qu'elles peuvent apporter au système sol en cas de minéralisation complète, ni même au niveau de leur toxicité sur l'organisme modèle *Vibrio fischeri* (**Chapitre 4**) avec des CI_{50} similaires entre les deux formulations commerciales Callisto[®] et Milagro[®]. Les cinétiques de dégradation rapide observées pour la mésotrione pourraient expliquer en partie la dégradation accélérée du S-métolachlore dans le mélange de ces deux herbicides, par des mécanismes de co-métabolisme. A l'inverse, le nicosulfuron se dissipe moins bien, et sa formulation pourrait s'avérer plus toxique pour les communautés microbiennes du sol, expliquant le retard de dissipation observée pour le S-métolachlore dans ce mélange. Nous avons remarqué une perte de ces différents effets en cas de mélange des trois herbicides, avec une cinétique de dissipation identique à celle du S-métolachlore lorsque le Dual Gold Safeneur[®] est employé seul. On peut estimer dans ce cas, qu'une compensation de ces effets de stimulation et d'inhibition s'effectue. **Les chromatogrammes HPLC de dosage des différentes molécules présentent des pics correspondant à la production de produits de dégradation.** Toutefois, l'identification de ces différents produits ainsi que leur dosage n'ont pas encore été effectués, nous pouvons juste ajouter que leur présence, couplée à celle des molécules mères et des adjuvants, contribue à la pression de pollution dans le sol.

L'idée de suivre les cibles d'action des différentes molécules actives herbicides, si tant est qu'elles soient partagées par les communautés microbiennes du sol, fut un des points que nous avons souhaité développer lors de la réflexion pour la mise en place de ces travaux de thèse. Pour rappel, le S-métolachlore cible la formation des longues chaînes d'acides gras (VLCFA), un métabolisme commun à de nombreux organismes, ce qui nous a conduit à estimer ses effets, couplés à ceux des autres herbicides, par des analyses globales sur la structure, l'abondance et les activités des communautés microbiennes (**Chapitre 5**). Seule la mésotrione cible une fonction liée à la photosynthèse : la synthèse des plastoquinones et de l' α -tocophérol, précurseurs d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes. Ainsi, nous avons pu estimer si cette cible d'action particulière est plus préjudiciable pour les communautés phototrophes colonisant la surface du sol comparé aux actions des autres herbicides (**Chapitre 6**). Enfin, le nicosulfuron agit par inhibition de l'acétolactate synthase (ALS), enzyme responsable de la synthèse d'acides aminés essentiels. Nous avons pu voir quels étaient les effets du Milagro[®] sur l'abondance du gène AHAS codant l'acétolactate synthase grâce à nos collègues de l'INRA de Dijon qui travaillent sur les herbicides de la famille des sulfonylurés. Les résultats à court terme (2 et 8 jours après le traitement au Milagro[®], soit 16 et 22 jours après le début d'expérimentation) ne montrent aucune différence pour l'abondance de ce gène que ce soit dans les traitements simples ou en mélanges de 2 ou 3 herbicides (Figure 27).

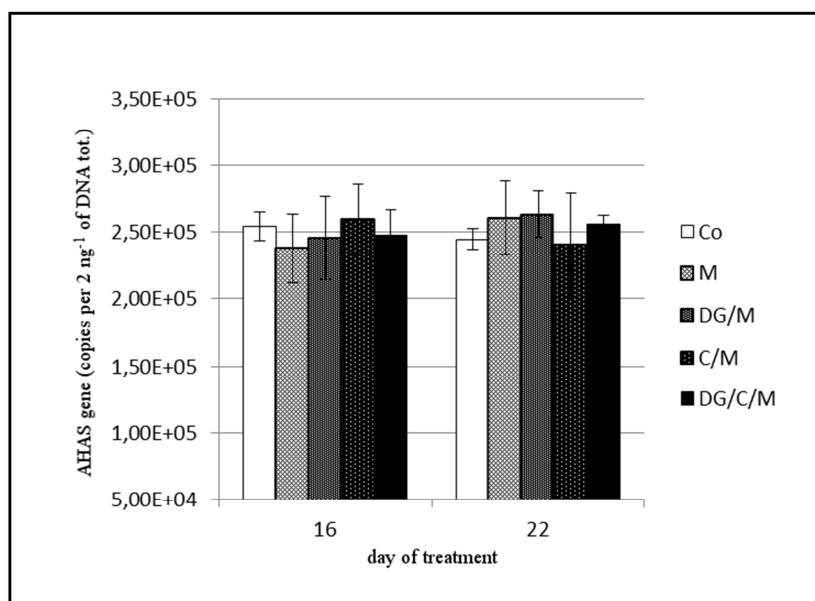


Figure 27 – Abondance de la communauté AHAS dans les microcosmes contrôle (Co) et traités (Milagro : M ; Dual Gold Safeneur/Milagro : DG/M ; Callisto/Milagro : C/M et Dual Gold Safeneur/Callisto/Milagro : DG/C/M). Les abondances ont été estimées par PCR quantitative ciblant le gène fonctionnel AHAS et exprimées en nombre de copies de gènes pour 2 ng d'ADN total du sol.

Ces différentes études (Chapitres 5 et 6) nous ont permis de dresser les conclusions relatives aux effets de l'emploi des mélanges d'herbicides sur le sol de Limagne.

Ainsi, des modifications à court et moyen termes liés à la présence des herbicides sont observées (Figure 28). Une stimulation rapide de l'activité respiratoire potentielle (SIR) est observée dans les microcosmes traités par le mélange de trois herbicides (**Chapitre 5**). Cet effet peut traduire :

- (i) une stimulation directe des populations microbiennes capables de dégrader et d'utiliser les herbicides comme source de nutriments, notamment dans les microcosmes ayant reçu le triple traitement, qui représente donc le plus grand apport exogène. Cette hypothèse est appuyée par la dégradation rapide à court terme des différentes molécules (**Chapitre 5**).
- (ii) un ajout de matière organique labile provenant des organismes morts (sensibles aux herbicides), qui peut stimuler l'activité des organismes non sensibles (protégés, ou résistants, ou dégradants). Parmi ces organismes, nous ne pouvons identifier précisément une communauté, certainement par manque de résolution plus fine lié au choix de nos analyses, mais également de par la forte redondance fonctionnelle existante (Wardle and Parkinson, 1990), qui peut expliquer le peu de variations dans les activités hydrolytiques potentielles suivies. Toutefois, les analyses réalisées sur les communautés impliquées dans le cycle de l'azote mettent en avant une diminution de l'abondance des archées nitrifiantes dans les microcosmes traités par les mélanges d'herbicides (**Chapitre 5**), et les retards de colonisation des communautés phototrophes dans les microcosmes traités au Dual Gold Safeneur[®] (**Chapitre 6**) soulignent la présence de ces communautés sensibles.

Ces différents effets de stimulation peuvent également provenir d'une meilleure utilisation de la matière organique présente dans le sol, par des processus de co-métabolisme favorisés par les apports de matière organique fraîche cités précédemment. Enfin, il n'est pas à exclure que cette augmentation de l'activité respiratoire soit le reflet d'un état de stress généralisé chez les communautés microbiennes résistantes, accroissant de ce fait leur métabolisme basal (Schimel et al., 2007).

Cet effet de stimulation de la respiration et donc d'utilisation de matière organique, est en lien logique avec **l'augmentation des teneurs en ammonium** (processus d'ammonification) observée dans les microcosmes traités par plusieurs herbicides, et notamment après 1 mois d'expérimentation (jour 28), où l'augmentation est maximale (Figure 28).

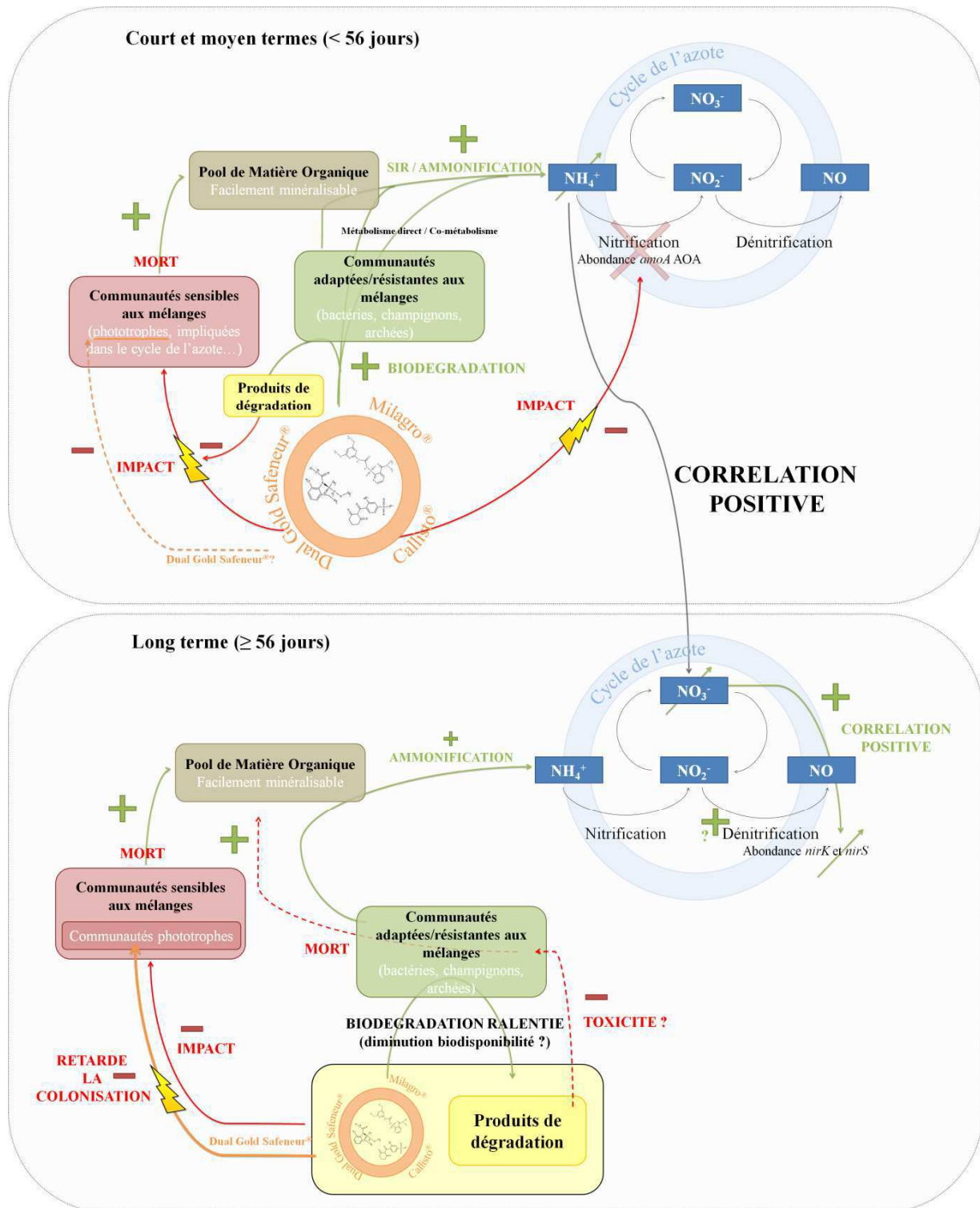


Figure 28 – Schéma de synthèse du devenir et des effets des mélanges d'herbicides employés à la dose agronomique, à court et moyen termes (en haut) et à long terme (en bas), sur les communautés microbiennes du sol de Limagne, dans les conditions expérimentales de cette étude. Les flèches pleines représentent des hypothèses soutenues par nos analyses contrairement aux flèches en pointillés.

