

Université de Montréal

**Effet des pesticides sur la diversité bactérienne des
champs agricoles et la capacité des bactéries à les
dégrader**

par Asmaâ AGOUSSAR

Département de Microbiologie Immunologie et Infectiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Microbiologie

Mai, 2017

© Asmaâ AGOUSSAR, 2017

Résumé

Dans cette étude, à l'aide du séquençage d'amplicon de l'ARN 16S bactérien, associé aux analyses bioinformatiques et statistiques, nous avons démontré pour la première fois que les Actinobacteries qui sont majoritaires dans le sol et représentent jusqu'à 45%, sont les plus affectées par les pesticides. En outre, nous avons démontré que les Acidobacteries sont aussi affectées par le mélange Linuron et Diuron testé, et que l'exposition successive du sol à ces molécules peut entraîner leur diminution significative. Cependant, le pourcentage des bactéries de l'ordre des Burkholderiales appartenant à la classe BetaProteobacteria, et les Xanthomonadales, qui appartiennent à la classe GammaProtéobacteria, du groupe Protéobacteria augmentent significativement. Une fois que l'exposition aux pesticides s'est arrêtée pendant la période hivernale, la biodiversité des bactéries citées avait tendance à revenir à la normale.

Rhodanobacter spathiphyllum et *Geobacillus stearothermophilus* ont été isolés d'un échantillon de sol exposé aux pesticides et ont montré une croissance optimale en présence de Diuron dans un milieu minimum par rapport à leur absence.

La dégradation de Linuron par les deux bactéries, a été confirmée par HPLC-MS, et le résultat semble être le même (de 20 µg / ml à 0,9 µg / ml), alors que la dégradation de Diuron par *R. spathiphyllum* était meilleure (de 40 µg / ml à 31 µg / ml) par rapport à *G. stearothermophilus* (de 40 µg / ml à 37 µg / ml). Cette dégradation de Diuron par *R. spathiphyllum* semble donner des produits de dégradation toxiques pour cette bactérie après deux semaines d'incubation, ce qui résulte un déclin de croissance de la bactérie.

Mots-clés : Microbiologie des pesticides, Diuron, Linuron, Bioremédiation, biofiltres, Biodiversité du sol.

Abstract

This study presents the characterization of bacteria involved responsible *in-vivo* bioremediation of herbicides Diuron and Linuron. Microbial biodiversity was analyzed using 16S RNA amplicon sequencing methods for six soil samples of two different biofilters, sampled three times a year over three year period.

Illumina MiSeq amplicon sequencing coupled with bioinformatics and statistical analysis showed that the Actinobacteria group are most abundant in soil noncontaminated by pesticides accounting for up to 45% of bacteria, whereas subsequent exposure of soil to pesticides altered the biodiversity and the abundance of each group of bacteria present in a given soil sample. Proteobacteria were found to be the most abundant after three successive exposures to pesticides during the growing session. Once pesticide exposure stopped during the winter period, the biodiversity of our soil had a tendency to recover.

Rhodanobacter spathiphyllum and *Geobacillus stearothermophilus* were isolated from a soil sample exposed to pesticides and showed optimal growth in the presence of Diuron in liquid minimal medium compared to conditions without the pesticide. The results of degradation of Diuron and Linuron by *R. spathiphyllum* in minimal medium, were confirmed by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS), and showed a better degradation of Linuron (from 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and Diuron (from 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by *R. spathiphyllum* and (from 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by *G. stearothermophilus*. The degradation of Diuron by *R. spathiphyllum* seems to produce by-products that inhibit its growth.

Keywords : Microbiology of pesticides, Diuron, Linuron, Bioremediation, Biofilters. Biodiversity of soil.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Table des matières	3
Liste des tableaux	6
Liste des figures	7
Liste des sigles	8
<u>Dédicace</u>.....	9
<i>A mes chers parent : Ali & Aïcha</i>	<i>9</i>
Remerciements.....	10
Introduction générale.....	11
<u>Partie 1:</u>	14
<u>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>.....	14
Chapitre bibliographique 1 : Les pesticides et leurs impacts sur l'environnement.....	15
Mise en contexte.....	16
I. Les pesticides	16
1) Définition	16
2) Classification des pesticides	16
3) Application des pesticides.....	18
4) Règlement sur les pesticides	19
5) La contamination par les pesticides	20
6) Contamination des ressources d'eau	20
a) La contamination diffuse	21

b) La contamination ponctuelle.....	21
c) Contamination des fruits et légumes.....	21
d) Contamination de l'air	22
II. Toxicité et écotoxicité	23
1) Pour les humains.....	23
2) Pour l'environnement.....	24
III. Les herbicides	24
1) Définition	24
2) Classification des herbicides.....	25
IV. Caractéristiques des pesticides choisis.....	27
1) Linuron.....	27
2) Diuron	28
<u>Chapitre bibliographique 2 : Procédés de dépollution</u>	30
Mise en contexte.....	31
I. Les procédés physicochimiques.....	31
II. Les traitements thermiques	31
III. Les traitements biologiques	32
1) Les procédés biologiques anaérobies.....	32
2) Les procédés biologiques aérobies.....	33
3) La phytoremédiation	34
4) La biodégradation par les microorganismes	36
IV. Les systèmes de bioremédiation.....	38
1) Le <i>Biobed</i>	38
2) Phytobac.....	39
3) Biofiltre.....	40
V. Les facteurs influençant la dégradation biologique.....	41
1) Facteurs biologiques	42

a) Les interactions entre les bactéries	42
b) Les interactions bactéries-plantes	43
2) Facteurs physicochimiques	44
a) La température	44
b) Le pH	44
c) Teneur en eau	44
d) La nature du sol, et de la matière organique	45
e) La porosité	45
VI. Rôle des communautés microbiennes dans la biorémédiation	45
1) Études microbiologiques.....	46
2) Études métagénomiques.....	46
VII. La bioremédiation des pesticides en milieux agricoles.....	47
<u>Partie 2 : Article</u>	49
Introduction:.....	53
Materials and methods.....	54
Results and discussion.....	57
1) Biodiversity of soil exposed to pesticides.....	57
2) Degradation of pesticides:.....	59
Conclusion	62
References:	63
Table and Figures.....	67
<u>Partie 3</u>.....	83
<u>Discussion générale</u>	83
Conclusion.....	91
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I. Les techniques de phytoremédiation (inspiré de (SQP, 2016)	34
Tableau II. Les techniques de bioremédiation microbienne	37
Table 1 : Representative table of sampling.....	80

Liste des figures

Figure 1. Classification des pesticides (basé sur (Gouvernement du Québec, 2016) et (E-TIC, 2014)	17
Figure 2. Classification des herbicides	26
Figure 3. Formule développée de linuron	27
Figure 4. Formule développée du Diuron	28
Figure 5. Recyclage biologique de la matière entre les organismes vivants	33
Figure 6. Schéma simplifié d'un Biobed (inspiré de (Del Pilar Castillo et al., 2008)	39
Figure 7. Schéma simplifié d'un Phytobac (inspiré de (Chambres d'Agriculture, 2006))	40
Figure 8. Schéma simplifié d'un biofiltre	41

ARTICLE

Figure 1. Graphical representation of bacterial abundance by group in uncontaminated soil	70
Figure 2. Example of proliferation of the Proteobacteria group for the six sampling points	71
Figure 3. Graphical representation of bacterial abundance by group in a soil exposed to pesticides.....	72
Figure 4. Proliferation of the Proteobacteria group during the three-year exposure to pesticides.....	73
Figure 5. Decrease in the Actinobacteria group during the three-year exposure to pesticides	74
Figure 6. Graphical representation of bacterial abundance up to the species in a soil exposed to pesticides.....	75
Figure 7. Burkholderiales increase during the three-year exposure to pesticides.....	76
Figure 8. Xanthomonadales increase during the three-year exposure to pesticides	77
Figure 9. Example of bacterial growth in the presence of Diuron.....	78
Figure 10. Bacteria growth using pesticides	79

Liste des sigles

3,4-DCA : 3,4-dichlooraniline

ADN : Acide désoxyribonucléique

C : Carbone

CVAC : Critère de vie aquatique chronique

DMHA : Diméthylhexylamine

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IRIC: Institut de Recherche en Immunologie et Cancer. Université de Montréal

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

MDDELCC : Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques

MDDEP : Ministère de Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs.

MM : Milieu minimum (Minimal media)

MS : Spectrométrie de masse

N : Azote

O : oxygène

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

Dédicace

A mes chers parent : Ali & Aïcha

A mes chers frères : Said & Abdellatif

A mon neveu que j'adore : Ali

A mes chers amours Amine & Soulaymane

Remerciements

Avant toute chose, mes plus sincères remerciements s'adressent à mon directeur, Professeur George Szatmari pour son soutien.

Mes vifs remerciements s'adressent au Dre. Marylise Dupertuy et Dr. Mohamed Hijri de me faire l'honneur d'accepter de juger mon travail.

Un grand merci à mon nouveau directeur de thèse Etienne Yergeau pour son encouragement et son aide. Sans toi Etienne, je ne finirai jamais cette maîtrise.

Merci à mes meilleurs amis et mes collègues pour tous les moments qu'on a partagé durant ces cinq sessions de recherche, merci également pour nos échanges scientifiques qui ont permis de m'aider à évoluer dans la bonne direction, merci d'avoir rendu mon quotidien à l'université agréable. Amal, Insaf et Fabio, je vous remercie pour les conseils, le soutien moral et pour les tasses de café qu'on a partagé chaque midi.

À titre plus personnel, je remercie ma famille, et en particulier mes parents qui grâce à eux j'ai pu faire ce travail, merci pour vos visites fréquentes qui m'encouragent, merci pour votre amour qui m'épaule à chaque moment de faiblesse. Je remercie fort mes deux frères pour leurs appels téléphoniques quotidiens et soutien, j'aimerais bien que vous sachiez que vous resterez toujours gravés dans mon cœur.

Un grand merci à mon époux pour sa patience, merci de m'endurer et de partager avec moi tout les moments durs et difficiles, merci d'être un amour, un ami et un époux agréable. Le plus grand remerciement s'adresse à mon petit prince Soulaymane qui vient de fêter son deuxième mois de vie, MERCI pour la sensation spéciale de devenir Maman.

Introduction générale

L'intensification de l'agriculture a engendré une utilisation croissante des fertilisants et des produits phytosanitaires due au progrès dans le domaine de la chimie organique de synthèse. Ces produits, qu'ils soient de synthèse ou naturels, sont destinés à limiter la prolifération des parasites tels que les mauvaises herbes, les insectes, les champignons, les rongeurs, les acariens... dans le but d'améliorer les rendements agricoles.

La pollution des sols dans plusieurs régions du monde y compris le Québec est à la base des pratiques agricoles intensives. Au Québec, les ventes de pesticides totalisaient 4,4 millions de kilogrammes d'ingrédients actifs en 2012, dont 84,4 % pour le milieu agricole, comparativement à 10,3 % pour le milieu urbain. On compte dans la totalité 348 ingrédients actifs dans la composition de 1 216 produits commerciaux (MDDELCC, 2015).

Toutefois, certains de ces pesticides peuvent demeurer dans le sol plusieurs années après avoir été appliqués tels les organochlorés. Ainsi ils peuvent être acheminés vers les eaux de surface ou les eaux souterraines en s'infiltrant à travers les couches du sol. Des organismes tels les abeilles, les oiseaux, les organismes aquatiques qui ne sont pas visés directement peuvent être touchés, atteignant ainsi des humains via un transfert des polluants par chaîne alimentaire. On note plus de 1800 déclarations annuelles à propos des intoxications probables aux pesticides au Québec (MDDELCC, 2015).

De ce fait, il est indispensable de mettre en place toutes les mesures nécessaires permettant de réduire ces transferts dans l'environnement en instaurant les bonnes pratiques agricoles et en développant des techniques de traitement adaptées pour éliminer les résidus phytosanitaires dans des conditions contrôlées.

Les traitements biologiques, qui sont souvent utilisés pour remédier à ce genre de problèmes se basent sur des organismes vivants pour dégrader un polluant donnée. Toutefois, l'efficacité des technologies connues pour ces traitements n'est pas satisfaisante pour tout type de pollution.

Dans le cadre de notre recherche, la technologie de traitement biologique qu'on va développer, est la bioremédiation/biofiltration.

La bioremédiation est la dégradation et transformation des polluants organiques toxiques en produits non ou moins toxiques pour l'environnement. Ce processus qui se déroule dans un sol contaminé est principalement activé par des microorganismes qui ont la capacité de survivre dans des conditions similaires.

Notre hypothèse suggère que la pollution des sols par des pesticides à plusieurs reprises augmente la résistance des micro-organismes qui nichent cet environnement, et qui peuvent être par la suite capables de dégrader ces polluants. Ces micro-organismes acquièrent des gènes codant des enzymes responsables de la dégradation de ces pesticides.

L'objectif principal dans le cadre de ce travail de recherche était de développer des approches tant conceptuelles que techniques qui permettent de dépolluer une eau contaminée par des pesticides, surtout lors d'une contamination ponctuelle.

Nos objectifs spécifiques sont de:

- Isoler, identifier et quantifier les espèces bactériennes présentes dans un sol contaminé par les pesticides ;
- Confirmer *in vitro* la capacité de ces micro-organismes à dégrader le Diuron et le Linuron ;
- Confirmer *in situ* le potentiel des bactéries isolées à dégrader le Linuron et le Diuron, en les inoculant sur des biofiltres contaminés à la ferme.

Ce mémoire compte en plus d'une introduction deux grandes parties :

La première partie est une synthèse bibliographique divisée en deux chapitres, dont le premier est dédié à l'étude de la problématique, tenant compte de la contamination des sols et des eaux par les pesticides, la toxicité de ces derniers et leur classification, et le deuxième traite des solutions possibles pour la décontamination des sols et des eaux pollués par les pesticides.

La deuxième partie porte sur les résultats obtenus au laboratoire, et dans les champs, dans le but de mettre en évidence l'applicabilité de la méthode choisie, à savoir la technique de bioremédiation utilisant un système de biofiltration à la ferme.

Une conclusion générale termine ce manuscrit et propose des perspectives.

Partie 1:

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

**Chapitre bibliographique 1 : Les pesticides et leurs impacts
sur l'environnement**

Mise en contexte

L'étude bibliographique faite dans ce chapitre porte sur l'utilisation des produits néfastes pour notre environnement ainsi que pour l'être humain : les pesticides.

Qu'est ce qu'un pesticide? Quels sont ses dérivés, ses modes d'action, et son importance dans l'agriculture? Plusieurs autres questions qui nous ont rendu intéressés par ce sujet de recherche, dont ce chapitre représente des réponses claires.

I. Les pesticides

1) Définition

Toutes substances ou mélanges de substances utilisés pour éloigner, détruire ou diminuer tout êtres vivants nuisibles pour l'agriculture, est communément nommé les pesticides (CRAAQ, 2016), et peuvent être destiné contre les populations d'insectes ou des rongeurs, de mauvaises herbes ou de microorganismes, ou toutes autres formes de vies considérées nuisibles pour l'agriculture. Selon leur composition on peut trouver des pesticides organochlorés ou organophosphorés, les premiers sont plus stables chimiquement, et peuvent persister plusieurs années dans l'environnement, par contre les deuxièmes sont moins stables et se dégradent assez rapidement par des processus naturels.

2) Classification des pesticides

Ces substances peuvent être classées selon les maladies contre lesquels ils agissent, ou bien selon les phytopathogènes responsables. Les fongicides, les herbicides et les insecticides représentent à eux seuls 97 % (Esteve, 2007). Ils peuvent aussi être classées selon leurs origines (E-TIC, 2014) (Fig1). Or, les effets de ces produits peuvent être nocifs pour l'environnement ou pour d'autres organismes qui ne sont pas visés par leur application.

Le risque le plus grave de cette pollution peut atteindre la santé des consommateurs, si le polluant atteint l'eau souterraine ou bien est absorbé par les plantes qui peuvent être consommées par la suite (Lallemand-Barrès, 1993).

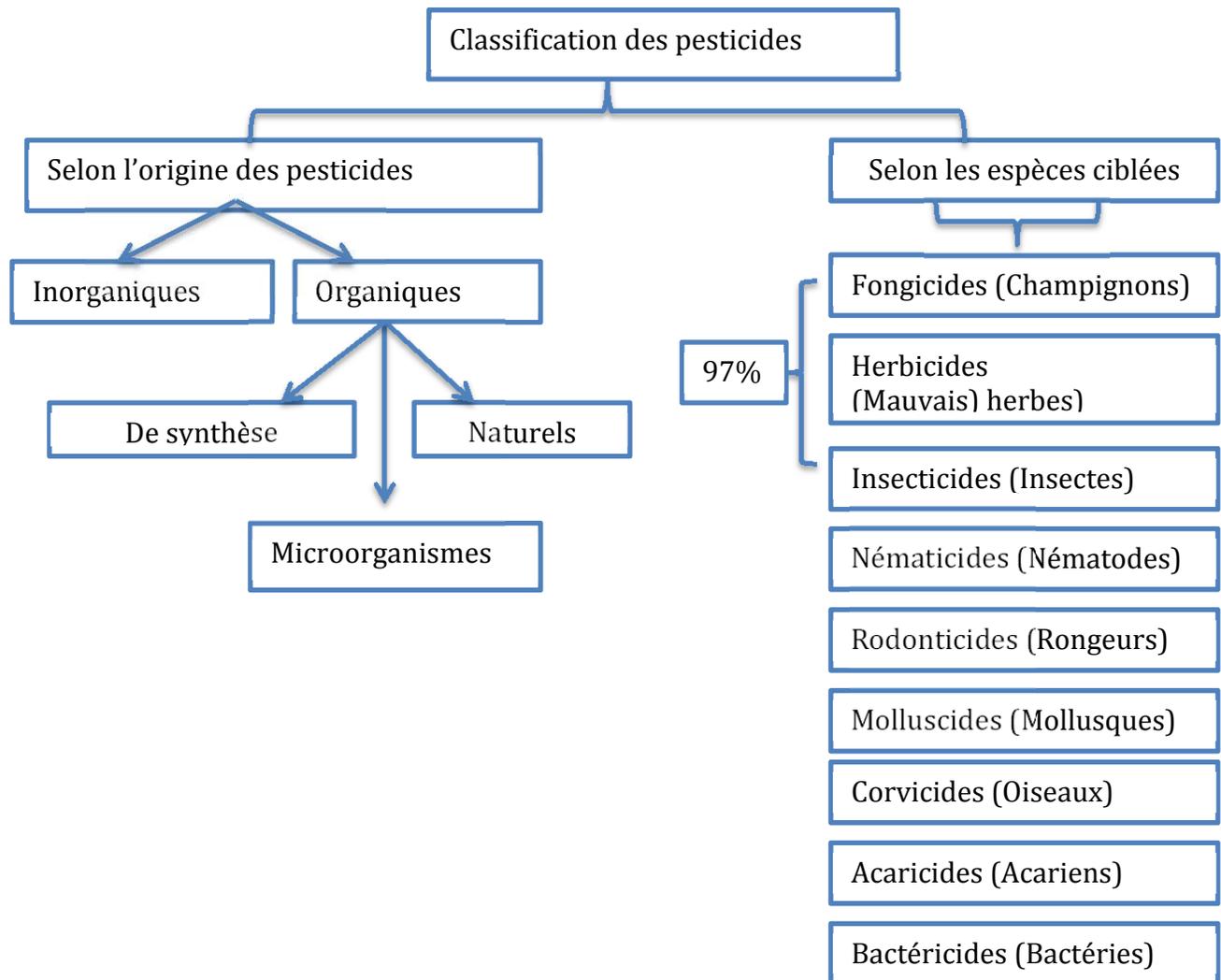


Figure 1. Classification des pesticides (basé sur (Gouvernement du Québec, 2016) et (E-TIC, 2014))

Les pesticides inorganiques sont des produits chimiques qui intègrent dans leurs structure d'autres atomes tel que du carbonate ou du cyanure, ils sont dérivés essentiellement de minéraux à base cuivre, arsenic, fluore, mercure, soufre ou cyanure (Gouvernement du Québec, 2016), ces éléments chimiques dont ils sont constitués ne se dégradent pas, ce qui rend leurs impacts environnementaux et toxicologiques sévères (E-TIC, 2014). Alors que les pesticides organiques contiennent du carbone et peuvent être facilement divisés en trois groupes, à savoir les pesticides organiques de synthèse qui sont développés en laboratoire et produits en usine, les pesticides organiques naturels d'origine animale, microbienne ou végétale (Gouvernement du Québec, 2016), ou bien les bio-pesticides qui peuvent jouer un rôle important dans la gestion des nuisibles et qui sont fait à base d'ingrédients biologiques actifs, ou à base de vivant tel que des microorganismes utiles, comme les bactéries, les virus, les champignons, les protozoaires, ou bien des nématodes bénéfiques (E-TIC, 2014).

3) Application des pesticides

Afin de mieux les gérer, les agriculteurs doivent savoir de quelle manière un pesticide affecte les nuisibles. Une bonne connaissance du principe actif toxique de la substance antiparasite peut faciliter l'attaque des nuisibles visés afin d'inhiber leur croissance, cette gestion chimique peut aussi aider à diminuer la prolifération de certaines phytophathologies. L'application d'une molécule antiparasite n'est efficace que lorsqu'on connaît bien la composition physique et chimique du principe actif, et que cette molécule tue ou endommage les organismes nocifs responsables de la dégradation des cultures. La dose applicable est basée sur l'abondance de nuisibles, les dégâts potentiels sur les cultures, les pertes de rendement estimées, sans oublier les coûts économiques de l'application des pesticides par rapport aux bénéfices rapportés par la protection des cultures (E-TIC, 2014).

