



**INDICATEURS POUR L'EVALUATION DE L'IMPACT DES  
PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA COMPOSANTE  
MICROBIENNE DE LA QUALITE BIOLOGIQUE DES SOLS**  
BIOINDICATORS FOR THE ASSESSMENT OF SIDE  
EFFECTS OF PESTICIDES ON THE SOIL BIOLOGICAL  
STATUS

Programme Evaluation et réduction des  
risques liés à l'utilisation des pesticides  
Rapport de fin de contrat : synthèse

UMR 1219 Œnologie INRA Université V. Segalen  
Bordeaux 2  
ISVV  
210 chemin de Leysotte  
33882 VILLENAVE3 D'ORNON Cedex  
G. Soulas  
Tel: 05 57 57 58 35  
Fax 05 57 57 58 13  
Guy.soulas@oenologie.u-bordeaux2.fr

Date : 30/09/2010

N° de contrat : CV07000782  
Date du contrat : 25./07/2007.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

# **INDICATEURS POUR L'EVALUATION DE L'IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA COMPOSANTE MICROBIOLOGIQUE DE LA QUALITE DES SOLS**

## **EVALUATION ET REDUCTION DES RISQUES LIES A L'UTILISATION DES PESTICIDES**

**Responsable scientifique du projet  
Guy Soulas**

**Aautres partenaires scientifiques bénéficiaires :**

**Robert Duran  
Beatrice Lauga  
Fabrice Martin-Laurent  
Diederik van Tuinen  
Vivienne Gianinazzi-Pearson  
Emile Benizri  
Corinne leyval  
Pascal Guilbaut  
Maxime Christen  
Xavier Salducci**

## 1. Contexte et objectifs

Les micro-organismes édaphiques constituent le second pool de carbone biologique des sols après les racines des plantes. Ils assurent un rôle de transformateurs essentiel au déroulement des grands cycles biogéochimiques, notamment ceux du carbone, de l'azote (recyclage de la matière organique, fixation symbiotique de l'azote, nitrification, ...) et du soufre, dont dépend la fertilité des sols. Ils font donc du sol un réacteur biologique. Les micro-organismes du sol sont également des agents d'épuration vis-à-vis de composés (xénobiotiques, hydrocarbures, ...) dont le sol est un lieu de passage obligé et dont la présence est une menace pour les espèces telluriques et les fonctions qu'elles assurent. Ainsi, il est connu, que de nombreux produits phytosanitaires se révèlent toxiques, par exemple, pour les champignons mycorrhizogènes à arbuscules (MA) qui jouent un rôle très important dans le flux sol-plante de phosphore, dans la structure des sols et dans leur capacité de rétention en eau ainsi que pour les *Rhizobium* fixateurs d'azote associés aux racines des Légumineuses. De même, la nitrification, indispensable à la nutrition azotée des plantes, peut être perturbée par certains pesticides. L'ammonification au contraire est en générale stimulée. L'emploi des pesticides peut aussi avoir des conséquences sur le développement de maladies telluriques, suite au déplacement éventuellement d'équilibres microbiens (Davet, 1996). Ainsi, les micro-organismes sont des acteurs essentiels et irremplaçables du fonctionnement des milieux terrestres et de la durabilité des agrosystèmes. Il semble important de se préoccuper de la protection de ce patrimoine biologique non renouvelable.

Par ailleurs, de par leur situation d'exposition directe aux polluants présents dans les sols, les micro-organismes représentent des sondes qui peuvent être utilisées pour caractériser l'état biologique des sols et son évolution consécutivement à des pressions d'origine naturelle ou anthropique. Les micro-organismes sont donc des indicateurs potentiels de la qualité biologique des milieux naturels

La présence de pesticides dans les sols agricoles représente, à terme, un risque toxicologique (contamination des eaux souterraines) et écotoxicologiques (contamination des eaux continentales). Par rapport à cet enjeu, le dispositif de la Directive 91/414/CEE relative à l'autorisation de mise sur le marché reste relativement démuné en matière de tests microbiens. Leur nécessité est en outre renforcée par la récente Directive visant à "*instaurant un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation durable des pesticides*" et insistant sur les conditions réelles d'utilisation des produits en instaurant des réseaux de surveillance.

Ainsi, les micro-organismes sont de bons candidats pour contribuer à une meilleure évaluation du risque lié à l'utilisation des pesticides. C'est cette hypothèse que nous avons tenté de vérifier dans ce travail qui s'organise autour de deux axes thématiques :

- Le premier, le plus prospectif, vise à tester la capacité indicatrice de populations microbiennes spécifiques du sol assurant différentes étapes-clé des cycles géochimiques du C, de l'N, du S et du P en associant analyse de la diversité et quantification des gènes impliqués dans les différentes transformations ciblées et mesures d'activités enzymatiques potentielles. Les objectifs étaient de développer de nouveaux outils venant renforcer l'arsenal réglementaire actuel. Ces travaux sont par ailleurs menés dans le contexte de la standardisation d'une méthode d'extraction directe des acides nucléiques du sol auprès de l'AFNOR et de l'ISO (texte provisoire ISO/CD 10063).

- Le second axe thématique s'inscrit dans une démarche à vocation plus opérationnelle. Il vise à proposer une *approche analytique intégrée* permettant la mise en œuvre, dans des conditions d'analyses facilitant le moyen/haut débit, de mesures de différents paramètres globaux de taille, d'activité et de diversité des communautés microbiennes naturelles des sols. La faisabilité et les avantages potentiels de cette approche analytique intégrée ont été évalués par rapport à une batterie de tests de "référence" mis en œuvre par un professionnel de l'analyse sur un dispositif en vraie grandeur.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Les démarches et les dispositifs

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Nous avons appuyé notre démarche méthodologique sur trois types d'approches expérimentales associées à deux dispositifs expérimentaux :

- Une approche « **écotoxicologique** » basée sur l'établissement au laboratoire de courbes de réponse d'un ensemble de bioindicateurs microbiens en fonction de différentes doses d'application à différents sols d'un cocktail de pesticides utilisés en viticulture. Les doses 0X, 1X, 10X, 20X ont été utilisées (éventuellement aussi 2,5X, 5X, et 40X).

- Une approche « **pre-homologation** », plus classique, visant à étudier les modifications éventuelles de différents bioindicateurs microbiens, pris à différents stades de la chaîne « Recherche – Développement », sélectionnés pour représenter différents niveaux d'organisation biologique. Ces indicateurs ont été mis en œuvre sur des sols conservés en microcosmes au laboratoire avec ou sans traitement par le cocktail de pesticides utilisés en viticulture à la dose agronomique (cf au dessous). Un ensemble de sols « représentatifs » des sols français ont été utilisés pour cette étude dont l'objectif était de développer des essais biologiques utilisables dans le cadre d'une procédure d'homologation.

- En parallèle, sur un dispositif expérimental de plein champ (Montagne Saint Emilion) cultivé en vignes et comparant différentes pratiques d'entretien des sols (enherbement, désherbage mécanique ou chimique), nous avons suivi différents bioindicateurs microbiens après application du même cocktail de pesticides que celui utilisé au laboratoire. Pour des raisons évidentes d'opérationnalité, les indicateurs sélectionnés sont déjà en cours d'utilisation par les laboratoires d'analyse (référence) soit en cours de développement. Dans ce dernier cas, nous avons opté pour **une approche analytique dite intégrée** car nous permettant de réaliser l'ensemble des essais sur un échantillon unique. Il s'agit d'une étude telle qu'elle pourrait être pratiquée pour les besoins d'une surveillance en conditions naturelles en situation de « **post-homologation** ».

*Le choix des produits phytosanitaires a été guidé par la volonté de s'aligner sur les pratiques phytosanitaires habituelles en viticulture. Nous avons donc choisi un cocktail de produits constitué de deux fongicides (fenhexamide, anti-botrytis et folpel, anti-mildiou) et d'un insecticide (deltaméthrine). Les produits utilisés sont le Teldor 750g/ha (1.5 mg MA/200g sol eq sec, M.A. = fenhexamide), le Decis 7.5g/ha (1.5µg MA/200g sol, M.A. = deltaméthrine), et l'Acryptan 1500g/ha (3 mg MA/200g sol, M.A. = folpel). En appliquant directement le cocktail de pesticides sur le sol, nous nous sommes placés dans la situation d'un pire scénario. Pour chaque placette, l'échantillon de sol prélevé était composé de 9 prélèvements (1 par « micro-placette ») réalisés à la tarière manuelle sur une profondeur de 15 cm, puis mélangés, homogénéisés et tamisés à 2 mm.*

*Le tableau suivant récapitule les dates des différentes interventions au cours des 2 années d'expérimentations.*

<i>Intervention</i>	<i>2008</i>	<i>2009</i>
<b>Prélèvement Sol "point zéro"</b>	5 mars	15 mai
Apport Cocktail	13 juin	26 mai
<b>Prélèvement Sol "T+3j"</b>	16 juin	29 mai
<b>Prélèvement Sol "T+30j"</b>	15 juillet	

### 2.2. Les bioindicateurs sélectionnés

#### Indicateurs globaux

- **Biomasse microbienne** mesurée selon une technique de fumigation-extraction, selon la norme FD ISO 14240-2 modifiée selon Chaussod (1999) pour la concentration en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05 N),

- **Activités FDA hydrolase**, selon Schnürer et Rosswall (1982),

- **Respiration microbienne** durant 4 semaine à 28°C (exprimée en mgC-CO<sub>2</sub> / kg MS / 28 jours) (Catroux *et al*, 1987),

- **Azote potentiellement minéralisable** mesuré après 4 semaines d'incubation à 28°C (exprimée en mgN-(NH<sub>4</sub>+NO<sub>3</sub>) / kg MS / 28 jours), (Catroux *et al*, 1987).

Ces premiers bioindicateurs ont été mis en œuvre par le laboratoire Celesta-lab qui a été chargé de suivre ces différents indicateurs biologiques sur le dispositif de Montagne St Emilion. Ils représentent des "références" car déjà au catalogue de certains laboratoires d'analyses.

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

### - Concentration en cellules microbiennes vivantes

Venant compléter les mesures de biomasse microbienne, nous avons utilisé une technique récemment mise au point (Pascaud *et al.*, 2008) de mesure de la concentration en cellules bactériennes vivantes. La méthode est basée sur un marquage différentiel de la microflore morte et vivante par deux intercalants de l'ADN. Le marquage des cellules est réalisé avec un kit du commerce, le kit LIVE/DEAD BacLight Viability kit (Invitrogen). L'un des intercalants, le SYTO 9, se fixe sur l'ADN de l'ensemble des cellules mortes et vivantes et génère de la fluorescence verte. Le second, l'iodure de propidium, se fixe uniquement sur l'ADN des cellules mortes où il déplace le SYTO 9 et émet de la fluorescence rouge. Cette technique cumule trois avantages : elle n'est pas sélective, il est possible de cibler la fraction vivante de la communauté bactérienne et, techniquement, elle peut facilement être mise en œuvre en routine. Pratiquement, le caractère quantitatif de cette approche est obtenu par la technique des ajouts réalisée avec différentes concentrations cellulaires connues d'*E. coli*.

