

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ENSAIA

**THESE**

Version corrigée

présentée pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT

en Sciences Agronomiques

**CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION ET DU  
COMPORTEMENT METABOLIQUE DE LA MICROFLORE  
INDIGENE DANS UN PROFIL DE SOL**

par

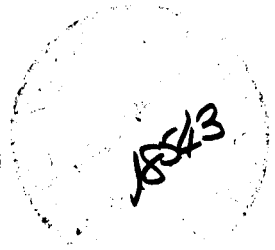
**Marie-Christine DICTOR**

Soutenance le 17 mars 1994

devant le jury composé de

- J.P.E. ANDERSON	Directeur de recherche	Examineur
- F. <del>ANDREUX</del>	Professeur à l'Université de Bourgogne	Rapporteur
- M. BABUT	Division Qualité Ressources Agence de l'Eau Rhin-Meuse	Examineur
- P. <del>FUSI</del>	Professeur à l'Université de Florence	Rapporteur
- I. SCHEUNERT	Directeur de recherche	Examineur
- M. SCHIAVON	Professeur à l'INPL-ENSAIA	President
- G. SOULAS	Directeur de recherche INRA	Examineur

# SOMMAIRE



PRÉAMBULE .....	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
- DISTRIBUTION DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL.....	3
<b>1- Principaux types de microorganismes présents dans le sous-sol et importance pondérale.....</b>	<b>3</b>
<b>1-1 MICROORGANISMES EUCARYOTES.....*</b>	<b>3</b>
1-1 -1 Protozoaires.....	4
1-1 -2 Champignons.....	5
1-1 -3 Levures.....	6
1-1 -4 <b>Algues</b> .....	6
<b>1-2 MICROORGANISMES PROCARYOTES.....</b>	<b>6</b>
1-2-1 Bactéries.....	6
1-2-2 Actinomycètes.....	7
<b>2- Etat nutritionnel des microorganismes du sous-sol.....</b>	<b>8</b>
2-1 DÉFINITION DE L'OLIGOTROPHIE.....	8
2-2 ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES DES MICROORGANISMES <b>OLIGOTROPHES</b> .....	
<b>3- Origine de la colonisation microbienne du sous-sol.....</b>	<b>11</b>
<b>4- Diversité physiologique des microorganismes du sous-sol. . . . .</b>	<b>12</b>
- <b>ACTIVITÉS MICROBIENNES DANS LE SOUS-SOL.....</b>	<b>15</b>
<b>1- Dégradation de composés organiques naturels.....</b>	<b>15</b>
<b>2- Dégradation des pesticides dans le sous-sol.....</b>	<b>17</b>

2-1 MISE EN ÉVIDENCE DE LA PERSISTENCE DES <b>PESTICIDES</b> .....	17
2-2 ADAPTATION DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL À LA DÉGRADATION DES COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES.....	19
<b>INFLUENCE DES CARACTÉRISTIQUES DU MILIEU ENVIRONNANT SUR LA DISTRIBUTION ET L'ACTIVITÉ DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL</b> .....	20
<b>1- Description de l'environnement souterrain</b> .....	20
<b>2- Principaux facteurs de l'environnement</b> .....	21
2-1 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE .....	22
2-2 INFLUENCE DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE.....	23
2-3 INFLUENCE DE LA TEXTURE DU SOUS-SOL.....	23
2-4 INFLUENCE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION .....	24
2-5 <b>INFLUENCE</b> Du PH .....	26
2-6 INFLUENCE DU CARBONE ORGANIQUE.....*	27
2-7 INFLUENCE DES NUTRIMENTS MINÉRAUX .....	29

<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>
-----------------------------

## **PRESENTATION DU SITE DE CÎTEAUX**

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	30
<b>1- Installation de la station expérimentale</b> .....	30
<b>2- Collecte et traitement des échantillons de sol</b> .....	31
<b>3- description pédologique du profil de sol</b> .....	31
<b>4- Analyses physiques</b> .....	31