Selon une citation de Paracelse (1493-1541), médecin suisse : "Rien n'est poison, tout est poison, seule la dose fait le poison. »

4) Règlement sur les pesticides

En vertu du Règlement sur les permis et certificats pour la vente et l'utilisation des pesticides, « Tout producteur qui utilise des pesticides à usage agricole, ou encore toute personne ou tout employé chargé d'utiliser pour lui ces pesticides doit être titulaire d'un certificat de qualification, qu'il aura obtenu après avoir réussi un examen d'évaluation des connaissances reconnu pour son secteur d'activité » (Design, 2011). Et selon (Gouvernement du Québec, 2016). « Tout produit phytosanitaire importé d'ailleurs à des fins de commerce ou d'utilisation au Canada doit être homologué par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA), relèvant de Santé Canada ».

Selon la section VI du chapitre I de la loi sur la protection de l'environnement, Article 20 : « Nul ne doit émettre, déposer, dégager ou rejeter ni permettre l'émission, le dépôt, le dégagement ou le rejet dans l'environnement d'un contaminant au-delà de la quantité ou de la concentration prévue par règlement du gouvernement. La même prohibition s'applique à l'émission, au dépôt, au dégagement ou au rejet de tout contaminant, dont la présence dans l'environnement est prohibée par règlement du gouvernement ou est susceptible de porter atteinte à la vie, à la santé, à la sécurité, au bien-être ou au confort de l'être humain, de causer du dommage ou de porter autrement préjudice à la qualité du sol, à la végétation, à la faune ou aux biens » (Irosoft, 2016) Et selon l'article 25 de la loi portant sur la qualité de l'environnement, « le ministre peut ordonner à toute personne ou compagnie émetant sur l'environnement toute sorte de contaminat visé par l'article 20, d'arrêter définitivement ou temporairement ou bien de limiter, l'émission, le rejt, le dépôt, ou le dégagement de ce contaminant » (Irosoft, 2016)

5) La contamination par les pesticides

La surveillance des pesticides en milieu aquatique, effectuée au Québec, met en évidence leur présence dans l'environnement, à des doses qui peuvent dépasser le critère de vie aquatique chronique (CVAC) et affecter les espèces aquatiques intégrées dans la chaîne alimentaire selon une étude faite par le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) (Giroux, 2015).

Malgré tous les efforts faits par le MDDELCC, des herbicides sont toujours détectés dans les eaux de rivières du Québec en milieu agricole, cette détection est appuyée par une augmentation des ventes de ces derniers en milieu urbain. De plus, le MDDELCC a poursuivi un échantillonnage des puits individuels près de zones en culture au Québec, et l'étude a mis en évidence des traces de pesticides dans 69 % des puits échantillonnés, d'où un impact potentiel sur la santé des consommateurs (MDDELCC, 2015), et dans certaines situations, des effets négatifs de cette contamination sont observés entre autre sur la biodiversité et sur la qualité de l'eau pour l'irrigation des cultures (Design, 2011).

6) Contamination des ressources d'eau

Les résultats de suivi fait par le MDDELCC montrent que la pluie est parmi les facteurs responsables de l'apparition des pesticides dans l'eau de rivière, cette pluie achemine ces derniers à travers les couches de sol pour atteindre les nappes phréatiques, d'où la détection d'un mélange de plusieurs pesticides au même temps (Giroux, 2004). Par conséquent on remarque deux voies de contamination, et on parle de la contamination diffuse ou la contamination ponctuelle.

a) La contamination diffuse

La contamination diffuse des eaux par les pesticides est le résultat d'un ajout de ces derniers sur un grand territoire. L'érosion, le ruissellement et le lessivage sont les principaux mécanismes qui conduisent à la diffusion des pesticides dans le sol jusqu'aux eaux souterraines (Pesce, 2010). Sachant que le polluant se répand dans le milieu agricole en petites quantités, ce dernier peut causer finalement un risque de contamination si on tient compte des longues périodes d'utilisation régulières (Boudouch, 2009). La contamination diffuse est le résultat de facteurs anthropiques tel que les traitements, les pratiques agricoles ou le type de culture et aussi selon des paramètres liés au milieu naturel incluant le climat, la nature du sol ou bien la topographie, ce qui rend sa maîtrise beaucoup plus difficile (Esteve, 2007).

b) La contamination ponctuelle

La contamination ponctuelle ou directe est le résultat d'une quantité de pesticides rejetée à un point unique et identifiable, à des concentrations assez élevées par rapport à la contamination diffuse (Boudouch, 2009), on compte parmi les raisons un déversement accidentel, une fuite d'effluent ou une pratique inappropriée des bouillies, leur transport, la vidange du matériel ou son nettoyage, l'entreposage des pesticides ou même l'abandon de ses contenants non rincés avec des quantités non négligables près d'une source d'eau (CRAAQ, 2016).

Cette contamination représente 50 à 90% de la pollution des eaux par les pesticides (Hepia, 2012), Elle représente le risque réel pour l'environnement, mais en tenant compte de ses origines contrôlables, sa maîtrise est devenue obligatoire.

c) Contamination des fruits et légumes

Selon le plan de surveillance de l'innocuité des aliments, réalisé par le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) entre 2007 et 2011, le laboratoire d'expertise et d'analyses alimentaires (LEAA) a reçu et analysé

3460 échantillons de fruits et légumes frais, et des résidus de pesticides ont été détectés dans 43 % des aliments.

D'autres études ont confirmé l'existence d'un nombre accru de substances actives et des concentrations plus élevées des pesticides dans les produits étrangers que dans ceux du Québec avec un pourcentage des résidus de pesticides de 41 % dans les produits du Québec, et 45 % dans les échantillons d'ailleurs (Richard, 2011).

d) Contamination de l'air

Le déplacement des gouttelettes pulvérisées de pesticides ou la vaporisation des gouttelettes de pesticides, dans ou hors de la zone visée par le traitement peut constituer une source importante de contamination, surtout pour les zones voisines qui n'ont pas été traitées par ces molécules, et peut en résulter des poursuites judiciaires à cause des dommages potentiellement causés (CRAAQ, 2016). La vaporisation de certains pesticides durant et après la pulvérisation peut contaminer l'air avec des vapeurs qui s'élèvent et se transportent par les courants d'air sur des distances non négligeables au-dessus de la zone traitée (Giroux, 2004). Les conditions météorologiques telles que la force du vent, l'humidité relative de l'air ou la température sont responsables de cette vaporisation, qui peut par la suite être influencée par des caractéristiques de l'équipement utilisé pour la pulvérisation tel que le diamètre des gouttelettes pulvérisées, la vitesse de déplacement du matériel d'application, ou même la distance entre la buse et la cible (CRAAQ, 2016).

On peut donc gérer cette contamination, ou garantir une meilleure efficacité du produit, tout en diminuant les risques pour la santé et l'environnement, par la réduction de la dérive de l'air, ou l'application d'une quantité bien précisément démontrée efficace pour les cultures à traiter (CRAAQ, 2016).

II. Toxicité et écotoxicité

L'application des pesticides a causé une contamination des échantillons alimentaires et des produits agricoles dans de nombreux pays (Yasser El-Nahhal, 2015), sans oublier que les sols et les eaux ont été contaminés par ces composés ou métabolites intermédiaires formés lors de leur biodégradation (Cycoń et al., 2010). Les dépassements de critères de la qualité de l'eau et la présence conjuguée de plusieurs pesticides peuvent avoir des conséquences sur les espèces aquatiques (Giroux, 2004).

1) Pour les humains

Les pesticides possèdent tous, à différents degrés, un potentiel de toxicité, qui peut malheureusement aussi toucher des organismes non visés, dont l'Homme, problème qu'on ne peut pas expérimenter chez les êtres humains (CRAAQ, 2016). Le délai d'apparition des symptômes varie en fonction de la toxicité du pesticide, et peut aller de quelques minutes à quelques heures après une exposition directe aux produits. Il peut aussi varier en fonction de la dose reçue, de la sensibilité de la personne touchée ou de la voie d'absorption (orale, cutanée ou respiratoire) (Giroux, 2004).

Par ailleurs les pesticides pourraient avoir des effets sur la reproduction telle que la diminution de la fertilité ou même l'infertilité, et sur le développement du fœtus donnant naissance à des bébés prématurés, et pourraient aussi causer des anomalies du développement embryonnaire donnant des malformations ou bien des retards de croissance et de développement. On note aussi l'avortement spontané, la baisse de libido et des effets sur la mobilité des spermatozoïdes (CRAAQ, 2016). Certaines expositions répétées aux pesticides peuvent ainsi causer des problèmes plus sérieux, potentiellement on note des répercussions sur le système nerveux, le système endocrinien, ou même le système immunitaire, ainsi que l'apparition de certains types de cancer et parfois des effets génétiques (Design, 2011; Giroux, 2004).

2) Pour l'environnement

Les résidus de pesticides sont présents sous forme de mélanges dans l'environnement. Ils peuvent subir des effets synergiques ou antagonistes additifs qui peuvent altérer l'équilibre des écosystèmes (Yasser El-Nahhal, 2015). L'infiltration des pesticides, peut contaminer les cours d'eau et toute source d'eau douce ou potable atteinte, et aussi contaminer les personnes habitant dans les zones contaminées (CRAAQ, 2016).

La répartition des pesticides dans les zones voisines non traitées peut avoir des effets néfastes sur la végétation non ciblée surtout quand on parle des herbicides, qui peuvent inhiber la croissance et le développement des herbres non ciblés (CRAAQ, 2016). Les mollusques, les algues, les insectes, les petits crustacés, les plantes aquatiques... ou tout organisme vivant dans une eau douce au voisinage des champs traités peut aussi être endommager, alors qu'ils n'étaient pas ciblés (Giroux, 2004).

III. Les herbicides

1) Définition

Un grand nombre de pesticides ont été détectés dans l'eau des rivières de Québec, et les herbicides sont les plus abondants selon une étude faite par le Ministère de Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) (Giroux and Pelletier, 2012), on note aussi qu'ils sont les plus vendus en agriculture représentant plus de la moitié des ventes totales en 2004 (Giroux, 2004).

Un herbicide est un produit phytopharmaceutique à usage agricole qui cible plus précisément les mauvaises herbes. Il s'agit de molécule, de synthèse ou d'une substance naturelle, qui possède une activité sur le métabolisme des plantes entraînant ainsi la mort de ces dernières, il sert à éliminer les plantes indésirables qui ne peuvent que

nuire aux rendements, en raison de la compétition sur les nutriments ou sur l'espace, qu'elles exercent sur les cultures en émergence (Giroux, 2004).

Selon une étude menée en 2001 sur les besoins de l'industrie de l'agriculture biologique par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation de la Saskatchewan, la lutte contre les mauvaises herbes est parmi les priorités en matière de recherche du ministère, et serait classée au deuxième rang (Johnson, 2011). Alors que l'augmentation de l'utilisation des herbicides en agriculture dans ces dernières années est encore en progression.

2) Classification des herbicides

Il existe de nombreux herbicides à la disposition des agriculteurs. On peut les classer selon différents critères, que ce soit le but, le moment d'application (ou de traitement), mode de pénétration dans la plante ou bien la famille chimique ou la sélectivité. La figure 2 résume la classification des herbicides selon ces critères.

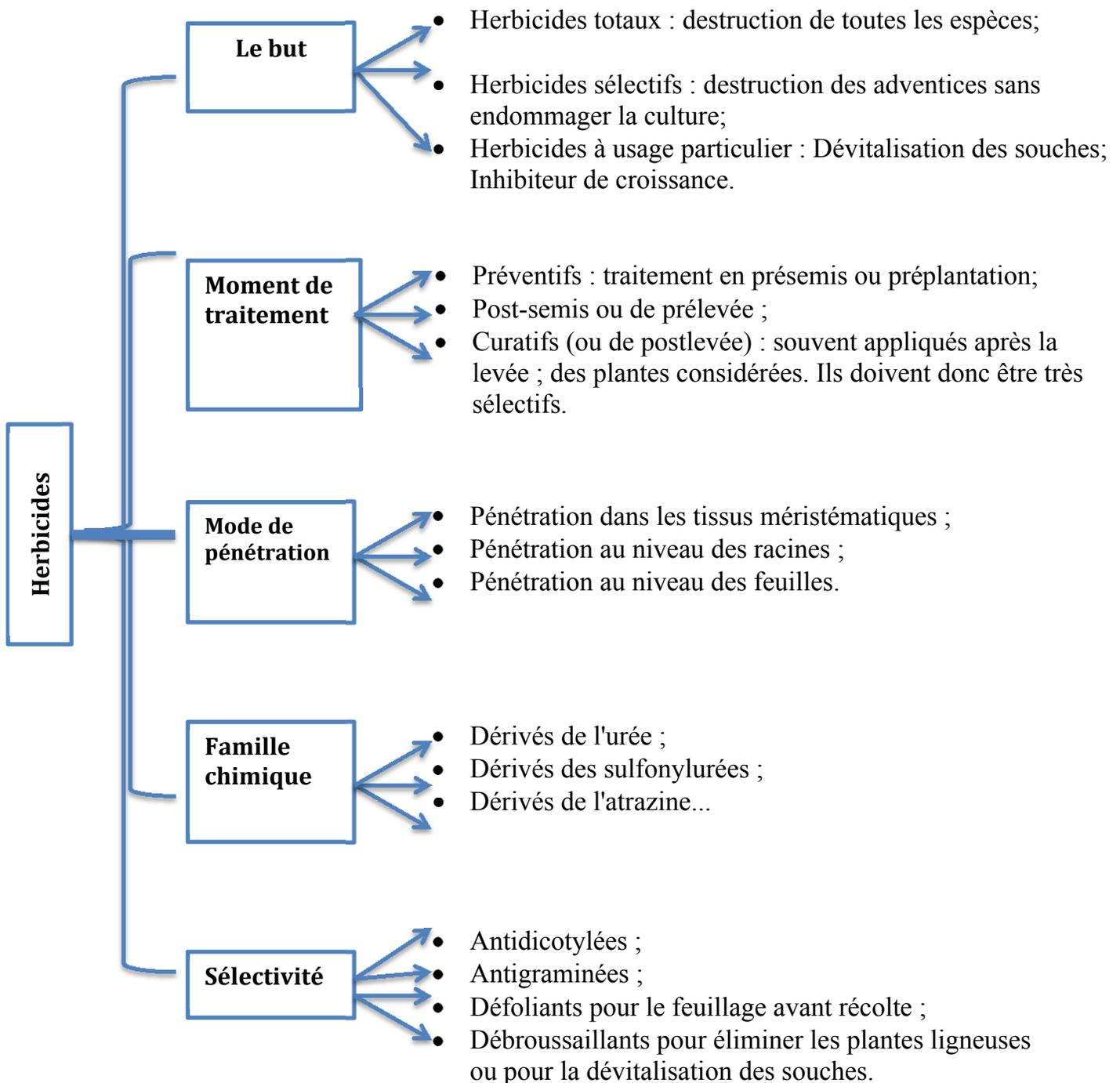


Figure 2. Classification des herbicides (Inspiré de Fourrages Mieux, (2016))

IV. Caractéristiques des pesticides choisis

Les herbicides du type phénylurée tels que Linuron, Diuron, Isoproturon et d'autres sont largement utilisés pour le contrôle pré et post-levée des graminées annuelles et les mauvaises herbes à feuilles larges (Aslim and Ozturk, 2009; Hulsen et al., 2002).

1) Linuron

Le Linuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea] est un herbicide des phénylurées substitués (Breugelmans et al., 2007a; Guzzella et al., 2006), son nom commercial est (LOROX, AFOLAN, LINURON) (Giroux, 2014a) et sa formule brute est $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$, alors que sa formule développée est mentionnée ci-bas (fig.3)

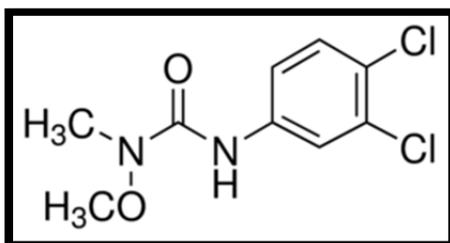


Figure 3. Formule développée de linuron

Il est modérément persistant et mobile dans les sols (Cycoń et al., 2010) avec une demi-vie de 38-67 jours (Dejonghe et al., 2003; Hulsen et al., 2002), et considéré comme modérément à fortement toxique pour les organismes aquatiques. Son principal mode d'action est la rupture de la photosynthèse dans les plantes cibles par l'inhibition des enzymes impliquées dans les chaînes de transport d'électrons photosynthétiques (Cycoń et al., 2010). Or, cette substance peut aussi toucher l'homme, on agissant

comme un antagoniste des récepteurs des androgènes affectant le système reproducteur mâle, et est donc également préoccupant pour la santé humaine (Breugelmans et al., 2007a).

Selon une étude faite par le MDDELCC le Linuron est un des herbicides les plus fréquemment détectés dans les eaux de Québec, avec une fréquence de détection qui dépasse 20% dans les eaux de surface et 70% dans les eaux de rivières près des cultures maraichères, et qui dépasse les critères de qualité de l'eau pour la protection des espèces aquatiques (Giroux, 2014b).

2) Diuron

Le Diuron (3-(3,4-dichlorophényl) -1,1-diméthylurée) est un herbicide de phénylurée substitué (Couture, 2009; M-Brugere, 2001) dont la formule brute est $C_9H_{10}Cl_2N_2O$, et la formule chimique est indiquée dans la figure 4. Il est largement utilisé pour le contrôle à long terme des mauvaises herbes dans les zones non cultivées et également dans une gamme de cultures arboricoles (Cullington and Walker, 1999).

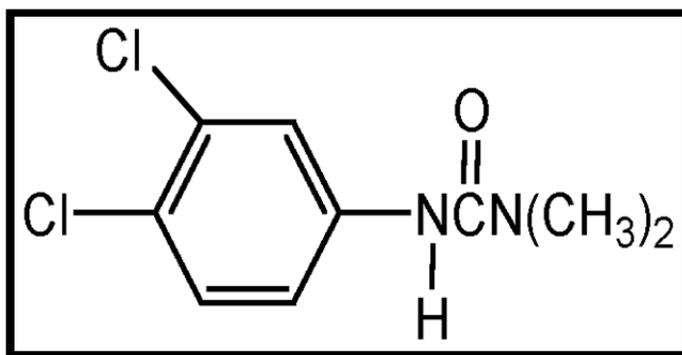


Figure 4. Formule développée du Diuron

C'est un des membres les plus utilisés comme herbicides à base de phénylurée, ces herbicides peuvent inhiber la photosynthèse en bloquant le transfert d'électrons (Aslim and Ozturk, 2009). Il est également utilisé dans de nombreuses régions du monde comme herbicide à large spectre dans les zones urbaines et industrielles, comme ingrédient actif dans les peintures pour bateaux antifouling et dans les formulations algicides utilisées dans les fontaines et l'aquaculture (Sørensen et al., 2008).

Le Diuron est relativement persistant dans le sol, avec des demi-vies de 90 à 180 jours (Cullington and Walker, 1999; Hulsen et al., 2002), et est largement utilisé dans une large gamme de formulations d'herbicides et, par conséquent, il est fréquemment détecté comme contaminant majeur dans les zones où il existe une utilisation extensive (Sørensen et al., 2008).

Selon des études faites par le ministère de l'Environnement, le Diuron est parmi les herbicides qui dépassent les critères de la qualité de l'eau pour la protection des espèces aquatiques (Giroux, 2004). Des niveaux élevés de cet herbicide dans l'eau peuvent entraîner une toxicité pour les organismes aquatiques et peuvent avoir des répercussions sur la santé humaine (Hladik and Calhoun, 2012). Il est modérément toxique pour les poissons et très toxique pour les invertébrés aquatiques (Hladik and Calhoun, 2012). Tenant compte de la toxicité de ce pesticide et de ses sous-produits, son élimination des eaux naturelles est une réelle nécessité (M-Brugere, 2001).

La dégradation microbienne est considérée comme le principal mécanisme de dissémination du sol (Cullington and Walker, 1999).

Chapitre bibliographique 2 : Procédés de dépollution

Mise en contexte

Ce chapitre traite des solutions disponibles pour la problématique de contamination des eaux citée dans le chapitre précédant, toutefois il faut savoir que pas toutes les solutions ou les techniques sont pratiquement applicables à tous les polluants.

Aussi il faut noter que la gravité de cette contamination qui touche notre environnement, notre santé et même nos pays à travers les pertes économiques des ressources aquatiques, signale un sérieux besoin de développer des techniques d'assainissement afin de minimiser ou même éliminer la contamination des ressources d'eaux.

I. Les procédés physicochimiques

Ce sont les premiers procédés connus, et sont assez nombreux, parmi eux on peut citer la séparation électrocinétique, fracturation, lessivage des sols, extraction vapeur, réduction/oxydation chimique, solidification/stabilisation, extraction chimique, déhalogénéation ou lavage. Par contre, l'inconvénient de ces projets c'est la nécessité d'un traitement *ex-situ*, alors que d'autres peuvent être faits *in situ* dans le but de minimiser les coûts et le transport, on note comme exemple l'oxydation chimique (peroxyde d'hydrogène, permanganate et persulfate de sodium ou potassium) (SQP, 2016).