### - Activité déshydrogénase

En complément de l'activité FDA hydrolase, le niveau de certaines enzymes pourrait aussi être un indicateur du fonctionnement et de la qualité biologique des sols (Dick, 1994). Les enzymes les plus couramment sollicitées sont celles qui sont en liaison directe avec l'oxydation de la matière organique des sols. L'intérêt particulier des déshydrogénases tient au fait qu'il s'agit d'enzymes dont le fonctionnement est étroitement lié à une structure cellulaire intacte et viable (Rossel et Tarradellas, 1991), évitant ainsi toute interférence avec des enzymes existant à l'état libre dans le sol. Le dosage est basé sur la capacité des cellules microbiennes en activité de réduire un sel de tétrazolium en un composé coloré : le formazan dont la quantité formée est mesurée par spectrophotométrie (485 nm). Le kit commercial CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (promega) a été utilisé. Le dosage de l'activité déshydrogénase est réalisé à partir d'une dilution appropriée d'une suspension de sol diluée en présence de milieu de culture LB dilué au  $1/10^{\text{ème}}$ . Le développement de la coloration est suivi en continu avec un lecteur de microplaque pendant 16 heures toutes les demi-heures à une température de 30°C. La phase exponentielle initiale de développement de la coloration est utilisée pour calculer le temps nécessaire ( $t_s$ ), appelé *temps critique*, pour atteindre un niveau donné ( $y_s$ ) de

coloration en utilisant un modèle exponentiel ( $y_s = y_0 + ae^{bt_s}$ ). En première approche, la comparaison des  $t_s$  nous donne une mesure relative de l'activité déshydrogénase dans les différents échantillons de sol. Dans ce protocole d'application, l'activité déshydrogénase est essentiellement celle des bactéries cultivables.

### - Diversité biochimique

Depuis ses premières applications (Garland and Mills, 1991), la détermination de profils d'utilisation de substrats carbonés (ou de profils physiologiques de communautés microbiennes) a trouvé de nombreuses applications et est devenu l'une des techniques les plus utilisées pour caractériser la diversité physiologique des communautés microbiennes des sols et les effets de différentes pratiques culturales (Bending *et al.*, 2004; Crecchio *et al.*, 2004), notamment l'utilisation de pesticides (el Fantroussi *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2008). Le principe est identique à celui de l'activité déshydrogénase, la consommation d'un substrat comme source de carbone et d'énergie s'accompagnant de la réduction d'un sel de tétrazolium en dérivé coloré. Nous avons utilisé le système des "Ecoplaques" BIOLOG® partitionnées en trois zones contenant chacune les mêmes 32 substrats carbonés. Les puits sont inoculés avec la dilution  $10^{-4}$  d'une suspension de sol et l'apparition d'une coloration est suivie pendant 5 jours au spectrophotomètre à 590 nm. Les différents profils d'utilisation des substrats ont été analysés d'abord par le calcul des indices de diversité de Shannon-Weaver ou des indices de similitude basés sur le calcul des distances euclidiennes. Ces indices ont été analysés par ANOVA à 2 ou 3 facteurs.

### - Diversité spécifique

L'essor récent des techniques dites "non culturales" basées sur des techniques moléculaires d'analyse de l'ADN extrait du sol, ARDRA (*Amplified RDNA Restriction Analysis*) (Moyer *et al.* 1994), DGGE (*Denaturing Gel Gradient Analysis*) (Muyzer *et al.* 1993), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Avaniss-Aghajani *et al.* 1994) a largement contribué à un renouveau

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

technique indéniable dans l'analyse de la diversité microbienne. Nous avons sélectionné la technique de T-RFLP qui se prête plus facilement que d'autres à une approche quantitative. L'analyse T-RFLP a été conduite sur les gènes codant pour l'ARNr 16S caractéristiques de chaque bactérie. Pour cela l'ADN total extrait du sol a été amplifié par les amorces universelles spécifiques aux bactéries. Le marquage de chaque amorce par deux fluorochromes permet d'étiqueter spécifiquement les extrémités de chaque fragment généré par PCR. Après coupure de ces fragments par une enzyme de restriction on génère des fragments plus petits de tailles différentes qui sont séparés par électrophorèse capillaire. Seuls les fragments terminaux marqués sont détectés. Le jeu de données résultant de l'analyse de chaque échantillon a finalement été traité par une analyse statistique multivariée.

**La technique soustractive** que nous avons envisagée pour quantifier globalement le niveau d'identité de la composition en espèces de deux communautés microbiennes n'a pas confirmé en seconde année les résultats prometteurs de la première année. Le manque de reproductibilité des résultats est probablement dû à un comportement colloïdal des billes magnétiques utilisées comme support de l'ADN. Nous avons envisagé d'aborder le problème en utilisant une technique plus conventionnelle de biologie moléculaire, la SSCP, dont le choix se justifie par la présence d'une compétence locale ainsi que par la possibilité de ces résultats à ceux obtenus par T-RFLP. Les résultats de ce travail en cours ne sont pas actuellement disponibles. Ils seront fournis sous forme d'addendum et présentés lors de la réunion du 1er décembre.

*Remarque : la première série d'indicateurs microbiens : **biomasse microbienne** déterminée par une technique biocidale, **activité respiratoire** mesurée par le dégagement de CO<sub>2</sub>, **activité FDA hydrolase** et **activité potentielle de minéralisation de l'azote** ont été mis en œuvre par le laboratoire Celesta. Il s'agit d'indicateurs dits « conventionnels » car déjà utilisables en routine que nous avons choisis comme référence opérationnelle. Une seconde série d'indicateurs en cours de développement : **concentration cellulaire bactérienne vivante** faisant appel à une technique fluorométrique, **activité déshydrogénase** et **diversité biochimique** faisant toutes deux appel à une technique colorimétrique, ont été réalisées dans le cadre d'une **approche analytique** dite « **intégrée** » (Pascaud et al. soumis) car permettant de réaliser l'ensemble des mesures sur un seul et même échantillon*

### Indicateurs spécifiques

#### **- Germination des spores des champignons mycorrhiziens à arbuscules**

Les champignons MA vivent en symbiose avec 80% des familles de plante, ainsi que la majorité des plantes cultivées, et appartiennent tous au phylum des Gloméromycètes. Ces champignons jouent un rôle important dans la santé des plantes, améliorant leur nutrition minérale, et augmentant leur résistance vis-à-vis des stress biotique ou abiotique. Ce sont des microorganismes ubiquistes, qui peuvent aussi être affectés par la présence de polluants dans les sols (Leyval, Singh and Joner, 1995, Weissenhorn and Leyval, 1996). Pour ces raisons, ils peuvent être considérés comme des bioindicateurs de qualité des sols (Gianinazzi et al, 2005). Un test de toxicité a été proposé et accepté par la commission de normalisation T95E de l'AFNOR et au niveau ISO. Le test consiste à placer 30 spores d'un champignon MA *Glomus mosseae* BEG12 entre deux membranes filtrantes quadrillées maintenues par un cadre de diapositive et placées entre deux couches de sol à tester dans une boîte de Pétri. Le sol est placé à 90% de la capacité de rétention en eau et est mis en incubation à 24°C pendant 14 jours. Après 14 jours, les « sandwich » de spores sont retirés des sols, placés pendant 15 minutes dans une solution de bleu trypan pour colorer les structures fongiques. Le pourcentage de spores germées est alors estimé sous la loupe binoculaire.

#### **- Pouvoir de colonisation racinaire par les champignons endomycorhizogènes. Test MPN.**

Un second test biologique (test MPN AFNOR X31-205-2), utilisant la mesure du pouvoir de colonisation racinaire d'une plante par les champignons MA, a été utilisé comme indicateur des effets secondaires de l'utilisation des produits phytosanitaires. Ce test permet de quantifier le nombre de propagules dans un échantillon de sol, une propagule étant une structure biologique (spore, fragment racinaire ou mycélien) pouvant coloniser une racine et permettant ainsi le développement du champignon. Il représente donc le potentiel de mycorrhization d'un sol déterminé. Le test consiste à réaliser des dilutions successives d'un sol et de déterminer le seuil de dilution en deçà duquel on n'observe plus la colonisation racinaire d'une plante piège, le poireau. (Sieverding, 1991).

#### **- Diversité des champignons MA. Approche moléculaire**

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Le **polymorphisme de séquence** de la grande sous-unité ribosomique a été utilisé pour évaluer la diversité des champignons MA présents dans les différents sols testés. En raison de la faible quantité de champignons MA présente dans ces sols, plusieurs amplifications successives ont dû être réalisées. Les diverses séquences obtenues ont été séquencées puis utilisées dans le cadre d'une analyse phylogénétique.

L'**analyse quantitative** des Gloméromycètes, ainsi que de *Glomus mosseae* et *G. claroideum/etunicatum*, a été réalisée par PCR quantitative.

### - Structure et abondance de la communauté microbienne intervenant dans la dégradation du protocatchuete

Le protocatchuete est un intermédiaire métabolique de la dégradation des composés phénoliques naturels (lignine,...) ou xénobiotiques (2,4-D,...). La structure cyclique de ce composé est rompue par une enzyme, la 3,4-protocatchuete dioxygénase (codée par les gènes *pcaH*). Ces gènes présentant un polymorphisme de séquences sont dispersés au sein de la microflore des sols. Ils codent pour des enzymes, des dioxygénases, intervenant dans la voie des  $\beta$ -cétodapates responsable de la dégradation de la matière organique des sols. Ils sont ainsi potentiellement de bons marqueurs fonctionnels du cycle du C dans le sol. La structure de la communauté microbienne intervenant dans la dégradation du protocatchuete a été évaluée par PCR-RFLP du gène *pcaH* (El Azhari *et al.* 2007) et son abondance par PCR quantitative ciblant ce gène (El Azhari *et al.* 2008).

### - Activité et abondance de la communauté microbienne nitrifiante

La nitrification réalisée par la microflore bactérienne est une étape clef du cycle de l'azote. L'oxydation de l'ammonium en nitrite, habituellement reconnue comme étant l'étape limitante de la nitrification (Philipps *et al.* 2000), est catalysée par l'ammonium monooxygénase (*amoA*). Différents travaux ont permis le développement d'outils moléculaires et biochimique permettant d'estimer la structure, la densité et l'activité des communautés microbiennes nitrifiantes (Kowalchuck et Stephen 2001). L'activité de la communauté nitrifiante a été évaluée par une mesure enzymatique selon la méthode décrite par Lensi *et al.* (1986). L'abondance de cette communauté a été mesurée par PCR quantitative ciblée sur le gène *amoA* selon la procédure décrite par Okano *et al.* (2004).