2-1 MESURE DES FLUCTUATIONS DE LA HAUTEUR DE LA NAPPE PHRÉATIQUE.....	31
2-2 MESURES DE LA TEMPÉRATURE DE L'AIR ET DU SOL.....	31
2-3 MESURE DE L'OXYGÈNE DU SOL.....	32
2-2-1 Oxygène présent dans l'atmosphère du sol.....	32
2-2-2 Oxygène dissous dans l'eau souterraine.....	34
- RESULTATS .....	35
1- Caractéristiques physico-chimiques des sols récupérés.....	35
2- Fluctuations de la nappe phréatique.....	35
3- Mesures de la température du sol.....	35
4- Mesures de l'oxygène et du gaz carbonique du sol.....	36
- DISCUSSION .....	37
1- Mesures de températures.....	37
2- Mesures d'oxygène et de gaz carbonique.....	37

## LES SOLS, LES PRODUITS

1- Les sols .....	40
1-1 PRÉLÈVEMENT DES SOLS ET ANALYSES BIOLOGIQUES.....	40
1-2 CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL.....	40
1-3 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SOL.....	41
2- Les produits utilisés.....	41
2-1 PRODUITS MARQUÉS ET FROIDS.....	41
2-2 PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE TRAITEMENT.....	42

# PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE : METHODES D'ESTIMATION DE LA TAILLE DE LA MICROFLORE

- INTRODUCTION .....	43
<b>1- Les techniques de dénombrement .....</b>	<b>43</b>
<b>1-1 LE DÉNOMBREMENT PAR EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT.....</b>	<b>43</b>
1-2 LES DÉNOMBREMENTS SUR MILIEU DE CULTURE.....	44
1-2-1 La technique du Nombre le Plus Probable (NPP).....	44
1-2-2 Le comptage sur boîtes. ....	45
<b>2- Les méthodes indirectes .....</b>	<b>46</b>
2-1 LES MÉTHODES BIOCIDALES.....	46
2-1-1 La méthode de Fumigation-Incubation (FI). ....	46
2-1-2 La méthode de Fumigation-Extraction (FE). ....	48
<b>3- Estimation de la biomasse microbienne par la méthode de Respiration Induite par le Substrat (RIS).....</b>	<b>50</b>
<b>4- Les methodes biochimiques.....</b>	<b>52</b>
- MATERIEL ET MÉTHODES.....	55
<b>1- Dénombrements microbiens sur milieux liquides et gélosés.....</b>	<b>55</b>
<b>2- Estimation de la biomasse microbienne par les méthodes biocidales.....</b>	<b>57</b>
2-1 FUMIGATION-EXTRACTION (FE).....	57
2-2 MARQUAGE "IN SITU" DE LA BIOMASSE DANS LE SOL.....	57
2-3 FUMIGATION-INCUBATION (FI).....	59
<b>3- Estimation de la biomasse microbienne par la méthode de Respiration Induite par le Substrat.....</b>	<b>59</b>

<b>- RESULTATS-DISCUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>1- Dénombrement microbiens sur milieux liquide et gélosés .....</b>	<b>60</b>
<b>1-1 OBSERVATIONS QUALITATIVES PRÉLIMINAIRES .....</b>	<b>60</b>
<b>1-2 DÉNOMBREMENT DE LA MICROFLORE TOTALE.....</b>	<b>61</b>
1-2-1 Comparaison des techniques NPP et étalement sur boites.....	61
1-2-2 Comparaison des dénombrement de la microflore totale sur différents milieux.....	61
<b>1-3 DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES AÉROBIES, ANAÉROBIES         ET DES CHAMPIGNONS.....</b>	<b>62</b>
<b>2- Mesures de biomasse par les méthodes biocidales et physiologique.....</b>	<b>65</b>
<b>2-1 DÉTERMINATION PAR FUMIGATION-EXTRACTION (FE).....</b>	<b>65</b>
<b>2-2 DÉTERMINATION DU COEFFICIENT KEC .....</b>	<b>65</b>
<b>2-2-1 étude de la répartition de la radioactivité après apport                 d'un substrat carboné marqué.. .....</b>	<b>65</b>
2-2-1-1 Influence de la concentration en glucose (1 ère expérience).....	65
2-2-1-2 Influence du temps d'incubation (2Ame expérience).....	66
2-2-1-3 Influence de la nature du substrat de marquage (3ème expérience).....	67
<b>2-2-2 Incorporation biologique de la radioactivité. Valeurs du Kec.. .....</b>	<b>67</b>
<b>2-3 DÉTERMINATION DE LA BIOMASSE PAR FUMIGATION-INCUBATION (FI).....</b>	<b>72</b>
<b>2-4 DÉTERMINATION PAR LA MÉTHODE DE RESPIRATION INDUITE         PAR LE SUBSTRAT (SIR).....</b>	<b>7a</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>76</b>