II. Les traitements thermiques

Ils sont utilisés depuis de nombreuses années pour dépolluer les sols contaminés par des polluants organiques (Lallemand-Barrès, 1993). On peut citer l'injection de vapeur, la vitrification, l'incinération, la pyrolyse, la désorption thermique, la décontamination des gaz chauds (SQP, 2016), or ces technologies peuvent engendrer

des déchets comme les cedres, qui doivent être gérés par la suite, sans oublier leurs risques majeurs pour la population (Dufresne, 2013).

III. Les traitements biologiques

On parle des traitements biologiques, lorsqu'on se base sur des organismes vivants pour dégrader une pollution donnée. Parmi les méthodes de traitement biologique on peut compter le bioréacteur, le compostage, la phytoremédiation, l'atténuation naturelle contrôlée, la barrière perméable réactive, et aussi l'électroremédiation... (Dufresne, 2013). Toutefois, l'efficacité de ces technologies n'est pas satisfaisante pour tout type de pollution.

Dans le cadre de notre recherche, la technologie de traitement biologique qu'on va développer, est la bioremédiation/biofiltration.

La bioremédiation des sols peut être divisée en deux catégories, selon la stratégie de base «*in situ*» et «*ex-situ*». La première méthode nécessite un traitement qui n'implique pas l'excavation de sol contaminé alors que la deuxième l'oblige (Surajudeen and Adaji, 2009).

1) Les procédés biologiques anaérobies

On parle des traitements anaérobiques, lorsqu'un procédé biologique en utilisant des microorganismes, se déroule en absence d'oxygène.

Ce procédé se déroule en deux phases, la première qui est l'acidogénèse, là où la matière organique complexe telle que les lipides, les polysaccharides ou bien les protéines, doit être transformée en molécules plus simples et en acides gras volatils comme l'acétate, le butyrate, etc. Après c'est la deuxième phase nommée la méthanogénèse, où les acides gras volatils obtenus dans la première phase se transforment en gaz par l'action de la biomasse. Ces gaz produits sont principalement le gaz carbonique, l'hydrogène et le méthane (Turcotte, 2009).

2) Les procédés biologiques aérobies

Le sol est un écosystème complexe dans lequel se développe une activité biologique très intense. Les plantes, les animaux et les microorganismes sont les principaux groupes d'organismes vivants qui mêlent leurs activités dans un sol. Ils interagissent, pour réguler les processus de décomposition de toute matière organique existante dans le sol, et aussi des flux des nutriments, faisant du sol un réseau trophique très complexe (Djical, 2003)

En présence d'oxygène, la nature est-elle même, capable de se débarrasser des polluants qui l'ennuient par des cycles biogéochimiques en se basant sur l'utilisation des microorganismes, algues, plantes ou animaux qui sont capables d'accumuler les polluants, ou bien les dégrader (fig.5).

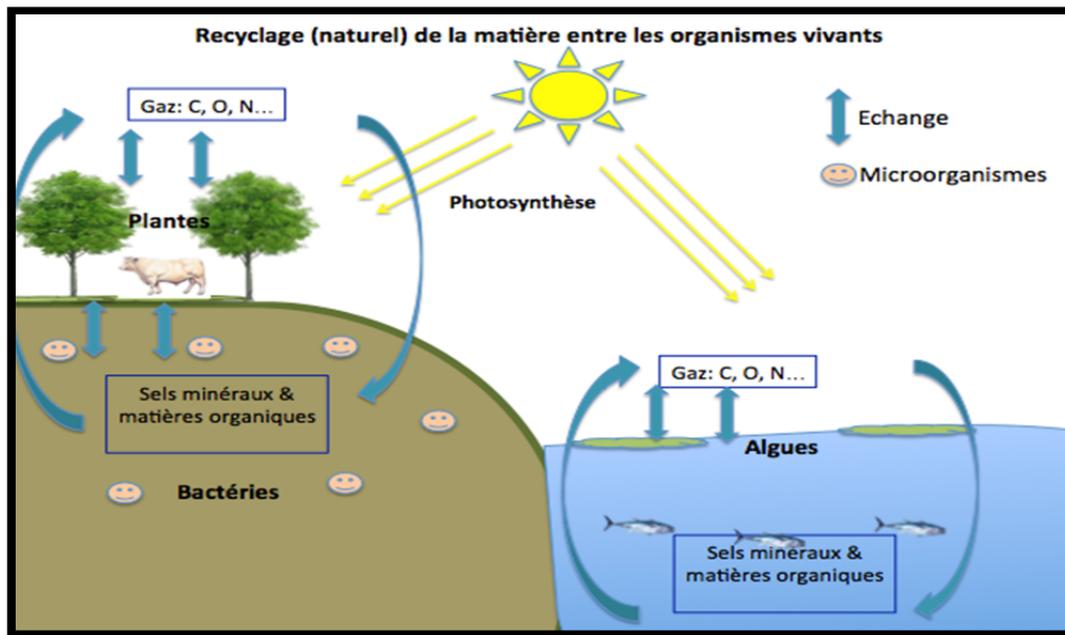


Figure 5. Recyclage biologique de la matière entre les organismes vivants

Certaines de ces plantes sont capables d'immobiliser les polluants (Lallemand-Barrès, 1993); Elles sont par la suite consommées par les animaux ce qui risque de transférer ces polluants à l'être humain par la chaîne alimentaire.

Les plantes et les animaux morts seront décomposés et minéralisés par les microorganismes qui s'en serviront de substrat et rejettent des sels minéraux, du gaz carbonique de l'azote, du phosphore (Moletta, 2011). Toutefois ces microorganismes et les plantes peuvent aider à dépolluer les sols par le processus naturel à des faibles concentrations de polluants, il s'agit de la bioremédiation naturelle. Seulement quelques espèces de bactéries ou de plantes peuvent tolérer de très fortes concentrations en métaux (Lallemand-Barrès, 1993).

3) La phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation des plantes pour réduire, dégrader, ou immobiliser des contaminants présents dans les sédiments, les eaux de surface, les eaux souterraines, les eaux usées ou principalement dans le sol (Chevrier, 2013). Le tableau I résume les principaux procédés de phytoremédiation et leurs principes.

Tableau I. Les techniques de phytoremédiation (inspiré de SQP, 2016)

Techniques	Principes
Phytoextraction ou Phytoaccumulation	L'extraction des contaminants du sol à l'aide des plantes, qui les accumulent dans leurs parties aériennes. On note parmi les contaminants, les éléments traces métalliques, et aussi certains types de contaminants organiques... Par la suite ces plantes doivent être retirées du site, pour retirer de façon permanente toute sorte de contaminants. Cette biomasse récoltée est incinérée dans un endroit contrôlé (Afin

	de s'assurer de la combustion optimale des gaz et de la récupération totale des cendres toxiques).
Phytostabilisation	Les plantes procèdent à une immobilisation chimique des contaminants dans le sol (précipitation, absorption, stabilisation ou piégeage), ou bien elles préviennent des mouvements latéraux ou verticaux via l'érosion ou lessivage.
Phytodégradation ou Phytotransformation	Les plantes accumulent les polluants organiques dans leurs tissus ou elles les dégradent en sécrétant des enzymes responsable de la biodégradation dans le sol.
Rhizodégradation ou Phytostimulation	La décontamination est effectuée par des micro-organismes dont la croissance et l'activité sont stimulées par les plantes, processus qui se déroule dans la rhizosphère.
Phytovolatilisation	Les polluants volatiles (organiques ou inorganiques) sont extraits du sol par les plantes, puis relargués dans l'atmosphère par transpiration. Il n'est pas obligatoire de récolter les plantes utilisées afin de les traiter. Par contre, il ne faut pas sousestimer le risque de transport des polluants dans l'atmosphères.
Rhizofiltration	Technique de traitement des eaux usées municipales, industrielles, souterraine, le lixiviat des sites d'enfouissement ou bien tout ruissellement de surface ou d'une eau qui s'infiltré dans le sol en zone agricole. Technique qui se base sur l'utilisation des plantes aquatiques ou terrestres, et parfois une combinaison des deux.

4) La biodégradation par les microorganismes

Le nettoyage des sols à l'aide de microorganismes est une technique très connue, car elle était utilisée à des fins d'exploitation minière (Lallemand-Barrès, 1993). Ces microorganismes ont été exploités pour la biodégradation des sols pollués ou des eaux usées, grâce à leur capacité à dégrader une vaste variété de composés organiques (Fuagier, 2010).

Le principe de biodégradation s'explique par la dégradation des composés à base de carbone par des microorganismes. Ces derniers peuvent être classés en microorganismes indigènes qui sont déjà présents dans la zone à traiter et qui sont capables de dégrader les polluants existant, ou des microorganismes exogènes qui sont ajoutés au milieu pollué au besoin, ou encore être isolés d'un échantillon du site contaminé, cultivés et identifiés au laboratoire puis ré-introduits dans le sol et c'est ce qu'on appelle la bioaugmentation (Abdelly, 2007). Beaucoup de ces isolats de bactéries ou fongiques qui sont capables de dégrader certains de ces composés ont été rapportés, mais ils sont encore mal caractérisés (Hulsen et al., 2002).

La bioremédiation d'un polluant carboné est aussi efficace pour l'élimination de composés pétroliers et des hydrocarbures BTEX (Benzène, Toluène, Éthyl-benzène, Xylène) (Gaudu, 2014). Or, pour mieux contrôler cette biodégradation dans le sol, il faut très bien identifier la population microbienne du sol capable de transformer ces polluants ou, éventuellement, de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie (Soulas, 1985).

Les chercheurs ont tendance à développer ce processus naturel de bioremédiation dans le cas d'une contamination forte de l'environnement, on parle de la biostimulation, la bioaugmentation, la bioventilation ou le *landfarming*. Le tableau II représente les différentes approches de bioremédiation microbienne avec ses principes.

Tableau II. Les techniques de bioremédiation microbienne

Approche	Principe
Bioaugmentation	L'addition de microorganismes qui ont le potentiel de la biodégradation d'un polluant, au réacteur de boue biologique (Nasseri et al., 2010), sachant que les réacteurs (ou systèmes) utilisés en bioremédiation sont nombreux.
Biostimulation	La stimulation et l'ajustement de certains facteurs physiques et chimiques (La température du sol, le pH, la teneur en humidité, la teneur en éléments nutritifs, etc.) de façon à augmenter la rentabilité des microorganismes indigènes dans le site affecté (Surajudeen and Adaji, 2009)
<i>Landfarming</i> (sorte de phytoremediation ou agro-remediation)	Le principe est d'étaler le sol pollué déjà excavé sur un lit d'une faible épaisseur et large surface jusqu'à ce que les polluants soient dégradés. L'objectif est d'aider et faciliter la dégradation aérobie des contaminants par les microorganismes indigènes. En général, la technique s'applique au traitement des sols superficiels de 10 à 35 cm (Surajudeen and Adaji, 2009).
<i>Bioventing</i> (bioventilation)	La bioventilation ou l'extraction sous pression réduite, se base sur le contrôle des niveaux d'oxygène dans le sol et le sous-sol pour améliorer les conditions d'aérobiose des microorganismes aérobiques, la circulation de l'air à travers le sol facilite la volatilisation des composés organiques volatiles, et rend les sols aussi propices au développement des microorganismes responsables de la biodégradation des composés organiques moins volatils (Boudouch, 2009)

IV. Les systèmes de bioremédiation

Les propriétaires d'un terrain contaminé sont habituellement tentés de se tourner vers la technologie la moins dispendieuse. Or ce n'est pas le seul caractère intéressant pour choisir un système de bioremédiation, on peut aussi se baser sur les dimensions (selon le terrain), le type de polluant à éliminer, et le délai de traitement. Selon ces caractéristiques et d'autres, on peut citer :

1) Le *Biobed*

Les *biobeds* (lits biologiques) sont originaires de Suède, ils ont été créés en réponse à la nécessité de méthodes simples et efficaces pour minimiser la contamination de l'environnement par l'utilisation de pesticides, et principalement lors du remplissage des équipements de pulvérisation, qui est une source typique de contamination ponctuelle (Del Pilar Castillo et al., 2008). Ils se composent d'une fosse remplie d'un substrat capable de retenir les matières actives dans l'effluent contaminé, et de les décomposer grâce au pouvoir enzymatique des microorganismes présents dans ce substrat (De Roffignac et al., 2006). Il se divise en trois composantes, la première couche d'argile au fond de 10 cm de profondeur, la deuxième couche de 50 cm de profondeur est un mélange de paille, de tourbe et de sol (50:25:25 vol%), et la dernière couche d'herbe qui recouvre la surface. Le *biobed* est également équipé d'une rampe pour l'entraînement et le positionnement du pulvérisateur sur la surface herbeuse (Del Pilar Castillo et al., 2008), voir figure 6.

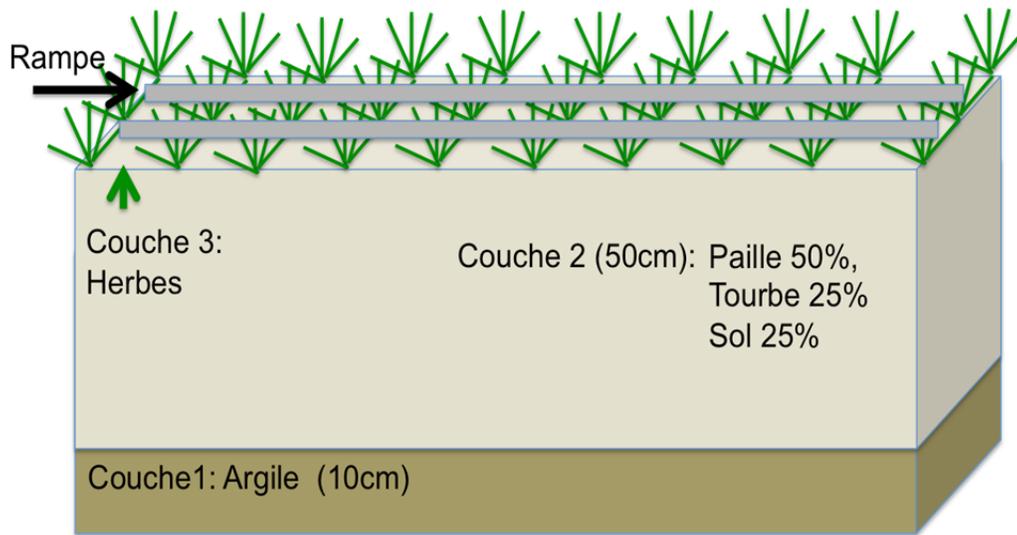


Figure 6. Schéma simplifié d'un *Biobed* (inspiré de Del Pilar Castillo et al., (2008))

2) Phytobac

Le Phytobac est comme son nom l'indique un bac dans lequel les effluents sont introduits régulièrement comprenant un mélange de terre et de paille, sa hauteur ne peut pas dépasser 60 cm après tassement, alors que sa superficie varie entre 2,5 et 5 m² par litre d'effluent généré annuellement au sein de l'exploitation. Cette dernière est calculée en se basant sur le volume d'effluents générés, l'exploitation, la répartition mensuelle des effluents, et aussi sur les conditions climatiques (Codis, 2009).

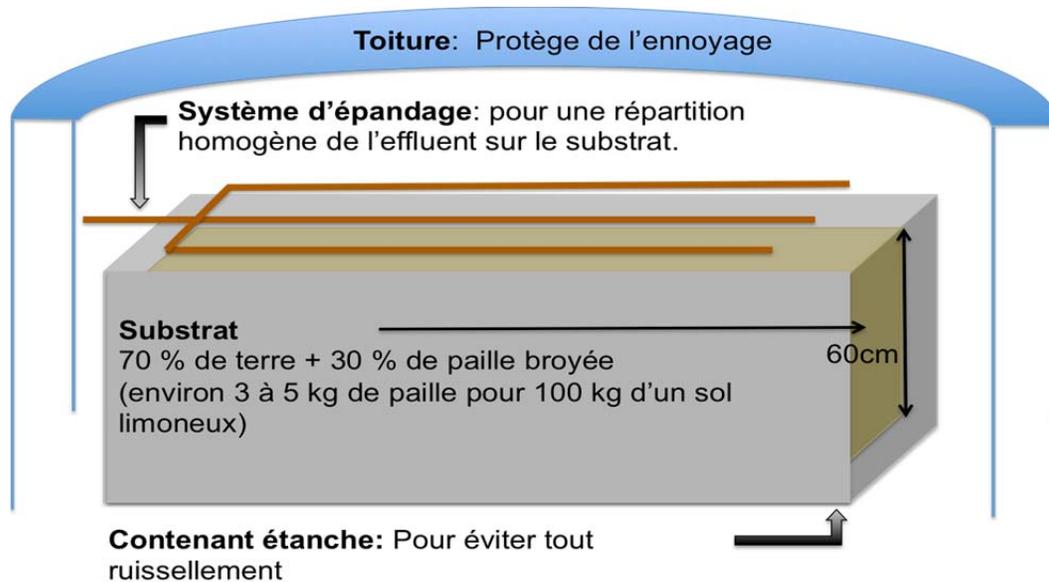


Figure 7. Schéma simplifié d'un Phytobac (inspiré de (Chambres d'Agriculture, 2006))

3) Biofiltre

Les biofiltres, sont un exemple des filtres de production d'eau potable, leur fonctionnement se base sur la combinaison de processus physiques et biologiques. Ils sont construits du matériau non dégradé fixe, sur lequel les bactéries responsables de la dégradation des polluants organiques se nichent et se développent. Son principe se base sur la séparation solide/liquide puis la dégradation des polluants biodégradables (Guillaume, 2009).

Les biofiltres classiques requièrent moins d'espace, et sont beaucoup plus faciles à exploiter par rapport aux systèmes de boues activées, et c'est pour cette raison qu'ils sont largement utilisés pour le traitement des eaux usées. Par contre les biofiltres percolateurs nécessitent un lit garni arrosé continuellement. Si on parle d'un lit filtrant, ce dernier doit être aussi composé de biomasse fixe sauf qu'il nécessite un arrosage continu par un liquide enrichi de la biomasse capable de dégrader les polluants (Raby, 2013).

Le système de biofiltre est constitué en général de trois phases essentielles (fig.8), la phase liquide qui est l'effluent ou l'eau usée à traiter, qui doit être riche en nutriments essentiels pour le développement des microorganismes (C, N, P). Ces derniers ont besoin d'oxygène d'où la nécessité de bien aérer pour maintenir leur survie (la phase gazeuse), puis la phase solide qui présente le support pour le développement de ces microorganismes.

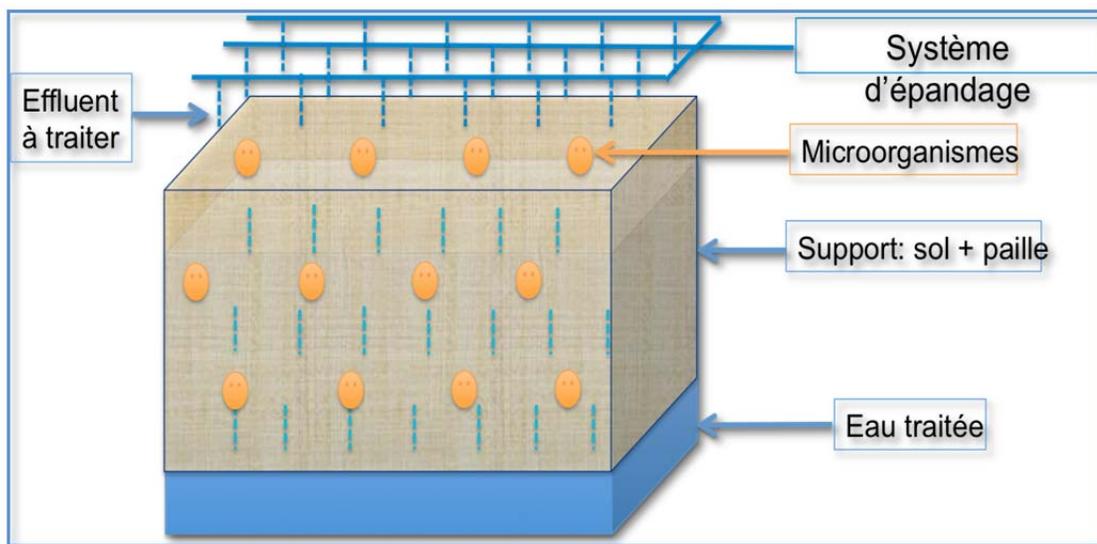


Figure 8. Schéma simplifié du biofiltre utilisé à (Phytodata)

V. Les facteurs influençant la dégradation biologique

Afin de réussir la biodégradation, les microorganismes doivent bénéficier des meilleures conditions pour survivre et ainsi permettre le bon déroulement de ce processus. Toutefois, l'utilisation d'une technologie biologique nécessite une durée de temps très flexible, et des conditions physicochimiques bien précises, puisque la mise en place de cultures biologiques dans un environnement donné peut parfois être complexe.