### - Abondance des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de composés xénobiotiques

Gène cible	Nom amorces	Séquence amorce (5'-3')	Composé cible	Fonction	Référence
<i>atzA</i>	<b>Couple 1 :</b>		Atrazine	Atrazine chlorohydrolase	(de Souza <i>et al.</i> , 1998)
	<i>atzA</i> ASoF	CCATGTGAACCAAGATCCT			
	<i>atzA</i> ASoR	TGAAGCGTCCACATTACC			
	<b>Couple 2 :</b>				
<i>atzA</i> -A1 F	ACGGGCGTCAATTCTATGAC	Atrazine	Hydroxyatrazine ethylaminohydrolase	(Devers <i>et al.</i> , 2004)	
<i>atzA</i> -A1 R	CACCCACCTCACCATAGACC				
<i>atzB</i> BSof	TCACCGGGGATGTCGCGGGC				
<i>atzB</i> BSOR	CTCTCCCGCATGGCATCGGG				
<i>atzB</i>	<i>atzB</i> B1 R	CACCACTGTGCTGTGGTAGA	Atrazine	Hydroxyatrazine ethylaminohydrolase	(Devers <i>et al.</i> , 2004)
	<i>atzB</i> B1 F	AGGGTGTGAGGTGGTGAAC			
	<i>mpd</i> F	GAATTCATATGCCCCGGAAGAAC			
<i>mpd</i> R	GAATTCTCGAGCTTGGGGTTGACGACCG				
<i>catA</i>	<i>catAF</i>	CCATTGAAGGGCCGCTCTATGT	Isoproturon, chlorotoluron, diuron, fluometuron	catechol 1,2-dioxygénase	(Sun <i>et al.</i> , 2009)
	<i>catAR</i>	ACCGAARTTGATGCGTSGTCA			
<i>tfdA</i>	GoF	AACGCAGCGRTRTCCCA	2,4 D	2,4-Dichlorophenoxyacetate monooxygénase	(Vieuble-Gonod <i>et al.</i> , 2006)
	GoR	ACGGAGTTCTGYGAYATG			
	HoF	ACGGAGTTCTGYGAYATG			
	HoR	AACGCAGCGRTRTCCCA			
<i>ndoB</i>	<b>Couple 1 :</b>		hydrocarbures polyaromatiques	naphthalene 1,2-dioxygénase	(Bordenave <i>et al.</i> , 2008)
	FRT5A	TYRARGCYAACTGGAA			
	FRT4B	GWHDYGYTCCATRTGTGTC			
	<b>Couple 2 :</b>				
	FRT6A	TACCACGTBGGTTGGAC			

Il est avéré que différentes espèces microbiennes présentes dans les sols possèdent la capacité de dégrader de nombreux pesticides. C'est le cas de l'atrazine (de Souza *et al.*, 1995; Topp *et al.*, 2000), du diuron (Cullington and Walker, 1999), du 2,4-D (Streber *et al.*, 1987), etc... Ces capacités de transformations peuvent être affectées en raison de l'effet délétère lié à la présence d'autres produits phytosanitaires. L'évaluation de la dynamique de ces communautés microbiennes dégradantes peut donc permettre de juger de l'impact d'un traitement phytosanitaire. Cette dynamique peut être approchée par la détermination du nombre de copies de gènes impliqués dans la dégradation des pesticides. Cette détermination peut être réalisée par PCR quantitative. Le travail engagé dans le cadre de ce contrat a consisté en une étude prospective visant à étudier les possibilités de détection par PCR classique d'un certain nombre de gènes intervenant dans la dégradation de composés naturels et xénobiotiques. Différents couples d'amorces ont été testés (voir tableau ci-dessus).

Afin d'obtenir des produits d'amplification purs, deux amplifications successives ont été réalisées. Les produits obtenus après amplification ont été séquencés afin de confirmer la pertinence des amorces utilisées.

#### - **Abondance et activité des communautés microbiennes impliquées dans la minéralisation du soufre organique**

Dans le sol le soufre est essentiellement (> 95 %) présent sous forme organique (Tabatabai, 1984). L'utilisation de ce S organique par la microflore requiert la synthèse d'enzymes appartenant à la famille des sulfatases. Les sulfatases sont susceptibles de catalyser l'hydrolyse d'une large gamme d'esters de sulfate aromatiques ou aliphatiques. Parmi elles, l'activité arylsulfatase (ARS), largement représentée dans les sols, catalyse l'hydrolyse des esters de sulfate en clivant la liaison O-S et permet la formation de sulfates. L'activité ARS est couramment utilisée comme indicateur de la qualité des sols (Bandick et Dick, 1999 ; Ndiaye *et al.* 2000 ; De la Paz Jimenez *et al.* 2002).

La **taille** de la communauté bactérienne cultivable manifestant l'activité ARS a été estimée par étalement d'une suspension de sol sur un milieu de culture semi-sélectif : le milieu M9-Xsulf, où la seule source de soufre est un ester de sulfate lié à un chromogène (Cregut *et al.* 2009). Après 21 jours d'incubation, le nombre de bactéries possédant l'activité ARS est exprimé en log CFU g<sup>-1</sup> de sol sec.

L'**activité ARS** totale potentielle (extracellulaire et intracellulaire) est déterminée d'après la méthode de Tabatabai et Bremner (1970).

Deux **couples d'amorces** ont été utilisés afin de détecter la structure de la communauté bactérienne possédant l'activité ARS et analyser l'impact d'un mélange de produits phytosanitaires sur la structure de cette communauté.

### **3. Résultats majeurs**

#### **3.1. Etude « doses-réponses »**

##### - Analyse de la **diversité métabolique**

Seuls les indices de distance généralisée indiquent une différence significative entre traitements (P<0.001). Il y a une différence significative entre les échantillons non traités et traités à la dose 2,5X et les échantillons traités à des doses plus élevées.

##### - Détermination de la **densité cellulaire des bactéries vivantes**

La détermination de la densité cellulaire des bactéries vivantes ne révèle aucun effet statistiquement significatif du cocktail de pesticides sur la viabilité des cellules (P=0,390).

##### - Mesure de l'**activité déshydrogénase**

Concernant l'activité déshydrogénase, la tendance à une diminution des temps critiques, associés à une activité déshydrogénase plus élevée, variant de 446 h pour le témoin non traité à 377 h pour le traitement 40X n'a pas de signification statistique (P=0.221).

Ainsi, à l'exception de la caractérisation de la diversité fonctionnelle qui semblerait indiquer un effet significatif du cocktail de pesticides qui se stabiliserait au delà de la dose 2.5X, aucun autre bioindicateur de niveau global n'est en mesure de confirmer ces effets.

##### - Test de **germination des spores** des champignons mycorhiziens à arbuscules



## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Les résultats montrent un pourcentage de germination élevé des spores dans le sol témoin et dans le sol de Martincourt sans apport de pesticides. Une tendance à la diminution de la germination avec l'augmentation de la dose de pesticides est observée, et une plus grande variabilité à la dose 20x, mais cet effet est faible et le pourcentage de germination reste élevé.

Cette absence d'effet des pesticides pourrait être liée aux composés utilisés. Il semblerait cependant que l'effet des pesticides sur les champignons MA et sur la colonisation mycorhizienne varie avec les pesticides employés et les plantes associées (Abd-Alla *et al.* 2000).

*En conclusion, le cocktail de pesticides apporté à cette dose ne montre pas d'effet significatif sur la germination des spores de champignons MA, mais seulement une tendance à la diminution. Cet essai ne renseigne que sur la première étape de la mycorhization, la germination des spores, qui doit conduire à la colonisation racinaire. Il faudrait donc suivre en complément la colonisation racinaire.*

### - Analyse par PCR quantitative de la **quantité de Glomérormycètes**

L'analyse par PCR quantitative de la quantité de Glomérormycètes et de *G. mosseae* a permis d'observer une diminution de l'ensemble des Glomérormycètes 3 jours après l'apport de la dose 20x, mais cet effet n'est pas confirmé après 30 jours, en raison de la grande variabilité expérimentale. A l'exception de ce point, nous n'observons pas de différence statistiquement significative par l'apport du cocktail de produits phytosanitaires sur les Glomérormycètes. Pour *G. mosseae*, nous n'avons pas non plus observé d'effet statistiquement significatif.

*Ce résultat pourrait être lié à la très faible teneur en champignons MA dans le sols de Bordeaux qui n'a pas facilité leur détection ainsi que la mise en évidence d'un impact éventuel lié à l'apport de pesticides.*

### - Analyse de l'**abondance de la communauté pca**

Trois jours après l'apport du cocktail l'abondance spécifique de la communauté *pcaH* dans le sol de bordeaux diminue en fonction de la dose apportée ( $P < 0.05$ ). Cet effet n'est plus observé après 30 jours d'incubation. A contrario, dans le sol de Martincourt, l'abondance spécifique de la communauté *pca* ne semble pas affectée par le cocktail de pesticides.

*La réponse de ce marqueur fonctionnel semble peu sensible étant donné qu'il réagit aux doses les plus importantes ( $\times 10$  et  $\times 20$ ). Toutefois, il est probable que la réponse de ce marqueur puisse être améliorée par la définition d'amorces taxon spécifique susceptibles de décrire plus finement l'abondance des différentes populations constituant cette communauté microbienne fonctionnelle.*

### - Taille de la **communauté bactérienne cultivable fonctionnelle** associée à l'**activité ARS**

La taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable associée à l'activité ARS est modifiée en fonction de la dose de produits phytosanitaires. Cependant la réponse diffère en fonction du type de sol : stimulation significative aux doses les plus fortes (10 et 20X) dans le sol de Martincourt et diminution significative dans le sol de Bordeaux.

### - Détermination de l'**activité Arylsulfatase**

L'activité ARS demeure stable et aucun « effet dose » des produits phytosanitaires apportés n'est noté, quelque soit la dose apportée. Seul l'effet « type de sol » est significatif avec une activité la plus élevée dans le cas du sol de Martincourt et plus faible dans le cas du sol de Bordeaux.

## **3.2. Etude pre-homologation au laboratoire**

### - Analyse de la **diversité métabolique**

Si 3 jours après traitement aucun effet statistiquement significatif des traitements pesticides ou de l'influence résiduelle du mode de désherbage n'a pu être mis en évidence sur la diversité métabolique, 30 jours après traitement, les échantillons non traités ( $H=3.29$ ) ont mieux résisté à l'érosion de la diversité que les échantillons traités ( $H=3.25$ ). La différence observée est statistiquement significative ( $P=0.043$ ). Par ailleurs, la valeur de la probabilité associée à l'effet du mode de conduite ( $P=0.122$ ) indique une tendance qui tendrait à associer aux traitements "enherbé" et "désherbage chimique" ( $H=3.28$ ) une diversité métabolique supérieure à celle associée au désherbage mécanique ( $H=3.25$ ).

### - Mesure de la **concentration en cellules bactériennes vivantes**

Aucun effet du traitement pesticide ou de la technique de désherbage n'a pu être mis en évidence

### - Mesure de l'**activité déshydrogénase**

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Trois jours après l'apport du cocktail de pesticides aux mésocosmes contenant les sols de Bordeaux, la probabilité ( $P=0.067$ ) associée à l'augmentation de l'activité déshydrogénase dans les sols traités est très proche du niveau de signification statistique. Au contraire, la probabilité ( $P=0.545$ ) associée à l'effet du mode de conduite du désherbage, indique bien que les effets observés initialement ont disparu. Cet effet est le résultat d'un découplage entre le transfert électronique et la production d'énergie au niveau des chaînes respiratoires (Rouard *et al.* 1996; Lors *et al.* 2006; Anderson, 2003). Cet effet persiste au cours du temps ( $P=0.042$ ).

En conclusion, c'est, avec la diversité métabolique, le seul bioindicateur abordé à un niveau global qui permette de mettre en évidence un effet lié à la présence de pesticides. Ce résultat est encourageant. Mais, il s'agit ici d'une première observation obtenue avec un bioindicateur en cours de développement. En particulier, lors de l'étude "Doses – réponses", cet effet n'avait pas été observé. Cette étude avait été réalisée avec un sol frais. On peut penser que la période de pré-incubation des sols avant traitement des mésocosmes a contribué à fragiliser la microflore des sols et à la rendre réactive à la présence des pesticides.

### - Etude de la **structure des communautés bactériennes totales**

L'ACP réalisée sur les données T-RFLP obtenues pour l'ensemble des sols de l'expérimentation aux trois temps de prélèvement indique que la structure des communautés bactériennes est propre à chacun des sols. Cette analyse a montré globalement que les communautés bactériennes que nous étions capables de cibler par cette technique n'apparaissent être que peu éprouvées par le traitement pesticides. La communauté la plus réactive serait la communauté du sol de Bordeaux qui avait subi antérieurement des traitements herbicides au glyphosate (modalité Bordeaux 3). Dans ce cas, la communauté bactérienne semble plus apte à une prompt résilience même si l'impact du traitement apparaît minime. On peut penser que la période de pré-incubation de 4 semaines a été suffisante pour assurer une certaine stabilisation de la structure des communautés microbiennes du sol.