## DEUXIEME PARTIE EXPÉRIMENTALE : METHODES D'ESTIMATION DE LA TAILLE DE LA MICROFLORE

<b>1- Méthode d'estimation du potentiel hétérotrophe du sol.....</b>	<b>77</b>
<b>1-1 DÉVELOPPEMENTS THÉORIQUES ET APPLICATION AUX MILIEUX NATURELS. . .</b>	<b>77</b>
1-1-1 Application aux milieux aquatiques - Bases théoriques .....	77
1-1-2 Application au milieu "sol".....	78

I-1-3 Quelques exemples d'application .....	79
I-1-4 <b>Interêts</b> et limites de la notion d'activité hétérotrophe.. .....	80
I-2 EXPÉRIENCES RÉALISÉES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL.....	82
<b>2- Etudes des cinétiques de transformation de différents substrats carbonés biogéniques et xénobiotiques.....</b>	<b>84</b>
<b>2-1 CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DE TROIS SUBSTRATS CARBONÉS NATURELS : GLUCOSE, ACÉTATE DE SODIUM ET ACIDE BENZOÏQUE. ....</b>	<b>84</b>
2-1-1 Première expérience .....	84
2-1-2 Deuxième expérience. ....	85
2-2 CINÉTIQUES DE <b>MINÉRALISATION</b> DE COMPOSÉS <b>XÉNOBIOTIQUES. CAS DU 2,4-D ET DE L'ATRAZINE.....</b>	<b>86</b>
<b>2-3 CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION ET D'INCORPORATION BIOLOGIQUE DU CARBONE. CAS DU 2,4-D.....</b>	<b>87</b>
2-3-1 Rappels bibliographiques sur la méthode utilisée.....	87
2-3-2 Expérimentation réalisée.....	88
<b>- RESULTATS-DISCUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>1- Mesure de l'activité hétérotrophe de différents horizons de sol provenant de la zone non saturée.....</b>	<b>89</b>
I-1 <b>MINÉRALISATION</b> DE L'ACÉTATE.....	89
I-2 <b>MINÉRALISATION</b> DU GLUCOSE.....	93
<b>2- Cinétiques de minéralisation de substrats carbonés.....</b>	<b>95</b>
2-1 SUBSTRATS NATURELS.....	95
2-1-1 Cinétiques de minéralisation de longue durée.. .....	95
2-1-1-1 Influence de la structure chimique du substrat.. .....	95
2-1-1-2 Influence de la concentration. ....	97
2-1-1-3 Influence de la profondeur. ....	97
2-1-2 Cinétiques de minéralisation en temps court.. .....	97
<b>3- Substrats xénobiotiques. Cas du 2,4-D et de l'atrazine.....</b>	<b>100</b>
3-1 CINÉTIQUES DE <b>MINÉRALISATION</b> DU 2,4-D ET DE <b>L'ATRAZINE.....</b>	<b>100</b>
3-2 <b>CINÉTIQUES</b> DE MINÉRALISATION ET DE <b>L'INCORPORATION</b> BIOLOGIQUE DU CARBONE DU 2,4-D.....	104

3-2-1 Minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle .....	104
3-2-2 Cinétiques d'incorporation du carbone aromatique du 2,4-D .....	105
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>106</b>