1) Facteurs biologiques

Le sol est un support aéré riche en nutriments, assurant la survie de plusieurs organismes vivants. Son fonctionnement est basé sur les interactions biologiques qui s'établissent entre ces différents organismes, ainsi que sur les relations qu'entretiennent ces derniers avec les constituants organiques et minéraux du sol. Ces interactions résultent de la libération des éléments nécessaires pour le fonctionnement du sol, en l'enrichissant pour devenir un milieu favorable à la survie de d'autres organismes vivants (Djical, 2003).

a) Les interactions entre les bactéries

Les bactéries sont souvent impliquées dans des interactions avec d'autres microorganismes, notamment au niveau du sol, et plus particulièrement au niveau de la rhizosphère. Ces interactions sont souvent nutritionnelles.

La dégradation de produits ou de substrats spécifiques dans le sol par les microorganismes est souvent faite en chaîne de réactions, là où chaque microorganisme est responsable d'une étape de dégradation, ou différents microorganismes sont en compétition pour le même substrat pour donner des produits de dégradation différents. Ces derniers peuvent favoriser la survie et le développement de d'autres microorganismes, on parle des interactions positives telles que le commensalisme, et le mutualisme. D'autres parts, des microorganismes peuvent exercer un effet nuisible sur d'autres microorganismes, on note la production des antibiotiques ou de composés toxiques, et parmi les interactions négatives on note l'antibiose, la compétition ou l'amensalisme (Djical, 2003).

b) Les interactions bactéries-plantes

Les bactéries peuvent aussi avoir des interactions avec d'autres organismes non microscopiques tels que les plantes, ces interactions peuvent être symbiotiques ou non symbiotiques.

➤ **Les interactions symbiotiques**

L'interaction symbiotique entre les microorganismes est une vie en commun de deux espèces différentes selon De Bary (1979) dont les deux espèces tirent profit, la plus grande étant appelée l'hôte et la plus petite le symbiote. La symbiose est un type d'interaction liant la plante hôte et son symbiote, et donnant naissance à des organes spécifiques dont on peut nommer le nodule (Bresson, 2013).

La première bactérie isolée par Beijerinck (1888) à partir des nodules racinaires de plantes était une bactérie aérobie en bâtonnet Gram-négatif de la famille des Rhizobiaceae. Les bactéries de cette famille ont la capacité d'interagir avec les plantes, certaines peuvent infecter les racines, ou les tiges des légumineuses afin de former des nodules (Bresson, 2013).

➤ **Les interactions non symbiotiques**

Les nodules peuvent se former sans contact direct entre les plantes et les bactéries. Ces dernières colonisent la rhizosphère et produisent des composés organiques essentiels au développement du système racinaire des plantes. Elles peuvent recycler et solubiliser les éléments minéraux tels que l'azote, le phosphore et le calcium; elles peuvent aussi synthétiser des vitamines, des acides aminés et des auxines. Par ce fait elles peuvent aider à stimuler la croissance des plantes ou bien inhiber les organismes pathogènes des plantes par sécrétion de d'autres substances responsables (Djical, 2003).

2) Facteurs physicochimiques

a) La température

La température est un facteur limitant pour la survie de la plupart des organismes vivants, elle affecte l'organisme de manière directe ou indirecte. Si on parle des enzymes, leur activité augmente avec la température jusqu'à une limite de température optimale, au delà de laquelle apparaissent des processus de dénaturation qui vont baisser par la suite les taux de croissance (Raby, 2013).

Une température assez basse pourrait aussi ralentir le processus d'hydrolyse de certains herbicides adsorbés sur un matériau minéral argileux, tenant compte du pouvoir catalytique de ce dernier (Couture, 2009).

b) Le pH

C'est un paramètre important affectant l'activité épuratrice des systèmes de traitement biologique. Une interval de pH autour de 6 est idéale pour restreindre l'inhibition causée par les contaminants organiques et inorganiques dans un système de traitement biologique (Raby, 2013). La valeur de pH peut changer les conditions acido-basiques à la surface des minéraux argileux déshydratés (Couture, 2009).

c) Teneur en eau

L'eau est une nécessité obligatoire pour toute forme de vie, elle est très importante dans tous les phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui peuvent se dérouler dans le sol.

La teneur en eau du sol peut déterminer la répartition du polluant dans les trois phases (solide, liquide, gaz) du sol (Boudouch, 2009). Par contre la quantité d'eau présente dans le sol est très importante pour le déroulement et le bon fonctionnement des réactions dans le sol. Sa présence en excès peut diminuer l'acidité de surface du

minéral, et qui est indispensable à la catalyse de la réaction, et si la quantité n'est pas suffisante plusieurs réactions peuvent être bloquées (Couture, 2009).

d) La nature du sol, et de la matière organique

La structure et la nature du sol peut influencer la rétention des polluants (Boudouch, 2009). Les cycles biogéochimiques des éléments nutritifs peuvent être directement influencés par la quantité de polluants ou de matières organiques diversées dans le sol. Et pourtant cette matière organique est essentielle pour maintenir le sol en bonne qualité et augmenter la productivité agricole, alors que selon leur contenu en carbone et en azote, les microorganismes dégradent cette matière organique. (Sithurain Kende, 2010).

e) La porosité

Les agrégats dans le sol forment des porosités qui facilitent la circulation des gaz et des liquides dans les différents compartiments du sol. Les conditions d'aération des sols dépendent de la taille et de la forme des pores, de la présence de substrats (carbones assimilables, organismes, etc...) du potentiel hydrique de l'eau (Djical, 2003).

La porosité peut aussi influencer sur la teneur en oxygène dans le sol, qui est évidemment un facteur limitant pour la croissance et l'inhibition des microorganismes du sol.

VI. Rôle des communautés microbiennes dans la biorémédiation

Les communautés microbiennes isolées d'un environnement pollué sont susceptibles de se développer et de résister à des doses plus ou moins tolérables de la pollution organique. Leur croissance peut amener à une dégradation remarquable de cette pollution (Pesce, 2010).

Le rôle de certains microorganismes dans la dégradation des pesticides a été mis en évidence dans plusieurs études (Fuagier, 2010), mais on connaît encore peu de choses sur leur rôle dans le fonctionnement biologique du sol. Les changements des conditions du sol peuvent stimuler le développement de certains microorganismes, par contre les bactéries les plus abondantes et les plus actives peuvent être affectées par ces changements. Certaines bactéries peuvent ne pas résister à certains polluants alors que d'autres peuvent surexprimer des gènes impliqués dans la résistance à des concentrations élevées des polluants, et peuvent jouer des fonctions écologiques majeures, notamment la dépollution naturelle du sol.

1) Études microbiologiques

Les études microbiologiques se basent sur l'isolement et la caractérisation des espèces existant dans un sol pollué, et qui sont jugées capables de dégrader ces polluants. Plusieurs bactéries du genre *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* et *Mycobacterium* sont des exemples connues par leur pouvoir de dégradation de certains polluants, tels que les pesticides, les alcanes, les hydrocarbures, et les composés polyaromatiques (Abdelly, 2007).

2) Études métagénomiques

Les limites imposées par la culture de ces microorganismes *in vitro* ont permis le développement d'approches métagénomiques.

Depuis 1990, l'étude des bactéries par leur ADN directement extrait de l'environnement a imposé plus de précision sur leur rôle environnemental. Le métagénome ou l'ADN total du sol récolté à partir des échantillons environnementaux, peut être analysé afin de caractériser la structure d'une communauté bactérienne complexe. Récemment les chercheurs ont réussi à obtenir des giga-bases de données de séquences en se basant sur des nouvelles techniques de séquençage d'ADN venant même de bactéries non cultivées (Fuagier, 2010).

Le génome bactérien peut être facilement affecté par des mutations ponctuelles dont le taux peut varier selon les conditions environnementales, donnant ainsi naissance à des acquisitions, des délétions ou même des réarrangements d'informations génétiques. Ces mutations peuvent aider certaines bactéries à s'adapter facilement aux changements de conditions du milieu (Fuagier, 2010).

Malgré tous ces efforts, des limitations techniques peuvent s'imposer pour permettre l'exploitation de la diversité microbienne du sol, et l'accès à la totalité de l'information génétique bactérienne est encore incomplet, à cause des caractéristiques physicochimiques du sol.

VII. La bioremédiation des pesticides en milieux agricoles

Les procédés de biodégradation sont connus pour être l'un des principaux moteurs de l'atténuation naturelle des résidus de pesticides dans l'environnement (Pesce, 2010). La biodégradation d'un pesticide est un processus complexe, qui dépend de plusieurs facteurs tels que l'oxygène, le pH, la température... La dégradation des pesticides par les microorganismes peut aussi être influencée par la structure chimique ou la concentration des composés organiques, les interactions microbiennes et aussi les conditions environnementales (Esteve, 2007).

En 1999, des études ont démontré une certaine dégradation du Diuron par une souche *Streptomyces*, qui était également active contre le Linuron et une gamme d'herbicides acétanilide et s-triazine. Cependant, il n'y a eu qu'un seul rapport d'une bactérie du sol isolée montrant une certaine activité contre le Diuron (Cullington and Walker, 1999). En 2003, trois souches, *Variovorax sp.* souche WDL1, *Delftia acidovorans* WDL34, et *Pseudomonas sp.* souche WDL5, ont été isolées directement à partir des échantillons contaminés par le Linuron, et ont été montrés capables de la dégrader ce dernier (Dejonghe et al., 2003). Alors que jusqu'à 2007, seuls quelques

rapports existent sur l'isolement et la caractérisation des bactéries impliquées dans la dégradation de cet herbicide, *Bacillus sphaericus* ATCC12123 et *Arthrobacter globiformis* D47 transforment Linuron en 3,4-DCA et N, O-DMHA (Breugelmans et al., 2007a).

Partie 2 : Article

Mise en contexte et contribution dans l'article :

Dans cet article, j'ai entrepris les essais microbiologiques au laboratoire sous la supervision de Dr Szatmari. On a pu isoler deux bactéries jugées capables de dégrader des pesticides, qui sont la *Rhodanobacter spathiphyllum* et *Geobacillus stearothermophilus* lesquelles ont subi un suivi de croissance en présence de Diuron et Linuron, et dont les résultats de dégradation évaluée par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-MS) ont montré une diminution de concentration de Diuron de 40 µg/ml à 31 µg/ml en utilisant la bactérie *R. spathiphyllum*, et 37 µg/ml en utilisant la *G. stearothermophilus*, et de 20 µg /ml à 0.9 µg/ml pour le Linuron, pour les deux bactéries testées. On a pu démontrer pour la première fois que les Actinobactéries qui sont le groupe dominant dans les sols non contaminé par les pesticides seront les bactéries les plus affectées par des expositions successives au Diuron et Linuron. Aussi le mélange Diuron et Linuron a augmenté significativement l'abondance des Protéobactéries qui ont pris le premier rang après trois expositions successives aux pesticides pendant la première année.

Ma contribution à l'article est évaluée à 80% du travail et consiste en la réalisation de la partie microbiologique et moléculaires amenant à l'identification des bactéries capables de dégrader les pesticides testés (toutes les figures), les traitements bio-informatiques par Geneious, et les analyses bio-statistiques par GraphPad (toutes les figures), ainsi que la rédaction de l'article en totalité lequel a été par la suite corrigé par mon directeur Dr. George Szatmari.

Pesticides effect on the bacterial diversity of agricultural fields, and the ability of bacteria to degrade them.

Authors:

Asmaâ Agoussar¹, Hervé Van Der Heyden ², George Szatmari¹

¹Département de Microbiologie, Immunologie, Université de Montréal, C.P. 6126, Succ. Centre ville, Montréal QC, H3C 3J7, Canada

² Phytodata Inc., 111 Rang Saint Pierre E, Sherrington, QC J0L 2N0

Keywords:

Bioremediation, Biodiversity of soil, Soil contamination, Pesticides, Diuron, Linuron.

Short abstract:

Soil samples from biofilters were analysed for bacterial content and diversity by Illumina MiSeq sequencing. Actinobacteria were found to be the most abundant group in untreated soil, and exposure to the herbicides Linuron and Diuron resulted in an increase in Proteobacteria.

Long Abstract:

Soil pollution by pesticides is a serious problem all over the world. The pollutants can cross the soil layers to reach the underground water, which will transmit the contamination to the living beings.

The purpose of this study is to Isolate, identify and quantify bacterial species in pesticide-contaminated soil; then to confirm the ability of these microorganisms to degrade Diuron and Linuron;

Two biofilters were constructed in triplicate by two soils from two farms using herbicides for market gardening, and then inoculated with a mixture of pesticides including Diuron and Linuron. Our results suggest that the mixture of the two herbicides tested affects Actinobacteria and Acidobacteria, and the subsequent exposure of soil to these molecules can cause their significant decrease. However, the percentage of Burkholderiales bacteria belonging to the class BetaProteobacteria, and the Xanthomonadales, which belongs to the class GammaProteobacteria, of the Proteobacteria group increase significantly.

Rhodanobacter spathiphyllum and *Geobacillus stearothermophilus* were isolated from a biofilter-soil sample exposed to pesticides and showed optimal growth in the presence of Diuron in minimal medium compared to their absence. The results of degradation of Diuron and Linuron by *R. spathiphyllum* in minimal medium, were confirmed by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS), and showed a better degradation of Linuron (from 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and Diuron (from 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by *R. spathiphyllum* and (from 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by *G. stearothermophilus*. The degradation of Diuron by *R. spathiphyllum* seems to produce by-products that inhibit its growth.

Keywords : Microbiology of pesticides, Diuron, Linuron, Bioremediation, Biofilters. Biodiversity of soil.

Introduction:

Pesticides are increasingly being used in agriculture to protect crops, but the repeated use of these chemicals can lead to residual accumulation of toxic molecules in the soil (Stanley and Preetha, 2016), and poses a risk to the health of users, their environment, food consumers and the environment (CRAAQ, 2016).

Pesticides enter the aquatic ecosystem through washing irrigation water and precipitation (Stanley and Preetha, 2016). High levels of herbicides in water may result in toxicity to aquatic organisms and may have human health implications (Hladik and Calhoun, 2012). Herbicides are also moderately toxic to fish and highly toxic to aquatic invertebrates (Hladik and Calhoun, 2012). Taking into account the toxicity of pesticides and their products, their removal from natural waters is a real necessity (M-Brugere, 2001). In our study we focused on two of the most detected herbicides, Linuron and Diuron, whose main mode of action is the breakdown of photosynthesis in target weeds by the inhibition of enzymes involved in photosynthetic electron transport chains (Cycoń et al., 2010). Linuron can also affect humans, acting as an antagonist of androgen receptors affecting the male reproductive system, and thus also of concern for human health (Breugelmans et al., 2007b). Diuron is detected as a major contaminant in areas with extensive agricultural use (Sørensen et al., 2008).

Though microbes are responsible for the regulation of many ecosystems, soil ecotoxicological risk assessment guidelines do not consider microbes as assessment end points (Stanley and Preetha, 2016). Because of the ability of soil microorganisms to breakdown pesticides and other man-made organic compounds, this is a great benefit to modern agriculture (Topp, 2003). This microbial degradation is considered the main mechanism of soil dissemination (Cullington and Walker, 1999), and most herbicides use this type of degradation as a main route of dissipation in the environment (Bundt et al., 2015), but the knowledge of soil microbial ability to degrade pesticides and their influence on microbial diversity in soil are still limited.

Approaches involving molecular methods have found changes in the diversity of microbial communities in soil exposed to different pesticides (Chi-Chu, 2010; Seghers et al., 2003; Stanley and Preetha, 2016). But microbiological analyses on the microbial communities based on standard plate count methods lack precision, because only approximately 1 % of the soil bacteria can be cultured (Chi-Chu, 2010). Which bacteria can degrade the herbicides Diuron and Linuron? And how the pesticides pollutant can change the bacterial biodiversity? To address this, our study was based on the genetic approach to evaluate the effects of pesticide application on the microbial communities in an agricultural soil. More specifically, we tested the hypothesis that the repeat contamination of soil with known pesticides can result an increases in microbial populations able to degrade them, by acquire the degradation gene of this pesticides to resiste in the pollute soil.

Materials and methods

1. Medium

Minimal Medium (MM) contained, 7.35 mmol of KH_2PO_4 , 0.86 mmol of K_2HPO_4 , 0.82 mmol of MgSO_4 , 0.054 mmol of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.72 mmol of NaCl , 5.66 mmol of NH_4Cl as Nitrogen source, 33.33 mmol of glucose as carbon source, with agar added at 1.5% if required in 1 liter of distilled water. The pH was adjusted to 6,5 prior to autoclave sterilization. 1 ml of sterile solution of FeSO_4 (5g/L) was added after sterilization and 1 ml of salt solution (prepared by 32.79 mmol H_3BO_3 , 11.92 mmol $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.24 mmol $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.63 mmol CuSO_4 , 1.22 mmol Na_2MoO_4 and 1 micro-crystal of CONO_3 in 1L of distilled water) and 2ml of vitamin solution (prepared by 2.5 mg of thiamine-HCl, 1mg of biotin, 500ml of distilled water, then filter-sterilised).

Linuron (0.08 mmol) or Diuron (0.13 mmol) from (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added to isolate bacteria capable of using these pesticides as either a carbon or nitrogen source.

2. Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this study were isolated by plating 0.5 ml of the 10^{-4} dilution of diuron treated soil in saline solution (0,9% NaCl), on MM agar plates with 30 mg of diuron per liter as sole source of carbon, then incubated at 28°C for 24h to 48h.

Four bacterial strains were selected from soil samples as the most detected in soil exposed to pesticides, to study their growth conditions and to measure their ability to degrade pesticides. The bacteria were inoculated in a minimal medium with or without a carbon source and a nitrogen source. Diuron was added at 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$, and growth of each bacteria in liquid MM at 28°C with shaking, was measured by spectrophotometry at 595 nm. The bacteria were identified by sequencing the 16S RNA gene, followed by Blast search in Gene Bank.

Bacterial genomic DNA was isolated from pesticide-contaminated soil using the FastDNA Spin Kit for Soil (MPBio, Santa Ana, USA) using the manufacturers instructions. Then the 16S ribosomal RNA genes were amplified using V4 and V5 primers as (ACACTGACGACATGGTTCTACA) and (TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT).

3. Biofilter preparation

Two biofilters were constructed by field soil from two different farmers (DELFI and LECL) that used herbicides near to Phytodata.Inc. Three replicate of each biofilter were used to treat samples of water contaminated with pesticides. In addition one biofilter was used as a control.

These biofilters were used to treat samples of water contaminated with a diuron solution at a concentration of 225 ppm. For 6 weeks, 12 L of wastewater were applied to each tray each week for a total of 72 liters of wastewater.

4. Sampling, and quantification of bacteria species in contaminated biofilter with pesticides

At each exposure, the residence time was 12h and 3L of treated water was then taken from amber bottles and stored at 4°C for HPLC analysis. The genomic DNA of each sample as described on (table 1 in Annexe), was stored at -20°C, and the soil samples at -4°C. Seventy seven samples (table 1), taken from biofilter on 3 different dates during 2014 and 2015, along with DNA isolated from a control biofilter, were combined and sent to Génome Québec for high-throughput sequencing (Illumina Miseq) using the V4 and V5 primers as (ACACTGACGACATGGTTCTACA) and (TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT). The fragment/librairie size was 412 pb.

5. Chemical analyses, and bacteria growth:

The bacteria grow in MM with pesticides were evaluated by measurement of optical density (DO) at 595nm. The amount of Diuron present was quantified by HPLC-MS by SGS Canada and by AGAT labs, Montreal, Quebec.

6. Sequencing process

The genomic DNA samples (table 1) were sequenced on Genome Quebec, based on illumina Miseq PE250, using qPCR as a concentration methode.

7. Post-seequencing pipeline

The bioinformatic analysis of Illumina sequencing was performed using the 16S Biodiversity Tool of the Geneious 10.1.3. software package (Kearse et al., 2012). Graphs representing the percentage abundance of each bacteria were obtained for each sample using One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was using GraphPad Prism version 7.00 for Mac (GraphPad software, San Diego, CA). Every sample received on two reads as forward and reverse reads, downloaded from Genome Quebec to Geneious. To improve the poor quality reads, and remove misleading

fragments, or sequences under 150 bp we start by “Trim ends” the two reads, then we proceed to “Merge paired ends” to correct upon assembly mapping to a reference, after that we proceed to “Filter the merged paired reads”. The last step is the 16S biodiversity analysis by Geneious.

Results and discussion

1) Biodiversity of soil exposed to pesticides

Bacterial evolution in contaminated soil was followed based on the sequencing results for the three years of exposure to various pesticides (Diuron and Linuron),

The sequencing results were treated using the 16S biodiversity tool of Geneious software as described in material and methods, and gave graphs of percent bacterial presence in each sample ranging from Phylum to Genus for some samples. The Actinobacteria group was found to be the most abundant in normal soil, representing for our two uncontaminated soil samples 44% and 35% respectively, followed by 30% and 25% Proteobacteria with a 100% confidence interval (Fig. 1). Our analyses indicated that the difference between the different points of each biofilter sampled on the same date, was not significant according to the One-way ANOVA test for all the groups of bacteria tested (Fig. 2), whereas (Guzzella et al., 2006) have shown that herbicides have been detected only in the surface layer (0-10 cm) of the soil. In this layer, Diuron was reduced to 50% of its initial concentration at the end of the experiment, while Linuron was still present at 70% after 245 days. Infiltration of contaminated water may depend on the characteristics of the soil that can retain these molecules, while our biofilters were constructed from field soil mixed with straw to allow proper aeration that helps increase degradation for aerobic microorganisms.

