

ELISE

Action 5 : Approche microbiologique



L'approche microbiologique du projet ELISE a consisté à **développer des bio-indicateurs bactériens** puis à évaluer ces indicateurs sur la base d'échantillons aqueux (eaux de nappe ou eaux de percolation). Ces expériences ont permis d'évaluer la relation entre l'empreinte moléculaire de la flore bactérienne et le degré de contamination au métolachlore, et d'évaluer l'effet du S-métolachlore et de ses produits de dégradation sur la dynamique structurelle et fonctionnelle de la microflore bactérienne.

Un **protocole de biologie moléculaire pour l'étude spécifique de la microflore bactérienne des eaux de nappe a été développé et validé**. Le protocole de biologie moléculaire inclut l'extraction d'ADN total, l'amplification PCR (Polymérase Chain Reaction du gène de l'ARN 16S) et l'analyse de l'empreinte moléculaire de l'échantillon par une méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP ou Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism).

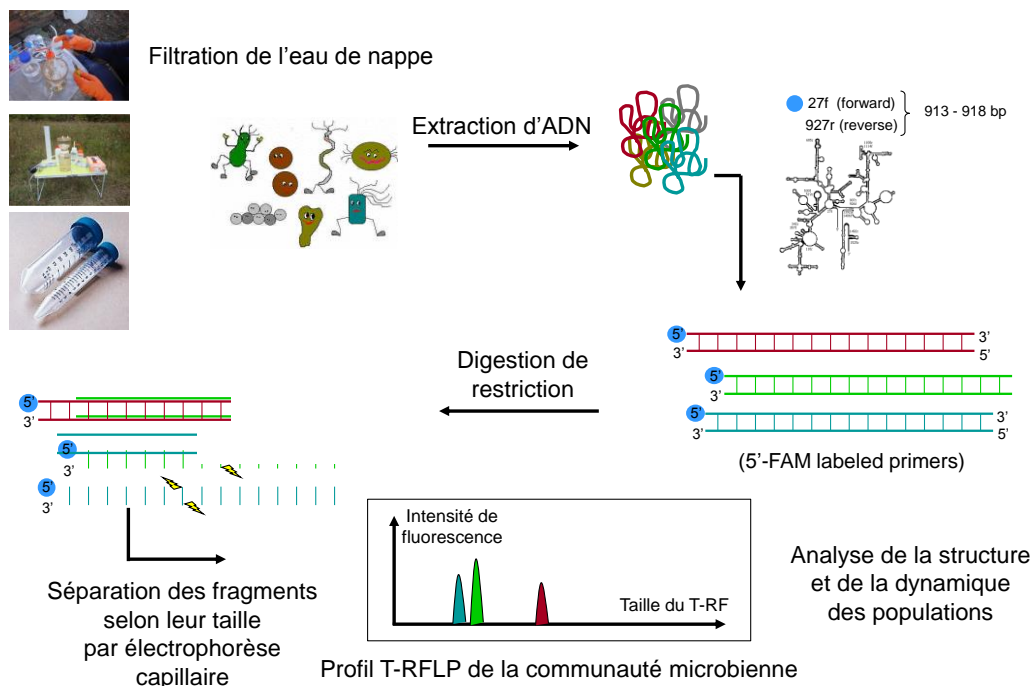


Illustration 1 - Principe de la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP) des gènes bactériens de l'ARNr 16S amplifiés par PCR pour évaluer la dynamique de la structure des communautés bactériennes de la nappe d'Ariège. Un fragment du gène de l'ARN 16S est généré à partir de l'ADN extrait de la nappe de l'Ariège. Les amplicons marqué (6-FAM- ou de carboxy-X-rhodamine (ROX)) sont digérés par des enzymes de restriction et les fragments sont séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire.

EVOLUTION SPATIALE ET TEMPORELLE DE LA FLORE BACTERIENNE DE LA NAPPE DE L'ARIEGE

Le protocole de biologie moléculaire mis en place a été décliné sur les différents échantillons d'eau souterraine collectés au niveau des points de suivi de la qualité de la nappe depuis mai 2012 et plus spécifiquement sur cinq puits d'intérêt portant les numéros 151>60>117>230>224 (donnés en ordre décroissant de concentrations en produits phytosanitaires et métabolites). Ces derniers présentent des contaminations contrastées tant du point de vue du cocktail de substances rencontrées que des gammes de concentrations observées. Ces points ont également été suivis pour les besoins des approches menées dans l'étude des amphibiens et des macro-organismes souterrains.