<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>107</b>
----------------------------------	------------

i-

## **ANNEXES**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## PREAMBULE

Au sein de l'environnement naturel, l'utilisation agricole intensive d'engrais azotés et de composés xénobiotiques tels que les pesticides **entraîne** un double phénomène de pollution du sol et des nappes phréatiques. Effectivement, en Europe, des études récentes montrent la **présence** de pesticides dans les eaux superficielles et souterraines. Dans 6 pays **européens**, le recensement des composés xénobiotiques dans les eaux, révèle la présence de résidus d'atrazine, de carbofuran, de bentazone, de dichlorprop, de 2,4-D, de MCPA, de mecoprop et de simazine pour ne citer que les principaux.

La présence de polluants dans l'eau souterraine stimule l'intérêt porté à l'écologie microbienne des milieux souterrains. Dans un but de bioremédiation des sites contaminés, ce constat justifie la finalité des recherches concernant la compréhension des facteurs qui limitent l'activité métabolique de la microflore du sous-sol.

Ceci est d'importance, car une des voies d'entrée des polluants dans la nappe phréatique est constituée par la zone non saturée du sol au travers de laquelle le transport d'une substance organique se fait soit à l'état dissous, soit à l'état adsorbé.

Dans le sol de surface, des processus abiotiques et biologiques sont responsables de la **dégradation** des pesticides. Ces composés sont photodégradés ou hydrolysés. Mais, le processus de dégradation microbienne est souvent majoritaire dans la détoxification de nombreux composés organiques. Qu'en est-il sous la zone cultivée du sol? Jusqu'à ce jour, peu d'études ont été réalisées et ne permettent pas de répondre à cette question. Devant l'augmentation du nombre de polluants détectés dans les eaux et le sous-sol, il a paru nécessaire de mieux **connaître** les mécanismes de biodégradation des composés **xénobiotiques** qui s'y trouvent ainsi que le rôle des facteurs environnementaux qui affectent la disponibilité biologique des polluants.

L'objectif à long terme de cette recherche concerne la maîtrise de la persistance des **produits** dans l'environnement terrestre. Dans cette optique, plusieurs thèmes doivent être **développés**. Ils concernent :

- une connaissance approfondie de la microflore du sous-sol,
- une évaluation réaliste des vitesses de dégradation des composés organiques dans le sous-sol,

- l'établissement d'une base de données qui servira à modifier et à valider les modèles mathématiques **prédictifs** de la persistance des composés xénobiotiques dans la zone non saturée du sol.

- l'isolement de communautés ou de souches microbiennes issues de la zone non saturée du sol dont nous pourrions envisager l'utilisation ultérieure dans le cadre de biotechnologies appliquées à la **restauration** des environnements pédologiques et aquatiques contaminés.

C'est dans le cadre d'un programme de recherche européen (STEP **CT90-0027**), mis en place en 1990, et en collaboration avec les laboratoires de BAYER AG (Allemagne) et Zeneca Agrochemicals (Angleterre) qu'une réflexion a été engagée au Laboratoire de Microbiologie des sols de **l'INRA** de Dijon sur les différents **thèmes** cités.

Le travail d'expérimentation mis en place comporte trois objectifs principaux :

- Le premier est de préciser les conditions environnementales du milieu souterrain. Il s'agissait de mettre en place un dispositif de terrain permettant le suivi des facteurs physiques comme la température ou la teneur en oxygène mesurées à différentes profondeurs dans le sol.

- Le second conduit à estimer l'importance de la microflore du sous-sol. Pour cela, nous avons adapté les techniques classiques de dénombrement aux conditions, notamment nutritives, de l'environnement souterrain ainsi que les techniques de mesure de biomasse.

- Le troisième a pour but de préciser l'activité métabolique de cette microflore en mettant **l'accent** sur les potentialités dégradantes de la microflore du sous-sol envers de deux herbicides : le 2,4-D et l'atrazine.

la plus forte concentration à une réelle tendance à une reprise de l'incorporation que l'on peut même observer dans les sols provenant d'horizons plus profonds (140-180 cm).