### - Test de **germination des spores des champignons mycorhiziens à arbuscules**

Les incubations en mésocosmes avec apport de pesticides montrent des résultats différents vis à vis de la germination des spores de champignons mycorhiziens selon les sols. Ainsi, pour quatre des sols testés, le pourcentage de germination des spores n'est pas différent entre les échantillons prélevés juste après apport de pesticides et ceux prélevés un mois après, alors que les pesticides n'étaient plus détectables. Pour les sols de Pau et Bordeaux 2, en revanche, les valeurs diffèrent entre les deux prélèvements. Par ailleurs, le taux de germination des spores est plus faible dans les sols de Bordeaux que les autres, ce qui pourrait être lié aux caractéristiques physicochimiques de ces sols.

### - Calcul du **pouvoir mycorhizogène** des sols

La quantité de champignons endomycorhizogènes dans les sols, généralement inférieures à 100 propagules/kg de sol, à l'exception du sol enherbé de Bordeaux pour lequel un nombre de propagules plus important (700 propagule/kg) est extrêmement faible. Pour ce dernier sol, une tendance, statistiquement non significative, de réduction du nombre de propagules est observée 30 jours après l'apport des produits phytosanitaires.

### - Analyse moléculaire de la **diversité des champignons endomycorhizogènes**

Une analyse phylogénétique des champignons MA présents dans les sols de Martincourt et de Bordeaux 1 et 2 a permis d'obtenir au total 9 ribotypes. Le sol de Martincourt a une diversité moindre que celle des deux sols de Bordeaux, qui diffèrent dans la distribution des ribotypes présents.

### - Analyse **quantitative des Gloméromycètes**

L'analyse quantitative des Gloméromycètes et *G. mosseae* du sol de Martincourt révèle une réduction de près de 50% 3 jours après l'apport du cocktail pesticide. Cet effet a disparu après 30 jours. Cet effet n'a pas été confirmé sur les sols de Bordeaux en 2009.

### - Analyse de la **structure de la communauté microbienne pcaH**

L'analyse de la structure de la communauté pcaH responsable de la dégradation du protocatechuate, intermédiaire métabolique clef de la voie des  $\beta$ -cétoadipates, montre que :

- les propriétés physicochimiques des sols l'influencent grandement

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- le traitement du sol par le cocktail de pesticides peu l'influencer selon le type de sol et en interaction avec le mode de désherbage pratiqué sur la parcelle.

### - Analyse de l'**abondance de la communauté microbienne *pcaH***

La communauté *pcaH* est détectée dans les différents sols dans des gammes allant de  $10^4$  à  $10^5$  copies  $g^{-1}$  de sol. L'abondance spécifique de cette communauté fonctionnelle n'est pas affectée par l'apport des pesticides. Pour un des sols, celui de Bordeaux, l'abondance spécifique de la communauté évolue différemment selon le mode d'entretien du sol suite à l'ajout du cocktail. Globalement, il est probable que la communauté *pca* des bactéries chez lesquelles cette fonction est présente est peu sensible, en termes d'abondance, à des pressions externes au milieu. Elle semble davantage liée à des paramètres constitutifs tels que, par exemple, la teneur en matière organique labile des sols. Dans ce cas, cette communauté fonctionnelle garderait une abondance spécifique relativement stable mais varierait dans sa composition comme en atteste l'analyse de la structure de ces communautés.

### - Analyse de l'**activité nitrifiante**

L'activité nitrifiante varie selon les sols. Suite à l'ajout du cocktail de pesticides, l'activité nitrifiante des sols de Bordeaux 2, Epoisses et Pau tend à diminuer au cours de l'incubation, cette tendance n'étant pas statistiquement significative.

### - Analyse de l'**abondance de la communauté nitrifiante**

Suite au traitement du sol avec le cocktail de pesticides, l'abondance spécifique du gène *amoA* bactérien, détecté à des niveaux de  $9 \times 10^3$  à  $5 \times 10^4$  copies par ng d'ADN de sol, reste stable quel que soit le sol considéré.

Pour conclure, le traitement du sol par le cocktail de pesticides n'affecte ni l'activité potentielle ni l'abondance spécifique de la communauté nitrifiante. Ces deux marqueurs varient sensiblement en fonction des paramètres physicochimiques du sol, la plus faible activité potentielle et la plus basse abondance spécifique de la communauté *amoA* étant détectées dans les sols sableux de Pau et Bordeaux. Comme nous l'avons suggéré pour la communauté fonctionnelle *pcaH*, il est probable que la redondance fonctionnelle de la communauté nitrifiante masque pour partie des changements possibles de sa composition suite au traitement du sol par le cocktail de pesticides.

### - Recherche de **gènes impliqués dans la dégradation de pesticides**

Nous avons pu obtenir un produit d'amplification pour la plupart des gènes ciblés à l'exception des gènes *mpd* (dégradation du méthyl parathion) et le gène *tfdA* (dégradation du 2,4-D) (voir tableau). Pour le gène *cat*, les amorces utilisées manquent probablement de spécificité, les séquences obtenues par amplification n'ayant montré aucune similarité avec les séquences déjà répertoriées. Nous avons pu montrer que le sol de Bordeaux comportait des gènes impliqués dans la dégradation de xénobiotiques.

Cible	PCR directe	PCR nichée	Conformité
<i>AtzA</i>	-	+	+
<i>AtzB</i>	-	+	Non éprouvée
<i>mpd</i>	-	-	/
<i>Cat</i>	-	+(multibandes)	-
<i>TfdA</i> (Go et Ho)	-	-	/
<i>ndoB</i>	-	+	+

### - **Taille** de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle **ARS**

La taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable ne demeure pas stable au cours du temps et il semble qu'elle réponde à l'apport de produits phytosanitaires. Cet apport semble stimuler la taille laissant penser à une utilisation par la microflore du mélange de pesticides comme substrat. En outre, l'effet « type de sol » est également significatif avec une taille de la communauté bactérienne fonctionnelle la plus élevée dans le cas du sol d'Epoisses et la plus faible dans le cas du sol de Pau. Pour le sol de Bordeaux, aucune influence des pratiques de désherbage n'est mise en évidence.

### - Mesure de l'**activité Arylsulfatase**

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

L'activité ARS demeure stable au cours du temps et aucun effet de l'apport de produits phytosanitaires n'est noté. Seul l'effet « type de sol » est significatif avec une activité la plus élevée dans le cas du sol de Martincourt et la plus faible dans le cas du sol de Bordeaux. Pour ce dernier cas, aucune influence des pratiques de désherbage n'est mise en évidence.

### - Amplification du **gène codant l'arylsulfatase**

Des essais d'amplification menés sur le sol d'Epoisses à t0, t3 et t30 jours ont permis de mettre en évidence un fragment à la taille attendue. Ce fragment a été cloné et envoyé au séquençage de façon à s'assurer qu'il s'agit bien d'une séquence affiliée au gène codant l'ARS.

### **3.3. Etude post-homologation**

#### - Détermination de la **biomasse microbienne**

L'analyse statistique de la teneur en biomasse microbienne du sol tout au long des 2 années d'essai ne montre pas de différences significatives entre les biomasses microbiennes des modalités traitées avec les pesticides (p) et de leurs homologues non traitées (t). De même, si un effet stimulant de l'enherbement est observée sur les valeurs moyennes de la biomasse microbienne, les analyses statistiques ne mettent pas en évidence un effet significatif au seuil de 5%.

#### - Dosage des activités **FDA hydrolases**

On n'observe pas de différences significatives entre les activités FDA hydrolases ni entre modalités de traitement avec le cocktail pesticide ni entre les modalités d'entretien du sol. Seul un effet significatif « date de prélèvement » apparaît, en liaison avec les conditions climatiques

#### - Mesure des **activités respiratoires**

On n'observe pas de différences significatives entre la respiration des modalités traitées et non traitées (t). Les activités respiratoires plus élevées observées dans la modalité « enherbement » représentent une tendance qui n'est pas confirmée par analyse statistique, sauf à deux dates.

#### - Mesures des **activités potentielles de minéralisation de l'azote.**

Quelle que soit la date du prélèvement, on n'observe pas de différences significatives entre les potentiels de minéralisation de l'azote des modalités traitées et non traitées, ainsi qu'entre modalités d'entretien des sols et dates de prélèvement.

Ainsi, les outils analytiques de "référence" utilisés n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du cocktail de pesticides sur la quantité de biomasse microbienne ou de ses activités, ni un effet du mode d'entretien des sols, même si des tendances positives de l'enherbement se dessinaient.

#### - Analyse de la **diversité biochimique**

Avant traitement, l'analyse des indices de Shannon permettent de mettre en évidence des différences significatives ( $P=0,028$ ) entre sols enherbés et sols désherbés chimiquement ou mécaniquement. Trois jours après application des pesticides, cette différence initiale a été partiellement comblée. Cependant, la valeur de la probabilité associée à l'effet du mode de conduite ( $P=0,072$ ) indique une tendance qui tendraient à associer aux traitements "enherbé" et "désherbage chimique" une diversité métabolique supérieure au désherbage mécanique. Trente jours après application des pesticides sur la parcelle expérimentale, alors que les traitements pesticide restent sans effet, il est à possible de mettre en évidence les différences significatives ( $P=0,008$ ) au niveau de la diversité biochimique des communautés microbiennes lié au mode de désherbage.

#### - Analyse de la **concentration cellulaire bactérienne vivante**

Que ce soit 3 jours ou 30 jours après l'application des pesticides, aucune différence n'apparaît entre les échantillons traités ou non traités ainsi qu'entre les sols soumis à différents modes d'entretien.

#### - Détermination de l'**activité déshydrogénase**

Avant apport des pesticides, l'activité déshydrogénase tend à être supérieure dans les échantillons de sol prélevés dans les parcelles enherbées. Il s'agit d'une tendance qui n'est pas totalement confirmée par ANOVA, la probabilité associée étant de 0.08. Cette tendance ne se manifeste plus 3 jours ou 30 jours après apport des pesticides

#### - Analyse de l'**abondance de la communauté pca**

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Comme précédemment, l'abondance de la communauté *pca* varie de  $2 \times 10^4$  à  $9 \times 10^4$  copies de *pcaH* par g de sol. L'abondance de ce gène est statistiquement plus élevée dans le sol des parcelles désherbées mécaniquement comparé à un désherbage chimique ou à l'enherbement.

Rapportée au nombre de gènes codant pour les ARNr 16S, donc relativement à l'abondance de la communauté bactérienne globale, il n'y a plus de différence liée au mode d'entretien des sols. Toutefois, l'abondance spécifique *pca* est réduite significativement dans les sols désherbés par voie chimique comparé aux deux autres modes de d'entretien des sols.

### 4. Conclusion

Au regard des résultats présentés, on peut dire que globalement, en utilisant un ensemble de bioindicateurs pris à différents niveaux d'organisation biologique, l'impact du cocktail de pesticides (folpel, déltaméthrine et fenhexamide) sur la microflore de différents sols reste toujours très limité, souvent à la limite de la signification statistique, voire nul.

Ainsi, parmi les différents bioindicateurs globaux de référence (biomasse microbienne, activité FDA hydrolase, activité respiratoire, azote potentiellement minéralisable) ou en développement (concentration en cellules bactériennes vivantes, activité déshydrogénase, diversité biochimique et structure spécifique), seules la diversité biochimique ainsi que dans certains cas, l'activité déshydrogénase sont les seuls indicateurs qui permettent de mettre en évidence un effet lié à la présence de pesticides ainsi, d'ailleurs, qu'au mode d'entretien du sol.

Concernant les champignons mycorrhizogènes à arbuscules (MA), seuls les deux tests de germination des spores et de mesure du pouvoir de colonisation se sont avérés positifs, bien que statistiquement non significatifs.

L'analyse de l'impact écotoxicologique des pesticides testés sur la structure, l'abondance et la diversité de communautés fonctionnelles des sols impliquées dans le cycle du carbone (communauté *pca*) et de l'azote (communauté *amoA*) a montré que globalement ces marqueurs étaient peu affectés par l'application du cocktail.