Une seconde hypothèse pour expliquer cette augmentation des teneurs en ammonium dans les microcosmes traités serait celle d'un impact sur les communautés nitrifiantes, comme peuvent le laisser supposer les **diminutions d'abondances relevées pour les archées nitrifiantes** (suivi du gène *amoA* AOA) le même jour. L'abondance des archées nitrifiantes est connue pour être supérieure à l'abondance des bactéries nitrifiantes dans les sols, cependant cela ne signifie pas pour autant que leur part d'activité est plus importante dans le phénomène de nitrification (Leininger et al., 2006). Les analyses d'activité de nitrification potentielle (NEA) n'ont pas été en mesure de révéler des impacts sur cette activité, il serait dès lors intéressant de préciser les analyses en se focalisant sur l'étude des transcrits des gènes *amoA* (AOA et AOB), potentiellement exprimés dans le sol.

A plus long terme, une augmentation des teneurs en nitrates est observée dans les microcosmes traités par les mélanges d'herbicides (principalement C/M et DG/C/M), comparativement aux concentrations mesurées dans les microcosmes contrôles (Figure 28). Cette augmentation, initiée au 56^{ème} jour d'expérimentation et vraisemblablement liée à une levée de l'inhibition de la nitrification, est **corrélée aux fortes concentrations en ammonium** mesurées au 28^{ème} jour. De plus, **l'augmentation en nitrates est également corrélée à l'augmentation d'abondance des communautés dénitrifiantes** (suivi des gènes *nirK* et *nirS*) au 56^{ème} jour. Encore une fois, nous ne sommes pas en mesure de faire de lien entre l'abondance et l'activité de ces communautés, mais nous supposons que leur accroissement serait lié à cette accumulation de nitrates. Des analyses complémentaires pour préciser ces effets seraient nécessaires, principalement au niveau des activités de ces communautés spécifiques impliquées dans le cycle de l'azote. Or, les tentatives menées pour extraire la fraction ARN du sol afin d'accéder à l'information codée par les ARN messagers (- de 10% de la fraction ARN totale) sur les processus de nitrification et de dénitrification, se sont avérées vaines. L'une des principales raisons pourrait provenir d'une trop longue conservation des échantillons de sol avant l'extraction des ARN. Nous ne sommes donc pas en mesure d'obtenir ces informations d'activités. Toutefois, afin d'étayer les effets possibles sur les communautés impliquées dans le cycle de l'azote pour ce sol, **des analyses de diversité ciblant les différents gènes de la nitrification et de la dénitrification sont en cours. In fine, ces analyses apporteront peut-être une identification de communautés sensibles, à mettre en lien avec les modifications en teneurs des nutriments azotés et les abondances des gènes ciblés (*amoA*, *nirK* et *nirS*).**

L'analyse des communautés phototrophes colonisant la surface des microcosmes de Limagne révèle la présence majoritaire de Diatomées et de Chlorophycées (Chapitre 6 et Annexe 2). Les herbicides employés n'impactent pas tous ces communautés réputées sensibles de par leur métabolisme proche de celui des adventices ciblées. Comme souligné par plusieurs auteurs (e.g. Accinelli et al., 2002; Bending et al., 2007; Wainwright, 1978) des doses agronomiques de pesticides peuvent ne pas avoir d'effet sur les communautés microbiennes. Tel est le cas dans cette étude pour la mésotrione et le nicosulfuron formulés, qui ne provoquent pas ou peu (Milagro[®] seul après 91 jours) d'effets sur la biomasse et la diversité phototrophe, qu'ils soient employés seul ou en mélanges. **Le Dual Gold Safeneur[®] cependant, réduit significativement et durablement la biomasse phototrophe,** avec des teneurs en pigments toujours significativement plus faibles dans les microcosmes traités par cet herbicide, de façon seule ou mélangée. Cette observation à la dose agronomique recommandée avait déjà été soulignée lors de notre étude prospective (**Chapitre 2**), pour le pigment chlorophylle *a*. La cible d'action du S-métolachlore, la molécule active du Dual Gold Safeneur[®], concerne la formation des longues chaînes d'acides gras : un métabolisme commun à de nombreux organismes. Ainsi, il est difficile d'établir un lien d'effet direct entre cette molécule et les communautés impactées, ce qui nous laisse supposer que les fortes concentrations en S-métolachlore à la dose agronomique (1,038 mg de S-métolachlore par microcosme comparativement aux 81µg de mésotrione et aux 32,4µg de nicosulfuron), peuvent en grande partie être responsables d'un effet toxique aigu sur ces communautés phototrophes de Limagne. En conclusion, l'approche proposée, par analyse totale du contenu pigmentaire par HPLC, s'avère bien adaptée au système sol, et la diversité importante de pigments considérés ainsi que la quantification des pigments majoritaires (chlorophylle *a*, *b* et fucoxanthine) ont permis un regroupement confondant des traitements comprenant le Dual Gold Safeneur[®]. Il s'agit à présent d'optimiser les techniques permettant l'appréciation de la diversité des phototrophes.

Enfin nous avons remarqué une diminution de la vitesse de biodégradation des herbicides avec le temps, suggérant une toxicité des produits de dégradation s'accumulant sur les communautés responsables de leur biodégradation.

VERS DES COMPARAISONS MULTI-SOLS

Les conclusions présentées précédemment ne se rapportent qu'à un seul et unique sol : celui de la Limagne. De plus, le manque d'informations relatives à la diversité des communautés

impliquées dans le cycle de l'azote et surtout à leurs activités, fait qu'il nous est impossible d'apporter de conclusions robustes quant aux effets de ces mélanges herbicides dans l'environnement. En effet, impossible de savoir si l'extrême stabilité de la diversité microbienne générale ou des activités enzymatiques observée pour ce sol, sera identique dans d'autres sols agricoles recevant des cultures de maïs et donc, potentiellement, ce mélange d'herbicides. Ce projet de thèse s'inscrivant dans le cadre d'un projet EC2CO Ecodyn (**Devenir et impacts d'un « cocktail » d'herbicides sur des groupes fonctionnels microbiens: élaboration de bioindicateurs de perturbations**), nous serons bientôt en mesure de comparer l'intégralité de ces résultats avec ceux du second sol choisi : un luvisol en provenance de Versailles (Figure 29).

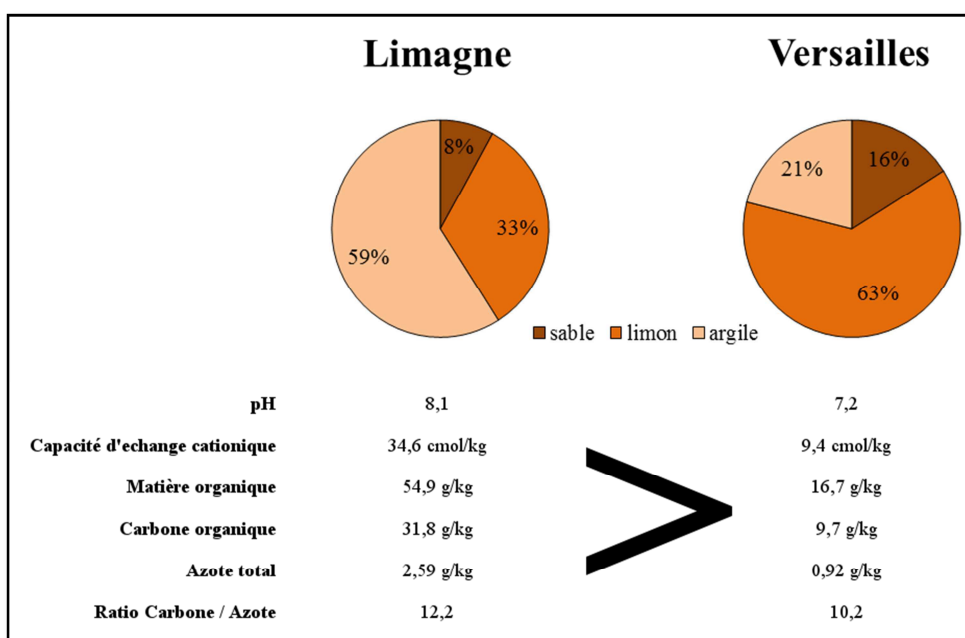


Figure 29 – Comparaison des propriétés physicochimiques des deux sols utilisés dans le cadre du projet DevImCocMic

Ce sol est en tous points différent de celui utilisé pour ces travaux de thèse, avec des teneurs en argile et en MO bien moindres, lui procurant une capacité d'échange cationique plus de 3 fois inférieure à celle de la Limagne.

Le traitement des données sur les communautés phototrophes de Versailles réalisé durant l'été 2013 nous a permis de comparer ces données avec celle de la Limagne (**Chapitre 6**). Les communautés phototrophes colonisant la surface des microcosmes diffèrent, avec pour le sol de Versailles la présence de Cyanobactéries, de mousses et de thalles de fougère. **Les deux études s'accordent cependant sur le même point : les effets délétères du Dual Gold**

Safeneur[®], utilisé seul ou en mélanges, sur l'abondance et la diversité des communautés phototrophes. Une fois les derniers résultats de Limagne et l'intégralité des résultats de cette étude sur Versailles obtenus, nous serons donc en mesure d'apporter des réponses bien plus solides en termes d'effets pour ce mélange d'herbicides. **Toutefois, deux sols n'arriveront jamais à représenter l'exhaustivité de la diversité des réponses microbiennes.** Ces travaux de thèse m'ont permis de me rendre compte des paramètres sur lesquels il serait nécessaire de s'appesantir à l'avenir.

