

INSTITUT NATIONAL
DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Unité de Science du Sol

INSTITUT NATIONAL
AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
Sciences des Sols et Hydrologie

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Docteur de l'INA PARIS-GRIGNON

par

Rahima ABDELHAFID

Minéralisation accélérée de l'atrazine dans les sols : conditions de mise en place, caractérisation et influence de la disponibilité en carbone et en azote

Soutenue le 11 Juin 1998
devant le jury composé de :

R. CALVET, Professeur (INA-PG)
G. SOULAS, Directeur de Recherches (INRA)
E. TOPP, Professeur (London, Ontario, Canada)
T. GROLLIER, (Société Novartis)
S. HOUOT, Chargée de Recherches (INRA)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

À mes très chers parents

AVANT-PROPOS

Sabine Houot, Chargée de Recherches à l'INRA (Science du Sol, Grignon) est à l'origine de ce travail de thèse. Je la remercie pour sa disponibilité permanente, sa patience, ses nombreux conseils qui ont permis la réalisation de ce travail, jusqu'à la rédaction du rapport final. Je tiens surtout à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir permis d'évoluer dans un climat de confiance et d'amitié, où mes connaissances ont évoluées dans les domaines de la microbiologie du sol et des pesticides, au cours du stage de DEA et des trois années de thèse. Ainsi, je lui suis reconnaissante de m'avoir encouragée à présenter mes résultats au cours des colloques.

Je tiens à remercier Raoul Calvet, Professeur à l'INA-PG et Directeur de l'Unité de Science du Sol à Grignon, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de présider le jury qui va juger ce travail. Je le remercie pour ses conseils scientifiques et sa disponibilité qui ont été particulièrement utiles.

Guy Soulas, Directeur de Recherches à l'INRA (Microbiologie des sols, Dijon), a suivi ce travail depuis son origine. Ses remarques constructives et les discussions au cours de la progression du travail m'ont permis d'améliorer mes connaissances concernant la dégradation biologique des pesticides. Je le remercie d'avoir accepté de faire partie du jury en tant que rapporteur.

Edward Topp, Professeur au Pest Management Research Centre (London, Ontario, Canada), a suivi ce travail depuis la première année. Je le remercie de l'intérêt qu'il a porté à ce travail et d'avoir accepté d'être le deuxième rapporteur de ce jury. Je tiens à le remercier pour ses conseils et les discussions concernant la dégradation de l'atrazine, qui ont toujours été à la fois enthousiastes et instructives. Ainsi je le remercie pour la correction de mes deux premiers articles et ses encouragements.

Thierry Grollier du Service d'Homologation à la Société Novartis, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail et de faire partie du jury.

Enrique Barriuso, Directeur de Recherches à l'INRA (Science du Sol, Grignon), a suivi ce travail depuis son origine. Je tiens à le remercier pour sa constante disponibilité et son aide qui m'ont été particulièrement utiles. Je le remercie pour ses remarques et ses conseils très constructives au cours de la réalisation de ce travail, et sa participation à la correction de son rapport final.

Ce travail a également été suivi par un comité de parrainage. Je tiens donc à remercier Lucile Jocteur Monrozier et René Bally, Chercheurs au laboratoire de Microbiologie des Sols (CNRS Lyon), Sylvie Recous, Chercheur au laboratoire d'Agronomie (Laon-Peronne), pour leurs remarques constructives sur ce travail qui m'ont permis de faire régulièrement le point sur l'état d'avancement des expérimentations.

Je tiens à remercier Marie-Paule Charnay, Maître de Conférence à l'INA-PG, et Pierre Benoit, Chargé de Recherches à l'INRA (Science du Sol, Grignon), pour leur disponibilité, leurs enthousiastes discussions et leurs encouragements.

Ce travail a été en partie supportée financièrement par un programme d'AIP (AIP-Etude et Gestion de l'Ecosystème Sol) mettant en collaboration les laboratoires de Science du Sol (INRA, Grignon), de Microbiologie des Sols (INRA, Dijon), d'Ecologie Microbienne (CNRS, Lyon) et de Pest Management Research Centre (London, Ontario, Canada).

La partie expérimentale a été réalisée grâce à la contribution de nombreuses personnes. Je remercie particulièrement Jean Noël Rampon pour m'avoir accompagnée sur les parcelles, pour les nombreux prélèvements de sol qu'il a réalisés, pour sa disponibilité et son aide au laboratoire. Je remercie Valerie Bergheaud pour son aide et ses conseils concernant les manipulations de produits radioactifs. Je remercie Thérèse Lasnier, Véronique Etiévant, Hélène Jean Jacques, Claudette de Saint Steban et Christophe Labat pour leur disponibilité et leur aide utiles, ainsi que leur bonne humeur.

De toutes ces personnes, je garderai un excellent souvenir de nos relations aussi bien au sein du laboratoire qu'à l'extérieur.

Je n'oublie pas de remercier Josiane Guillemot, Assistante Ingénieur (Science du Sol, Versailles), pour son extrême gentillesse au cours de la réalisation des dosages de carbone.