Il ressort de nos expérimentations que l'apport de produits phytosanitaires n'a aucun impact sur l'activité arylsulfatase potentielle totale quels que soient le type de sol utilisé, la dose considérée (y compris jusqu'à à 20 fois la dose agronomique) et le temps d'incubation.

Au-delà du manque de sensibilité apparent des différents bioindicateurs, les conditions dans lesquelles ils ont été testés ne sont pas optimales. En particulier, les caractéristiques des produits phytosanitaires choisis, Koc élevés à très élevés (deltaméthrine et folpel), volatilité importante (folpel) et demi-vie très courte (fenhexamide), contribuent probablement à limiter leurs effets sur les organismes vivants.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABD-ALLA MH, Omar SH, Karanxha S., 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology*, 14, 191-200.
- ANDERSON T.-H. 2003. "Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98(1-3): 285-293.
- AVANISS-AGHAJANI E., JONES K., CHAPMAN D. ET BRUNK C., (1994) A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17, 144-149.
- BANDICK A.K., DICK R.P. (1999) Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry*. 31:1471-1479.
- BENDING, G.D., M.K. TURNER, F. RAYNS, M.-C. MARX, AND M. WOOD. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1785-1792.
- CATROUX, G., CHAUSSOD R. ET NICOLARDOT B. – 1987 – Appréciation de la fourniture d'azote par le sol – C.R. Acad. Agric. Fr. – 73(3) : 71-79
- CHAUSSOD R., BREUIL M.C., NOUAIM R., LEVEQUE J., ANDREUX F. – 1999 – La fertilité des sols viticoles : les indicateurs microbiologiques – In 12<sup>ème</sup> colloque Viticole et Œnologique, Cahier Technique 1999, ITV France, Paris, p 15-22
- CRECCHIO, C., A. GELSOMINO, R. AMBROSOLI, J.L. MINATI, AND P. RUGGIERO. 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1873-1883.
- CREGUT M., PIUTTI S., SLEZACK-DESCHAUMES S., VONG P.C., CROVISIER I., BENIZRI E. (2009) Density, structure and diversity of the arylsulfatase bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. *Soil Biology & Biochemistry*: 41, 704-710.
- CULLINGTON, J.E., AND WALKER, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 677-686.
- DAVET P. (1996). Vie microbienne des sols et production végétale. INRA Editions, 383 pp.
- DE LA PAZ JIMENEZ M., DE LA HORA A.M., PRUZZO L., PALMA R.M. (2002) Soil quality : a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology Fertility Soils*. 35 :302-306.
- DE SOUZA, M., WACKETT, L., BOUNDY-MILLS, K., MANDELBAUM, R., AND SADOWSKY, M. (1995). Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3373-3378.
- DICK R. P., (1994) Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In "Defining Soil Quality for a Sustainable Environment". Doran J. W., Coleman D. C., Bezdicek D. F., Stewart B. A. eds; pp 107-124. Soil Scienc Society of America special publication, N° 35; American Society of Agronomy, Inc; Madison, Wisconsin USA.
- EL AZHARI N., CHABAUD S., BRU D. AND MARTIN-LAURENT F. (2007) *pcaH* a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil environment. *Pest Management Science*.63: 459-467.
- EL AZHARI, N; BRU, D; SARR, A, MARTIN-LAURENT F. 2008. Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. *European Journal of Soil Science* 59: 665-673
- EL FANTROUSSI, S., L. VERSCHUERE, W. VERSTRAETE, AND E.M. TOP. 1999. Effect of Phenylurea Herbicides on Soil Microbial Communities Estimated by Analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and Community-Level Physiological Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:982-988.

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- GARLAND, J.L., AND A.L. MILLS. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2351-2359.
- GIANINAZZI S., PLUMEY-JACQUOT E., GIANINAZZI-PEARSON V., LEYVAL C., 2005. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality and terrestrial ecotoxicology. In: *Microbiological Methodes for Assessing Soil Quality* Bloem J., Hopkins D.W., Benedetti A. (eds). CABI Publishing, Wallingford, UK, 248-256.
- GRIFFITHS, B., S. CAUL, J. THOMPSON, C. HACKETT, J. CORTET, C. PERNIN, AND P. KROGH. 2008. Soil microbial and faunal responses to herbicide tolerant maize and herbicide in two soils. *Plant and Soil* 308:93-103.
- LENSI R., MAZURIER S., GOURBIÈRE F. AND JOSSE RAND A. 1986. Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biology and Biochemistry* 2: 239-240.
- LEYVAL C, SINGH B R, JONER E J. (1995). Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water, Air, & Soil Pollution* 84, 203-216.
- LORS, C., B. LAGACHERIE, C. CHABANET, AND G. SOULAS. 2005. DNOC, a model pollutant, adversely affects the potential of soil microbial communities to mineralise the herbicide 2,4-D: an investigation using micro-sampling procedures. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1023-1032.
- MOYER C. L., DOBBS F. C. AND KARL D. M., (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active hydrothermal vent system, Loihi Seamount Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2501-2507.
- MUYZER G., WAAL E. C., AND UITTERLINDEN A. G., (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- NDIAYE E.L., SANDENO J.M., MCGRATH D., DICK R.P. (2000) Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal Altern Agric.* 15: 26-36.
- NORTCLIFF S., (2002). "Standardisation of soil quality attributes." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 88(2): 161-168.
- OKANO Y., HRISTOVA H. R., LEUTENEGGER C. M., JACKSON L. E., DENISON R. F., GEBREYESUS B., LEBAUER D. AND SCOW K. M., (2004) Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1008-1016.
- PASCAUD, A., S. AMELLAL, M.-L. SOULAS, AND G. SOULAS. 2009. A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. *Journal of Microbiological Methods* 76:81-87.
- ROPER M.M., OPHEL-KELLER K.M., (1997) Soil Microflora as bioindicators of soil health. In : *Biological Indicators of Soil Health* (eds CE Pankhurst, BM Doube and VVSR Gupta), pp : 157-177.
- ROSSEL D. AND TARRADELLAS J., (1991) Significance of soil deshydrogenase activity in ecotoxicological studies. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6, 17.
- ROUARD, N., M.-C. DICTOR, R. CHAUSSOD, AND G. SOULAS. 1996. Side-effects of herbicides on the size and activity of the soil microflora: DNOC as a test case. *European Journal of Soil Science* 47:557-566.
- SCHNÜRER J. AND T. ROSWALL - 1982 - Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter - *Appl. Env. Microb.* - 43: 1256-1261

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

SIEVERDING E. (1991). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. (Eschborn: Deutsch Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)).

STREBER, W.R., TIMMIS, K.N., AND ZENK, M.H. (1987). Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. J. Bacteriol. 169, 2950-2955.

TABATABAÏ M.A., (1984) Importance of sulphur in crop production. *Biogeochemistry*. 1: 45-62

TABATABAI M.A., BREMNER J.M. (1970) Arylsulfatase activity in soils. *In: Soil Soc.Amer. Proc.* 34: 225-229.

TOPP, E., MULBRY, W.M., ZHU, H., NOUR, S.M., AND CUPPELS, D. (2000). Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3134-3141.

WEISSENHORN I, LEYVAL C. (1996). Spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi in soils differing in heavy metal content and other parameters. *Eur. J. Soil Biol.* 32, 165-172.



## En français

---

### CONTEXTE GENERAL

#### *Quelle situation, quels enjeux motivent ce projet ?*

Les micro-organismes du sol assurent un ensemble de transformations essentielles au déroulement des grands cycles biogéochimiques, notamment ceux du carbone, de l'azote (recyclage de la matière organique, fixation symbiotique de l'azote, nitrification, ...) et du soufre. Du bon déroulement de ces transformations dépend la fertilité des sols. Les micro-organismes du sol sont par ailleurs des agents d'épuration vis-à-vis de composés (xénobiotiques, hydrocarbures, ...) dont le sol est un lieu de passage obligé et dont la présence est une menace pour les espèces dont le sol est l'habitat naturel et les fonctions qu'elles y assurent. Il est maintenant bien connu que de nombreux produits phytosanitaires peuvent se révéler délétères, par exemple, pour les champignons mycorhizogènes à arbuscules (MA) dont le rôle dans l'alimentation phosphorée des plantes, dans la structure des sols et dans leur capacité de rétention en eau est important. Il en est de même pour des bactéries telles que les *Rhizobium*, seuls organismes capables de fixer l'azote atmosphérique lorsqu'ils vivent en association symbiotique sur les racines des Légumineuses. La nitrification, indispensable à la nutrition azotée des plantes, peut également être perturbée par certains pesticides. L'utilisation des pesticides peut aussi s'accompagner du développement de certaines maladies des plantes, suite à des modifications d'équilibres microbiens (Davet, 1996). En résumé, les micro-organismes sont des acteurs essentiels et irremplaçables du fonctionnement des milieux terrestres et de la durabilité des agrosystèmes. Il est important de se préoccuper de la protection de ce patrimoine biologique non renouvelable.

Considérée sous un angle plus opérationnel, la réactivité des micro-organismes du sol à la présence de polluants peut être mise à profit pour caractériser l'état de viabilité des sols. Les micro-organismes apparaissent ainsi comme des bioindicateurs potentiels de la qualité des sols et des instruments d'évaluation du risque lié à l'utilisation des pesticides.

### OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

C'est cette hypothèse que nous avons tenté de vérifier dans ce travail qui s'organise autour de deux axes :

- Le premier, le plus prospectif, vise à tester la valeur, en tant que bioindicateur, de communautés ou populations microbiennes du sol assurant différentes étapes-clé des cycles géochimiques du C, de l'N, du S et du P pour lesquelles les gènes ont été identifiés. Nous avons ainsi ciblé et suivi l'évolution quantitative de ces gènes sensée représenter celle des espèces microbiennes qui les possèdent. Des tests d'activité potentielle ont également été mis au point et utilisés en complément ou en substitution des essais génétiques précédents. Les objectifs étaient de développer de nouveaux outils venant renforcer l'arsenal réglementaire actuel.

- Le second axe thématique s'inscrit dans une démarche à vocation plus opérationnelle. Il vise à proposer un ensemble intégré de mesures de différents paramètres de taille, d'activité et de diversité des communautés microbiennes des sols conçu pour répondre à des critères techniques et économiques relatifs à des analyses de routine. Ces analyses devraient venir compléter la batterie de tests de "référence" mis en œuvre par un professionnel de l'analyse.

### QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

#### 1. Les démarches expérimentales et les produits utilisés

Nous avons basé notre démarche sur des études de laboratoire et des études de plein champ.

Au laboratoire nous avons développé :

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- une approche basée sur un test **écotoxicologique** classique consistant à étudier les courbes de réponse des bioindicateurs microbiens sélectionnés en fonction de la dose d'application d'un cocktail de pesticides utilisés en viticulture afin de déterminer la dose correspondant à la réduction de 50% de l'activité ou de la population concernée (Dose Létale 50 ou DL50).

- une approche, dite de **pré-homologation**, visant à étudier les modifications éventuelles de différents bioindicateurs microbiens, pris aux stades « recherche » ou « développement », sélectionnés pour représenter différents niveaux d'organisation biologique. Ces indicateurs ont été mis en œuvre sur des sols conservés en microcosmes au laboratoire avec ou sans traitement par le cocktail de pesticides utilisés en viticulture à la dose agronomique. Un ensemble de sols « représentatifs » des sols français ont été utilisés pour cette étude dont l'objectif était de développer des essais biologiques utilisables dans le cadre d'une procédure d'homologation.