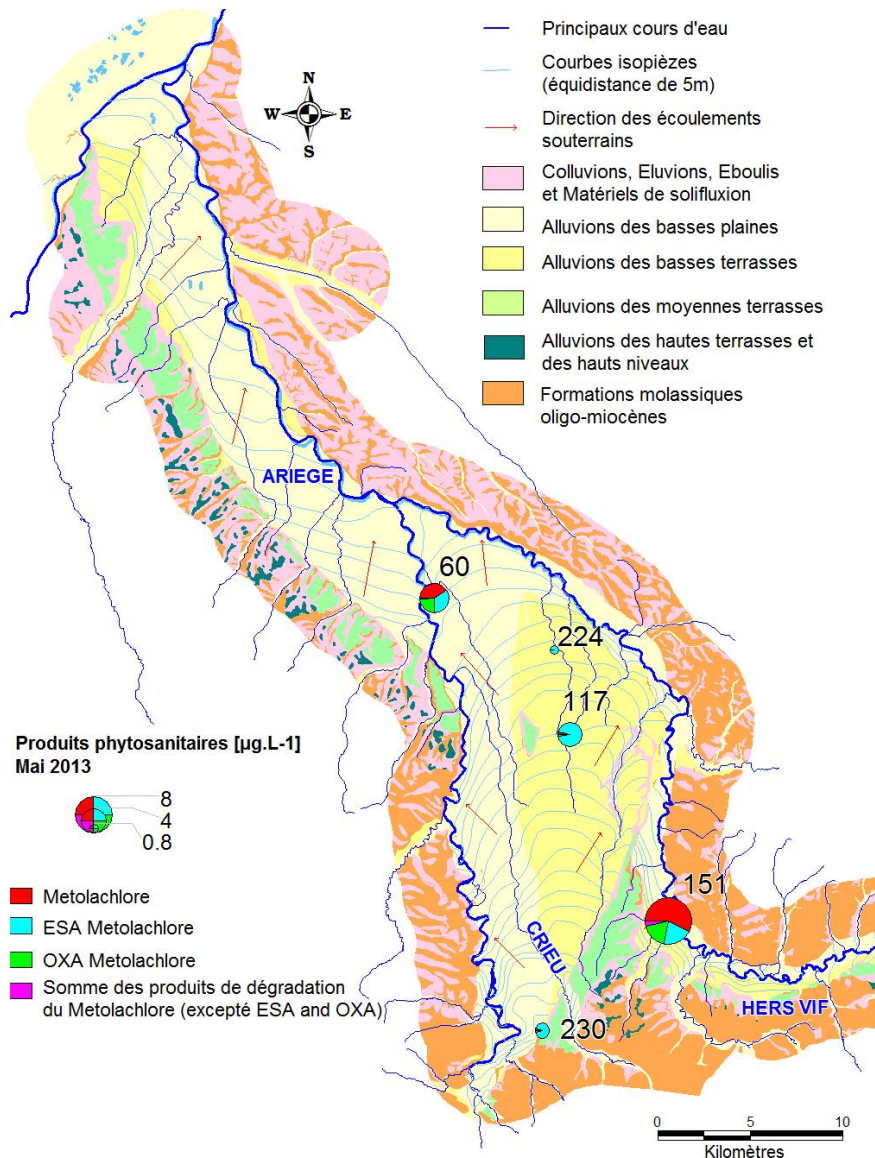


Illustration 2 – Carte de localisation des 5 points de suivi de la qualité de la nappe de l'Ariège échantillonnés dans le cadre du protocole de biologie moléculaire (campagne de mai 2013)

Globalement, sur la base des échantillons étudiés et de l'approche utilisée, les résultats obtenus suggèrent que la présence de nitrate et de certains produits de dégradation du métolachlore est liée à des changements de structure de la microflore microbienne de la nappe. Cependant un lien de causalité réel entre la présence de produit de dégradation (dont les concentrations sont très faibles) et le changement de communautés bactériennes observé ici reste hypothétique en raison de la complexité des processus biochimiques dans l'environnement et a demandé confirmation en expériences contrôlées de laboratoire.

BIO-INDICATEURS MICROBIENS DU METABOLISME DU METOLACHLORE

Des cultures d'enrichissement bactériennes ont été mises en place pour **l'étude spécifique des bactéries impliquées dans le métabolisme du métolachlore et des gènes correspondants**.