Mes remerciements vont également à Raymonde Jézéquel, Thérèse Dimey et Geneviève Fouchard, ainsi que pour les autres personnes de l'Unité de Science du Sol (INRA, Grignon) : Pierre Vachier, Serge Bourgeois, Yves Coquet, Joël Michelin..., et merci à l'équipe de la reprographie de Grignon, efficace et sympathique.

L'ambiance amicale au laboratoire a été marquée par le passage de nombreux thésards, stagiaires de DEA et DAA et post-doctoraux que j'ai eu la chance de les connaître et de passer des moments agréables avec eux, plus particulièrement avec Fatima Ziza, Safya Menasseri et Claire Serra-Wittling. Mes sincères remerciements à Nelly qui a été ma complice depuis ma première année à Grignon, dans et en dehors du laboratoire, les moments qu'on a passés ensemble resteront de bons souvenirs pour moi.

Je remercie de tout coeur mes amis qui ont toujours été disponibles pour m'accueillir chez eux ou pour me rendre visite, merci surtout pour leur soutien moral et leurs encouragements dans les moments difficiles : Féréshteh et Nouraya qui occupaient des chambres dans le même bâtiment que moi de la Rose des Vents, le sympathique couple "Amina et Kamel", ma confidente Nora et ses soeurs Zina, Houria, Aïcha et son adorable fille Lillia, Karim, la sympathique Baya, Ahmed, Samira, Sihem, Nadia et les maris de ces trois dernières.

Que tous ceux qui se sont intéressés à ce travail de près ou de loin veuillent trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Une profonde pensée à mon pays "l'Algérie" qui traverse une crise difficile, qui je l'espère ne sera que temporaire, en gardant l'espoir que le peuple Algérien revivra à nouveau dans la paix.

Résumé

La minéralisation accélérée de l'atrazine est-elle liée à l'existence d'une microflore spécifiquement adaptée à l'atrazine ? Cette microflore est-elle capable de dégrader d'autres pesticides azotés ? A quelle vitesse la minéralisation accélérée de l'atrazine se met-elle en place dans un sol ? Est ce que des apports organiques ou minéraux exogènes modifient le devenir de l'atrazine dans un sol selon que sa dégradation se fait par métabolisme ou co-métabolisme ? Ces questions sont à l'origine de ce travail. L'atrazine a été longtemps considérée comme relativement persistante dans les sols. Récemment, une dégradation très rapide de l'atrazine allant jusqu'à la minéralisation complète du cycle triazinique de cet herbicide a été montrée.

Deux parcelles situées à Grignon sous le même sol limono-argileux sont essentiellement utilisées dans ce travail : l'une sous monoculture de maïs reçoit de l'atrazine au champ annuellement, l'autre sous monoculture de blé n'en reçoit jamais.

Dans le sol limono-argileux de Grignon, la microflore peut s'adapter rapidement à la dégradation complète de l'atrazine allant jusqu'à la minéralisation du cycle triazinique. La fréquence d'application de l'atrazine au champ est le facteur prépondérant dans la mise en place de la minéralisation accélérée de l'atrazine dans ce sol. Dans ce type de sol, la dégradation de l'atrazine semble pouvoir se faire via la déalkylation initiale ou l'hydroxylation initiale. La détection de l'hydroxyatrazine est fugace quand le sol est adapté, celle-ci s'accumule quand le sol n'est pas adapté à la dégradation de l'atrazine.

Dans le sol adapté, l'addition de substrats organiques carbonés modifie peu le devenir de l'atrazine. En revanche, ceux-ci stimulent la minéralisation du cycle triazinique dans le sol non adapté confirmant la dégradation par co-métabolisme dans ce sol. Dans les deux sols, la présence d'azote minéral inhibe la minéralisation de l'atrazine. L'effet des formes organiques d'azote dépend de la vitesse de minéralisation de cet azote, donc de sa disponibilité vis-à-vis des microorganismes. Le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine augmente avec l'intensité de la minéralisation de l'azote organique. L'effet de l'azote pourrait être du à l'inhibition des enzymes intervenant dans la dégradation de l'atrazine. Si les apports carbonés stimulent la dégradation partielle de l'atrazine et la formation de métabolites, en revanche, les apports azotés inhibent également leur formation.

Dans les deux sols, des teneurs importantes en azote minéral sont nécessaires à l'inhibition de la minéralisation de l'atrazine. Les différences de disponibilité de l'azote de la matière organique du sol dues à la différenciation de leur statut organique liée à des pratiques de fertilisation différentes ne sont pas suffisantes pour modifier la cinétique de minéralisation de l'atrazine. Un apport simultané d'azote minéral et de glucose inhibe totalement la minéralisation de l'atrazine. Dans les deux sols, l'augmentation de la stabilisation de résidus inextractibles d'atrazine (résidus liés) semble associée à la stimulation de la microflore totale à la suite d'apports organiques facilement minéralisables.