Je pense donc pour plus de pertinence, qu'il faudrait repenser les études d'écotoxicologie microbienne en microcosmes, traitant des effets des mélanges herbicides :

- (i) en respectant les efforts consentis dans ces travaux de thèse afin de se rapprocher des réalités environnementales d'épandage. **Ceci passe par l'utilisation de formulations commerciales, le respect des doses agronomiques, le respect des plannings d'épandage...** Ces études sont pour l'heure trop peu nombreuses et méritent d'enrichir au plus vite la littérature scientifique.
- (ii) en **multipliant le nombre de sols étudiés.** Sachant la quantité de travail que cela peut représenter, il est essentiel de réduire le nombre d'analyses envisagé (iii)
- (iii) en **ciblant une fonction précise** de l'environnement étudié. Ces études à faibles doses sont fortement influencées par les mécanismes de redondance fonctionnelle existants pour les fonctions clés du système. Or les processus s'effectuant à l'échelle de niches « larges » (forte redondance fonctionnelle : dégradation MOS, minéralisation) ou « étroites » (faible redondance fonctionnelle : nitrification, dégradation de xénobiotiques) peuvent avoir des caractéristiques de vulnérabilité différentes à l'égard de perturbations (Griffiths et al., 2000; Wertz et al., 2007). Ainsi en réponses aux perturbations, des mécanismes d'adaptation à l'échelle de la communauté (e.g. redondance fonctionnelle, sélection de microorganismes tolérants ou résistants) confèrent des capacités de résilience et/ou de résistance aux processus fonctionnels. La mise en relation de ces adaptations communautaires avec des modifications structurales est souvent plus aisée pour des processus assurés par des groupes fonctionnels restreints (e.g. nitrification, photosynthèse) que pour des processus plus généralistes (minéralisation des MOS, respiration, Nielsen et al., 2011). **Ainsi, des groupes fonctionnels restreints (e.g., nitrifiants, phototrophes) présentent l'avantage de pouvoir analyser plus finement les effets de contaminants sur les relations diversité-fonctionnement.** Nous serions donc, dans ces conditions, en mesure de mettre en place des études permettant d'apporter

aux pouvoirs publics des réponses concrètes quant aux pratiques agricoles modernes de protection des cultures, pour les aider dans les choix concernant l'emploi du large panel de molécules phytosanitaires existant.

Enfin, de nombreux autres modèles prédictifs méritent d'être considérés pour se rapprocher encore plus de la réalité, tel que les études en microcosmes « plantés » ajoutant une composante rhizosphérique à la matrice sol, les études en mésocosmes, ou les études « *in situ* ». L'important au final pour tous les travaux en cours et à venir, reste de bien établir les questions écotoxicologiques que l'on se pose et de définir les outils adéquats pour y répondre.

D'un point de vue strictement personnel, dans la continuité des considérations écotoxicologiques sus-citées, je développerais plus avant l'analyse des communautés phototrophes de surface. Ces communautés présentent des qualités indéniables en tant que bioindicateur de pollution, pas seulement dans leur diversité, mais également dans leur capacité à coloniser la surface du sol. L'une des plus grandes frustrations ressentie lors de cette thèse est de ne pas avoir pu pousser plus loin certaines analyses par défaut de dates d'échantillonnage (obligatoire et raisonnable, vu le nombre de microcosmes nécessaire), qui auraient peut-être permis de confirmer certaines de nos hypothèses. Un autre point, lié au précédent, passe par le sacrifice obligatoire des microcosmes, ce qui empêche toute continuité directe dans le suivi des communautés microbiennes. Or, les communautés phototrophes présentent une qualité indéniable pour dépasser ces contraintes : le fait d'être directement visualisable. J'ai pour projet de développer un outil optique et informatique permettant le suivi journalier de colonisation des communautés phototrophes de surface, qui, adapté à l'écotoxicologie microbienne, permettrait de comparer facilement les effets de xénobiotiques, sur de nombreux sols. Des tests de mise au point de ce dispositif sont en cours au laboratoire avec à terme, l'ambition de coupler cet outil aux analyses biologiques (pigments et ADN), tout en approfondissant les moyens d'études liés à leur activité (PAM (Pulse-Amplitude-Modulation) fluorometry).



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abu-Qare, A.W., and Duncan, H.J. (2002). Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. *Chemosphere* 48, 965–974.

Accinelli, C., Screpanti, C., Dinelli, G., and Vicari, A. (2002). Short-Time Effects of Pure and Formulated Herbicides on Soil Microbial Activity and Biomass. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 82, 519–527.

Adair, K.L., and Schwartz, E. (2008). Evidence that Ammonia-Oxidizing Archaea are More Abundant than Ammonia-Oxidizing Bacteria in Semiarid Soils of Northern Arizona, USA. *Microb Ecol* 56, 420–426.

Alavanja, M.C.R., and Bonner, M.R. (2012). Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 15, 238–263.

Alletto, L., Benoit, P., Bolognesi, B., Couffignal, M., Bergheaud, V., Dumény, V., Longueval, C., and Barriuso, E. (2013). Sorption and mineralisation of S-metolachlor in soils from fields cultivated with different conservation tillage systems. *Soil and Tillage Research* 128, 97–103.

Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., and Grimme, L.H. (2000). Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2341–2347.

Alves, R.J.E., Wanek, W., Zappe, A., Richter, A., Svenning, M.M., Schleper, C., and Urich, T. (2013). Nitrification rates in Arctic soils are associated with functionally distinct populations of ammonia-oxidizing archaea. *ISME J* 7, 1620–1631.

Anderson, I.C., and Cairney, J.W.G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 769–779.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.-C., and García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 123, 247–260.

Ashburn Poppell, C., Hayes, R.M., and Mueller, T.C. (2002). Dissipation of Nicosulfuron and Rimsulfuron in Surface Soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4581–4585.

Atlas, R.M., and Bartha, R. (1981). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 560 pp.

B

Bailey, D., Mazurak, A.P., and Rosowski, J.R. (1973). Aggregation of Soil Particles by Algae. *Journal of Phycology* 9, 99–101.

Barra Caracciolo, A., Giuliano, G., Grenni, P., Guzzella, L., Pozzoni, F., Bottoni, P., Fava, L., Crobe, A., Orrù, M., and Funari, E. (2005). Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environmental Pollution* 134, 525–534.

Barriuso, E., Benoit, P., and Dubus, I.G. (2008). Formation of pesticide nonextractable (bound) residues in soil: magnitude, controlling factors and reversibility. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1845–1854.

Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., and Fierer, N. (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* 5, 908–917.

Batisson, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.-F., Mallet, C., and Bohatier, J. (2009). Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* 157, 1195–1201.

Beigel, C., Charnay, M.-P., and Barriuso, E. (1999). Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 525–534.

- Bending, G.D., Rodríguez-Cruz, M.S., and Lincoln, S.D. (2007). Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69, 82–88.
- Bengtson, P., Sterngren, A.E., and Rousk, J. (2012). Archaeal abundance across a pH gradient in an arable soil and its relationship with bacterial and fungal growth rates. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Bérard, A., Rimet, F., Capowiez, Y., and Leboulanger, C. (2004). Procedures for determining the pesticide sensitivity of indigenous soil algae: a possible bioindicator of soil contamination? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 24–31.
- Berenbaum, M.C. (1985). The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* 114, 413–431.
- Berg, F. van den, Kubiak, R., Benjey, W.G., Majewski, M.S., Yates, S.R., Reeves, G.L., Smelt, J.H., and Linden, A.M.A. van der (1999). Emission of Pesticides into the Air. *Water, Air, & Soil Pollution* 115, 195–218.
- Beulke, S., Brown, C.D., Fryer, C.J., and van Beinum, W. (2004). Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. *Chemosphere* 57, 481–490.
- Bintrim, S.B., Donohue, T.J., Handelsman, J., Roberts, G.P., and Goodman, R.M. (1997). Molecular phylogeny of Archaea from soil. *PNAS* 94, 277–282.
- Bock, E., and Wagner, M. (2006). Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. In *The Prokaryotes*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 457–495.
- Bond, G.P., and Martin, J. (2005). Microtox. In *Encyclopedia of Toxicology* (Second Edition), (New York: Elsevier), pp. pp. 110–111.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., and Bohatier, J. (2008). Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 576–583.

Boyle-Yarwood, S.A., Bottomley, P.J., and Myrold, D.D. (2008). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environ. Microbiol.* *10*, 2956–2965.

Buscot, F., and Varma, A. (2006). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions: Roles in Genesis and Functions* (Springer).

C

Calvet, R. (2005). *Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales* (France Agricole Editions).

Cao, P., Liu, F., Wang, S., Wang, Y., and Han, L. (2007). GC–ECD analysis of S-metolachlor (Dual Gold) in cotton plant and soil in trial field. *Environmental Monitoring and Assessment* *143*, 1–7.

Cao, P., Wang, X., Liu, F., Zhao, E., and Han, L. (2008). Dissipation and Residue of S-metolachlor in Maize and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* *80*, 391–394.

Caquet, T., Thybaud, E., and Le Bras, S. (1989). Utilisation de mésocosmes pour l'étude du comportement et des effets biologiques des composés phytosanitaires en milieu aquatique, application à la Deltaméthrine. *Med. Fac. Landbouw, Rijkuniv. Gent.* 1049–1060.

Chaabane, H., Vulliet, E., Calvayrac, C., Coste, C.-M., and Cooper, J.-F. (2008). Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Manag. Sci.* *64*, 86–93.

Chen, X., Li, W., Wu, Q., Chen, W., and Han, L. (2012). Dissipation and residues of the herbicide mesotrione in maize and soil in open field. *Bull Environ Contam Toxicol* *88*, 772–775.

Chen, X.-P., Zhu, Y.-G., Xia, Y., Shen, J.-P., and He, J.-Z. (2008). Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology* *10*, 1978–1987.

Chernyak, S.M., Rice, C.P., and McConnell, L.L. (1996). Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi seas. *Marine Pollution Bulletin* 32, 410–419.

Chu, X., FANG, H., PAN, X., WANG, X., SHAN, M., FENG, B., and YU, Y. (2008). Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *Journal of Environmental Sciences* 20, 464–469.

Cicerone, R.J. (1989). Analysis of sources and sinks of atmospheric nitrous oxide (N₂O). *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 94, 18265–18271.

Cockell, C.S., and Stokes, M.D. (2004). Ecology: Widespread colonization by polar hypoliths. *Nature* 431, 414–414.

Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J., and Mallet, C. (2010). Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 193–202.

Crouzet, O., Wiszniowski, J., Donnadieu, F., Bonnemoy, F., Bohatier, J., and Mallet, C. (2013). Dose-Dependent Effects of the Herbicide Mesotrione on Soil Cyanobacterial Communities. *Arch Environ Contam Toxicol* 64, 23–31.

Csotonyi, J.T., Swiderski, J., Stackebrandt, E., and Yurkov, V. (2010). A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environ Microbiol Rep* 2, 651–656.

Cullimore, D.R., and McCann, A.E. (1977). Influence of four herbicides on the algal flora of a prairie soil. *Plant Soil* 46, 499–510.

D-E

Damalas, C.A., Lithourgidis, A.S., and Eleftherohorinos, I.G. (2012). Echinochloa species control in maize (*Zea mays* L.) with sulfonylurea herbicides applied alone and in mixtures with broadleaf herbicides. *Crop Protection* 34, 70–75.

Dankwardt, A., and Hock, B. (2001). Immunolocalization of non-extractable (bound) residues of pesticides and industrial contaminants in plants and soil. *Chemosphere* 45, 523–533.

Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., Hirsch, P.R., and Vogel, T.M. (2011). Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1315–1324.

Di, H.J., Cameron, K.C., Shen, J.P., Winefield, C.S., O’Callaghan, M., Bowatte, S., and He, J.Z. (2009). Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geosci* 2, 621–624.

Domsch, K.H., Jagnow, G., and Anderson, T.-H. (1983). An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. In *Residue Reviews*, F.A. Gunther, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 65–105.

Durand, S., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.-M., Combourieu, B., and Besse-Hoggan, P. (2006). First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 222–228.

Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P., and Combourieu, B. (2010). Biodegradation pathway of mesotrione: complementarities of NMR, LC-NMR and LC-MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* 81, 372–380.

Dyson, J.S., Beulke, S., Brown, C.D., and Lane, M.C.G. (2002). Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *J. Environ. Qual.* 31, 613–618.

F-G-H-I

Felix, J., Doohan, D.J., and Bruins, D. (2007). Differential vegetable crop responses to mesotrione soil residues a year after application. *Crop Protection* 26, 1395–1403.

Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., and Jackson, R.B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4117–4120.

Fogg, P., Boxall, A.B.A., and Walker, A. (2003). Degradation of pesticides in biobeds: the effect of concentration and pesticide mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5344–5349.

- Fragoeiro, S., and Magan, N. (2008). Impact of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* on differential breakdown of pesticide mixtures in soil microcosms at two water potentials and associated respiration and enzyme activity. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 376–383.
- Fuerst, E.P., Irzyk, G.P., and Miller, K.D. (1993). Partial Characterization of Glutathione S-Transferase Isozymes Induced by the Herbicide Safener Benoxacor in Maize. *Plant Physiol* 102, 795–802.
- Gevao, B., Semple, K.T., and Jones, K.C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108, 3–14.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., and Matthey, W. (1998). *Le Sol vivant* (Presses polytechniques et universitaires romandes).
- Graymore, M., Stagnitti, F., and Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int* 26, 483–495.
- Grayston, S., Campbell, C., Bardgett, R., Mawdsley, J., Clegg, C., Ritz, K., Griffiths, B., Rodwell, J., Edwards, S., Davies, W., et al. (2004). Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology* 25, 63–84.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S.J., Bååth, E., Bloem, J., De Ruiter, P.C., et al. (2000). Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* 90, 279–294.
- Grigg, B.C., Bischoff, M., and Turco, R.F. (1997). Cocontaminant Effects on Degradation of Triazine Herbicides by a Mixed Microbial Culture. *J. Agric. Food Chem.* 45, 995–1000.
- Guo, L., Jury, W.A., Wagenet, R.J., and Flury, M. (2000). Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. *Journal of Contaminant Hydrology* 43, 45–62.
- He, J.-Z., Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zheng, Y.-M., Xu, M.-G., and Di, H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and

ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ. Microbiol.* 9, 2364–2374.

Hunter-Cevera, J.C. (1998). The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology* 1, 278–285.

J-K-L

Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J., and Mallet, C. (2012). Impact of Maize Formulated Herbicides Mesotrione and S-Metolachlor, Applied Alone and in Mixture, on Soil Microbial Communities. *ISRN Ecology* 2012, 1–9.

Kamel, F., and Hoppin, J.A. (2004). Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environ Health Perspect* 112, 950–958.

Kang, Z., Dong, J., and Zhang, J. (2012). Optimization and Characterization of Nicosulfuron-Degrading Enzyme from *Bacillus subtilis* Strain YB1. *Journal of Integrative Agriculture* 11, 1485–1492.

Karant, N.G.K., Anderson, J.P.E., and Domsch, K.H. (1984). Degradation of the herbicide diclofop-methyl in soil and influence of pesticide mixtures on its persistence. *J Biosci* 6, 829–837.

Katagi, T. (2004). Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Rev Environ Contam Toxicol* 182, 1–189.

Kearney (1988). *Herbicides Chemistry: Degradation and Mode of Action* (CRC Press).

Kennedy, A.C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74, 65–76.

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

- Krogh, K., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B., and Vejrup, K. (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871–901.
- Kumar, S., Mukerji, K.G., and Lal, R. (1996). Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 22, 1–26.
- Laird, D.A., Yen, P.Y., Koskinen, W.C., Steinheimer, T.R., and Dowdy, R.H. (1994). Sorption of atrazine on Soil Clay Components. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1054–1061.
- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M., and Bérard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ Int* 26, 131–135.
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., and Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806–809.
- Leu, C., Singer, H., Stamm, C., Müller, S.R., and Schwarzenbach, R.P. (2004). Variability of Herbicide Losses from 13 Fields to Surface Water within a Small Catchment after a Controlled Herbicide Application. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3835–3841.
- Li, K.-B., CHENG, J.-T., WANG, X.-F., ZHOU, Y., and LIU, W.-P. (2008). Degradation of Herbicides Atrazine and Bentazone Applied Alone and in Combination in Soils. *Pedosphere* 18, 265–272.
- Lim, Y.W., Kim, B.K., Kim, C., Jung, H.S., Kim, B.-S., Lee, J.-H., and Chun, J. (2010). Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *J. Microbiol.* 48, 284–289.
- Liu, H., and Xiong, M. (2009). Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquat. Toxicol.* 93, 100–106.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., and Liu, W. (2006). A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 451–455.
- Liu, H., Huang, R., Xie, F., Zhang, S., and Shi, J. (2012). Enantioselective phytotoxicity of metolachlor against maize and rice roots. *J. Hazard. Mater.* 217-218, 330–337.

Lo, C.-C. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *J Environ Sci Health B* 45, 348–359.

Loiseau, L. (2001). Processus de stabilisation des pesticides dans les sols : mécanismes impliqués, caractérisation et bio-disponibilité des résidus liés (ou non extractibles) de l’Atrazine. Thèse d’Université. Paris IV.

M-N-O

Ma, Y., LIU, W.-P., and WEN, Y.-Z. (2006). Enantioselective Degradation of Rac-Metolachlor and S-Metolachlor in Soil. *Pedosphere* 16, 489–494.

Martikainen, E., Haimi, J., and Ahtiainen, J. (1998). Effects of dimethoate and benomyl on soil organisms and soil processes – a microcosm study. *Applied Soil Ecology* 9, 381–387.

McTavish, H., Fuchs, J.A., and Hooper, A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 175, 2436–2444.

Miller, K.D., Irzyk, G.P., and Fuerst, E.P. (1994). Benoxacor Treatment Increases Glutathione S-Transferase Activity in Suspension Cultures of *Zea mays*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 48, 123–134.

Miquel, G. (2003). Rapport sur «la qualité de l’eau et de l’assainissement en France» - Tome II - Annexes.

Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., and Wichert, R.A. (2001). Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57, 120–128.

Moro, C.V., Bricheux, G., Portelli, C., and Bohatier, J. (2012). Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 778–786.

Nélieu, S., Perreau, F., Guichon, R., Seguin, F., Bry, C., and Einhorn, J. (2005). Monitoring and effects of nicosulfuron in aquatic mesocosms: development of a simple analytical procedure and evidence for low toxicity to phytoplankton communities. *Anal Bioanal Chem* 382, 108–114.

Nielsen, U.N., Ayres, E., Wall, D.H., and Bardgett, R.D. (2011). Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships. *European Journal of Soil Science* 62, 105–116.

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

Nobels, I., Spanoghe, P., Haesaert, G., Robbens, J., and Blust, R. (2011). Toxicity Ranking and Toxic Mode of Action Evaluation of Commonly Used Agricultural Adjuvants on the Basis of Bacterial Gene Expression Profiles. *PLoS ONE* 6, e24139.

Novak, S.M., Banton, O., and Schiavon, M. (2003). Modelling metolachlor exports in subsurface drainage water from two structured soils under maize (eastern France). *Journal of Hydrology* 270, 295–308.

O’Connell, P.J., Harms, C.T., and Allen, J.R.F. (1998). Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protection* 17, 207–212.

Ogunseitan, O.A., and Olson, B.H. (1993). Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 799–807.

Otero, R., Esquivel, D., Ulibarri, M.A., Jiménez-Sanchidrián, C., Romero-Salguero, F.J., and Fernández, J.M. (2013). Adsorption of the herbicide S-Metolachlor on periodic mesoporous organosilicas. *Chemical Engineering Journal* 228, 205–213.

P-Q-R

Pampulha, M.E., and Oliveira, A. (2006). Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Curr. Microbiol.* 53, 238–243.

Pannacci, E., and Covarelli, G. (2009). Efficacy of mesotrione used at reduced doses for post-emergence weed control in maize (*Zea mays* L.). *Crop Protection* 28, 57–61.

Pereira e Silva, M.C., Dias, A.C.F., van Elsas, J.D., and Salles, J.F. (2012). Spatial and Temporal Variation of Archaeal, Bacterial and Fungal Communities in Agricultural Soils. *PLoS ONE* 7, e51554.

- Références bibliographiques -

Philippot, L., Hallin, S., and Schlöter, M. (2007). Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil. In *Advances in Agronomy*, Donald L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 249–305.

Pileggi, M., Pileggi, S.A.V., Olchanheski, L.R., da Silva, P.A.G., Munoz Gonzalez, A.M., Koskinen, W.C., Barber, B., and Sadowsky, M.J. (2012). Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* 86, 1127–1132.

Pino, N., and Peñuela, G. (2011). Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 827–831.

Pozo, K., Harner, T., Lee, S.C., Wania, F., Muir, D.C.G., and Jones, K.C. (2009). Seasonally Resolved Concentrations of Persistent Organic Pollutants in the Global Atmosphere from the First Year of the GAPS Study. *Environ. Sci. Technol.* 43, 796–803.

Puglisi, E. (2012). Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides (European Food Safety Authority).

Qiu, Y., Xiao, X., Cheng, H., Zhou, Z., and Sheng, G.D. (2009). Influence of environmental factors on pesticide adsorption by black carbon: pH and model dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4973–4978.

Radivojević, L., Gašić, S., Šantrić, L., Gajić Umiljendić, J., and Marisavljević, D. (2012). Short-time effects of the herbicide nicosulfuron on the biochemical activity of Chernozem soil. *J. Serb. Chem. Soc.* 77, 845–855.

Rama Krishna, K., and Philip, L. (2011). Bioremediation of single and mixture of pesticide-contaminated soils by mixed pesticide-enriched cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1257–1277.

Reemtsma, T., Alder, L., and Banasiak, U. (2013). Emerging pesticide metabolites in groundwater and surface water as determined by the application of a multimethod for 150 pesticide metabolites. *Water Research*.

Rhine, E.D., Fuhrmann, J.J., and Radosevich, M. (2003). Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. *Microb. Ecol.* 46, 145–160.

Riechers, D.E., Kreuz, K., and Zhang, Q. (2010). Detoxification without Intoxication: Herbicide Safeners Activate Plant Defense Gene Expression. *Plant Physiol* 153, 3–13.

Rose, A.H., and Tempest, D.W. (1989). ADV IN MICROBIAL PHYSIOLOGY VOL 30 APL (Academic Press).

Rüdel, H. (1997). Volatilisation of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere* 35, 143–152.

S

Scheyer, A., Graeff, C., Morville, S., Mirabel, P., and Millet, M. (2005). Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France). *Chemosphere* 58, 1517–1524.

Schimel, J., Balser, T.C., and Wallenstein, M. (2007). MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS FOR ECOSYSTEM FUNCTION. *Ecology* 88, 1386–1394.

Schnitzer, M., and Khan, S.U. (1975). *Soil Organic Matter* (Elsevier).