Dans les figures 68 et 69, nous avons reporté la courbe de l'incorporation biologique du 2,4-D ainsi que celle du carbone microbien estimé par la technique de Fumigation-Extraction. Nous avons choisi les valeurs de biomasse microbienne marquée au  $^{14}\text{C}$ -2,4-D correspondant au pic observé après 9 jours d'incubation. Lors du traitement du sol avec une concentration de 0,033 mg 2,4-D.kg<sup>-1</sup>sol (figure 68A) ou de 3,33 g 2,4-D.kg<sup>-1</sup>sol (figure 69A), nous remarquons une similitude de forme entre les 2 courbes. En effet, la quantité de carbone microbien marqué et total diminue rapidement de la surface jusqu'à 60 cm de profondeur puis se stabilise entre 60 et 250 cm de profondeur. Le rapport entre la biomasse microbienne 2,4-D et celle de carbone microbien augmente avec la profondeur (figures 68B et 69B).

Nous constatons un comportement différent de la microflore du sous-sol. Dans un sol de surface prélevé sur un site expérimental à Dijon, Soulas (1990) conclut à l'existence de 2 communautés microbiennes dégradant le 2,4-D. La première est active dès l'introduction de l'herbicide et serait majoritairement composée d'organismes co-métabolisants surtout à faible concentration, la seconde intervient plus tardivement surtout lorsque la concentration augmente. Les micro-organismes qui appartiennent à cette seconde communauté seraient capables d'utiliser le pesticide comme seule source de carbone et d'énergie et sont à l'origine du phénomène d'adaptation. Ils sont également relativement peu nombreux, de l'ordre de 10 à 100 germes dans les sols agricoles. C'est leur complète disparition dans les horizons profonds du sous-sol qui expliquerait le caractère co-métabolique exclusif de la dégradation du 2,4-D.

## CONCLUSION

L'utilisation de la méthode de mesure de l'activité hétérotrophe de la microflore dans un sol reflète l'existence de 2 systèmes enzymatiques de transformation du glucose et de la cétate dans la population microbienne. En ce qui concerne la gamme de concentration de 0 mg C-substrat.kg<sup>-1</sup> sol, l'évolution de la vitesse initiale de minéralisation suit une courbe de type Michaelis-Menten. La diminution de la vitesse maximale de minéralisation est corrélée avec celle de la taille de la microflore. Mais, le résultat le plus intéressant est la diminution de la constante d'affinité pour le substrat ce qui s'interprète comme une diminution de l'affinité pour le substrat des micro-organismes indigènes dans le sous-sol. La vitesse potentielle de minéralisation et/ou d'incorporation des 2 herbicides, le 2,4-D et l'atrazine, dans le profil de sol de Cîteaux est faible dans les horizons situés en dessous de la couche cultivée de sol.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

### Bilan des résultats obtenus

#### CARACTÉRISTIQUES ENVIRONNEMENTALES DU MILIEU " SOUS-SOL "

Les différents aspects de ce travail expérimental contribuent à une connaissance plus approfondie du comportement de la microflore de la zone profonde du sol de Cîteaux. Dans le schéma suivant, nous avons résumé les principaux éléments susceptibles d'intervenir dans la capacité de survie de la microflore du sous-sol. L'évolution des paramètres environnementaux tels que la température et la teneur en oxygène à différentes profondeurs dans le profil de sol de Cîteaux sont compatibles avec une activité microbienne aérobie dans le sous-sol. D'une manière générale, nous avons montré que le nombre de micro-organismes croît d'un facteur de 10 à 100 avec la profondeur et que la microflore du sous-sol de Cîteaux est constituée majoritairement de bactéries aérobies. De même, l'activité microbienne, estimée par la mesure de la quantité de  $\text{CO}_2$  dégagée, diminue aussi avec la profondeur.

#### QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE MICROBIENNE PRÉSENTE DANS LE sous-SOL

Aucune des 3 méthodes d'estimation de la taille de la microflore du sol ne semble strictement applicable à la détermination de la quantité de biomasse microbienne dans le sous-sol. La technique de dénombrement présente plusieurs limites. Tout d'abord, seulement à 10% des micro-organismes du sol sont capables de se développer sur milieux de culture standards qui sont sélectifs de part la nature des substrats qu'ils contiennent. L'autre problème méthodologique important concerne la concentration élevée en substrats carbonés dans les milieux de culture qui pourrait inhiber la croissance des micro-organismes du sous-sol adaptés à de faibles teneurs en nutriments.

Les techniques biocidales et physiologiques d'estimation de la quantité de carbone microbien dans le sol sont, elles aussi, inadaptées dans le cas d'estimation du carbone microbien dans le sous-sol. Les coefficients de conversion en carbone microbien,  $K_{ec}$  et  $K_c$ , qui ont été calibrés dans les sols de surface, se révèlent être inadaptés dans le cas de la détermination de la quantité de biomasse microbienne du sous-sol. Comme l'a montré notre

travail, le coefficient  $K_{oc}$  varie avec la profondeur dans le profil de sol de Cîteaux et l'ignorance de cette variation peut entraîner, dans certains cas, une sous-estimation de la biomasse microbienne de 90%. D'une façon générale, nous pouvons soulever le problème de l'utilisation directe de méthodes mises au point dans le sol de surface, en profondeur. Un prolongement de ce travail serait de redéfinir les coefficients de conversion en carbone microbien, dans différents profils de sol de manière à confirmer ou à infirmer la tendance que nous avons observée.

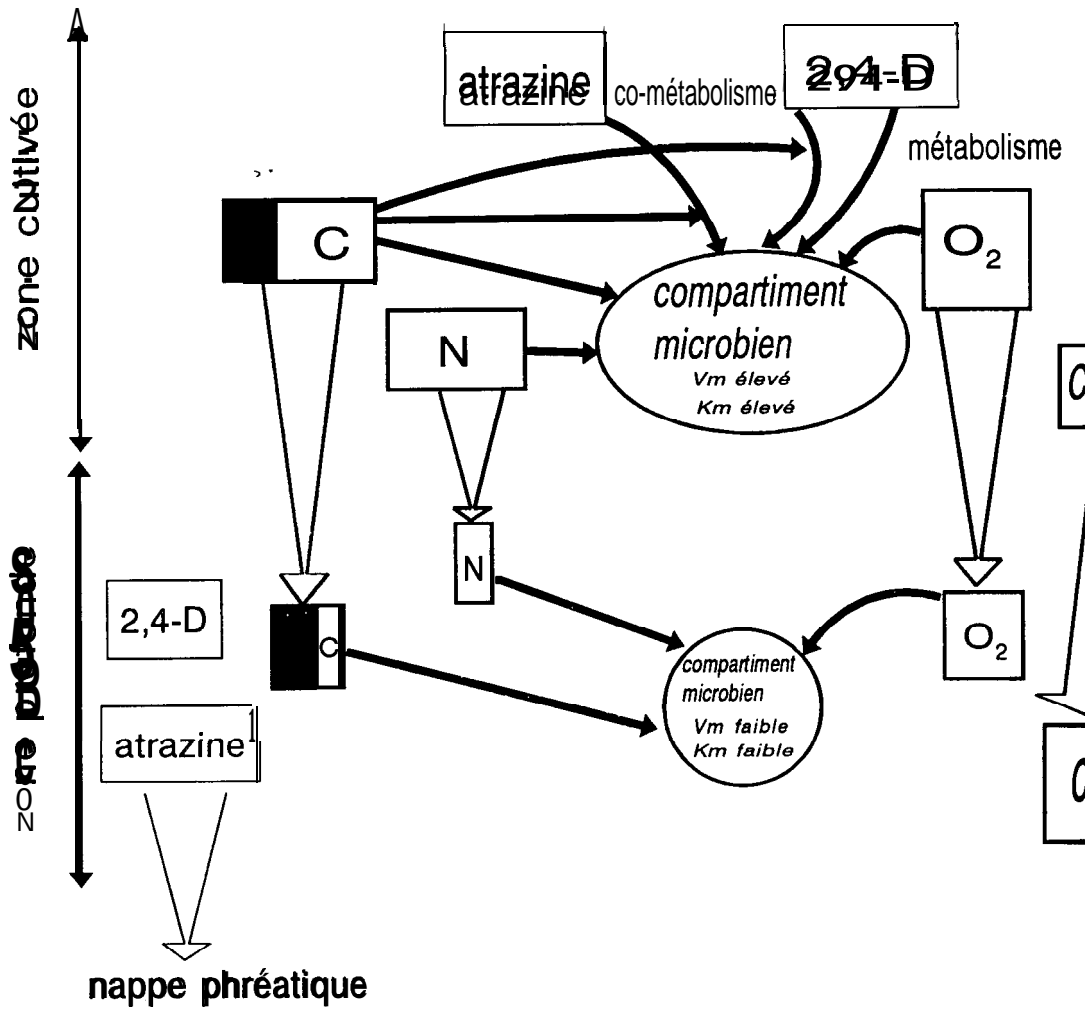
La méthode d'Anderson et Domsch dont le principe repose sur la saturation des capacités de transformation de la microflore du sol après un apport important d'un substrat carboné tel que le glucose pourrait elle aussi être inadaptée à la mesure de la biomasse en sol profond en raison de caractéristiques physiologiques des micro-organismes du sous-sol qui diffèrent de celles des micro-organismes présents dans les sols. En particulier, une stratégie d'incorporation préférentielle du substrat, plutôt que de minéralisation, pourrait entraîner une invalidation de la méthode SIR ou, du moins, la nécessité de sa recalibration.