Des amorces oligonucléotidiques correspondant à de brèves séquences conservées et associées à différentes familles d'enzymes impliquées dans le métabolisme du métolachlore ont été conçues et utilisées aussi bien sur des souches de références que des échantillons environnementaux pour permettre la détection qualitative et quantitative de gènes fonctionnel d'intérêt par PCR. Ces tests moléculaires spécifiques au métabolisme du métolachlore sont utilisables aussi bien à partir des échantillons d'eau de la nappe, des échantillons de sols agricoles ou d'échantillons issus de cultures microbiennes pour évaluer le potentiel de dégradation *in situ* du métolachlore et d'autres herbicides de la famille des chloroacétanilides. A l'issue du projet, aucune avancée significative n'a pu être réalisée sur ce volet.

SUIVI DE LA DIVERSITE BACTERIENNE ET EVALUATION PAR TEST MICROBIEN DE LA TOXICITE DES EAUX DE NAPPE APRES EXPOSITION AU METOLACHLORE AU LABORATOIRE

Une **expérience complémentaire**, a été développée au laboratoire pour évaluer le potentiel des analyses moléculaires de diversité bactérienne en bioindication de l'effet du métolachlore sur les eaux de nappe.

L'approche d'écotoxicologie microbienne proposée dans le projet ELISE s'appuie sur la caractérisation chimique et microbiologique initiale d'échantillons environnementaux et le contrôle expérimental de plusieurs variables physiques (par ex. température). L'objectif est de permettre une interprétation plus fine et robuste de l'évolution de la diversité bactérienne vis-à-vis des conditions hydrochimiques par rapport au suivi de terrain.

Cette approche répond ainsi au besoin de généralité d'une part, pour évaluer le lien entre exposition aux micropolluants et effets microbiologiques et d'autre part, pour référencer l'usage de la structure des populations bactériennes comme indicateur du bon état écologique d'écosystèmes (Imfeld et Vuilleumier, 2012).

Le travail effectué au laboratoire a été mené à partir d'échantillons d'eaux de nappe provenant des puits 151 et 224, dans lesquels respectivement de fortes et de faibles concentrations de métolachlore ont été détectées de manière récurrente au cours des deux premières années du projet.

Ces expériences suggèrent que des opérations d'incubation d'échantillons d'eau de nappe au laboratoire, permettront une meilleure évaluation des effets biotiques du métolachlore dans les écosystèmes aquatiques souterrains, tout en conciliant des avantages en termes de temps et de coût d'analyse.

APPROCHE D'ECOTOXICOLOGIE POUR L'ATRAZINE ET LA DEETHYLATRAZINE (DEA)

Le suivi effectué sur la plaine révélant encore une **forte occurrence de l'atrazine et surtout de son métabolite dééthylatrazine, il a été jugé pertinent d'évaluer également comment ces 2 molécules**, seules ou en mélange pouvaient impacter la diversité microbienne au sein de l'aquifère. Pour cela, des échantillons d'eaux souterraines provenant de 2 sites aux teneurs contrastées (site 261 considéré peu impacté et le site 224 avec un historique de contamination) ont été utilisés pour des expérimentations de laboratoire (exposition à des concentrations plus ou moins importantes d'une substance seule ou en mélange) en complément des expérimentations portant sur le métolachlore.

Il apparaît que la composition d'une communauté microbienne dans une eau ayant notamment un historique de contamination à différents pesticides de plusieurs années semble plus nombreuse et plus diverse que dans une eau type pristine. La biodiversité et l'abondance des microorganismes des eaux ayant un historique de contamination à différents pesticides semblent principalement affectées par la concentration de produits auxquels elles sont exposées plus que par le produit lui-même (atrazine ou dééthylatrazine).

De la même façon, la biodiversité et l'abondance des microorganismes des eaux sans historique de contamination à différents pesticides semblent principalement affectées par une combinaison entre concentration de produits auxquels elles sont exposées et la durée d'exposition plus que par le produit lui-même. Enfin, au-delà des aspects de bio-indication, la durée d'exposition semble réduire la proportion de la communauté dénitrifiante dans les 2 types d'eau, en conditions de laboratoire.

Ainsi, l'atrazine et la dééthylatrazine pourraient avoir un impact sur la biodiversité des eaux souterraines, impact qui pourrait être toutefois difficile à mettre en évidence *in situ*. Parmi les espèces impactées, il est possible que la communauté dénitrifiante puisse l'être. Les premières expérimentations menées dans le cadre du projet ELISE permettent de dégager des premiers résultats innovants mais qui méritent d'être complétés par des études complémentaires. Comme pour les macro-organismes, il est nécessaire de travailler sur les notions d'exposition à des mélanges de substances, ce qui est le cas *in situ*.