Schuster, E., and Schröder, D. (1990). Side-effects of sequentially- and simultaneously-applied pesticides on non-target soil microorganisms: Laboratory experiments. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 375–383.

Shaner, D.L., Brunk, G., Belles, D., Westra, P., and Nissen, S. (2006). Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Manag. Sci.* 62, 617–623.

Sheng, G., Yang, Y., Huang, M., and Yang, K. (2005). Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. *Environmental Pollution* 134, 457–463.

- Références bibliographiques -

Sherwood, A.R., and Presting, G.G. (2007). UNIVERSAL PRIMERS AMPLIFY A 23S rDNA PLASTID MARKER IN EUKARYOTIC ALGAE AND CYANOBACTERIA1. *Journal of Phycology* 43, 605–608.

Shimmel, S.M., and Darley, W.M. (1985). Productivity and Density of Soil Algae in an Agricultural System. *Ecology* 66, 1439.

Sikkema, P.H., Shropshire, C., and Soltani, N. (2009). Response of dry bean to pre-plant incorporated and pre-emergence applications of S-metolachlor and fomesafen. *Crop Protection* 28, 744–748.

Singh, B.K., Walker, A., and Wright, D.J. (2002). Degradation of chlorpyrifos, fenamiphos, and chlorothalonil alone and in combination and their effects on soil microbial activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2600–2605.

Soltani, N., Sikkema, P.H., and Robinson, D.E. (2007). Response of four market classes of dry bean to mesotrione soil residues. *Crop Protection* 26, 1655–1659.

Song, J., Gu, J., Zhai, Y., Wu, W., Wang, H., Ruan, Z., Shi, Y., and Yan, Y. (2013). Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour. Technol.* 140, 243–248.

Sørensen, S.R., Ronen, Z., and Aamand, J. (2001). Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5403–5409.

Stojanovic, B.J., Kennedy, M.V., and Shuman, F.L. (1972). Edaphic Aspects of the Disposal of Unused Pesticides, Pesticide Wastes, and Pesticide Containers. *Journal of Environmental Quality* 1, 54–62.

Sun, Y., Xu, Y., Sun, Y., Qin, X., and Wang, Q. (2013). Dissipation and dynamics of mesotrione in maize and soil under field ecosystem. *Bull Environ Contam Toxicol* 90, 242–247.

Sutton, P., Richards, C., Buren, L., and Glasgow, L. (2002). Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. *Pest Manag. Sci.* 58, 981–984.

Swarcewicz, M.K., and Gregorczyk, A. (2012). The effects of pesticide mixtures on degradation of pendimethalin in soils. *Environ Monit Assess* 184, 3077–3084.

T-U-V

Tejada, M. (2009). Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* 76, 365–373.

Ter Halle, A., Lavieille, D., and Richard, C. (2010). The effect of mixing two herbicides mesotrione and nicosulfuron on their photochemical reactivity on cuticular wax film. *Chemosphere* 79, 482–487.

Thompson, A., and Goyne, K.W. (2012). Introduction to the Sorption of Chemical Constituents in Soils. *Nature Education Knowledge* 4, 7.

Tixier, C., Sancelme, M., Aït-Aïssa, S., Widehem, P., Bonnemoy, F., Cuer, A., Truffaut, N., and Veschambre, H. (2002). 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.

Tomlin, C. (1994). *The Pesticide Manual* - 10th Edition (Clive Tomlin).

Torsvik, V., Øvreås, L., and Thingstad, T.F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064–1066.

Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.-P., and Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7, 1985–1995.

Vischetti, C., Monaci, E., Cardinali, A., Casucci, C., and Perucci, P. (2008). The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* 72, 1739–1743.

Vogel, J.R., Majewski, M.S., and Capel, P.D. (2008). Pesticides in Rain in Four Agricultural Watersheds in the United States. *Journal of Environment Quality* 37, 1101.

Vryzas, Z., Papadakis, E.N., Oriakli, K., Moysiadis, T.P., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012). Biotransformation of atrazine and metolachlor within soil profile and changes in microbial communities. *Chemosphere* 89, 1330–1338.

W-X-Y-Z

Wainwright, M. (1978). A Review of the Effects of Pesticides on Microbial Activity in Soils. *Journal of Soil Science* 29, 287–298.

Wardle, D.A., and Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant Soil* 122, 21–28.

Wauchope, R.D. (1978). The Pesticide Content of Surface Water Draining from Agricultural Fields—A Review. *Journal of Environmental Quality* 7, 459–472.

Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N., and Le Roux, X. (2007). Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environ. Microbiol.* 9, 2211–2219.

White, P.M., Potter, T.L., and Culbreath, A.K. (2010). Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Sci. Total Environ.* 408, 1393–1402.

Woznica, A., Nowak, A., Ziemiński, P., Kwasniewski, M., and Bernas, T. (2013). Stimulatory Effect of Xenobiotics on Oxidative Electron Transport of Chemolithotrophic Nitrifying Bacteria Used as Biosensing Element. *PLoS ONE* 8, e53484.

Wu, J., Hwang, I.-T., and Hatzios, K.K. (2000). Effects of Chloroacetanilide Herbicides on Membrane Fatty Acid Desaturation and Lipid Composition in Rice, Maize, and Sorghum. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66, 161–169.

Wu, Q., Chen, X., Xu, Y., and Han, L. (2010). Dissipation and residues of nicosulfuron in corn and soil under field conditions. *Bull Environ Contam Toxicol* 85, 79–82.

Xu, D., Wen, Y., and Wang, K. (2010). Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–1931.

Yang, Y., Chun, Y., Sheng, G., and Huang, M. (2004). pH-dependence of pesticide adsorption by wheat-residue-derived black carbon. *Langmuir* 20, 6736–6741.

Yang, Y., Tao, B., Zhang, W., and Zhang, J. (2008). Isolation and screening of microorganisms capable of degrading nicosulfuron in water. *Front. Agric. China* 2, 224–228.

Zhang, J., Zheng, L., Jäck, O., Yan, D., Zhang, Z., Gerhards, R., and Ni, H. (2013). Efficacy of four post-emergence herbicides applied at reduced doses on weeds in summer maize (*Zea mays* L.) fields in North China Plain. *Crop Protection* 52, 26–32.

(2009). The REACH baseline study: A tool to monitor the new EU policy on chemicals - REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals) (European Communities).



ANNEXES

ANNEXE 1 : RAPPORT D'ANALYSES DU LABORATOIRE DES SOLS D'ARRAS



LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le : 06/08/12

RAPPORT D'ESSAI

CNRS LMGE
LES CEZEAUX
PIERRE JOLY
24 AVENUE DES LANDAIS
63177 AUBIERE CEDEX

Numero Echantillon: 200315301
Soumission: 100107837
Date de Reception: 10/05/12
Date de mise en analyse: 28/05/12



Accréditation COFRAC N°1-1389
Portée disponible sur
www.cofrac.fr

Version: 1

Votre Reference: SOL_DEVIS N°2951.1

12-22

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du Laboratoire pour les
seuls essais couverts par l'accréditation identifiés par le symbole

SOL-0201 Teneur en eau résiduelle à 105°C (NF ISO 11465) - g/kg

Humidité 70.4 g/kg

SOL-0302 Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation (NF X 31-107) - g/kg

Argile (< 2 µm) 587 g/kg

Limons fins (2/20 µm) 281 g/kg

Limons grossiers (20/50 µm) 47 g/kg

Sables fins (50/200 µm) 46 g/kg

Sables grossiers (200/2000 µm) 39 g/kg

SOL-0405 Carbone (C) organique et azote (N) total (NF ISO 10694 et NF ISO 13878) - g/kg

Carbone (C) organique 31.8 g/kg

Azote (N) total 2.59 g/kg

C/N 12.2 -

Matière organique 54.9 g/kg

Traitement Carbone Par correction calcaire -

SOL-0701 Capacité d'échange cationique méthode Metson (NF X 31-130) - cmol+/kg

CEC Metson 34.6 cmol+/kg

Ce rapport d'essai ne doit pas être reproduit sinon en entier sans l'autorisation écrite du laboratoire.

Ce rapport ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse

Sauf indication contraire (p_sec) les résultats sont exprimés par rapport à un sol séché à l'air.

Laboratoire d'Analyses des sols d'Arras 273 Rue de Cambrai
62000 ARRAS



LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le : 06/08/12

RAPPORT D'ESSAI

CNRS LMGE
LES CEZEAUX
PIERRE JOLY
24 AVENUE DES LANDAIS
63177 AUBIERE CEDEX

Numero Echantillon: 200315301
Soumission: 100107837
Date de Reception: 10/05/12
Date de mise en analyse: 28/05/12



Accréditation COFRAC N°1-1385
Portée disponible sur
www.cofrac.fr

Version: 1

Votre Reference: SOL_DEVIS N°2951.1

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du Laboratoire pour les
seuls essais couverts par l'accréditation identifiés par le symbole

SOL-1852 Herbicides (triazines, phénylurées) par LC/MS/MS - ng/kg

di ATR p_sec	225	ng/kg
fénuron p_sec	<4.2	ng/kg
de ATR p_sec	555	ng/kg
cyanazine p_sec	<4.2	ng/kg
IPA p_sec	<4.2	ng/kg
monuron p_sec	<4.2	ng/kg
atraton p_sec	<4.2	ng/kg
simazine p_sec	108	ng/kg
desmétryne p_sec	<4.2	ng/kg
monolinuron p_sec	<4.2	ng/kg
IPPU p_sec	<4.2	ng/kg
prométon p_sec	<4.2	ng/kg
méthabenzthiazuron p_sec	37.6	ng/kg
DCPU p_sec	<8.39	ng/kg
IPPMU p_sec	<4.2	ng/kg
atrazine p_sec	2930	ng/kg
DCPMU p_sec	79.2	ng/kg
isoproturon p_sec	7.4	ng/kg
méthoprotrotryne p_sec	<4.2	ng/kg
amétryne p_sec	8.27	ng/kg
diuron p_sec	<8.39	ng/kg
linuron p_sec	66.2	ng/kg
prométryne p_sec	<4.2	ng/kg
propazine p_sec	64.3	ng/kg

Ce rapport d'essai ne doit pas être reproduit sinon en entier sans l'autorisation écrite
du laboratoire.

Ce rapport ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse

Sauf indication contraire (p_sec) les résultats sont exprimés par rapport à un sol
séché à l'air.

Laboratoire d'Analyses des sols d'Arras 273 Rue de Cambrai
62000 ARRAS

Page 2 / 3



LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le : 06/08/12

LISTING DES ANOMALIES

Sam Id

Texte

Ai

ANNEXE 2 : NEW MOLECULAR METHODS TO STUDY PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS AT THE COMMUNITY LEVEL IN TERRESTRIAL ECOSYSTEMS

En parallèle de l'étude menée sur le sol de Limagne, nous nous sommes intéressés au développement d'outils permettant le suivi structurel des communautés phototrophes du sol. Ces travaux ont été menés en grande partie par Benjamin Misson durant ses travaux d'ATER au sein de l'équipe CMES en 2012, et s'inspirent des travaux de Sherwood et Presting, (2007) qui ont mis au point en milieu aquatique, une paire de primers ciblant une région 23S ADNr plastidiale, hautement spécifique des lignées phototrophes. Le but de ces travaux était donc d'utiliser ces primers afin de transférer ces applications du milieu aquatique au milieu terrestre et de développer des méthodes de qPCR et de *fingerprinting* permettant l'analyse de la dynamique des communautés phototrophes et de leur structure génétique, dans de nombreux échantillons (Figure 30).