Considering the six sampling points of each biofilter as six replicates for each sampling date in order to increase the confidence interval of our analysis, it was found that the biodiversity for the six sampling points was already disrupted after the first year of exposure (September 2014). Exposure to Diuron and Linuron gave results totally

opposed to those found for uncontaminated soil, which showed the Proteobacteria group increasing, while that of Actinobacteria decreased (Fig. 3). (Fang et al., 2014) identified 69 genera capable of degrading organic pollutants, and were mainly affiliated with Proteobacteria (49.3%). Our bioinformatic analysis showed that the most abundant groups in the presence of pesticides are Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes and Firmicutes. The biostatistic analysis confirmed that the proliferation of Proteobacteria was statistically significant based on ANOVA test (Fig. 4), and exposure to Diuron and Linuron significantly decreased the presence of Actinobacteria (Fig.5) and Acidobacteria groups. Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria classes were the most abundant in the presence of pesticides whereas the pesticides had less of an effect on Alphaproteobacteria and Deltaproteobacteria whose difference was not significant according to One-Way ANOVA ($P > 0.05$). The most persistent bacteria in the presence of pesticides were the Burkholderiales among Betaproteobacteria, and Xanthomonadales among the class of Gammaproteobacteria, whereas the decrease of Actinobacteria was found to be significant. For the Firmicutes group it was found that Bacilli and Clostridia were also affected by pesticides, and decreased significantly. However, the percentage of Burkholderiales belonging to the Betaproteobacteria class and the Xanthomonadales belonging to the Gammaproteobacteria class increased (fig. 6), and was found to be statistically significant (fig 7 & 8). On the other hand (Breugelmans et al., 2007a) demonstrated that most members of the Linuron-degrading consortium were identified as *Variovorax*, but they also obtained a *Hydrogenophaga* and an *Achromobacter* strain, all of which are Burkholderiales of the class Betaproteobacteria, deemed to be capable of degrading Linuron. On the other hand (Turnbull et al., 2001) have described *Arthrobacter* D47 strain which is of the order Actinomycetales as being capable of degrading a range of pure cultured 3,4-dichloroaniline phenylurea herbicides and the *Sphingomonas* SRS2 strain which belongs to Alphaproteobacteria as being capable of mineralizing Isoproturon and also transformed Diuron and Chlortoluron to unidentified products, but showed no activity against Linuron. Whereas according to our Illumina sequencing results,

Actinobacteria and Alphaproteobacteria were affected by exposure to Diuron and Linuron, and this decrease was significant, according to the One-Way ANOVA test.

2) Degradation of pesticides:

The most important process responsible for the degradation of Linuron is microbial degradation through metabolic and co-metabolic pathways (Cycoń et al., 2010). Our results show that Linuron and Diuron appear to be well tolerated by soil microorganisms when applied at low doses; the effect of different concentrations of Diuron on microbial growth was characterized by transplanting colonies isolated from contaminated soil on solid minimal media containing different concentrations of Diuron (10, 20, 40 and 60 µg / mL). The growth levels obtained after 4 days were then quantified and qualified; an elevated diuron concentration (60 µg / mL) seemed to inhibit microbial growth at 90%, whereas a lower concentration (10 µg / mL) did not have an effect on bacterial viability and did not allow growth on minimal medium without C and N sources. According to these results, the optimal concentration seems to be between 30 µg / mL and 50 µg / mL. It is also possible that the sensitivity to Diuron appears to vary from one species to another. Similarly, optimal growth in the presence of Linuron was judged to be between 20 and 40 µg / mL.

In order to isolate bacteria from the soil capable to tolerate and grow in the presence of Diuron, the pesticide was added to solid minimal medium at a final concentration of 30mg/L. A 10^{-4} dilution of a soil suspension was plated on this medium, and colonies growing on the media were selected for further analysis. Colonies were inoculated in liquid minimal media containing pesticide as described in materials and methods. Growth curves with different types of minimal medium were performed in triplicate. The negative controls used were the minimum medium with Diuron non-inoculated with bacteria. The results showed that not all bacteria isolated in the presence of Diuron were capable of increased growth in minimal media with this pesticide. For example, *Arthrobacter sp.* and *Paenibacillus odorifer*, showed equal growth in the presence or absence of Diuron (fig. 9). *Rhodanococcus sphaerophilus* and *Geobacillus*

stearothermophilus showed better growth in a minimal media with Diuron added to C and N sources than the same media without Diuron (fig. 9).

In order to ensure that these bacteria could degrade pesticides, growth was evaluated by measuring the triplicate optical density (fig.10) and degradation was evaluated by HPLC-MS. The negative controls used are the minimum medium with the same concentration of Diuron or Linuron, non-inoculated with bacteria. The results show that after five weeks *R. spathiphillum* degraded Diuron in liquid minimal media better than *G. stearothermophilus*. The concentration of Diuron was evaluated by HPLC-MS and decreased from 40 µg/ml to 31.7 µg/ml in MM inoculated by *R. spathiphillum* and from 40 µg/ml to 37.3 µg/ml in MM inoculated by *G. stearothermophilus* after five weeks. The growth of *R. spathiphillum* was optimal after the first week, and decreases after two weeks (fig.10). It is possible that the degradation products of Diuron may be toxic to the bacteria, and these products may persist longer in the environment. The accumulation of these degradation products may affect the long-term usage of our bacteria as specific inocula to degrade pesticides.

The growth of *G. stearothermophilus* and *R. spathiphillum* in presence of Linuron in liquid MM did not seem to be affected by the degradation products. The concentration of Linuron decreased from 20 µg/ml to 0.9 µg/ml in the MM inoculated by *R. spathiphillum* or either *G. stearothermophilus*. The result showed that one of the degradation products of Linuron by the two bacteria tested is Diuron, which was detected at 153 µg/L among the degradation products by *G. stearothermophilus* and at 54.6 µg/L among the degradation products by *R. spathiphillum*. This suggests that the concentration of Diuron detected among the products of degradation by *R. spathiphillum* was lower because of the ability of *R. spathiphillum* to degrade this product better than *G. stearothermophilus*.

According to Bégin (1999), environmental conditions can cause organic compounds to be partially degraded, or be converted into intermediates which may be less, equally or more toxic, as the case may be, than the parent compounds. (Hladik and

Calhoun, 2012) suggested that, under some water treatment conditions, Diuron may form N-nitrosodimethylamine (NDMA), a class of B2 carcinogen (reasonably considered to be a Human carcinogen, according to US Environmental Protection Agency 2010), while biotransformation or photo-processing may lead to much more hazardous compounds (Couture, 2009). Bacterial degradation of Linuron involves stepwise transformation, which starts with direct hydrolysis, resulting in the formation of 3,4-dichloraniline (3,4-DCA) and N, O-dimethylhydroxylamine (N, O-DMHA), which can be mineralized (Breugelmans et al., 2007a).

It will be very important to completely degrade pesticides by other microorganisms or microbial communities, so as to obtain mineralized compounds non-toxic to microorganisms or aquatic life and human health.

Conclusion

The results obtained allow a better understanding of the microbial biodiversity involved in the biodegradation of pesticides in agricultural environments. The most persistent group in soils exposed to pesticides is the Proteobacteria. The Burkholderiales and the Xanthomonadales are the most involved bacteria in pesticide-contaminated soil.

The evaluation of the degradation of Diuron and Linuron by our species isolated from the contaminated soil revealed that *R. spathiphillum* degraded Diuron better than *G. stearothermophilus*, but the degradation products by *R. spathiphillum* seems to be toxic to this bacteria. The result of degradation of Linuron by these two bacteria species appears to be similar.

The further characterization of bacterial species involved in pesticide degradation will allow one to inoculate biofilters to assist in accelerating the degradation process; this can be used in a synthetic solution that can be used as inocula for our biofilters to improve field efficiency and biodegradation.

The abundance and biodiversity of biodegradation genes can also be a very important route to trace in order to quantify genes that are overrepresented in the presence of pesticides. Further amplicon sequencing analysis will help in the identification of potential pesticide degrading strains, and may be useful in identifying novel mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by an operating grant from the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec, and the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies of the Université de Montréal. We wish to thank Phytodata Inc. for their assistance in constructing biofilters, sampling soil and extracting DNA from these samples.

References:

- Abdelly, C. (2007). Bioremédiation / Phytoremédiation.
- Angly, F.E. (2016). Diuron tolerance and potential degradation by pelagic microbiomes in the Great Barrier Reef lagoon. *PeerJ* 4.
- Aslim, B., and Ozturk, S. (2009). Toxicity of herbicides to cyanobacterial isolates. *J. Environ. Biol.* 30(3), 381–384.
- Bégin, R. (1999). Lignes directrices pour le traitement de sol par biodégradation, bioventilation ou volatilisation (Ministère de l'Environnement).
- Boudouch, O. (2009). Etude de la dépollution des sols par extraction sous pression réduite. application au traitement des COV - download. INSA de Lyon.
- Bresson, J. (2013). Interaction plante-microorganismes : Implication de la rhizobactérie *Phyllobacterium brassicacearum* dans les réponses d'*Arabidopsis thaliana* au stress hydrique. Université Montpellier II.
- Breugelmans, P., D'Huys, P.-J., De Mot, R., and Springael, D. (2007a). Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 374–385.
- Breugelmans, P., D'Huys, P.-J., and Springael, D. (2007b). Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 374–385.
- BUNDT, A., AVILA, L., AGOSTINETTO, D., DICK, D.P., and BURAUDEL, P. (2015). IMIDAZOLINONE DEGRADATION IN SOIL IN RESPONSE TO APPLICATION HISTORY. *Planta Daninha* 341–349.
- Chambres d'Agriculture (2006). Gestion des effluents phytosanitaires Comment concevoir son lit biologique.
- Chevrier, É. (2013). LA PHYTOREMÉDIATION, UNE SOLUTION D'AVENIR POUR LE QUÉBEC. UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE.
- Chi-Chu, L. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Sci. Health Part B* 45, 348–359.
- Codis, S. (2009). Zoom sur le Phytobac, procédé de dégradation biologique des effluents phytosanitaires sur substrat.
- Couture, G. (2009). ÉTUDE DE L'HYDROLYSE ACIDE DES HERBICIDES ATRAZINE, SEMAZINE ET DIURON EN SOLUTION DANS L'EAU ET À LA SURFACE DE MINÉRAUX ARGILEUX DÉSHYDRATÉS À L'AIR LIBRE, AU VOISINAGE DE 0 ET DE 22 °C.
- CRAAQ (2016). Utilisation rationnelle et sécuritaire des pesticides. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ).
- Cullington, J.E., and Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 31, 677–686.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., and Kozdrój, J. (2010). Linuron effects on microbiological characteristics of sandy soils as determined in a pot study. *Ann. Microbiol.* 60, 439–449.
- De Roffignac, L., Cattani, P., Mailloux, J., Herzog, D., and Le Bellec, F. (2006). Gestion d'effluents phytosanitaires sur l'exploitation : un exemple en agriculture guadeloupéenne.
- Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Höfte, M., Vos, P.D., Verstraete, W., and Top, E.M. (2003). Synergistic Degradation of Linuron by a Bacterial Consortium and Isolation of a Single Linuron-Degrading *Variovorax* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1111–1118.

Microbiol. 69, 1532–1541.

Del Pilar Castillo, M., Torstensson, L., and Stenstrom, J. (2008). BIOBEDS – A SWEDISH CONTRIBUTION TO ENVIRONMENTAL PROTECTION FROM PESTICIDE POLLUTION. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6206–6219.

Design, P. (2011). Stratégie phytosanitaire québécoise en agriculture 20112021 (Bibliothèque nationale du Québec).

Djical, D. (2003). Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactériovores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes.

Dufresne, M. (2013). LES TECHNOLOGIES DE TRAITEMENT DES SOLS CONTAMINÉS : LESQUELLES SONT DURABLES ? Université de Sherbrooke.

Ellegaard-Jensen, L., Knudsen, B.E., Johansen, A., Albers, C.N., Amand, J., and Rosendahl, S. (2014). Fungal-bacterial consortia increase diuron degradation in water-unsaturated systems. *Sci. Total Environ.* 466–467, 699–705.

Esteve, K. (2007). Procédé de traitement biologique aérobie d’effluent phytosanitaires en viticulture. Université de Bordeaux 1.

E-TIC (2014). Gestion des nuisibles et des maladies.

Fang, H., Cai, L., Yang, Y., Ju, F., Li, X., Yu, Y., and Zhang, T. (2014). Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments. *Sci. Total Environ.* 470–471, 983–992.

Fourrages Mieux (2016). Les herbicides.

Fuagier, A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs monitaires « the rare biosphere ». L’ÉCOLE DOCTORALE ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE DE LYON.

Gaudu, F. (2014). BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUÉS AUX HYDROCARBURES: Les hydrocarbures aromatiques et les alcanes. UNIVERSITE DE RENNES 1.

Giroux, I. (2004). La présence de pesticides dans l’eau en milieu agricole au Québec.

Giroux, I. (2014a). Contamination de l’eau par les pesticides dans les secteurs de production de pommes de terre (Lévis).

Giroux, I. (2014b). PESTICIDES DANS LES COURS D’EAU AU QUÉBEC D’EAU AU QUÉBEC: L’empreinte des cultures sur la qualité de l’eau.

Giroux, I. (2015). Présence de pesticides dans l’eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya 2011 à 2014 (Québec, ministère du Développement durable, de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l’état de l’environnement).

Giroux, I., and Pelletier, L. (2012). Présence de pesticides dans l’eau au Québec : bilan dans quatre cours d’eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010.

Gouvernement du Québec (2016). À propos des pesticides.

Guillaume, S. (2009). MODELISATION D’UNE STATION PAR BIOFILTRATION. UNIVERSITÉ de LAVAL. QUÉBEC.

Guzzella, L., Capri, E., Di Corcia, A., Barra Caracciolo, A., and Giuliano, G. (2006). Fate of diuron and linuron in a field lysimeter experiment. *J. Environ. Qual.* 35, 312–323.

Hepia Un mur VERT qui épure. le VG - Biobed, un brevet hepia, agronomie.

Hladik, M.L., and Calhoun, D.. (2012). Analysis of the herbicide diuron, three diuron degradates, and six neonicotinoid insecticides in water—Method details and application to two Georgia streams: US Geol. Surv. Sci. Investig. Rep. 2012–5206 10.

Hulsen, K., Minne, V., Lootens, P., Vandecasteele, P., and Höfte, M. (2002). A chlorophyll a

fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron. *Environ. Microbiol.* *4*, 327–337.

Irosoft, architecture de gestion de l'information législative-legal information management system (2016). - Loi sur la qualité de l'environnement.

Irosoft, architecture de gestion de l'information législative-legal information management system - Loi sur la qualité de l'environnement.

Johnson, E. (2011). Programme de réduction des risques liés aux pesticides.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* *28*, 1647–1649.

Lallemand-Barrès (1993). Méthodes de dépollution des sols et des eaux pollués Par les métaux (Direction Technique de l'Ingénierie de l'Environnement, France).

M-Brugere, C. (2001). Effets sur le spermatozoïde humain du Diuron (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée) et de l'un de ses produits de transformation, la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) (Etude préliminaire). *Andrologie* *11*, 69–75.

MDDELCC (2015). Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. Stratégie québécoise sur les pesticides 2015-2018.

Moletta, R. (2011). La méthanisation (2e ed.) (Paris: Lavoisier).

Nasseri, S., Rezaei Kalantary, R., Nourieh, N., Naddafi, K., Mahvi, A.H., and Baradaran, N. (2010). INFLUENCE OF BIOAUGMENTATION IN BIODEGRADATION OF PAHs-CONTAMINATED SOIL IN BIO-SLURRY PHASE REACTOR. *Iran J Env. Health Sci Eng* *7*, 199–208.

Pesce, S. (2010). Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization: incidence of runoff and soil erosion. *J Soils Sediments* *10*, 698–707.

Raby, K. (2013). Élimination de l'azote contenu dans un lisier de porc synthétique à l'aide d'un biofiltre percolateur. UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE.

Richard, J.-P. (2011). Résidus de pesticides dans les fruits et légumes frais vendus au Québec 2007-2011 (MAPAQ).

Seghers, D., Verthé, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S.D., Verstraete, W., and Top, E.M. (2003). Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* *46*, 139–146.

Sithurain Kende (2010). MINERALISATION DE L'AZOTE DANS DEUX SOLS AMENDÉS AVEC DEUX COMPOSTS ENRICHIS D'UN ANTIBIOTIQUE. UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC.

Sørensen, S.R., Albers, C.N., and Aamand, J. (2008). Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 2332–2340.

Soulas, G. (1985). La dégradation des pesticides dans le sol, aspects microbiens et cinétiques. *Sci. Sol* *2*, 43–47.

SQP (2016). LA PHYTOREMÉDIATION. Société Québécoise Phytoremédiation 28.

Stanley, J., and Preetha, G. (2016). Pesticide Toxicity to Microorganisms: Exposure, Toxicity and Risk Assessment. In *Pesticides Toxicity to Non-Target Organisms*, (Springer Science+Business Media Dordrecht), pp. 351–410.

Surajudeen, A., and Adaji, B.O. (2009). Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation Techniques for the Remediation of Used Motor Oil Contaminated Soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* *747–754*.

- Topp, E. (2003). Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. *Can. J. Soil Sci.* 83, 303–309.
- Turcotte, V. (2009). Utilisation d'écaillés de cacao comme matériau support pour la biofiltration d'effluents agroalimentaires. Université du Québec.
- Turnbull, G.A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., and Morgan, J.A. (2001). Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2270–2275.
- Yasser El-Nahhal (2015). Toxicity of Diuron, Diquat and Terbutryn to Cyanobacterial Mats. *Ecotoxicol Env. Contam* 10, 71–82.

Table and Figures

Figure 1. Graphical representation of bacterial abundance by group in uncontaminated soil. DNA isolated from soil samples was amplified and subject to Illumina MiSeq sequencing using the V4 and V5 16S RNA primers. The FastQ files obtained from this analysis were processed using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The output is represented as the representative percent of each bacterial phylum.

Figure 2. Abundance and variability of Proteobacteria in a representative biofilter over a three year period. The biofilter DELF was sampled at six different points (DELF1-6), and the extracted DNA was subject to Illumina MiSeq sequencing using the V4 and V5 16S rRNA primers. The resultant FastQ files were processed using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The percentage of Proteobacteria in each sample at each date were obtained from this analysis and treated using One-Way ANOVA from GraphPad software package.

Figure 3. Graphical representation of bacterial abundance by group in a soil exposed to pesticides. DNA isolated from soil samples was amplified and subject to Illumina MiSeq sequencing using the V4 and V5 16S RNA primers. The FastQ files obtained from this analysis were processed using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The output is represented as the representative percent of each bacterial phylum.

Figure 4. Proliferation of Proteobacteria during three year exposure to pesticides. DNA from DELF biofilter was extracted and sequenced using Illumina MiSeq sequencing. The output was treated using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The percent abundance of Proteobacteria was determined for each sampling period over a three year period, and analysed by the Graphpad statistical software package using the One-Way ANOVA test, the results of test for 2014 and 2015 exposure to pesticides, than

the global test of the three years exposure to pesticides are represented in the tables on top of the graph.

Figure 5. Decrease in Actinobacteria during three year exposure to pesticides DNA from DELF biofilter was extracted and sequenced using Illumina MiSeq sequencing. The output was treated using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The percent abundance of Actinobacteria was determined for each sampling period over a three year period, and analysed by the Graphpad statistical software package using the One-Way ANOVA test, the results of test for 2014 and 2015 exposure to pesticides, than the global test of the three years exposure to pesticides are represented in the tables on top of the graph.

Figure 6. Graphical representation of bacterial abundance up to the species level in soil exposed to pesticides. DNA isolated from soil samples of DELF biofilter in october-2016 was amplified and subject to Illumina MiSeq sequencing using the V4 and V5 16S RNA primers. The FastQ files obtained from this analysis were processed using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The output is represented as percent of each classification rank ranging from the kingdom (bacteria) on the center to the species.

Figure 7. Increase in Burkholderiales during three year exposure to pesticides. DNA from DELF biofilter was extracted and sequenced using Illumina MiSeq sequencing. The output was treated using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The percent abundance of Burkholderiales was determined for each sampling period over a three year period, and analysed by the Graphpad statistical software package using the One-Way ANOVA test, the results of test for 2014 and 2015 exposure to pesticides, than

the global test of the three years exposure to pesticides are represented in the tables on top of the graph.

Figure 8. Increase in Xanthomonadales during three year exposure to pesticides. DNA from DELF Biofilter was extracted and sequenced using Illumina MiSeq sequencing. The output was treated using the 16S Biodiversity Tool from the Geneious software package. The percent abundance of Xanthomonadales was determined for each sampling period over a three year period, and analysed by the Graphpad statistical software package using the One-Way ANOVA test, the results of test for 2014 and 2015 exposure to pesticides, than the global test of the three years exposure to pesticides are represented in the tables on top of the graph.

Figure 9. Bacterial growth curves in the presence of Diuron. Single colonies of bacteria were inoculated into 50 ml of minimal media containing 30 mg/L of Diuron. Growth was maintained at 28°C with shaking at 150 rpm over a 13 day period, and cell turbidity was measured at 595 nm.