- En parallèle, sur un dispositif expérimental de plein champ (Montagne Saint Emilion) cultivé en vignes et comparant différentes pratiques d'entretien des sols (enherbement, désherbage mécanique ou chimique), nous avons suivi différents bioindicateurs microbiens après application du même cocktail de pesticides que celui utilisé au laboratoire. Pour des raisons évidentes d'opérationnalité, les indicateurs sélectionnés sont déjà en cours d'utilisation par les laboratoires d'analyse (référence) soit en cours de développement. Dans ce dernier cas, nous avons opté pour une approche analytique dite intégrée car nous permettant de réaliser l'ensemble des essais sur un échantillon unique. Il s'agit d'une étude telle qu'elle pourrait être pratiquée pour les besoins d'une surveillance en conditions naturelles en situation de **post-homologation**.

Le choix du cocktail de pesticides a été réalisé en fonction des pratiques phytosanitaires habituelles en viticulture. Les produits utilisés étaient **Teldor** 750g/ha (1.5 mg MA/200g sol eq sec, M.A. = **fenhexamide**), **Decis** 7.5g/ha (1.5µg MA/200g sol, M.A. = **deltaméthrine**), et **Acryptan** 1500g/ha (3 mg MA/200g sol, M.A. = **folpel**). Le cocktail a été appliqué directement sur le sol. Pour chaque placette, l'échantillon de sol prélevé était composé de 9 prélèvements (1 par « micro-placette ») réalisés à la tarière manuelle sur une profondeur de 15 cm, puis mélangés, homogénéisés et tamisés à 2 mm. Les prélèvements de sol en été réalisés en 2008 comme 2009 avant puis 3 jours et 30 jours après l'apport du cocktail

## 2. Les bioindicateurs sélectionnés

### 2.1. Bioindicateurs globaux

Il s'agit de caractéristiques de taille, d'activité ou de diversité qui ciblent l'ensemble de la communauté microbienne des sols ou des fonctions impliquant une large fraction de cette communauté.

Deux bioindicateurs sont basés sur des caractéristiques de taille :

- la **biomasse microbienne** mesurée selon une technique de fumigation-extraction qui consiste à tuer la microflore avec un fumigant toxique (chloroforme) et à extraire puis mesurer la quantité de carbone microbien libéré par la lyse cellulaire (Chaussod, 1999).

- la **concentration en cellules microbiennes vivantes**. Cette méthode (Pascaud *et al*, 2008) est basée sur la propriété de l'ADN cellulaire de fixer des intercalants fluorescents et, pour certains d'entre eux, sur des propriétés différentielle de perméabilité de la paroi cellulaire des cellules mortes et vivantes. On peut ainsi marquer différemment la microflore morte et vivante avec deux intercalants qui, fixés sur l'ADN, émettent dans le rouge pour les cellules mortes et dans le vert pour les cellules vivantes. L'émission de lumière est proportionnelle à la concentration cellulaire Cette technique cumule deux avantages : elle n'est pas sélective et, techniquement, elle peut facilement être mise en œuvre en routine.

Quatre bioindicateurs sont basés sur des caractéristiques d'activité :

- l'**activité respiratoire**. Elle consiste à mesurer la quantité de CO<sub>2</sub> issue de la minéralisation du carbone de la matière organique. La mesure est effectuée sur 4 semaines à 28°C (Catroux *et al*, 1987),

- l'**activité FDA hydrolase**. L'acétate de fluorescéine (FDA) peut être hydrolysé par de nombreuses enzymes (estérases, protéases et lipases), toutes intervenant dans la décomposition de la matière organique des sols (Schnürer and Rosswall 1982). Cette activité est par ailleurs étroitement liée à la

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

biomasse microbienne. Le test consiste à mesurer la fluorescence émise par la fluorescéine libérée lors de l'hydrolyse du FDA

- **l'activité déshydrogénase.** D'autres enzymes que celles qui interviennent dans l'activité FDA hydrolase interviennent également dans la minéralisation de la matière organique. Un intérêt particulier a été accordé aux déshydrogénases car il s'agit d'enzymes dont le fonctionnement n'est possible que dans une cellule microbienne. Cette activité cesse dès lors que les enzymes impliquées se retrouvent à l'état libre dans le sol (Rossel et Tarradellas, 1991). Pour réaliser le dosage, on stimule l'activité des déshydrogénases par un apport de substrat carboné et on associe à leur activité la transformation d'un composé incolore en un dérivé coloré. On mesure en continu pendant 16 heures le développement de la coloration. Le temps nécessaire pour atteindre un niveau donné arbitraire de coloration, appelé temps critique, est lié à l'activité déshydrogénase et permet de comparer cette activité dans différents échantillons de sol.

- **l'azote potentiellement minéralisable.** Dans les sols, l'azote existe essentiellement sous forme organique. La minéralisation de la matière organique s'accompagne de l'apparition de composés azotés minéraux, seuls utilisables par les organismes notamment végétaux. Le test consiste à mesurer la quantité de composés azotés minéraux formés sur une période de temps donnée (généralement 4 semaines) (Catroux *et al.*, 1987).

Enfin, nous avons sélectionné deux indicateurs pour caractériser la diversité microbienne.

- La caractérisation de la **diversité biochimique** est basée sur la capacité de la communauté microbienne des sols à utiliser comme substrats nutritifs un échantillonnage de composés carbonés. Plus cet échantillonnage est large, plus la diversité des espèces impliquées dans leur dégradation est importante. La consommation d'un substrat donné entraîne une activité déshydrogénase, avec, comme déjà indiqué, l'apparition d'une coloration. Le système que nous avons utilisé (BIOLOG<sup>®</sup>) contient 32 substrats carbonés différents distribués sur des plaques de microtitration. La diversité biochimique est liée au nombre de puits où une coloration se développe.

- La caractérisation de la **diversité spécifique.** Chaque espèce microbienne peut être repérée par des séquences d'ADN spécifiques. Ainsi, pour caractériser la richesse des sols en espèces microbiennes, on réalise une extraction de l'ADN des sols puis on amplifie sélectivement (par réaction en chaîne utilisant une polymérase ou PCR) l'ensemble des séquences caractéristiques des espèces microbiennes que l'on sépare ensuite par des techniques d'électrophorèse. Le repérage de ces séquences permet d'obtenir des profils de bandes analogues à des codes-barre dont la complexité est liée à la richesse en espèces microbiennes.

### 2.2. Bioindicateurs spécifiques

Il s'agit de tests qui ciblent plus particulièrement certains groupes microbiens fonctionnels qui interviennent dans les cycles du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre.

Concernant le **cycle du carbone** nous avons étudié :

- la **composition** et l'**abondance** de la communauté microbienne intervenant dans la dégradation du protocatéchuate. La matière organique des sols est constituée majoritairement de composés polyaromatiques résultant de la polymérisation de produits de transformation de la lignine d'origine végétale. La dégradation de la matière organique passe par une étape de dépolymérisation qui produit des intermédiaires phénoliques dont le protocatéchuate est un représentant important. Ce composé est ensuite dégradé par une enzyme (la 3,4-protocatéchuate dioxygénase) dont la production par les micro-organismes est sous la dépendance d'un gène connu (gène *pcaH*) dont la structure peut légèrement différer d'une souche microbienne à l'autre. L'identification des différentes formes de ce gène ainsi que la détermination du nombre de ses copies peuvent être utilisées pour caractériser la diversité génétique ainsi que la taille de la microflore dégradant le protocatéchuate..

- l'**abondance** des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de composés xénobiotiques. Par comparaison avec la communauté microbienne dégradant le protocatéchuate, probablement assez largement représentée dans le sol, les communautés microbiennes impliquées dans la transformation de composés xénobiotiques tels que les pesticides résultent probablement de l'association d'un nombre réduit d'espèces microbiennes auxquelles sont associées une faible redondance fonctionnelle et une sensibilité accrue aux stress. Certains des gènes intervenant dans la

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

dégradation de pesticides sont actuellement identifiés. C'est le cas de l'atrazine (gènes *atz*), de l'isoproturon et du diuron (gènes *cat*), du 2,4-D (gènes *tfd*), des organophosphorés (gènes *mpd*) et des hydrocarbures polycycliques aromatiques (gènes *ndo*). Comme dans le cas du protocatéchuate, le nombre de copies de ces gènes est un indicateur de la taille des communautés microbiennes dégradant ces différents composés xénobiotiques dont on peut ainsi suivre l'évolution suite à d'autres traitements pesticides.

Concernant le **cycle de l'azote** nous avons ciblé la transformation de l'ammonification en nitrite puis en nitrate. Cette étape de nitrification est réalisée par la microflore bactérienne. C'est une étape clef du cycle de l'azote qui contribue à fournir une forme d'azote utilisable par les plantes. La transformation de l'ammonium en nitrite, est habituellement reconnue comme l'étape limitante de la nitrification ; elle est contrôlée par le gène *amoA*.

- l'**activité** et l'**abondance** de la communauté microbienne nitrifiante ont été suivies. L'activité de la communauté nitrifiante a été évaluée par une mesure enzymatique selon la méthode décrite par Lensi *et al.* (1986). L'abondance de cette communauté a été évaluée par la mesure du nombre de copies du gène *amoA*.

Concernant le **cycle du phosphore**, quatre tests, dont deux sont déjà normalisés, ont été appliqués. Ils concernent les champignons mycorrhiziens à arbuscules (champignons MA) qui vivent en symbiose avec 80% des familles de plante, ainsi que la majorité des plantes cultivées. Ces champignons jouent un rôle important dans la santé des plantes, améliorant leur nutrition minérale, notamment en phosphore, et augmentant leur résistance vis-à-vis des stress biotiques ou abiotiques. Ces microorganismes ubiquistes peuvent aussi être affectés par la présence de polluants dans les sols.

- un test de **germination des spores des champignons mycorrhiziens à arbuscules** a été proposé et accepté par la commission de normalisation T95E de l'AFNOR et au niveau ISO. Le principe du test consiste à placer des spores d'un champignon MA (*Glomus mosseae* BEG12) au contact du sol à tester. Après incubation, les spores sont récupérées et le pourcentage de spores germées est estimé sous la loupe binoculaire.

- un test **MPN** pour caractériser le **pouvoir de colonisation racinaire** par les champignons endomycorhizogènes. Ce test (test AFNOR X31-205-2) utilise la mesure du pouvoir de colonisation racinaire d'une plante par les champignons MA comme indicateur des effets secondaires de l'utilisation des produits phytosanitaires. Ce test permet de quantifier le nombre de propagules dans un échantillon de sol, une propagule étant une structure biologique (spore, fragment racinaire ou mycélien) pouvant coloniser une racine et permettant ainsi le développement du champignon. Il représente donc le potentiel de mycorhization d'un sol déterminé. Le test consiste à réaliser des dilutions successives d'un sol et de déterminer le seuil de dilution en deçà duquel on n'observe plus la colonisation racinaire d'une plante piège, le poireau.

- un test de **diversité spécifique** des champignons MA. Le même type d'approche que pour les bactéries a été utilisée. On cible spécifiquement un gène ayant valeur phylogénétique. La structure de ce gène dépend de l'hôte fongique. Après extraction de l'ADN du sol, les différents variants de ce gène sont amplifiés, séparés et identifiés par des techniques d'électrophorèse. La détermination de leur structure permet ensuite de les classer en fonction de leur proximité phylogénétique.

- une **analyse quantitative de l'ensemble** des Gloméromycètes, ainsi que de *Glomus mosseae* et *G. claroideum/etunicatum*, en déterminant le nombre de copies de gènes spécifiques de ce groupe ou de ces espèces fongiques.