Les résultats nous ont permis de valider l'efficacité de ces différents outils pour l'écosystème terrestre, tout en pointant les limites de telles pratiques, à savoir la faible base de données disponible pour affilier les différentes séquences, mais également le nombre variables de plastides par cellules qui peut biaiser l'interprétation des qPCR. Cependant ces outils représentent un pas supplémentaire dans l'identification et le suivi des dynamiques des communautés phototrophes du sol.

L'approche proposée a fait l'objet d'une soumission à publication dans la revue **Soil Biology and Biochemistry** et a été refusée. Les causes du refus sont principalement liées aux manques de diversité d'échantillons environnementaux testés pour valider la méthode et par faute de temps, ces améliorations n'ont pas été menées pour le moment.

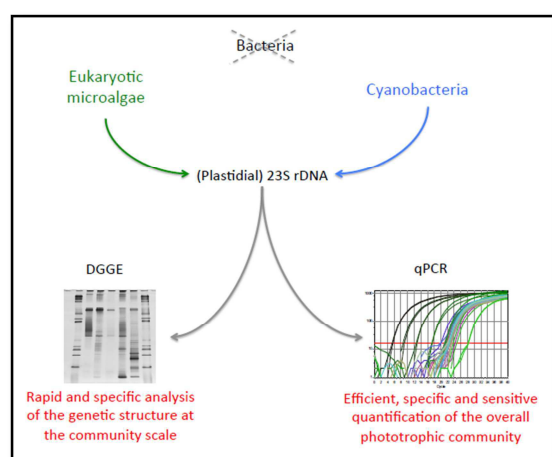


Figure 30 – *Graphical abstract* de la méthode proposée, réalisé lors de la première soumission de l'article.

New molecular methods to study phototrophic microorganisms at the community level in terrestrial ecosystems

Benjamin Misson ^{a,b} *, Pierre Joly ^{a,b}, Florence Donnadiou-Bernard ^{a,b}, and Clarisse Mallet ^{a,b}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

^b CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, F-63171 AUBIERE Cedex, France

* Corresponding author: LMGE, Université Blaise Pascal, U.F.R. Sciences et Technologies, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 AUBIERE cedex. Tel.: +33 4 73 40 74 32 ; Fax : +33 4 73 40 76 70 ; ben.misson@hotmail.com

ABSTRACT: Although microbial phototrophs can be of major importance for biogeochemical cycles, investigations on their abundance and diversity at the community scale in terrestrial ecosystems are scarce. A few molecular tools have been designed for studying the whole microbial phototrophic community in natural ecosystems, but never adapted to soil systems. In this study, we developed a qualitative and a quantitative molecular method, both targeting the same plastidial sequence and using the same PCR program. Starting from soil samples, we designed an efficient and sensitive qPCR assay, whose specificity was checked by cloning and sequencing. We also designed a DGGE assay that will help in the rapid comparison of the genetic structure of the phototrophic community between many samples. This set of molecular methods will be helpful in studying microbial phototrophs in a wide range of artificial or natural systems, and especially in soils where other more usual techniques, such as microscopy, are hardly usable.

KEY WORDS: Phototrophic microorganisms; community scale analyses; molecular tools; plastidial 23S rDNA; qPCR; DGGE

1. INTRODUCTION

The rapid growth rate, the small size and the ability of microbial phototrophic communities to use carbon dioxide for producing organic compounds allow them to play key roles in a wide range of ecosystems. Indeed, they can be major actors in the carbon cycle by being the main primary producers everywhere macroalgae and higher plants cannot develop because of unfavorable environmental conditions (*e.g.* Partensky *et al.*, 1999; Cockell and Stokes, 2004). Moreover, some phototrophic microorganisms, such as several cyanobacteria, are also able to fix atmospheric nitrogen, and are thus supposed to play an important role in the nitrogen cycle (Zehr *et al.*, 2001; Boison *et al.*, 2004; Montoya *et al.*, 2004). In terrestrial ecosystems, microalgal and cyanobacterial communities can be of major importance in ecosystem functioning, especially in extreme environments like hot or cold deserts, where they can be the solely phototrophic

organisms (Cockell and Stokes, 2004; Schmidt *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2012).

To date, molecular studies of phototrophic microorganisms mostly concerned low taxonomic levels (*i.e.* species or genus) and aquatic environments (*e.g.* Touzet *et al.*, 2009; Andree *et al.*, 2011). Only a few molecular tools allowing their study at the community level have been developed, in spite of their great interest for the understanding of (i) the functioning of phototrophic microbial communities and (ii) their responses to environmental perturbations and global change. This represents a serious technological limit, especially for terrestrial ecosystems where microscopy cannot easily help.

Phototrophic communities can be studied at the community level by molecular investigations targeting universal plastidial genes, such as plastidial ribosomal genes or RubisCO subunits genes. Such genes have

Table 1 - Primers used to amplify plastidial 23S rDNA in this study.

Primer	Sequence	Method	Reference
p23SrV_f1	5'-GGACAGAAAGACCCCTATGAA-3'	PCR, qPCR	Sherwood and Presting, 2007
p23SrV_r1	5'-TCAGCCTGTTATCCCTAGAG-3'	PCR, qPCR, PCR-DGGE	Sherwood and Presting, 2007
GC-p23SrV_f1	5'-CGCCCGGGGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGACGGGGGG GGACAGAAAGACCCCTATGAA-3'	PCR-DGGE	This study

previously been demonstrated to be helpful to overcome the paraphyletic nature of phototrophic communities, since they are common to every phototrophic lineage including both eukaryotic algae and cyanobacteria (e.g. Sherwood and Presting, 2007; Meakin and Wyman, 2011). However, to date, such molecular tools have never been applied to the study of terrestrial ecosystems, where the highest taxonomic levels investigated are the Bacillariophyceae class (Morin *et al.*, 2012) and the Cyanobacteria phylum (Crouzet *et al.*, 2012).

A previously designed primer pair (Sherwood and Presting, 2007; Table 1), targeting a plastidial 23S rDNA region, seems to be highly specific to all the phototrophic lineages, including cyanobacteria and phototrophic eukaryotes. These primers anneal to highly conserved regions of the plastidial 23S gene, target a sufficiently short sequence (410 bp) for quantitative analyses, and their specificity to phototrophs' DNA was verified on natural aquatic samples by cloning and sequencing after a touchdown PCR amplification (Sherwood *et al.*, 2008). Through this study, our objectives were to use these specific primers to transfer such applications to terrestrial ecosystems and to develop both qPCR and fingerprinting methods, allowing the analysis of the phototrophic community's dynamics and a quick assessment of the genetic structure in numerous samples, respectively.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Terrestrial phototrophic communities' samples and DNA extraction

Topsoil (0-10 cm) samples free of higher plants were collected in Spring 2011 from a vertisol soil (determined using standard protocols of Arras Soil Analysis Laboratory, INRA, France; and according to FAO classification) located in the Limagne plain near Clermont-Ferrand (France) for a microcosm experiment designed to study the impact of herbicides on edaphic microbial communities (Joly *et al.* in prep). DNA was extracted from the surface layer (1 cm) of 8 microcosms (0.5 g aliquots) by using FastDNA® Spin Kit For Soil (MP Biomedicals) according to the manufacturer's instructions.

2.2 Quantifying plastidial 23S gene copies

In order to establish standard curves, one DNA extract of surface soil was amplified according to Sherwood *et al.* (2008) and cloned into pGEM-T vector system II (Promega) for producing plasmids containing the target plastidial p23S insert. The correct size of the insert of a randomly chosen white colony was checked by PCR and electrophoresis on a BET stained 1% agarose gel. The PCR products were then purified by ExoSAP-It (USB) and sequenced by MWG Eurofins. After verifying that the sequence was affiliated to a phototrophic organism through the use of BLAST (accession number KC284849), plasmids were extracted from the colony and linearized by using PstI restriction enzyme (New England BioLabs). Linearization products were visualized on a BET stained 1% agarose gel to ensure that there was a single restriction site in the cloned plasmids. In every single qPCR run, seven dilutions (ranging from 1.5×10^7 to 1.5×10^1 copies) of linearized plasmid were then used in duplicate to establish Ct (threshold cycle number, the cycle number at which the fluorescence first exceeds the threshold) vs. gene copy numbers standard curves (Fig. 1).

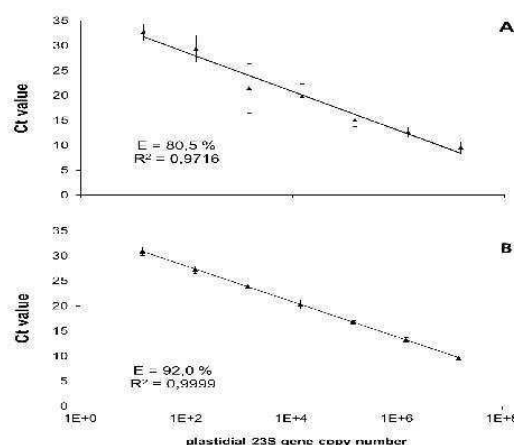


Figure 1 - Ct vs. gene copy numbers qPCR standard curves obtained for the two PCR programs tested. (A) standard curve of program A, (B): standard curve of program B. E is the efficiency of amplification and was calculated from the following equation: $E = 10^{(-1/a)-1}$, where "a" is the slope of the standard curve. Error bars represents standard deviation (n = 5 for 1.5×10^7 , 1.5×10^5 and 1.5×10^2 gene copies in A, n = 6 for every other values).

All the qPCRs were carried out in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf) in a final volume of 25 µL and in 96-well plates, using MESA GREEN qPCR Mastermix (Eurogentec), 200 nM of forward primer p23SrV_f1 (Table 1), 300 nM of reverse primer p23SrV_r1 (Table 1) and 0.25 mg.mL⁻¹ of BSA.

Two different PCR programs were used. The first program, further referred to as “program A”, contained a touchdown step as designed by Sherwood *et al.* (2008): 5 min at 95 °C, 40 cycles of 30 s at 95 °C, 45 s at 66°C (with a temperature decrease of 0.5 °C every cycle until touchdown temperature of 58 °C was reached) and 30 s at 72 °C. The second program, further referred to as “program B”, consisted in 5 min at 95 °C and 40 cycles of 30 s at 95 °C, 45 s at 58 °C and 30 s at 72 °C. In order to compare the reproducibility, the sensitivity and the efficiency of these two programs, standard curves were established with both programs, ran 3 times each, and efficiencies were calculated from the following equation: $E = 10^{(-1/a)-1}$, where “a” is the slope of the standard curve. Plastidial 23S gene copy numbers were determined in our 8 surface soil DNA extracts by using program B and approximately 0.1 ng of DNA (dilution of the extracts to 1/1000 useful to prevent PCR inhibition). A melting curve analysis was performed at the end of each run, and revealed a single major peak around 86 °C.