Figure 10. Long term growth of *Rhodonobater spathiphyllum* and *Geobacillus stearothermophilus* in the presence of Diuron or Linuron. Single colonies of *R.spathiphyllum* and *G stearothermophilus* were inoculated into 50 ml of minimal media containing either 40 ug/ml or 20 ug/ml of Diuron or Linuron, respectively. Growth was maintained at 28°C with shaking at 150 rpm. Cell densities were measured at 595 nm.

Figure 1. Graphical representation of bacterial abundance by group in uncontaminated soil

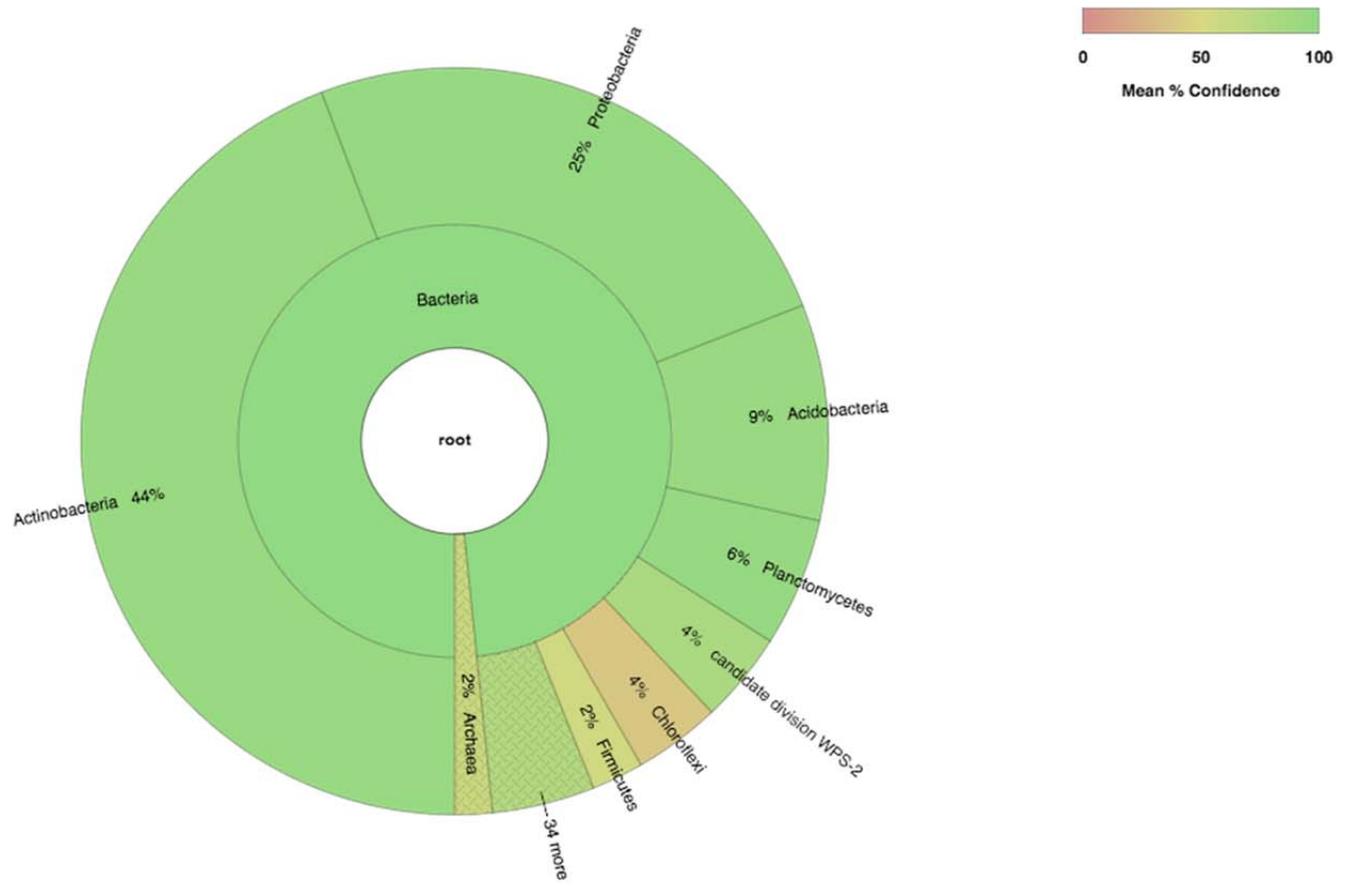


Figure 2. Example of proliferation of the Proteobacteria group for the six sampling points

P value	0.5208
P value summary	ns
Statistically significant (P < 0.05)?	No

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Treatment (between columns)	102.4	5	20.48	F (5, 35) = 0.8549
Individual (between rows)	1412	7	201.7	F (7, 35) = 8.417

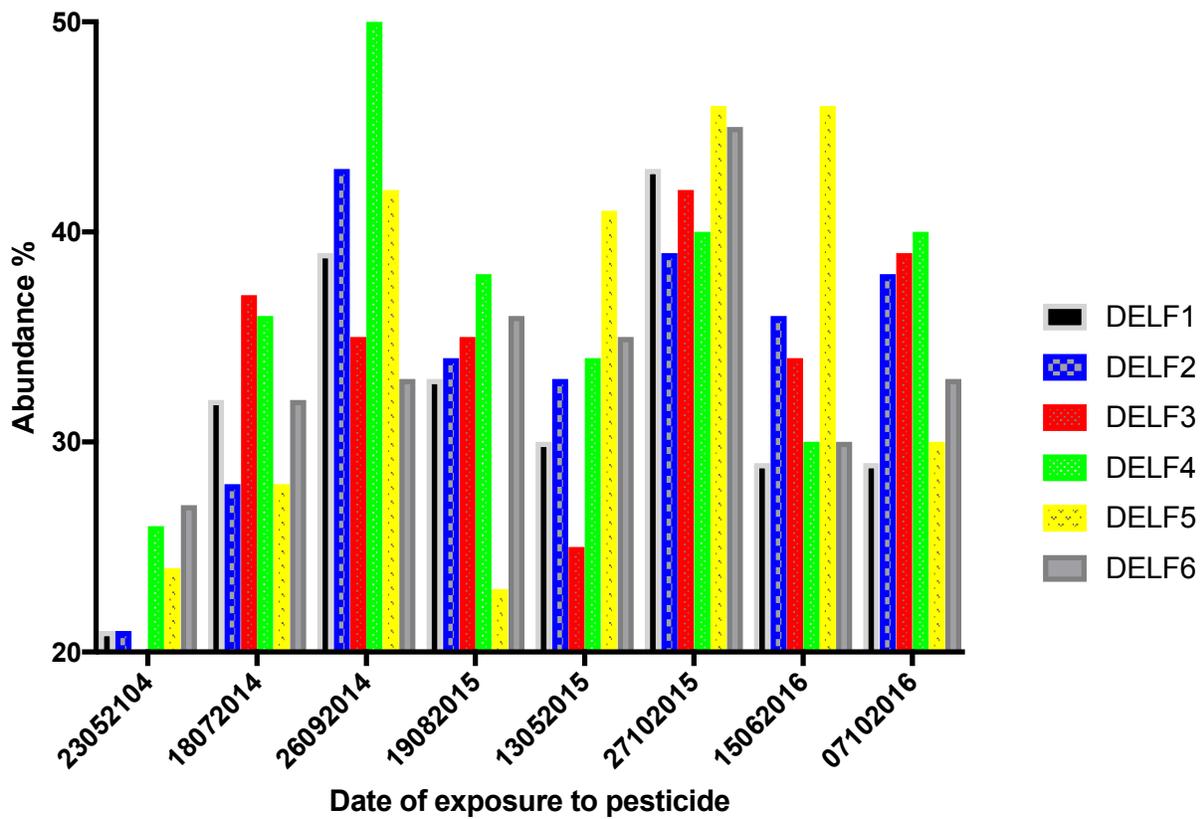


Figure 3. Graphical representation of bacterial abundance by group in a soil exposed to pesticides.



Figure 4. Proliferation of the Proteobacteria group during the three-year exposure to pesticides

2014		2015	
ANOVA summary		ANOVA summary	
F	25.92	F	8.359
P value	<0.0001	P value	0.0036
P value summary	****	P value summary	**
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes	Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.7756	R square	0.5271

3 years exposition	
Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No
F	9.929
P value	0.0018
P value summary	**
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0.3532
R square	0.6651

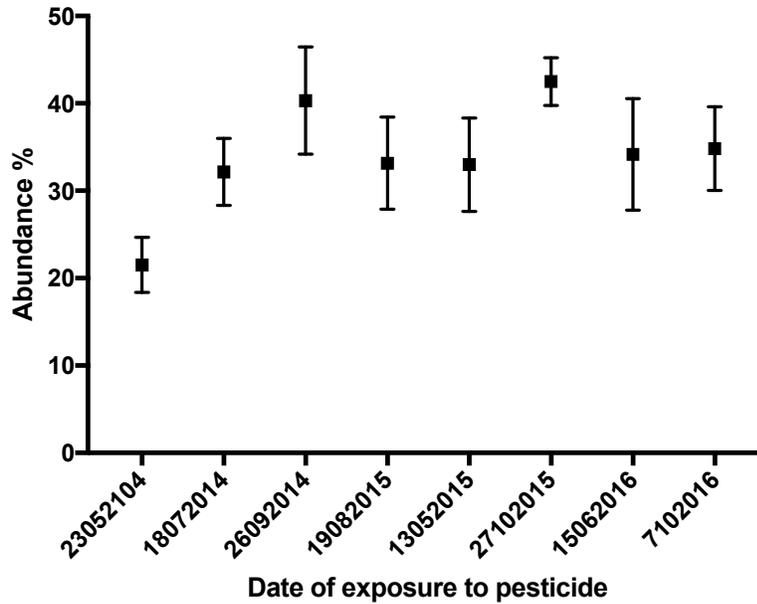


Figure 5. Decrease in the Actinobacteria group during the three-year exposure to pesticides

2014		2015	
ANOVA summary		ANOVA summary	
F	15.74	F	3.875
P value	0.0002	P value	0.0440
P value summary	***	P value summary	*
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes	Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.6773	R square	0.3407

3 years exposition	
ANOVA summary	
F	4.79
P value	0.0006
P value summary	***
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.456

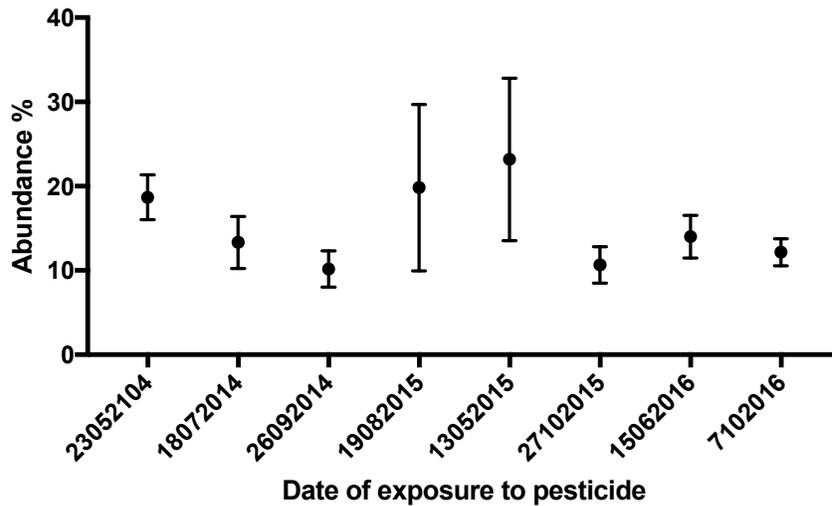


Figure 7. Burkholderiales increase during the three-year exposure to pesticides

2014		2015	
ANOVA summary		ANOVA summary	
F	5.562	F	12.72
P value	0.0156	P value	0.0006
P value summary	*	P value summary	***
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes	Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.4258	R square	0.6292

2014/2015/2016	
ANOVA summary	
F	6.137
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.5178

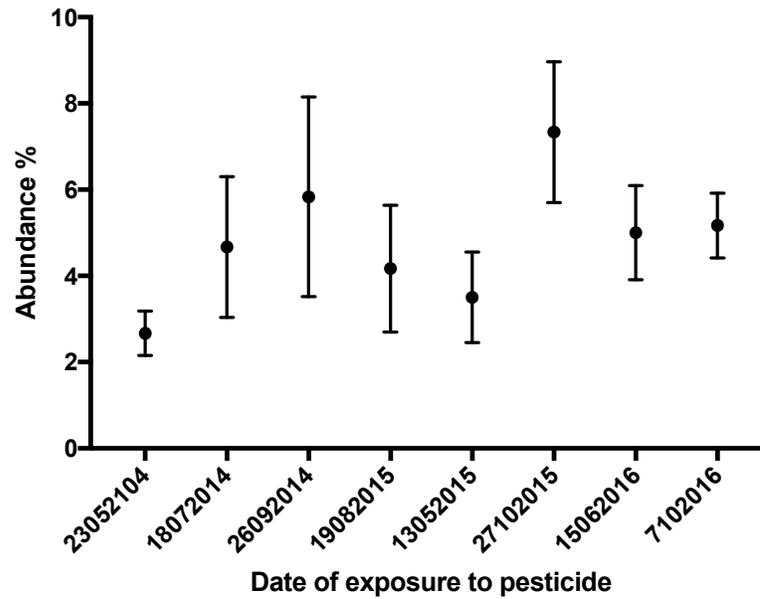


Figure 8. Xanthomonadales increase during the three-year exposure to pesticides

2014		2015	
ANOVA summary		ANOVA summary	
F	15.95	F	0.8316
P value	0.0002	P value	0.4545
P value summary	***	P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0.6802	R square	0.09982

2014/2015/2016	
ANOVA summary	
F	3.776
P value	0.0031
P value summary	**
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.3978

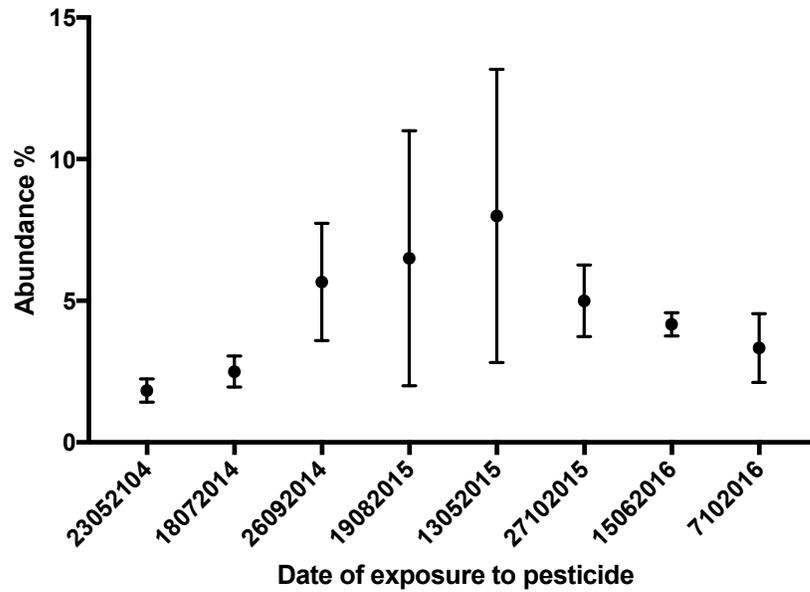


Figure 9. Example of bacterial growth in the presence of Diuron

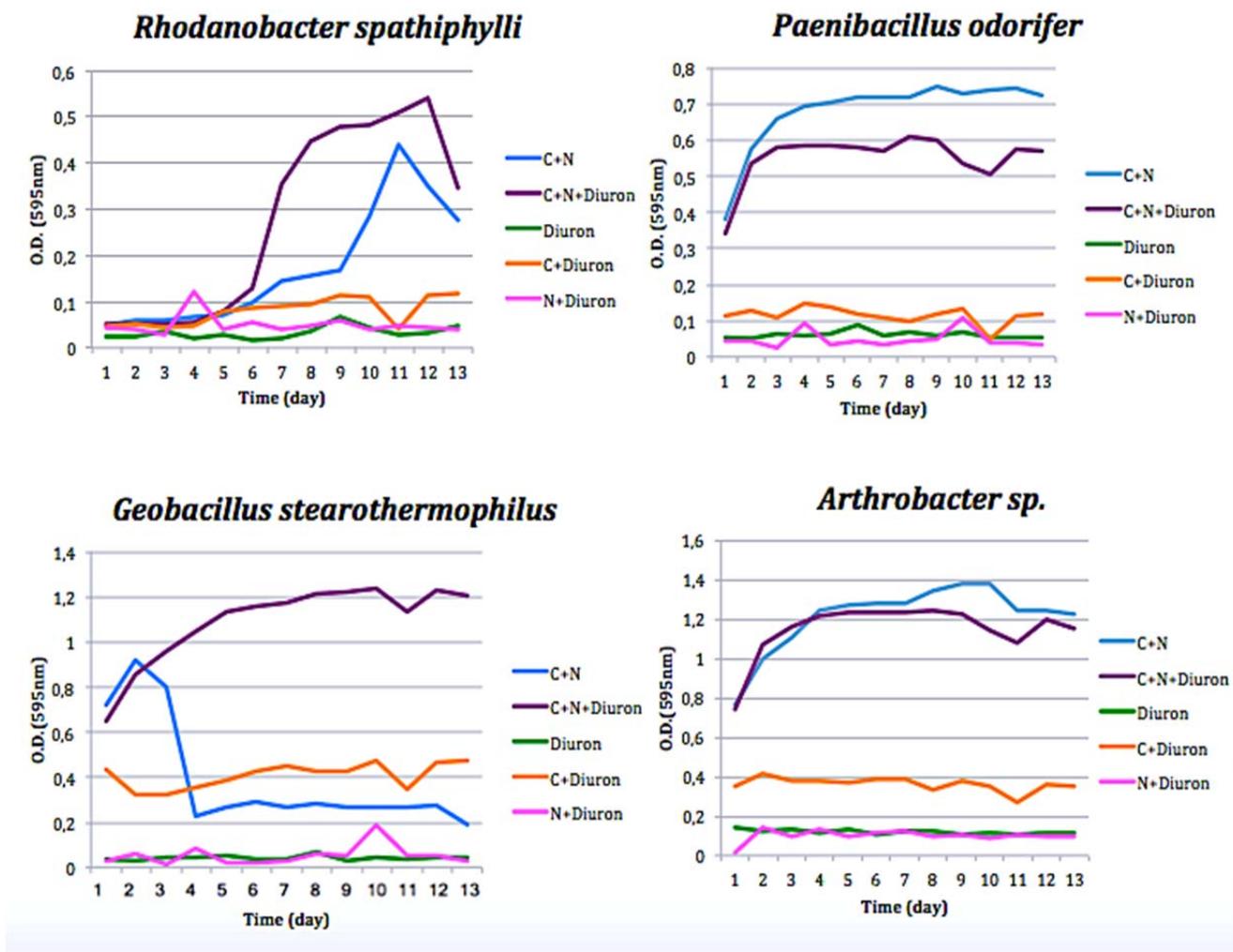


Figure 10. Bacteria growth using pesticides

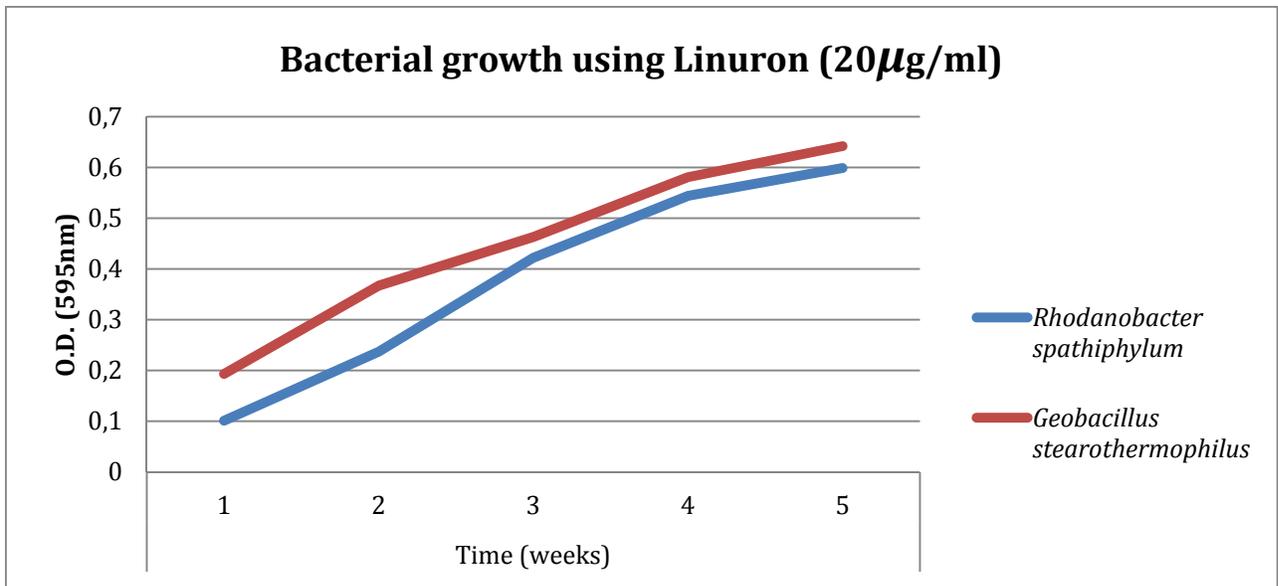
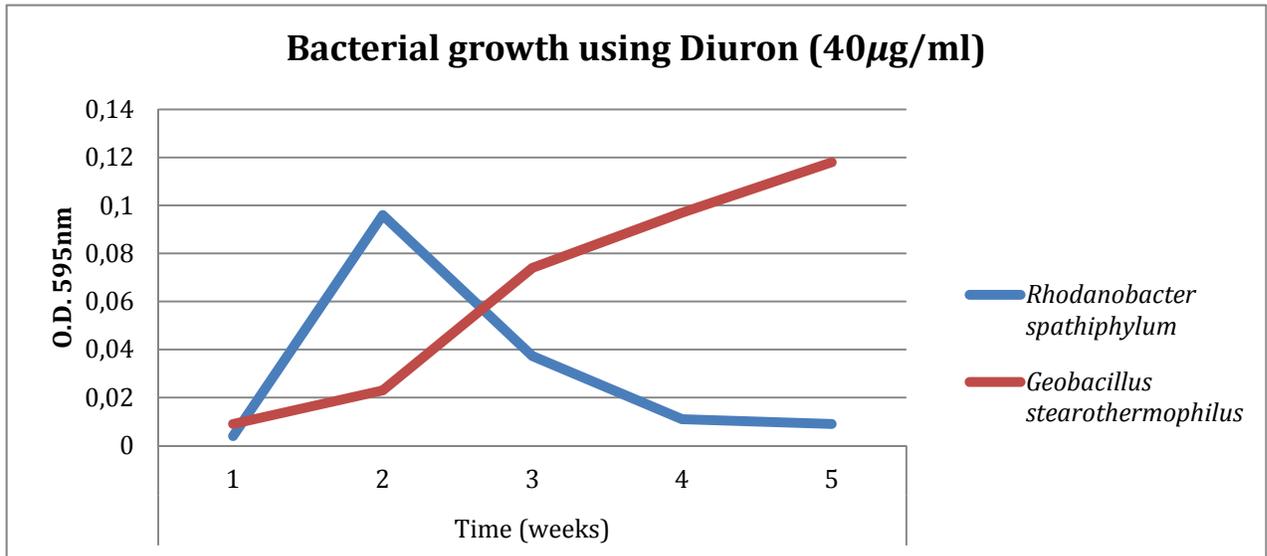