Enfin, nous nous sommes également intéressés au **cycle du soufre**. Dans le sol, le soufre est essentiellement (> 95 %) présent sous forme organique. L'utilisation de ce S organique par la microflore requiert la formation de sulfates. Parmi les différentes enzymes susceptibles de contribuer à cette formation, l'activité arylsulfatase (ARS) est largement représentée dans les sols. Cette activité ARS est couramment utilisée comme indicateur de la qualité des sols. Deux tests ont été utilisés en liaison avec cette activité :

- un test visant à déterminer la **taille** de la communauté bactérienne cultivable manifestant l'activité ARS : on étale une suspension de sol sur un milieu de culture semi-sélectif où la seule source de soufre est un ester de sulfate lié à un agent chromogène. La dégradation de l'ester entraîne la

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

coloration de la souche responsable, permettant ainsi de la repérer. Après une période d'incubation, on détermine Le nombre de bactéries possédant l'activité ARS.

- un test visant à déterminer l'**activité ARS totale potentielle** (extracellulaire et intracellulaire) est déterminée : on traite un échantillon de sol avec du p-nitrophénylsulfate de potassium. L'activité ARS libère dans la solution du sol du p-nitrophénol coloré. Après filtration de la solution du sol, la quantité de p-nitrophénol libérée, proportionnelle à l'ARS, est mesurée par colorimétrie.

- un troisième test visant à déterminer la structure de la communauté microbienne possédant l'activité ARS est en cours de développement. Ce test cible spécifiquement la famille des gènes impliqués dans l'activité ARS dont la séquence varie en fonction des hôtes microbiens. L'identification des différentes formes du gène donne une image de la structure de la communauté microbienne possédant l'activité ARS. Le travail a consisté à préparer les outils moléculaires (deux couples d'amorces pour amplification par PCR) nécessaires à cette caractérisation. Résultats obtenus

### 3. Résultats majeurs

#### 3.1. Etude « doses-réponses »

- Les indicateurs globaux mis en œuvre sont ceux de l'approche analytique intégrée réalisée sur la même suspension de sol témoin du dispositif de plein champ de Montagne Saint Emilion (sol de Bordeaux). Il s'agit de la **diversité métabolique / fonctionnelle**, de la **densité cellulaire des bactéries vivantes** et de l'**activité déshydrogénase**. A l'exception de la caractérisation de la diversité fonctionnelle qui indique un effet significatif du cocktail de pesticides qui se stabilise au delà de la dose 2.5X, les bioindicateur de taille et d'activité montrent une relative stabilité. Ainsi, concernant l'activité déshydrogénase, la tendance à une diminution des temps critiques, associés à une activité déshydrogénase plus élevée, variant de 446 h pour le témoin non traité à 377 h pour le traitement 40X n'a pas de signification statistique

- L'**abondance** spécifique de la communauté microbienne intervenant dans la dégradation du protocatéchate, étape-clé de la minéralisation de la matière organique, diminue significativement dans le sol de Bordeaux trois jours après l'apport du cocktail mais n'est plus observé 30 jours après. Dans le sol de Martincourt, l'abondance spécifique de la communauté dégradant le protocatéchate ne semble pas affectée par le cocktail de pesticides.

- Le test de **germination des spores** des champignons MA montre un pourcentage de germination élevé dans le sol de Martincourt sans apport de pesticides comme dans le sol témoin recommandé dans le test. Une tendance à la diminution de la germination avec l'augmentation de la dose de pesticides est observée, mais cet effet est faible et non significatif : le pourcentage de germination reste toujours élevé. Cet essai ne renseigne que sur la première étape de la mycorhization, la germination des spores. Il faudrait donc compléter ce test par un test de colonisation racinaire. La **quantité de Gloméromycètes** et de *G. mosseae* estimée par une technique de biologie moléculaire basée sur l'extraction de l'ADN du sol de Bordeaux a permis d'observer une diminution de l'ensemble des Gloméromycètes 3 jours après l'apport de la dose 20x, mais cet effet n'est pas confirmé après 30 jours, en raison de la grande variabilité expérimentale. A l'exception de ce point, nous n'observons pas de différence statistiquement significative par l'apport du cocktail de produits phytosanitaires, ni sur les Gloméromycètes ni sur *G. mosseae*. Ce résultat pourrait être lié à la très faible teneur en champignons MA du sol utilisé.

- Les résultats obtenus en ciblant la communauté microbienne associée à l'activité arylsulfatase sont plus ambigus. La **taille** de cette communauté bactérienne fonctionnelle, déterminée par une méthode culturale, est modifiée en fonction de la dose de produits phytosanitaires. Cependant la réponse diffère en fonction du type de sol : stimulation significative aux doses les plus fortes (10 et 20X) dans le sol de Martincourt et diminution significative dans le sol de Bordeaux. L'**activité arylsulfatase** demeure stable et aucun « effet dose » des produits phytosanitaires apportés n'est noté, quelque soit la dose apportée. Seul l'effet « type de sol » est significatif avec une activité plus élevée dans le cas du sol de Martincourt et plus faible dans le sol de Bordeaux.

#### 3.2. Etude pre-homologation au laboratoire

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- Des indicateurs globaux mis en oeuvre dans l'approche analytique intégrée pour caractériser les effets liés à l'apport du cocktail de pesticides ou du mode d'entretien du sol sur le dispositif de Bordeaux, deux se sont avérés pertinents. Ainsi, si 3 jours après traitement aucun effet statistiquement significatif des traitements pesticides ou du mode de désherbage n'a pu être mis en évidence sur la **diversité métabolique**, l'augmentation de l'**activité déshydrogénase** dans les sols traités est très proche du niveau de signification statistique. 30 jours après traitement, les échantillons non traités ont mieux résisté à l'érosion de la diversité que les échantillons traités. La différence observée dans les indices de diversité est statistiquement significative. Par contre, aucun effet du mode d'entretien du sol n'a été détecté. De même, aucun effet du traitement pesticide ou de la technique de désherbage n'a pu être mis en évidence par la mesure de la **concentration en cellules bactériennes vivantes**.

- L'étude de la **structure** des communautés bactériennes totales par une technique non culturale basée sur une analyse de l'ADN du sol montre globalement que les communautés bactériennes ne sont que peu éprouvées par le traitement pesticides. Cette structure est propre à chacun des sols.

- L'**abondance** de la communauté microbienne intervenant dans la dégradation du protocatéchine, estimée par le nombre de copies du gène *pcaH* variant de  $10^4$  à  $10^5$  copies  $g^{-1}$  de sol, n'est pas affectée par l'apport des pesticides. La **structure génétique** de cette communauté déduite de l'analyse des différents variants du gène *pcaH*, révèle essentiellement une influence du type de sol. Les effets différentiels du cocktail pesticide que l'on observe selon le type de sol et le mode de désherbage pour le sol de Bordeaux ne sont que des tendances non statistiquement significatives. Elles sembleraient cependant indiquer que l'ajustement de cette communauté microbienne à une perturbation chimique se ferait plus par une adaptation de sa composition que de sa taille.

- Une étape préalable à la détermination de l'**abondance** et de la **structure** des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation des pesticides sans passer par des techniques culturales souvent prises en défaut, consiste à choisir de bons gènes candidats et de définir les meilleures conditions pour en apprécier le nombre de copies. C'est cette phase du travail qui a été réalisée sur le sol de Bordeaux. Nous avons pu détecter deux gènes intervenant dans la dégradation de l'atrazine et un gène intervenant dans la dégradation des hydrocarbures polyaromatiques. Les essais n'ont pas abouti pour les gènes intervenant dans la dégradation du méthyl parathion et du 2,4-D. Enfin, plusieurs « gènes » intervenant dans la dégradation du catéchol ont été identifiés. Ils ne correspondent pas aux gènes actuellement connus.

- Le traitement du sol par le cocktail de pesticides n'affecte ni l'**activité nitrifiante potentielle** ni l'**abondance spécifique** de la communauté nitrifiante estimée au travers du nombre de copies du gène *amoA* variant de  $9 \times 10^3$  à  $5 \times 10^4$  copies par ng d'ADN de sol. Ces deux marqueurs varient sensiblement en fonction des paramètres physicochimiques du sol, la plus faible activité potentielle et la plus basse abondance spécifique de la communauté *amoA* étant détectées dans les sols sableux de Pau et Bordeaux. Comme nous l'avons suggéré pour la communauté fonctionnelle dégradant le protocatéchine, il est probable que la redondance fonctionnelle de la communauté nitrifiante masque pour partie des changements possibles de sa composition suite au traitement du sol par le cocktail de pesticides.

- Les tests de **germination de spores** des champignons MA montrent des résultats différents vis à vis de la germination des spores de champignons mycorhiziens selon les sols. Ainsi, pour quatre des sols testés, le pourcentage de germination des spores n'est pas différent entre les échantillons prélevés juste après apport de pesticides et ceux prélevés un mois après, alors que les pesticides n'étaient plus détectables. Pour les sols de Pau et Bordeaux 2, en revanche, les valeurs diffèrent entre les deux prélèvements. Par ailleurs, le taux de germination des spores est plus faible dans les sols de Bordeaux que dans les autres, ce qui pourrait être lié aux caractéristiques physicochimiques de ces sols. La détermination du **pouvoir mycorhizogène** des sols montre que la quantité de champignons endomycorhizogènes dans les sols, est généralement inférieure à 100 propagules/kg de sol. Pour le sol enherbé de Bordeaux, un nombre de propagules plus important (700 propagules/kg) a été dénombré. Pour ce sol, une tendance, statistiquement non significative, de réduction du nombre de propagules est observée 30 jours après l'apport des produits phytosanitaires. Une analyse moléculaire de la **diversité des espèces** de champignons endomycorhizogènes MA présents dans les sols de Martincourt et de

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Bordeaux 1 et 2 a permis d'obtenir au total 9 espèces. Le sol de Martincourt a une diversité moindre que celle des deux sols de Bordeaux, qui diffèrent dans la distribution des espèces présentes. Enfin, **l'analyse quantitative** des Gloméromycètes et *G. mosseae* dans le sol de Martincourt révèle une réduction de près de 50% 3 jours après l'apport du cocktail pesticide. Cet effet a disparu après 30 jours. Cet effet n'a pas été visible sur les sols de Bordeaux.

- La **taille** de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle **ARS** ne demeure pas stable au cours du temps et il semble qu'elle réponde à l'apport de produits phytosanitaires. Cet apport semble stimuler la taille laissant penser à une utilisation par la microflore du mélange de pesticides comme substrat. En outre, l'effet « type de sol » est également significatif avec une taille de la communauté bactérienne fonctionnelle la plus élevée dans le cas du sol d'Epoisses et la plus faible dans le cas du sol de Pau. Pour le sol de Bordeaux, aucune influence des pratiques de désherbage n'est mise en évidence. En complément, la mesure de l'**activité Arylsulfatase** demeure stable au cours du temps et aucun effet de l'apport de produits phytosanitaires n'est noté. Seul l'effet « type de sol » est significatif avec une activité la plus élevée dans le cas du sol de Martincourt et la plus faible dans le cas du sol de Bordeaux. Pour ce dernier cas, aucune influence des pratiques de désherbage n'est mise en évidence. Enfin, des essais de détection du gène impliqué dans l'activité ARS menés sur le sol d'Epoisses à t0, t3 et t30 jours ont permis de mettre en évidence une séquence génétique en cours d'identification.

### 3.3. Etude post-homologation

Pour des raisons évidentes d'opérationnalité, seuls des bioindicateurs utilisables en routine, déjà « sur le marché » ou en cours de développement ont été utilisés.