2.3 Checking the specificity of program B to phototrophic lineages

The program B was run through a conventional PCR on 5 from our 8 surface soil DNA extracts. For that, we used the same primers and BSA concentrations as for qPCR, and the number of cycles of the PCR program was reduced to 30 (enough to detect about 200 gene copies in qPCR, see Fig. 1). The PCR products were then cloned and 250 randomly chosen clones were sequenced as described above. After verifying their length (~ 410 bp), sequences were aligned by using Seaview v4.4.0 (Gouy *et al.*, 2010) and grouped into genotypes based on 100% identity (accession numbers KC284750 to KC284848 in GenBank database). The genotypes were clustered in 8 major OTUs (98 % similarity, data not shown) by using Mothur v1.27.0 (Schloss *et al.*, 2009). One representative of each OTU was compared to the Genbank “nr” database through the use of Blast, and the best hit for each OTU was aligned with all the genotypes. After the exclusion of the priming sites, an UPGMA tree based on K2P distances of the sequences was built by using Mega v5 (Tamura *et al.*, 2011).

2.4 Investigating the genetic structure of the phototrophic community through PCR-DGGE

PCR-DGGE was used by running program B, and by slightly modifying the reaction mix by adding a GC clamp at the 5' end of the forward primer (Table 1) and by using 800 nM of each primer and about 10 ng of template DNA.

Two terrestrial and 3 aquatic DNA extracts originating from phototrophic communities with various diversity degrees were compared. The terrestrial DNA extracts consisted of (i) 1 of our 8 surface soil samples, and (ii) total DNA originating from a cyanobacteria-rich soil (Crouzet *et al.*, 2012). The aquatic DNA extracts originated from (i) a spring diatom-dominated phytoplanktonic community from the eutrophic Grangent reservoir sampled in spring 2009 (Electricité De France, unpublished data), (ii) a *Microcystis sp.* bloom in the hypereutrophic Villerest reservoir sampled in September 2010 (more than 2×10^9 cell.L⁻¹, Misson B, personal communication), and (iii) a highly diversified phytoplanktonic community of the oligo-mesotrophic Pavin lake sampled in December 2007 (Rasconi *et al.*, 2012).

PCR products were checked on a BET stained 1% agarose gel and quantified with the DNA quantitation Kit (Sigma) using a Kontron spectrofluorimeter (Kontron Instruments, excitation set at 360nm and emission set at 460 nm). 750 ng of each PCR product were loaded into a 7.5 % polyacrylamide (w/v) denaturing gel with linear gradient of 40–60 % (100 % denaturant contains 7 M urea and 40 % formamide) and run in 1X TAE buffer at a temperature of 60 °C at 140 V for 16 h on a TTGEK-2401-220 (CBS Scientific). After electrophoresis, the DGGE gel was stained in 1X TAE buffer containing 1/20000 dilution of Gel Star (Lonza, Rockland, ME-USA) and digitized using a BioSpectrumAC Imaging System (UVP).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Molecular quantification of terrestrial phototrophs

Quantitative methods available to study microbial phototrophs in terrestrial ecosystems come down to microscopy, which is limited by the soil matrix, and to pigments quantification, which is limited by the varying nature and quantity of pigments present in the different phototrophic lineages. Thereafter, molecular quantification of phototrophs' plastidial genes by qPCR can provide a better precision.

A previous qPCR assay targeting plastidial 23S gene by using the primer set of Sherwood and Presting (2007) has already been designed to study a deep marine ecosystem

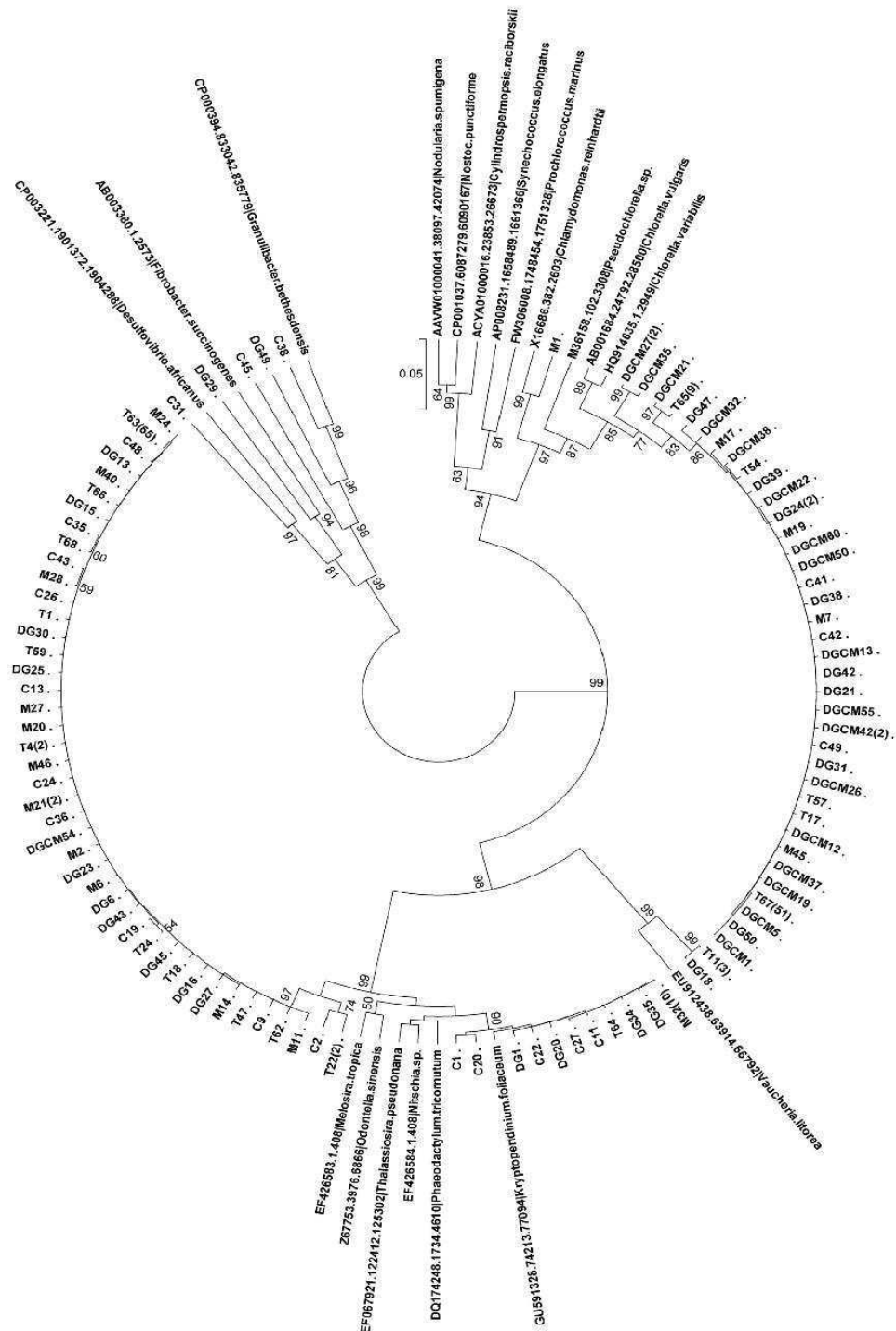


Figure 2 - UPGMA circle tree based on K2P distances of environmental plastidial 23S rDNA genotypes and reference sequences from GenBank. Numbers in brackets next to genotypes codes indicate the number of corresponding clones. Reference sequences are designated by their accession number followed by the name of the organism they refer to. Bootstrap values (1000 iterations) > 50% are presented.

(Gao *et al.*, 2011). However, the authors modified the original PCR program of Sherwood *et al.* (2008) in a way

that could greatly promote untargeted amplifications (no touchdown and decrease of the hybridization temperature

to 56°C) and they did not test the specificity of their new PCR program for phototrophic lineages.

In order to develop the most sensitive, the most specific and the most efficient qPCR assay for soils, we first compared two PCR programs: the program A, which contained a touchdown step as designed by Sherwood *et al.* (2008), and the program B, which presented a regular hybridization temperature of 58°C, similarly to the qPCR design of Gao *et al.* (2011). The program B, without the touchdown, appeared to be more efficient ($E = 92,0 \%$), more reproducible ($R^2 = 0,9999$) and more sensitive (150 gene copies detected in about 31 cycles) than the program A (Fig. 1). Moreover, with the program B, plastidial 23S rDNA genes extracted from all of our surface soil samples were detected within 26 cycles, in spite of the high dilution of template DNA (supplementary material). This result confirmed the high sensitivity of the method, which allows natural DNA extracts dilution in order to limit PCR inhibition. The amplification also proved to be highly reproducible, since we obtained an average relative standard deviation of 15 % with our natural samples (supplementary material). Finally, based on melting curve analysis, the amplification of environmental DNA extracts appeared to be specific.

Since the reproducibility, the sensitivity and the efficiency of this qPCR method are better without any touchdown, the ability of such a program to avoid the amplification of bacterial sequences had to be evaluated in more details. For that, we cloned and sequenced PCR products obtained after amplification of soil plastidial 23S rDNA through the program B. Within the 238 sequences obtained, only 5 (2,1 %) belonged to heterotrophic bacterial lineages. The 233 remaining were grouped in 94 genotypes affiliated to microalgal taxa (Fig. 2). The surprising low taxonomic diversity and the absence of cyanobacteria observed here do not seem to be related to primer bias, since Sherwood *et al.* (2008) reported a high taxonomic diversity within a natural aquatic community and a high proportion of cyanobacterial sequences. Then we assume that the phototrophs' diversity in our soil samples was low, which is supported by the comparison with other samples through DGGE (see below). These sequencing results confirm the high specificity of the method to phototrophic organisms, and indicate that our program B can be safely used for a specific qPCR assay.

3.2 Rapid assessment of the genetic structure of phototrophic communities

Fingerprint methods are powerful molecular tools that enable the rapid comparison of the genetic structure of

many samples. DGGE, for example, is a widely used technique for the study of various functional or taxonomical groups in soils (*e.g.* Muyzer, 1999; Girvan *et al.*, 2005; Ros *et al.*, 2006; Crouzet *et al.*, 2010). Thereby, such a molecular tool would be very useful for the study of phototrophic communities. However, DGGE does not easily allow the access to the amplified sequences and thus the reliability of the results relies on the specificity of the primers used to the targeted organisms.

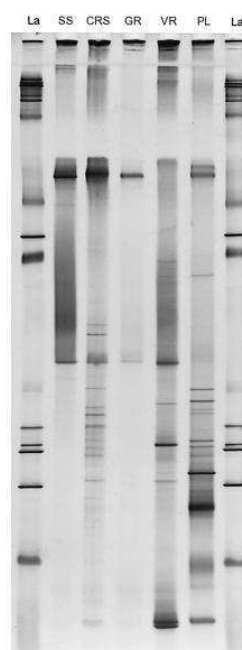


Figure 3 - PCR-DGGE patterns of amplified plastidial 23S fragments from 2 soils and 3 lakes. La: ladder, SS: surface soil sampled extracted for this study, CRS: Cyanobacteria-rich soil (Crouzet *et al.* 2012), GR: planktonic sample of Grangent reservoir, VR: planktonic sample of Villerest reservoir, PL: planktonic sample of Pavin Lake (Rasconi *et al.* 2012).