Table 1 : Representative table of sampling

Sampling date	Extraction date	Sample	DNA amount ng/ul	A260/280	Sampling date	Extraction date	Sampling	DNA amount ng/ul	A260/28
13-05-15	22-09-15	Delf1	210.9	1.64	05-06-2016	08-12-2016	Delf1	226.7	1.66
13-05-15	22-09-15	Delf2	205.4	1.65	05-06-2016	08-12-2016	Delf2	417.7	1.60
13-05-15	22-09-15	Delf3	289.1	1.68	05-06-2016	08-12-2016	Delf3	234.4	1.69
13-05-15	22-09-15	Delf4	196.5	1.63	05-06-2016	08-12-2016	Delf4	228.5	1.56
13-05-15	22-09-15	Delf5	268.6	1.59	05-06-2016	08-12-2016	Delf5	175.5	1.71
13-05-15	22-09-15	Delf6	253.1	1.63	05-06-2016	08-12-2016	Delf6	291.9	1.51
13-05-15	22-09-15	Lecl1	182.8	1.62	05-06-2016	08-12-2016	Lecl1	158.9	1.61
13-05-15	22-09-15	Lecl2	266.4	1.66	05-06-2016	08-12-2016	Lecl2	228.7	1.53
13-05-15	22-09-15	Lecl3	219.6	1.68	05-06-2016	08-12-2016	Lecl3	152.5	1.66
13-05-15	22-09-15	Lecl4	266.8	1.69	05-06-2016	08-12-2016	Lecl4	169.6	1.54
13-05-15	22-09-15	Lecl5	289.4	1.69	05-06-2016	08-12-2016	Lecl5	199.6	1.53
13-05-15	22-09-15	Lecl6	228.5	1.68	05-06-2016	08-12-2016	Lecl6	153.7	1.67
Uncontaminated soil	22-09-15	160-2	250.9	1.56	07-10-16	08-12-2016	Delf1	286.2	1.74
Uncontaminated soil	22-09-15	160-3	202.3	1.62	07-10-16	08-12-2016	Delf2	241.2	1.73
19-08-15	10-11-15	Delf1	134.6	1.72	07-10-16	08-12-2016	Delf3	297.6	1.75
24-08-15	10-11-15	Delf2	137.7	1.64	07-10-16	08-12-2016	Delf4	291.3	1.62
19-08-15	10-11-15	Delf3	126.1	1.70	07-10-16	08-12-2016	Delf5	352.5	1.72
24-08-15	10-11-15	Delf4	140.2	1.67	07-10-16	08-12-2016	Delf5	282.3	1.72
19-08-15	10-11-15	Delf5	110.0	1.70	07-10-16	08-12-2016	Lecl1	254.1	1.74
24-08-15	10-11-15	Delf6	146.1	1.70	07-10-16	08-12-2016	Lecl2	243.9	1.76
19-08-15	10-11-15	Lecl1	162.3	1.70	07-10-16	08-12-2016	Lecl3	249.1	1.60
19-08-15	10-11-15	Lecl2	149.1	1.75	07-10-16	08-12-2016	Lecl4	200.1	1.73
19-08-15	10-11-15	Lecl3	189.3	1.75	07-10-16	08-12-2016	Lecl5	179.7	1.67
19-08-15	10-11-15	Lecl4	171.0	1.68	07-10-16	08-12-2016	Lecl6	204.1	1.71
19-08-15	10-11-15	Lecl5	205.1	1.31	27-10-15	11-11-15	Delf6	136.6	1.72
19-08-15	10-11-15	Lecl6	185.7	1.76	28-10-15	11-11-15	Lecl1	131.6	1.70
27-10-15	11-11-15	Delf1	141.1	1.71	28-10-15	11-11-15	Lecl2	123.7	1.87
27-10-15	11-11-15	Delf2	110.5	1.63	28-10-15	11-11-15	Lecl3	94.9	1.71
27-10-15	11-11-15	Delf3	176.9	1.71	28-10-15	11-11-15	Lecl4	137.5	1.75
27-10-15	11-11-15	Delf4	106.0	1.65	28-10-15	11-11-15	Lecl5	100.3	1.71
27-10-15	11-11-15	Delf5	173.5	1.74	28-10-15	11-11-15	Lecl6	151.7	1.76

Table 2 : Sequencing data

Nom	Alias	Code-barre	Date de réception	Source	État de révision	Nombre de bases	Nombre de lectures MiSeq	Soumission(s)
delf1_07102016	delf1_07102016	VAL12402152-C06	2017-01-17	gDNA	—	67 023 000	134 046	SCI017861
delf1_13052015	delf1_13052015	VAL12402152-B02	2017-01-17	gDNA	—	69 573 500	139 147	SCI017861
delf1_15062016	delf1_15062016	VAL12402152-E05	2017-01-17	gDNA	—	77 373 000	154 746	SCI017861
delf1_18072014	delf1_18072014	VAL12402152-D01	2017-01-17	gDNA	—	68 877 500	137 755	SCI017861
delf1_19082015	delf1_19082015	VAL12402152-E02	2017-01-17	gDNA	—	80 358 000	160 716	SCI017861
delf1_23052104	delf1_23052104	VAL12402152-A01	2017-01-17	gDNA	—	81 735 500	163 471	SCI017861
delf1_26092014	delf1_26092014	VAL12402152-G01	2017-01-17	gDNA	—	79 233 500	158 467	SCI017861
delf1_27102015	delf1_27102015	VAL12402152-H02	2017-01-17	gDNA	—	77 287 000	154 574	SCI017861
delf2_07102016	delf2_07102016	VAL12402152-D06	2017-01-17	gDNA	—	75 837 500	151 675	SCI017861
delf2_13092015	delf2_13092015	VAL12402152-C02	2017-01-17	gDNA	—	68 738 500	137 477	SCI017861
delf2_15062016	delf2_15062016	VAL12402152-F05	2017-01-17	gDNA	—	73 172 500	146 345	SCI017861
delf2_18072014	delf2_18072014	VAL12402152-E01	2017-01-17	gDNA	—	59 280 000	118 560	SCI017861
delf2_19082015	delf2_19082015	VAL12402152-F02	2017-01-17	gDNA	—	79 995 000	159 990	SCI017861
delf2_23052104	delf2_23052104	VAL12402152-B01	2017-01-17	gDNA	—	62 699 500	125 399	SCI017861
delf2_26092014	delf2_26092014	VAL12402152-H01	2017-01-17	gDNA	—	70 036 000	140 072	SCI017861
delf2_27102015	delf2_27102015	VAL12402152-A03	2017-01-17	gDNA	—	79 668 500	159 337	SCI017861
delf3_07102016	delf3_07102016	VAL12402152-E06	2017-01-17	gDNA	—	67 706 000	135 412	SCI017861
delf3_13092015	delf3_13092015	VAL12402152-D02	2017-01-17	gDNA	—	69 707 000	139 414	SCI017861
delf3_15062016	delf3_15062016	VAL12402152-G05	2017-01-17	gDNA	—	73 073 500	146 147	SCI017861
delf3_18072014	delf3_18072014	VAL12402152-F01	2017-01-17	gDNA	—	78 334 500	156 669	SCI017861
delf3_19082015	delf3_19082015	VAL12402152-G02	2017-01-17	gDNA	—	76 729 500	153 459	SCI017861
delf3_23052104	delf3_23052104	VAL12402152-C01	2017-01-17	gDNA	—	62 589 500	125 179	SCI017861
delf3_26092014	delf3_26092014	VAL12402152-A02	2017-01-17	gDNA	—	81 498 000	162 996	SCI017861
delf3_27102015	delf3_27102015	VAL12402152-B03	2017-01-17	gDNA	—	81 992 000	163 984	SCI017861
delf4_07102016	delf4_07102016	VAL12402152-F06	2017-01-17	gDNA	—	74 454 000	148 908	SCI017861
delf4_15062016	delf4_15062016	VAL12402152-H05	2017-01-17	gDNA	—	72 919 000	145 838	SCI017861
delf5_07102016	delf5_07102016	VAL12402152-G06	2017-01-17	gDNA	—	60 439 500	120 879	SCI017861

delf5_15062016	delf5_15062016	VAL12402152-A06	2017-01-17	gDNA	—	72 837 500	145 675	SCI017861
delf6_07102016	delf6_07102016	VAL12402152-H06	2017-01-17	gDNA	—	72 837 000	145 674	SCI017861
delf6_15062016	delf6_15062016	VAL12402152-B06	2017-01-17	gDNA	—	70 833 500	141 667	SCI017861
lafi_1_07102016	lafi_1_07102016	VAL12402152-D10	2017-01-17	gDNA	—	75 554 500	151 109	SCI017861
lafi_2_07102016	lafi_2_07102016	VAL12402152-E10	2017-01-17	gDNA	—	70 763 500	141 527	SCI017861
lafiA_03072016	lafiA_03072016	VAL12402152-B10	2017-01-17	gDNA	—	79 349 000	158 698	SCI017861
lafiB_03072016	lafiB_03072016	VAL12402152-C10	2017-01-17	gDNA	—	72 023 000	144 046	SCI017861
lecl1_01102014	lecl1_01102014	VAL12402152-A04	2017-01-17	gDNA	—	77 135 500	154 271	SCI017861
lecl1_07102016	lecl1_07102016	VAL12402152-G07	2017-01-17	gDNA	—	66 339 000	132 678	SCI017861
lecl1_13052015	lecl1_13052015	VAL12402152-D04	2017-01-17	gDNA	—	71 022 000	142 044	SCI017861
lecl1_15062016	lecl1_15062016	VAL12402152-A07	2017-01-17	gDNA	—	77 399 000	154 798	SCI017861
lecl1_19082015	lecl1_19082015	VAL12402152-G04	2017-01-17	gDNA	—	76 699 500	153 399	SCI017861
lecl1_22072014	lecl1_22072014	VAL12402152-F03	2017-01-17	gDNA	—	76 911 000	153 822	SCI017861
lecl1_23052014	lecl1_23052014	VAL12402152-C03	2017-01-17	gDNA	—	74 904 500	149 809	SCI017861
lecl1_28102015	lecl1_28102015	VAL12402152-B05	2017-01-17	gDNA	—	71 954 000	143 908	SCI017861
lecl2_01102014	lecl2_01102014	VAL12402152-B04	2017-01-17	gDNA	—	79 153 000	158 306	SCI017861
lecl2_07102016	lecl2_07102016	VAL12402152-H07	2017-01-17	gDNA	—	37 794 000	75 588	SCI017861
lecl2_13052015	lecl2_13052015	VAL12402152-E04	2017-01-17	gDNA	—	68 308 500	136 617	SCI017861
lecl2_15062016	lecl2_15062016	VAL12402152-B07	2017-01-17	gDNA	—	83 563 000	167 126	SCI017861
lecl2_19082015	lecl2_19082015	VAL12402152-H04	2017-01-17	gDNA	—	78 799 000	157 598	SCI017861
lecl2_22072014	lecl2_22072014	VAL12402152-G03	2017-01-17	gDNA	—	76 802 000	153 604	SCI017861
lecl2_23052014	lecl2_23052014	VAL12402152-D03	2017-01-17	gDNA	—	68 661 000	137 322	SCI017861
lecl2_28102015	lecl2_28102015	VAL12402152-C05	2017-01-17	gDNA	—	72 131 000	144 262	SCI017861
lecl3_01102014	lecl3_01102014	VAL12402152-C04	2017-01-17	gDNA	—	78 036 500	156 073	SCI017861
lecl3_07102016	lecl3_07102016	VAL12402152-A08	2017-01-17	gDNA	—	77 483 000	154 966	SCI017861
lecl3_13052015	lecl3_13052015	VAL12402152-F04	2017-01-17	gDNA	—	73 798 500	147 597	SCI017861
lecl3_15062016	lecl3_15062016	VAL12402152-C07	2017-01-17	gDNA	—	56 474 500	112 949	SCI017861
lecl3_19082015	lecl3_19082015	VAL12402152-A05	2017-01-17	gDNA	—	66 577 000	133 154	SCI017861
lecl3_22072014	lecl3_22072014	VAL12402152-H03	2017-01-17	gDNA	—	56 619 500	113 239	SCI017861
lecl3_23052014	lecl3_23052014	VAL12402152-E03	2017-01-17	gDNA	—	73 919 000	147 838	SCI017861
lecl3_28102015	lecl3_28102015	VAL12402152-D05	2017-01-17	gDNA	—	57 531 000	115 062	SCI017861
lecl4_07102016	lecl4_07102016	VAL12402152-B08	2017-01-17	gDNA	—	75 951 000	151 902	SCI017861
lecl4_15062016	lecl4_15062016	VAL12402152-D07	2017-01-17	gDNA	—	64 996 000	129 992	SCI017861
lecl5_07102016	lecl5_07102016	VAL12402152-C08	2017-01-17	gDNA	—	77 046 500	154 093	SCI017861
lecl5_15062016	lecl5_15062016	VAL12402152-E07	2017-01-17	gDNA	—	70 574 000	141 148	SCI017861
lecl6_07102016	lecl6_07102016	VAL12402152-D08	2017-01-17	gDNA	—	70 896 500	141 793	SCI017861
lecl6_15062016	lecl6_15062016	VAL12402152-F07	2017-01-17	gDNA	—	78 269 000	156 538	SCI017861
remr_1_15062016	remr_1_15062016	VAL12402152-D09	2017-01-17	gDNA	—	76 598 000	153 196	SCI017861
remr_2_15062016	remr_2_15062016	VAL12402152-E09	2017-01-17	gDNA	—	73 342 000	146 684	SCI017861
remr_3_15062016	remr_3_15062016	VAL12402152-F09	2017-01-17	gDNA	—	76 762 000	153 524	SCI017861
remr_4_15062016	remr_4_15062016	VAL12402152-G09	2017-01-17	gDNA	—	63 110 500	126 221	SCI017861
remr_5_15062016	remr_5_15062016	VAL12402152-H09	2017-01-17	gDNA	—	80 765 000	161 530	SCI017861
remr_6_15062016	remr_6_15062016	VAL12402152-A10	2017-01-17	gDNA	—	65 073 500	130 147	SCI017861
vand_3_07102016	vanh_3_07102016	VAL12402152-H08	2017-01-17	gDNA	—	75 883 000	151 766	SCI017861
vanh_13062016	vanh_13062016	VAL12402152-E08	2017-01-17	gDNA	—	76 533 000	153 066	SCI017861
vanh_1_07102016	vanh_1_07102016	VAL12402152-F08	2017-01-17	gDNA	—	79 249 000	158 498	SCI017861
vanh_2_07102016	vanh_2_07102016	VAL12402152-G08	2017-01-17	gDNA	—	59 294 000	118 588	SCI017861
vanh_4_07102016	vanh_4_07102016	VAL12402152-A09	2017-01-17	gDNA	—	80 635 500	161 271	SCI017861
vanh_5_07102016	vanh_5_07102016	VAL12402152-B09	2017-01-17	gDNA	—	79 088 000	158 176	SCI017861
vanh_6_07102016	vanh_6_07102016	VAL12402152-C09	2017-01-17	gDNA	—	77 673 000	155 346	SCI017861

Partie 3

Discussion générale

Biodiversité microbienne des sols exposés aux pesticides

En se basant sur les résultats de séquençage pour les trois ans d'exposition aux pesticides (Diuron et Linuron) on a pu suivre l'évolution bactérienne dans le sol contaminé. Plus on expose nos échantillons aux pesticides, on peut trancher entre les bactéries capables de tolérer ces molécules et qui peuvent être capables de les dégrader en les utilisant comme sources nutritionnelles, et d'autres dont l'abondance diminue et qui sont incapables de les tolérer. Ces résultats ont été traités par le logiciel Geneious, et ont donné des graphes de pourcentage d'abondance bactérienne dans chaque échantillon allant du Phylum jusqu'au genre pour certains échantillons. Le groupe des Actinobacteria est le plus abondant dans un sol normal représentant pour nos deux échantillons du sol non contaminés 44% et 35%, suivi des Proteobacteria 30% et 25% avec un intervalle de confiance de 100% (fig.1).

Nos analyses ont démontré que la différence entre les points d'échantillonnage (la profondeur) est non significative selon le test de One-way ANOVA, pour la totalité des groupes de bactéries testées (fig.2), alors que (Guzzella et al., 2006), ont démontré que les herbicides n'ont été détectés que dans la couche superficielle (0-10 cm) du sol dans laquelle, le pesticide testé qui est le Diuron a été réduit à 50% de sa concentration initiale à la fin de l'expérience, tandis que le Linuron était encore présent à 70% après 245 jours. L'infiltration de l'eau contaminée à travers les couches du sol, peut dépendre des caractéristiques du sol qui peut retenir plus ces molécules, alors que nos biofiltres étaient construits du sol mélangé avec des pailles afin de bien permettre l'aération qui aide à augmenter la dégradation pour les microorganismes aérobies.

Considérant les six points d'échantillonnage fait dans la même date

comme six répétitions pour chaque date d'échantillonnage afin d'augmenter l'intervalle de confiance de nos analyses, on a pu juger que la biodiversité pour les six points d'échantillonnage est déjà bouleversée après la première année d'exposition (Septembre 2014), cette exposition au Diuron et Linuron a donné des résultats totalement inverses par rapport à un sol non contaminé, dont le groupe des Proteobactéries se prolifère, alors que celui des Actinobacteries diminue (fig.3). (Fang et al., 2014) ont identifiés 69 genres capables de dégrader les polluants organiques, et qui étaient principalement affiliés aux Protéobactéries à 49,3%.

Les analyses bio-informatiques ont démontré que les groupes les plus intéressants en présence de pesticides sont les Proteobacteries, les Actinobacteries, les Acidobacteries, les Chloroflexi, les Bacteroidetes et le Firmicutes. Alors que les traitements biostatistiques, confirment que la prolifération des Proteobacteries, les Bacteroidetes et les Firmicutes est statistiquement significative (fig.4), et que l'exposition au mélange de Diuron et Linuron diminue de manière significative la présence des Actinobacteries et Acidobacteries (fig.5).

Parmi les Proteobacteries, les classes de Gammaproteobacteries et Betaproteobacteries, sont les plus abondantes en présence des pesticides alors que ces molécules affectent moins les classes des Alphaproteobacteries et Deltaproteobacteries dont l'abondance a donné une différence non significative selon le test de One-Way ANOVA ($P > 0.05$). En descendant dans la classification (fig. 6), les bactéries les plus persistantes en présence de pesticides sont de l'ordre des Burkholderiales (fig. 7) parmi les Betaproteobacteries, et l'ordre des Xanthomonadales (fig.8) parmi la classe des Gammaproteobacteries dont l'abondance augmente significativement en exposant nos échantillons aux pesticides, alors que la diminution des Actinobacteridae est toujours significative. Les Bacilli et Clostridia appartenant au groupe des Firmicutes sont affectés aussi par les pesticides, et diminuent de manière significative.