- Une première série d'indicateurs microbiens dits « conventionnels » ont été mis en œuvre par le laboratoire Celesta. Il s'agit de la **biomasse microbienne** déterminée par une technique biocidale, de l'**activité respiratoire** mesurée par le dégagement de CO<sub>2</sub>, de l'**activité FDA hydrolase** et de l'**activité potentielle de minéralisation de l'azote**. Quel que soit l'indicateur retenu, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre modalités traitées avec les pesticides et leurs homologues non traitées, ceci tout au long des 2 années d'essai. Les accroissements observés de la biomasse microbienne et de l'activité respiratoire dans la modalité « enherbement » ne sont pas confirmés par analyse statistique. Ainsi, les outils analytiques de "référence" utilisés n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du cocktail de pesticides sur la quantité de biomasse microbienne ou de ses activités, ni un effet du mode d'entretien des sols, même si des tendances positives de l'enherbement semblent se dégager.

- En parallèle, nous avons suivi une seconde série d'indicateurs microbiens en cours de développement et considérés dans le cadre d'une approche analytique intégrée, les différents indicateurs étant mesurés sur le même échantillon. L'analyse de la **concentration cellulaire bactérienne vivante** n'a révélé aucune différence entre échantillons traités ou non traités ainsi qu'entre les sols soumis à différents modes d'entretien. L'**activité déshydrogénase** tend à être supérieure dans les échantillons de sol prélevés dans les parcelles enherbées. Il s'agit d'une tendance qui ne se manifeste plus 3 jours ou 30 jours après apport des pesticides. Par contre, si l'analyse de la **diversité biochimique** ne permet pas de mettre en évidence des effets liés au traitement pesticide, on observe des différences significatives liées au mode de désherbage, le désherbage chimique et surtout l'enherbement contribuant le mieux à maintenir cette diversité.

- Enfin, nous avons également testé un indicateur faisant appel à une approche moléculaire, l'analyse de l'**abondance de la communauté dégradant le protocatéchine**. Ainsi, si l'abondance du gène impliqué dans cette transformation est statistiquement plus élevée dans le sol des parcelles désherbées mécaniquement comparé à un désherbage chimique ou à l'enherbement, il n'y a plus de différence liée au mode d'entretien des sols dès lors que le nombre de copies du gène est exprimé relativement à l'abondance de la communauté bactérienne globale.

## 4. Conclusion

Au regard des résultats présentés, on peut dire que globalement, en utilisant un ensemble de bioindicateurs pris à différents niveaux d'organisation biologique, l'impact du cocktail de pesticides

## Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

(folpel, déltaméthrine et fenhexamide) sur la microflore de différents sols reste toujours très limité, souvent à la limite de la signification statistique, voire nul.

Ainsi, parmi les différents bioindicateurs globaux de référence (biomasse microbienne, activité FDA hydrolase, activité respiratoire, azote potentiellement minéralisable) ou en développement (concentration en cellules bactériennes vivantes, activité déshydrogénase, diversité biochimique et structure spécifique), seules la diversité biochimique ainsi que dans certains cas, l'activité déshydrogénase sont les seuls indicateurs qui permettent de mettre en évidence un effet lié à la présence de pesticides ainsi, d'ailleurs, qu'au mode d'entretien du sol.

Concernant les champignons mycorhizogènes à arbuscules (MA), seuls les deux tests de germination des spores et de mesure du pouvoir de colonisation se sont avérés positifs, bien que statistiquement non significatifs.

L'analyse de l'impact écotoxicologique des pesticides testés sur la structure, l'abondance et la diversité de communautés fonctionnelles des sols impliquées dans le cycle du carbone (communauté *pca*) et de l'azote (communauté *amoA*) a montré que globalement ces marqueurs étaient peu affectés par l'application du cocktail.

Il ressort de nos expérimentations que l'apport de produits phytosanitaires n'a aucun impact sur l'activité arylsulfatase potentielle totale quels que soient le type de sol utilisé, la dose considérée (y compris jusqu'à à 20 fois la dose agronomique) et le temps d'incubation.

Au-delà du manque de sensibilité apparent des différents bioindicateurs, les conditions dans lesquelles ils ont été testés ne sont pas optimales. En particulier, les caractéristiques des produits phytosanitaires choisis, Koc élevés à très élevés (deltaméthrine et folpel), volatilité importante (folpel) et demi-vie très courte (fenhexamide), contribuent probablement à limiter leurs effets sur les organismes vivants.

### **IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION**

- Implications pratiques :

**Norme ISO** : Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples – ISO CD11063

- Recommandations et limites éventuelles :
- Réalisations pratiques et valorisation :

### **PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES**

Partenariat avec Celesta Lab mis en place dans le cadre du projet

### **POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)**



**LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)**

<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	
Publications scientifiques parues	<p>PASCAUD, A., S. AMELLAL, M.-L. SOULAS, AND G. SOULAS. 2009. A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. <i>Journal of Microbiological Methods</i> 76:81-87.</p> <p>PASCAUD A., SOULAS M.-L., AMELLAL S et SOULAS G ; An integrated analytical approach for assessing the biological status of the soil microbial community (soumis)</p> <p>EL AZHARI, N; BRU, D; SARR, A, MARTIN-LAURENT F. 2008. Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. <i>European Journal of Soil Science</i> 59: 665-673</p> <p>EL AZHARI N, DEVERS M, CHATAGNER G, ROUARD N AND MARTIN-LAURENT F. 2009. <i>catA</i> as a molecular marker of the catechol-degrading community in soil. <i>Journal of Hazardous Material</i> (en revisions)</p>
Publications scientifiques à paraître	
Publications scientifiques prévues	
Participations passées à des colloques	<p><b>COLLOQUES</b></p> <p>Rivera-Becerril F, Beguet J, Rouard N, Soulas G, Martin-Laurent F. Effet d'un cocktail de pesticides sur une communauté bactérienne fonctionnelle du sol impliquée dans la dégradation de composés aromatiques. 4<sup>ème</sup> Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, 30 Août 2 Septembre 2009, Lyon, France. (poster)</p> <p>Rivera-Becerril F, Martin-Laurent F, Chatagnier O, Kuszala C, Rouard N, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D. Arbuscular mycorrhizal fungi, a tool to access the side effects of pesticides used in grapevine production. ICOM 6, 9-14 Août 2009, Belo Horizonte, Brésil (poster).</p> <p>Communication au 6<sup>th</sup> International Conference on Mycorrhiza ICOM6 « Beyond the roots ». 9 au 14 août 2009, Belo Horizonte, Brésil.</p>
Participations futures à des colloques	
Thèses passées	
Thèses en cours	
<b>ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION</b>	
Articles de valorisation parus	<p><b>Norme ISO : Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples – ISO CD11063</b></p>
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
<b>AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS</b>	
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	
Actions vers les médias prévues	

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

	<b>ENSEIGNEMENT - FORMATION</b>	
Enseignements/formations dispensés		
Enseignements/formations prévus		
	<b>EXPERTISES</b>	
Expertises menées		
Expertises en cours		
Expertises prévues		
	<b>METHODOLOGIES (GUIDES...)</b>	
méthodologies produites		
méthodologies en cours d'élaboration		Proposition d'essais microbiens standardisés pour apprécier l'état biologique des sols
méthodologies prévues		
	<b>AUTRES</b>	
Précisez...		

## RESUMES

### En français

Le présent projet visait à tester la capacité indicatrice de différents descripteurs de la taille, de l'activité et de la diversité de communautés microbiennes du sol pris à différents niveaux d'organisation biologique : gène fonction, groupe fonctionnel. Nous avons ciblé des communautés microbiennes impliquées dans différentes étapes-clé des cycles géochimiques du C, de l'N, du S et du P. Les objectifs étaient de participer au développement d'approches analytiques qui soient susceptibles de contribuer à la production de bio-essais venant renforcer l'arsenal réglementaire actuel ou venant en appui de politiques de surveillance. La faisabilité et les avantages potentiels de ces nouveaux outils de caractérisation de l'état biologique des sols ont été évalués par rapport à une batterie de tests de référence mis en œuvre par un professionnel de l'analyse.

Au regard des résultats obtenus, on peut dire que globalement, l'impact d'un cocktail de pesticides (folpel, déltaméthrine et fenhexamide) sur la microflore de différents sols reste toujours très limité, souvent à la limite de la signification statistique, voire nul.

Ainsi, parmi les différents bioindicateurs globaux de référence (biomasse microbienne, activité FDA hydrolase, activité respiratoire, azote potentiellement minéralisable) ou en développement (concentration en cellules bactériennes vivantes, activité déshydrogénase, diversité biochimique et structure spécifique), seules la diversité biochimique ainsi que dans certains cas, l'activité déshydrogénase sont les seuls indicateurs qui permettent de mettre en évidence un effet lié à la présence de pesticides ainsi, d'ailleurs, qu'au mode d'entretien du sol.

Concernant les champignons mycorrhizogènes à arbuscules (MA), seuls les deux tests de germination des spores et de mesure du pouvoir de colonisation se sont avérés positifs, bien que statistiquement non significatifs.

L'analyse de l'impact écotoxicologique des pesticides testés sur la structure, l'abondance et la diversité de communautés fonctionnelles des sols impliquées dans le cycle du carbone (communauté *pca*) et de l'azote (communauté *amoA*) a montré que globalement ces marqueurs étaient peu affectés par l'application du cocktail.

Il ressort de nos expérimentations que l'apport de produits phytosanitaires n'a aucun impact sur l'activité arylsulfatase potentielle totale quels que soient le type de sol utilisé, la dose considérée (y compris jusqu'à à 20 fois la dose agronomique) et le temps d'incubation.

Au-delà du manque de sensibilité apparent des différents bioindicateurs, les conditions dans lesquelles ils ont été testés ne sont pas optimales. En particulier, les caractéristiques des produits phytosanitaires choisis, Koc élevés à très élevés (deltaméthrine et folpel), volatilité importante (folpel) et demi-vie très courte (fenhexamide), contribuent probablement à limiter leurs effets sur les organismes vivants.

---

## MOTS CLES

Bioindicateurs, structure et abondance de communautés microbiennes, cycle du carbone, cycle de l'azote, cycle du soufre, dégradation des pesticides, activités enzymatiques, diversité biochimique, nombre de copie de gènes fonctionnels, test de germination de spores et pouvoir de colonisation de champignons mycorrhizogènes à arbuscules (MA).

## In English

---

The present project aimed at assessing the potential to be used as bioindicators of different descriptors of the abundance, activity and diversity of selected microbial communities taken at different levels of biological organisation: from the gene to the function and the community. The objective was to contribute to the development of novel technical approaches with the potential to be used as bioassays for regulation or environmental surveillance. The advantages of these tools have been compared to those of more conventional approaches.

Overall, it was found that a mixture of different pesticides commonly used in wine growing areas (folpel, deltamethrin et fenhexamid) had little or no effect on the soil microflora.

Different bioindicators, microbial biomass, FDA hydrolase activity, respiratory activity, potentially mineralisable N, viable bacterial cell concentration, biochemical diversity, and dehydrogenase activity, were used to assess side-effects of pesticides. Only biochemical diversity and, in some cases, dehydrogenase activity were found to vary significantly in the presence of pesticides or as a result of soil management practices

Different tests conducted with arbuscular mycorrhizal fungi (spore germination and colonisation potential) were found positive but not statistically significant.

Pesticides did not show appreciable effects on the abundance, activity and diversity of functional communities involved in carbon- (*pcaH* community), nitrogen- (*amoA* community) or sulphur (ARS community) cycles.

The physico-chemical characteristics of the chemicals: high to very high Koc (deltamethrin, folpel), susceptibility to volatilisation (folpel) and reduced DT50 (fenhexamid) may partly explain these results.

### KEY WORDS

Bioindicators, structure and abundance of microbial communities, C cycle, N cycle, S cycle, pesticide degradation, enzyme activities, biochemical diversity, number of copies of functional genes, spore germination and colonisation potential of arbuscular mycorrhizal fungi