#### ACTIVITÉS POTENTIELLES DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

Au sujet de l'activité de cette microflore, nos résultats montrent l'existence d'une activité microbienne aérobie significative jusqu'à 5 mètres de profondeur dans le profil de sol de Cîteaux. La modification des caractéristiques de l'activité hétérotrophe de la microflore issue de différents horizons par rapport à celle du sol de surface, à savoir une diminution de la vitesse de minéralisation  $V_m$  et de la constante de Michaelis  $K_m$  met en évidence un comportement différent des micro-organismes du sous-sol, caractéristique du phénomène d'adaptation de la population microbienne aux conditions oligotrophes du milieu. En particulier, la diminution de la valeur du paramètre  $K_m$  est le signe d'une grande affinité des micro-organismes pour les substrats carbonés. Cette stratégie de "type K" est probablement la plus adaptée à l'exploitation de milieux pauvres en ressources nutritives.

La réduction de la vitesse potentielle de minéralisation de différents substrats carbonés tels que le glucose, l'acétate et l'acide benzoïque avec la profondeur serait due à l'influence des facteurs abiotiques (teneur en argile, en nutriments carboné et azoté) et à des facteurs biotiques tel que la diminution de la quantité de biomasse microbienne dans le sol. Mais, l'absence d'une relation de proportionnalité entre la vitesse potentielle de minéralisation du substrat carboné et la quantité de biomasse présente dans les différents horizons du profil de sol traduirait une adaptation de la biomasse, à de faibles quantités de substrat, dans les horizons profonds.

En ce qui concerne la dégradation des molécules xénobiotiques telles que le 2,4-D et l'atrazine, la tendance est non seulement à une diminution des capacités dégradantes de la



Carbone non disponible  
 Carbone disponible

Shéma récapitulatif montrant l'évolution du carbone (C), de l'azote (N), de l'oxygène (O<sub>2</sub>) et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans un profil de sol. Influence de ces différents facteurs sur la microflore du sol.

microflore du sous-sol mais, pour le premier produit nommé, à une modification de la nature du processus de dégradation qui deviendrait de nature essentiellement co-métabolique donc tributaire de la fourniture **carbonée** même si dans certains horizons du sous-sol de Cîteaux, nous avons mis en évidence la possibilité d'une légère adaptation de la microflore à la dégradation du 2,4-D. Il est probable que la dégradation des pesticides dans le sous-sol soit largement conditionnée par les flux de carbone dont le caractère discontinu entraîne probablement des variations très importantes dans la dégradation des molécules xénobiotiques. Comme nos résultats le montrent, la microflore du sous-sol ne possède pas les capacités enzymatiques nécessaires à la dégradation des molécules aromatiques xénobiotiques. Par contre, nous avons montré sa capacité à minéraliser un composé aromatique, l'acide benzoïque. Ceci signifierait que les micro-organismes présents dans le sous-sol ne disposeraient pas des enzymes réalisant les premières étapes du clivage de la molécule de 2,4-D.