D'autre part, (Breugelmans et al., 2007a) ont démontré que la plupart des membres bactériens dégradant le Linuron ont été identifiés comme étant *Variovorax*, mais ils ont également obtenu une *Hydrogenophaga* et une souche *Achromobacter*, qui appartiennent toutes les trois à l'ordre des Burkholderiales de la classe des Betaproteobacteries, jugées capables de dégrader le Linuron. Par contre (Turnbull et al., 2001) ont décrit la souche D47 de *Arthrobacter* qui est de l'ordre des Actinomycetales, comme étant capable de dégrader une gamme d'herbicides phénylurées à 3,4-dichloroaniline, et la souche *Sphingomonas* SRS2 qui est une Alphaproteobacteria comme étant capable de transformer le Diuron et le chlortoluron en produits non identifiés et également peut minéraliser l'isoproturon, mais n'a montré aucune activité contre le Linuron, alors que d'après nos résultats de séquençage Illumina, les Actinobacteries et Alphaproteobacteries ont été affectées par l'exposition aux Diuron et Linuron, et cette diminution était significative, selon le test de One-Way ANOVA.

Dégradation des pesticides

Le processus le plus important responsable de la perte de Linuron est la dégradation microbienne par des voies métaboliques et co-métaboliques (Cycoń et al., 2010). Nos résultats montrent que le Linuron et le Diuron semblent être bien tolérés par les microorganismes du sol lorsqu'ils sont appliqués à des faibles doses, l'effet de différentes concentrations de Diuron sur la croissance microbienne a été caractérisé en repiquant les colonies isolées d'un sol contaminé sur des milieux solides contenant différentes concentrations de Diuron (10, 20, 40 et 60 µg/mL). La croissance sur milieu solide après quatre jours a ensuite été quantifiée et qualifiée, une concentration trop élevée en Diuron (60µg/mL) semble inhiber la croissance microbienne à 90%, tandis qu'une concentration trop faible (10µg/mL) ne semble pas avoir un effet sur les bactéries, et aussi ne permet pas la croissance sur un milieu minimum sans C et N. La concentration optimale semble se situer entre 30 et 50 µg/mL. Il est également possible de noter que l'effet de la concentration en Diuron semble varier d'une espèce à l'autre.

De la même manière on a pu juger que la croissance en présence de Linuron semble être optimale entre 20 et 40 µg/mL.

En parallèle, le Diuron (30mg/l) a été ajouté à des milieux minimums solides dont la dilution de 10^{-4} de notre échantillon de sol contaminé par les pesticides est additionné afin d'isoler les bactéries du sol capables se développer en présence de ces molécules, et la croissance a été évaluée par densité optique. D'après les résultats on peut démontrer que parmi les bactéries qu'on peut isoler en présence de Diuron, il y en a qui sont capables de le tolérer et dont la croissance est égale à sa présence ou absence. *Arthrobacter sp.* et *Paenibacillus odorifer*, sont de bons exemples (fig9). Aussi on a pu isoler d'autres bactéries telles, *Rhodanococcus spathiphilli* et *Geobacillus stearothermophilus* qui semblent avoir une meilleure croissance dans un milieu minimum en présence de Diuron par rapport à celui sans Diuron, et dont la croissance semble être meilleure dans un milieu additionné des sources de C et N, par rapport a un milieu minimum enrichie de Diuron comme seule source de C ou/et N (fig. 10). Afin de s'assurer que ces microorganismes dégradent nos pesticides et non pas les tolèrent, la croissance à 28°C a été réévaluée dans un milieu minimum liquide avec Diuron ou Linuron par mesure de la densité optique en triplicata, en quantifiant la dégradation des pesticides par Chromatographie en phase liquide à haute performance et spectrométrie de masse (HPLC-MS).

Afin de s'assurer que ces bactéries pourraient dégrader les pesticides, la croissance a été évaluée en mesurant la densité optique en triplicata (fig.10) et la dégradation a été évaluée par HPLC-MS. Les résultats montrent que dans cinq semaines, *R. spathiphillum* semble dégrade le Diuron dans un milieu minimum liquide, mieux que *G. stearothermophilus*. Après cinq semaines la concentration de Diuron a été évaluée par HPLC-MS et a diminuée de 40 µg / ml à 31,7 µg / ml dans le MM inoculé par *R. spathiphillum* et de 40 µg / ml à 37,3 µg / ml dans le MM inoculé par *G. stearothermophilus*. La croissance de *R. Spathiphillum* dans les deux premières semaines semble être optimale, et les mesures de D.O. ont montré une baisse de

croissance après la deuxième semaine (fig.10). Il est suggéré que les produits de dégradation de Diuron sont toxiques pour la bactérie. Nous avons supposé que les produits de dégradation sont responsables du déclin rapide de la croissance bactérienne, ce qui affectera par la suite la rentabilité de nos inoculats.

La croissance des deux bactéries en présence de Linuron dans le MM liquide semble ne pas être affectée par les produits de dégradation. La concentration de Linuron a diminuée de 20 µg / ml à 0,9 µg / ml dans le MM inoculé par *R. spathiphillum* ou *G. stearothermophilus*. Les résultats de HPLC-MS ont montré que l'un des produits de dégradation de Linuron par les deux bactéries testées est le Diuron, qui a été détecté à une concentration de 153 µg/L parmi les produits de dégradation par *G. stearothermophilus* et à une concentration de 54,6 µg/L parmi les produits de dégradation par *R. spathiphillum*, on suppose que cette bactérie dégrade le Linuron et un de ces sous-produits qui est le Diuron ; Afin de valider ces résultats, et de mieux comprendre le processus de dégradation des pesticides, on devrait faire un dosage hebdomadaire de Linuron et Diuron et des sous-produits de dégradation connus.

Selon (Bégin, 1999), les conditions du milieu peuvent aider les microorganismes à dégrader complètement les composés organiques, ou seulement les transformer en produits intermédiaires qui peuvent être, selon le cas, moins, également ou plus toxiques que les composés d'origine, et selon (Hladik and Calhoun, 2012) dans certaines conditions de traitement de l'eau, le Diuron peut former de la N-nitrosodiméthylamine (NDMA), qui est raisonnablement considéré comme un cancérigène humain, selon US Environmental Protection Agency 2010, alors que sa biotransformation ou sa photo-transformation peut conduire à des composés beaucoup plus dangereux selon (Couture, 2009).

La dégradation bactérienne du Linuron est une réaction complexe, qui débute par une hydrolyse directe conduisant à la formation de 3,4-dichloraniline (3,4-DCA) et

de N, O-diméthylhydroxylamine (N, O-DMHA), ces composés peuvent ensuite être minéralisés selon (Breugelmans et al., 2007b).

Ca sera alors très important de s'assurer que la dégradation des pesticides par les microorganismes, amènera à des composés simples, non toxiques pour les microorganismes, et n'affectant pas la vie aquatiques et la santé humaine.

(Breugelmans et al., 2007a) ont démontré que la dégradation du Linuron était réalisée par un groupe de bactéries métaboliquement en interaction plutôt que par des souches individuelles, cette dégradation peut dépendre de plusieurs interactions bactériennes et aussi des interactions avec d'autres microorganismes tels des champignons, dont les hyphes fongiques peuvent fonctionner comme vecteurs de transport de bactéries, ce qui facilite une propagation plus efficace des organismes dégradants dans le sol, tel que décrit par (Ellegaard-Jensen et al., 2014) qui ont mis en évidence que la minéralisation la plus rapide du Diuron a été observée dans le consortium consistant en *Mortierella* LEJ702, *Variovorax* SRS16 et *A. globiformis* D47, mesurée par le CO₂ évolué grâce à ¹⁴C marqué.

Si le sol est le principal réservoir en termes de nombre de cellules et de diversité avec environ 10⁸-10⁹ bactéries par gramme, il faut aussi noter qu'un millilitre d'eau douce contient environ 1 million de cellules bactériennes (Fuagier, 2010). Les études faites par (Angly, 2016) suggèrent que les microbiomes pélagiques peuvent aussi protéger les écosystèmes des herbiers marins en les dégradant.

Les cyanobactéries qui sont un groupe d'organismes procaryotes et autotrophes abondants dans les environnements terrestre, dulçaquicole et marin (Aslim and Ozturk, 2009), sont écologiquement importants en raison de leurs rôles essentiels dans la production d'oxygène, le cycle des nutriments et la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Certains nombre d'études ont mis en évidence leur capacité à dégrader les polluants organiques, y compris les pesticides (Yasser El-Nahhal, 2015), d'autres études faites par (Pesce, 2010) ont confirmé l'existence d'un pouvoir biodégradable

élevé du Diuron par les microorganismes benthiques dans les bassins hydrographiques exposés à cet herbicide, et aussi démontré que les interconnexions entre le sol et les sédiments peuvent jouer un rôle important dans la surexpression, l'inhibition ou la modification des fonctions biologiques de la communauté benthique qui régule les écosystèmes aquatiques. Pour cette raison l'étude des interactions microbiennes dans la dégradation des pesticides sera encore un objectif important à entamer, ces interactions peuvent aider à réussir la dégradation des produits toxiques de telle sorte que les sous-produits de dégradation soient non toxiques pour notre écosystème.

En parallèle, nous sommes en train de tester la biodégradation de Diuron et Linuron, sous l'activité des deux bactéries isolées la *Rhodanobacter spathiphyllum* et *Geobacillus stearothermophilus* sur le champs, en formant des mini biofiltres comme support pour nos bactéries, et nous utiliserons les mêmes approches pour confirmer l'efficacité de la biodégradation des pesticides sur le champs.

Conclusion

Les résultats obtenus nous permettent de mieux comprendre la biodiversité microbienne impliquée dans la biodégradation des pesticides dans les milieux agricoles. Le groupe le plus persistant dans les sols exposés aux pesticides est celui de Proteobactéries, cependant, en raison de manque de précision des résultats de séquençage on a pas pu déterminer quelles sont les espèces les plus abondantes, mais on a pu confirmer que les Burkholderiales et les Xanthomonadales sont les ordres de bactéries les plus abondantes dans des sols exposés aux pesticides à plusieurs reprises, ces bactéries semblent être les responsables de la biodégradation microbienne de ces molécules.

L'évaluation de la dégradation de Diuron et Linuron par les bactéries isolées a révélé que *R. spathiphillum* peut dégrader le Diuron mieux que *G. stearothermophilus*, mais les produits de dégradation par *R. spathiphillum* semblent empêcher la croissance de cette bactérie, résultant en une chute de croissance remarquable après la deuxième semaine, par contre les résultats de la dégradation de Linuron par les deux bactéries semblent être les mêmes sauf qu'on ne peut pas juger que les produits de dégradation sont les mêmes.

La biomasse servant à inoculer ces biofiltres peut être composée de plusieurs microorganismes dégradant les pesticides, ou bien d'autres aidant indirectement dans l'accélération du processus de dégradation, cette biomasse peut être inoculée dans une solution synthétique composée d'éléments nutritifs et d'oligoéléments, qu'on peut utiliser comme inocula pour nos bio-filtres afin d'améliorer l'efficacité et la biodégradation des pesticides sur le champs.

L'abondance et la diversité des gènes de biodégradation peut être aussi un objectif très important à entamer afin de quantifier les gènes surreprésentés en présence de pesticides, ces gènes surabondants peuvent coder des enzymes responsables de cette dégradation, et malgré le fait que quelques gènes sont déjà

connus, les gènes responsables de leurs transport peuvent être beaucoup plus impliqués que les gènes de dégradation même. En se basant sur l'extraction de l'ADN des sols exposés aux pesticides, le séquençage Illumina, peut via des analyses bio-informatiques et statistiques nous donner une idée sur les gènes qui dominent pendant le processus de biodégradation, ces gènes peuvent coder des enzymes responsables de la dégradation dont l'abondance va augmenter de plus en plus en exposant nos échantillons du sol aux pesticides, et peuvent aussi être des gènes de transport. L'exposition du sol aux pesticides peut augmenter la fréquence de ces gènes que les bactéries vont intégrer par transfert latéral ou suite à la résistance acquiert après plusieurs expositions successives.

Bibliographie

- Abdelly, C. (2007). Bioremédiation / Phytoremédiation.
- Angly, F.E. (2016). Diuron tolerance and potential degradation by pelagic microbiomes in the Great Barrier Reef lagoon. *PeerJ* 4.
- Aslim, B., and Ozturk, S. (2009). Toxicity of herbicides to cyanobacterial isolates. *J. Environ. Biol.* 30(3), 381–384.
- Bégin, R. (1999). Lignes directrices pour le traitement de sol par biodégradation, bioventilation ou volatilisation (Ministère de l'Environnement).
- Boudouch, O. (2009). Etude de la dépollution des sols par extraction sous pression réduite. application au traitement des COV - download. INSA de Lyon.
- Bresson, J. (2013). Interaction plante-microorganismes : Implication de la rhizobactérie *Phyllobacterium brassicacearum* dans les réponses d'*Arabidopsis thaliana* au stress hydrique. Université Montpellier II.
- Breugelmans, P., D'Huys, P.-J., De Mot, R., and Springael, D. (2007a). Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 374–385.
- Breugelmans, P., D'Huys, P.-J., and Springael, D. (2007b). Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol* 62, 374–385.
- BUNDT, A., AVILA, L., AGOSTINETTO, D., DICK, D.P., and BURAUER, P. (2015). IMIDAZOLINONE DEGRADATION IN SOIL IN RESPONSE TO APPLICATION HISTORY. *Planta Daninha* 341–349.
- Chambres d'Agriculture (2006). Gestion des effluents phytosanitaires Comment concevoir son lit biologique.
- Chevrier, É. (2013). LA PHYTOREMÉDIATION, UNE SOLUTION D'AVENIR POUR LE QUÉBEC. UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE.
- Chi-Chu, L. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Sci. Health Part B* 45, 348–359.
- Codis, S. (2009). Zoom sur le Phytobac, procédé de dégradation biologique des effluents phytosanitaires sur substrat.
- Couture, G. (2009). ÉTUDE DE L'HYDROLYSE ACIDE DES HERBICIDES ATRAZINE, SEMAZINE ET DIURON EN SOLUTION DANS L'EAU ET À LA SURFACE DE MINÉRAUX ARGILEUX

DÉSHYDRATÉS À L'AIR LIBRE, AU VOISINAGE DE 0 ET DE 22 °C.

- CRAAQ (2016). Utilisation rationnelle et sécuritaire des pesticides. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ).
- Cullington, J.E., and Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 31, 677–686.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., and Kozdrój, J. (2010). Linuron effects on microbiological characteristics of sandy soils as determined in a pot study. *Ann. Microbiol.* 60, 439–449.
- De Roffignac, L., Cattan, P., Mailloux, J., Herzog, D., and Le Bellec, F. (2006). Gestion d'effluents phytosanitaires sur l'exploitation : un exemple en agrumiculture guadeloupéenne.
- Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Höfte, M., Vos, P.D., Verstraete, W., and Top, E.M. (2003). Synergistic Degradation of Linuron by a Bacterial Consortium and Isolation of a Single Linuron-Degrading *Variovorax* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1532–1541.
- Del Pilar Castillo, M., Torstensson, L., and Stenstrom, J. (2008). BIOBEDS – A SWEDISH CONTRIBUTION TO ENVIRONMENTAL PROTECTION FROM PESTICIDE POLLUTION. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6206–6219.
- Design, P. (2011). Stratégie phytosanitaire québécoise en agriculture 20112021 (Bibliothèque nationale du Québec).
- Djical, D. (2003). Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes.
- Dufresne, M. (2013). LES TECHNOLOGIES DE TRAITEMENT DES SOLS CONTAMINÉS : LESQUELLES SONT DURABLES ? Université de Sherbrooke.
- Ellegaard-Jensen, L., Knudsen, B.E., Johansen, A., Albers, C.N., Amand, J., and Rosendahl, S. (2014). Fungal-bacterial consortia increase diuron degradation in water-unsaturated systems. *Sci. Total Environ.* 466–467, 699–705.
- Esteve, K. (2007). Procédé de traitement biologique aérobie d'effluent phytosanitaires en viticulture. Université de Bordeaux 1.
- E-TIC (2014). Gestion des nuisibles et des maladies.
- Fang, H., Cai, L., Yang, Y., Ju, F., Li, X., Yu, Y., and Zhang, T. (2014).

Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments. *Sci. Total Environ.* 470–471, 983–992.

- Fourrages Mieux (2016). Les herbicides.
- Fuagier, A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere ». L'ÉCOLE DOCTORALE ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE DE LYON.
- Gaudu, F. (2014). BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUÉS AUX HYDROCARBURES: Les hydrocarbures aromatiques et les alcanes. UNIVERSITE DE RENNES 1.
- Giroux, I. (2004). La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec.
- Giroux, I. (2014a). Contamination de l'eau par les pesticides dans les secteurs de production de pommes de terre (Lévis).
- Giroux, I. (2014b). PESTICIDES DANS LES COURS D'EAU AU QUÉBEC D'EAU AU QUÉBEC: L'empreinte des cultures sur la qualité de l'eau.
- Giroux, I. (2015). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya 2011 à 2014 (Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement,).
- Giroux, I., and Pelletier, L. (2012). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010.
- Gouvernement du Québec (2016). À propos des pesticides.
- Guillaume, S. (2009). MODELISATION D'UNE STATION PAR BIOFILTRATION. UNIVERSITÉ de LAVAL. QUÉBEC.
- Guzzella, L., Capri, E., Di Corcia, A., Barra Caracciolo, A., and Giuliano, G. (2006). Fate of diuron and linuron in a field lysimeter experiment. *J. Environ. Qual.* 35, 312–323.
- Hepia Un mur VERT qui épure. le VG - Biobed, un brevet hepia, agronomie.
- Hladik, M.L., and Calhoun, D.. (2012). Analysis of the herbicide diuron, three diuron degradates, and six neonicotinoid insecticides in water—Method details and application to two Georgia streams: US Geol. Surv. Sci. Investig. Rep. 2012–5206 10.
- Hulsen, K., Minne, V., Lootens, P., Vandecasteele, P., and Höfte, M. (2002). A chlorophyll a fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to

monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron. *Environ. Microbiol.* **4**, 327–337.

- Irosoft, architecture de gestion de l'information législative-legal information management system (2016). - Loi sur la qualité de l'environnement.
- Irosoft, architecture de gestion de l'information législative-legal information management system - Loi sur la qualité de l'environnement.
- Johnson, E. (2011). Programme de réduction des risques liés aux pesticides.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649.
- Lallemand-Barrès (1993). Méthodes de dépollution des sols et des eaux pollués Par les métaux (Direction Technique de l'Ingénierie de l'Environnement, France).
- M-Brugere, C. (2001). Effets sur le spermatozoïde humain du Diuron (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée) et de l'un de ses produits de transformation, la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) (Etude préliminaire). *Andrologie* **11**, 69–75.
- MDDELCC (2015). Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. Stratégie québécoise sur les pesticides 2015-2018.
- Moletta, R. (2011). La méthanisation (2e ed.) (Paris: Lavoisier).
- Nasser, S., Rezaei Kalantary, R., Nourieh, N., Naddafi, K., Mahvi, A.H., and Baradaran, N. (2010). INFLUENCE OF BIOAUGMENTATION IN BIODEGRADATION OF PAHs-CONTAMINATED SOIL IN BIO-SLURRY PHASE REACTOR. *Iran J Env. Health Sci Eng* **7**, 199–208.
- Pesce, S. (2010). Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization: incidence of runoff and soil erosion. *J Soils Sediments* **10**, 698–707.
- Raby, K. (2013). Élimination de l'azote contenu dans un lisier de porc synthétique à l'aide d'un biofiltre percolateur. UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE.
- Richard, J.-P. (2011). Résidus de pesticides dans les fruits et légumes frais vendus au Québec 2007-2011 (MAPAQ).
- Seghers, D., Verthé, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S.D.,

Verstraete, W., and Top, E.M. (2003). Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 139–146.

- Sithurain Kende (2010). MINERALISATION DE L'AZOTE DANS DEUX SOLS AMENDÉS AVEC DEUX COMPOSTS ENRICHIS D'UN ANTIBIOTIQUE. UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC.
- Sørensen, S.R., Albers, C.N., and Aamand, J. (2008). Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2332–2340.
- Soulas, G. (1985). La dégradation des pesticides dans le sol, aspects microbiens et cinétiques. *Sci. Sol* 2, 43–47.
- SQP (2016). LA PHYTOREMÉDIATION. Société Québécoise Phytoremédiation 28.
- Stanley, J., and Preetha, G. (2016). Pesticide Toxicity to Microorganisms: Exposure, Toxicity and Risk Assessment. In *Pesticides Toxicity to Non-Target Organisms*, (Springer Science+Business Media Dordrecht), pp. 351–410.
- Surajudeen, A., and Adaji, B.O. (2009). Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation Techniques for the Remediation of Used Motor Oil Contaminated Soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 747–754.
- Topp, E. (2003). Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. *Can. J. Soil Sci.* 83, 303–309.
- Turcotte, V. (2009). Utilisation d'écaillés de cacao comme matériau support pour la biofiltration d'effluents agroalimentaires. Université du Québec.
- Turnbull, G.A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., and Morgan, J.A. (2001). Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2270–2275.
- Yasser El-Nahhal (2015). Toxicity of Diuron, Diquat and Terbutryn to Cyanobacterial Mats. *Ecotoxicol Env. Contam* 10, 71–82.