Knowing that, we designed a DGGE assay targeting the plastidial 23S rDNA of cyanobacteria and eukaryotic phototrophs, by using the same PCR procedure as for qPCR. To be validated, this fingerprint method had only to provide sufficiently high band richness for allowing the discrimination of different samples, since we previously demonstrated the specificity of the PCR to phototrophic lineages (Fig. 2). Hence, we compared five samples differing in their origin (terrestrial vs. aquatic samples) and in the diversity of their microbial phototrophic community. A total of more than 40 distinct bands were observed, with 4 to 19 bands per lane (Fig. 3). The band richness reflected well the diversity of the microbial phototrophic communities of the ecosystems where the samples were taken. Indeed, the band richness was low for our surface soil sample (according to the sequencing results, Fig. 2), and for two aquatic samples originating from eutrophic reservoirs experimenting diatoms or cyanobacteria blooms. In contrast, many bands were observed for the most diversified soil

sampled (cyanobacteria-rich sample; Crouzet *et al.*, 2012) and for the oligo-mesotrophic lake sample (previously demonstrated to contain Chlorophytes, Cryptophytes, Diatoms and Euglenids; Rasconi *et al.*, 2012).

Taken together, these results highlight the usefulness of this fingerprint method for discriminating the genetic structure variations between the phototrophic communities of various samples, by providing enough resolution and by avoiding the amplification of 23S rDNA of heterotrophic bacteria.

4. CONCLUSION

By using a common primer pair targeting plastidial ribosomal DNA and a common PCR program, we were able to adapt and design new molecular tools that will be useful for the future analysis of phototrophic microbial communities in various situations where autotrophic macroorganisms are missing. Of course, this set of methods also presents some limits. First, the shortness of the fragment and the poor plastidial 23S rDNA sequences database available lower the precision of the affiliation of the sequences. Then, the presence of introns or mutations in the priming sites of a very limited number of species (Del Campo *et al.*, 2010) prevents very exhaustive investigations. At last, the varying numbers of plastids per cell and of 23S rDNA copies per plastid (Rawson and Boerma, 1976; Palmer, 1985) limit the interpretation of qPCR results in highly diversified systems. However, these qualitative and quantitative methods will still help us to overcome the difficulties encountered with the use of more usual techniques, such as microscopy, while investigating the identity and the dynamics of terrestrial microbial phototrophs. Furthermore, these new methods also open the door to the restricted study of active phototrophs by targeting 23S rRNA through RT-qPCR or RT-PCR-DGGE. More generally, this work opens new perspectives for a wide range of researches, survey and commercial applications, for which quantifying and assessing the diversity of phototrophic microorganisms while excluding other contaminant organisms is needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the French National Center of Scientific Research (CNRS) and the CNRS-EC2CO program DevImCocMic. We express our gratitude to Marlène Jobard and Electricité de France for kindly providing lake DNA samples and corresponding information about the phytoplanktonic community structures. We thank Wanda Lipsky for helping to improve the English text.

REFERENCES

- Andree, K.B., Fernandez-Tejedor, M., Elandaloussi, L.M., Quijano-Scheggia, S., Sampedro, N., Garces, E., Camp, J., Diogene, J., 2011. Quantitative PCR Coupled with Melt Curve Analysis for Detection of Selected *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) from the Northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1651–1659.
- Boison, G., Mergel, A., Jolkver, H., Bothe, H., 2004. Bacterial life and dinitrogen fixation at a gypsum rock. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7070–7077.
- Chan, Y., Lacap, D.C., Lau, M.C.Y., Ha, K.Y., Warren-Rhodes, K.A., Cockell, C.S., Cowan, D.A., McKay, C.P., Pointing, S.B., 2012. Hypolithic microbial communities: between a rock and a hard place. *Environmental Microbiology* 14, 2272–2282.
- Cockell, C.S., Stokes, M.D., 2004. Widespread colonization by polar hypoliths. *Nature* 431, 414–414.
- Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J., Mallet, C., 2010. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 193–202.
- Crouzet, O., Wiszniowski, J., Donnadieu, F., Bonnemoy, F., Bohatier, J., Mallet, C., 2012. Dose-Dependent Effects of the Herbicide Mesotrione on Soil Cyanobacterial Communities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. DOI 10.1007/s00244-012-9809-9
- Del Campo, E.M., Del Hoyo, A., Royo, C., Casano, L.M., Alvarez, R., Barreno, E., 2010. A single primer pair gives a specific ortholog amplicon in a wide range of Cyanobacteria and plastid-bearing organisms: Applicability in inventory of reference material from collections and phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57, 1323–1328.
- Gao, W., Shi, X., Wu, J., Jin, Y., Zhang, W., Meldrum, D.R., 2011. Phylogenetic and Gene Expression Analysis of Cyanobacteria and Diatoms in the Twilight Waters of the Temperate Northeast Pacific Ocean. *Microbial Ecology* 62, 765–775.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology* 7, 301–313.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221–224.

- Meakin, N.G., Wyman, M., 2011. Rapid shifts in picoeukaryote community structure in response to ocean acidification. *Isme Journal* 5, 1397–1405.
- Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P., Hansen, A., Villareal, T.A., Capone, D.G., 2004. High rates of N-2 fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430, 1027–1031.
- Morin, S., Roubex, V., Batisson, I., Winterton, P., Pesce, S., 2012. Characterization of Freshwater Diatom Communities: Comparing Taxonomic and Genetic-Fingerprinting Approaches. *Journal of Phycology* DOI: 10.1111/jpy.12001.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317–322.
- Palmer, J., 1985. Comparative Organization of Chloroplast Genomes. *Annual Review of Genetics* 19, 325–354.
- Partensky, F., Hess, W.R., Vaulot, D., 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 106–127.
- Rasconi, S., Niquil, N., Sime-Ngando, T., 2012. Phytoplankton chytridiomycosis: community structure and infectivity of fungal parasites in aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology* 14, 2151–2170.
- Rawson, J.R.Y., Boerma, C., 1976. Influence of growth conditions upon the number of chloroplast DNA molecules in *Euglena gracilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2401–2404.
- Ros, M., Goberna, M., Moreno, J.L., Hernandez, T., Garcia, C., Insam, H., Pascual, J.A., 2006. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. *Applied Soil Ecology* 34, 93–102.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 75, 7537–7541.
- Schmidt, S.K., Lynch, R.C., King, A.J., Karki, D., Robeson, M.S., Nagy, L., Williams, M.W., Mitter, M.S., Freeman, K.R., 2011. Phylogeography of microbial phototrophs in the dry valleys of the high Himalayas and Antarctica. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278, 702–708.
- Sherwood, A.R., Chan, Y.L., Presting, G.G., 2008. Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community. *Molecular Ecology Resources* 8, 1011–1014.
- Sherwood, A.R., Presting, G.G., 2007. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 43, 605–608.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731–2739.
- Touzet, N., Keady, E., Raine, R., Maher, M., 2009. Evaluation of taxa-specific real-time PCR, whole-cell FISH and morphotaxonomy analyses for the detection and quantification of the toxic microalgae *Alexandrium minutum* (Dinophyceae), Global Clade ribotype. *Fems Microbiology Ecology* 67, 329–341.
- Zehr, J.P., Waterbury, J.B., Turner, P.J., Montoya, J.P., Omoregie, E., Steward, G.F., Hansen, A., Karl, D.M., 2001. Unicellular cyanobacteria fix N-2 in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412, 635–638.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Sample ID	Number of qPCR replications	Mean Ct ($\pm$ SD)	10^5 copies per gram of fresh soil ($\pm$ SD)
S1	4	22.8 ($\pm$ 0.4)	13.2 ($\pm$ 3.2)
S2	4	22.4 ($\pm$ 0.2)	16.8 ($\pm$ 2.0)
S3	4	23.0 ($\pm$ 0.2)	11.3 ($\pm$ 1.4)
S4	3	23.6 ($\pm$ 0.3)	7.55 ($\pm$ 1.3)
S5	4	21.9 ($\pm$ 0.3)	20.1 ($\pm$ 4.4)
S6	4	22.2 ($\pm$ 0.3)	24.3 ($\pm$ 4.5)
S7	4	22.6 ($\pm$ 0.1)	15.2 ($\pm$ 1.25)
S8	3	22.2 ($\pm$ 0.1)	20.0 ($\pm$ 1.9)

Supplementary data 1 - Plastidial 23S gene copy number quantification in 8 soil DNA extracts by qPCR

Etude des effets de mélanges d'herbicides employés sur le maïs, sur les communautés microbiennes édaphiques : approche en microcosmes

Résumé : Ces travaux s'inscrivent dans une problématique actuelle de compréhension des effets, encore peu connus, des mélanges de pesticides dans le sol. Les formulations d'herbicides S-métolachlore (Dual Gold Safeneur[®]), mésotrione (Callisto[®]) et nicosulfuron (Milagro[®]) ont été appliquées en mélanges et à la dose agronomique recommandée. Les molécules formulées sont plus toxiques que les molécules actives seules (Microtox[®]) et aucun effet synergique ou antagoniste des mélanges n'a été observé. Cependant, ces mélanges impactent transitoirement et à court terme les communautés microbiennes du sol de Limagne, sans modifier les paramètres généraux de structure et d'abondance. Toutefois, des effets ont été mis en évidence sur des communautés sensibles telles que les phototrophes ou celles impliquées dans les processus de nitrification et de dénitrification. De plus, une comparaison des effets des mélanges sur les communautés phototrophes de deux sols souligne l'importante toxicité du Dual Gold Safeneur[®] et remet en cause son utilisation d'un point de vue écotoxicologique.

Mots clés : écotoxicologie microbienne, mélanges d'herbicides, formulations commerciales, doses agronomiques, microcosmes, structure, abondance, activité

Maize herbicides mixtures effects on soil microbial communities: microcosms studies

Abstract: These experiments are part of the actual problematic of understanding the poor-known effects of pesticides mixtures in soil ecosystem. The herbicidal commercial formulations of S-metolachlor (Dual Gold Safeneur[®]), mesotrione (Callisto[®]) and nicosulfuron (Milagro[®]) were applied in mixtures at the recommended field rate. Formulated compounds are more toxic than active ingredients alone (Microtox[®]) and no synergistic or antagonistic effects were recorded. However, these mixtures impaired rapidly and transitory the Limagne soil microbial communities, without modifying the global parameters of structure and abundance. Effects were also recorded on sensitive communities, such as phototrophic, nitrifying and denitrifying communities. A comparison of mixtures effects on phototrophic communities from two soils underlined the high toxicity of Dual Gold Safeneur[®] and challenged its use from an ecotoxicological point of view.

Mots clés : microbial ecotoxicology, herbicides mixtures, commercial formulations, recommended field rates, microcosms, structure, abundance, activity