#### CAPACITÉS DE SURVIE DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

L'ensemble des mesures d'activités potentielles dégradantes que nous avons **accompli** nous permet d'apporter quelques éléments complémentaires quant à la compréhension du fonctionnement de la microflore dans le sous-sol. Nous avons résumé les principales informations obtenues concernant le fonctionnement de la microflore dans le sous-sol sur le schéma suivant. La chute de la quantité de nutriments **carboné** et azoté avec l'augmentation de la profondeur a pour corollaire de diminuer la quantité de biomasse microbienne avec la profondeur. En raison de la quantité limitée de nutriments dans le sous-sol, la microflore indigène a dû développer une stratégie d'adaptation aux conditions d'oligotrophie régnant dans leur environnement. Ceci s'est traduit par une augmentation de l'affinité pour le substrat **caractérisée** par une faible constante d'affinité. Dans le sol de surface, la dégradation biologique de pesticides tels que le 2,4-D et l'atrazine s'effectue essentiellement selon les voies métaboliques (2,4-D) et co-métabolique (2,4-D, atrazine). Il n'en est pas de même dans le sous-sol où la minéralisation de ces composés est très faible. Les résultats publiés dans la littérature montrent une dégradation des composés xénobiotiques par voie co-métabolique **majoritaire**.

## Perspectives

### MESURES D'ACTIVITÉS DÉGRADANTES DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL *IN SITU*.

La démarche expérimentale que nous avons développée nous a permis de mesurer des activités potentielles de dégradation de composés organiques naturels et xénobiotiques.. Pour ce faire, nous nous sommes placés en condition contrôlées de température, d'humidité et de teneurs en oxygène identiques quel que soit l'horizon de sol étudié. Or, dans la partie expérimentale intitulée " Présentation du site de Cîteaux ", la température, la teneur en oxygène ainsi que l'humidité variaient avec la profondeur. La suite de ce travail va consister à mesurer des activités dégradantes au champ. Dans cette optique, un puits sec de 3 mètres de profondeur a été installé sur la parcelle de Cîteaux à l'intérieur duquel 2 chambres d'incubation *in situ* sont placées à 0,5 et 1,5 mètres de profondeur. Une série de capteurs répartis sur la totalité du profil permettra de suivre les variations journalières de la température et des teneurs en oxygène et en eau.

### CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUE ET MÉTABOLIQUE DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

Nous avons montré que la microflore du sous-sol avait développé des systèmes enzymatiques de transformation du substrat à haute affinité pour le substrat que ceux de la microflore indigène du sol de surface. Une étude approfondie de la diversité métabolique et physiologique de la microflore du sous-sol permettrait une meilleure compréhension du fonctionnement de la microflore du sous-sol et de son comportement vis à vis des composés xénobiotiques dans l'environnement.

### CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT NUTRITIONNEL DU MILIEU SOUTERRAIN

Parce que, dans le sous-sol, le processus co-métabolique semble être majoritaire dans la dégradation des composés xénobiotiques, il serait intéressant de corrélérer le taux de dégradation des composés xénobiotiques à la quantité de carbone disponible aux différentes profondeurs dans le sol. Nous proposons quelques pistes. Il s'agirait en premier lieu de préciser l'état nutritionnel du milieu souterrain en caractérisant les différentes formes de carbone et en mesurant la biodisponibilité du carbone dans le profil. Par la suite, l'étude de l'influence de la nature ainsi que de la teneur en carbone sur la dégradation des pesticides dans le sous-sol pourrait être envisagée.