Enfin, la capacité à dégrader rapidement d'autres pesticides azotés ne s'étend qu'à d'autres chloro-triazines, molécules de la même famille chimique confirmant le phénomène d'adaptation croisée. Pour l'atrazine et la simazine, les temps de demi-vie estimés sont beaucoup plus courts (5 à 7 jours) que ceux classiquement rencontrés dans la littérature.

Abstract

The objectives of this work were to study the accelerated mineralization and the effect of carbon and nitrogen availability on atrazine mineralization in two experimental plots located in Grignon (France) : a plot under maize monoculture received atrazine in field every year, and a plot had never received atrazine in field conditions.

In clay-silty soil of Grignon, the microflora can be adapted to complete the mineralization of the atrazine ring. Accelerated mineralization has been observed with repeated field applications of atrazine. Initially atrazine degradation is obtained by dealkylation or hydroxylation. The detection of hydroxyatrazine is transient in adapted soil when this by-product is accumulated in non adapted soil.

In adapted soil, addition of organic carbon substrats has no effect on atrazine behaviour. In the non adapted soil to atrazine mineralization, organic carbon substrats stimulate atrazine degradation by co-metabolism. In both soils, mineral N significantly reduces atrazine mineralization. Nitrogen availability of the different N compounds is estimated by the evolution of mineral N. The rate of atrazine mineralization decreases with N availability of the different N compounds. Mineralization could be explained by enzymatic inhibition of atrazine degradation. Organic carbon substrats also stimulate partial degradation of atrazine and formation of metabolites. Moreover, metabolites production is inhibited by nitrogen amendments.

In both soils, high concentration of mineral N are necessary for inhibiting atrazine mineralization. Availability of mineral N of soil organic matter depends on the different practice of fertilization, which are not sufficient to modify the kinetic of atrazine mineralization. Simultaneous addition of mineral N and glucose totally inhibit atrazine mineralization. In both soils, increasing of unextractables residues of atrazine (bound residues) seems to be closely related to the stimulation of microflora after amendments with easily biodegradable organic compounds.

Finally, the ability to degrade chlorotriazines and molecules of the same chemical family confirms cross-adaptation phenomenon. Estimated half-lives of atrazine and simazine are significantly shorter (5 to 7 days) than results presented in litterature.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------	----------

Première partie

Minéralisation accélérée de l'atrazine dans les sols ; comparaison avec d'autres pesticides azotés et lien avec la dynamique de la matière organique endogène des sols

Introduction	9
---------------------	----------

Chapitre 1 : Dissipation comparée de différents pesticides azotés dans deux sols pédologiquement identiques mais à statut organique différent

I. Introduction	11
II. Matériels et méthodes	11
2.1. Sols et molécules	11
2.2. Incubations	12
2.3. Extraction de l'azote minéral	15
2.4. Extractions de pesticides	15
2.5. Méthodes d'analyses	17
a. CO ₂	17
b. Azote minéral	17
c. Pesticides	17
III. Résultats et discussion	19
3.1. Activité de la microflore totale	19
3.2. Dissipation des pesticides au cours des incubations	23
IV. Conclusion	28

Chapitre 2 : Relation entre l'historique cultural de parcelles et le devenir de l'atrazine : comparaison avec d'autres pesticides azotés

I. Introduction	31
II. Matériels et méthodes	32
2.1. Sols	32
2.2. Molécules pesticides	33
2.3. Incubations en absence de pesticides	33
2.4. Incubations en présence de pesticides	34
2.5. Caractérisation de la radioactivité extractible	35
2.6. Caractérisations biologiques	35
2.6.1. Mesure de la biomasse microbienne totale	35
2.6.2. Dénombrements de la microflore totale	36
2.6.3. Numération des populations dégradant l'atrazine et la simazine	37
III. Résultats et discussion	37
3.1. Activité microbienne totale	37
3.2. Evolution de l'atrazine au cours des incubations	39
3.2.1. Minéralisation	43
3.2.2. Population dégradante	44

3.2.3. Distribution de la radioactivité totale	45
3.2.4. Caractérisation de la radioactivité extractible	47
3.3. Evolution de la simazine au cours des incubations	53
3.3.1. Minéralisation	53
3.3.2. Population dégradante	53
3.3.3. Distribution de la radioactivité totale	55
3.3.4. Caractérisation de la radioactivité extractible	57
3.4. Evolution du triticonazole au cours des incubations	63
3.4.1. Minéralisation	63
3.4.2. Distribution de la radioactivité totale	65
3.4.3. Caractérisation de la radioactivité extractible	65
IV. Conclusion	69
Conclusion de la première partie	73

Deuxième partie

Vitesse de mise en place de la minéralisation accélérée de l'atrazine - Contribution à la caractérisation de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine dans les sols

Introduction	75
Chapitre 3 : Vitesse de mise en place de la minéralisation accélérée de l'atrazine	
I. Introduction	79
II. Matériel et méthodes	79
2.1. Sols - molécule	79
2.2. Incubations	80
2.3. Numérations de la microflore dégradant l'atrazine	81
III. Résultats	81
3.1. Mise en évidence de problèmes expérimentaux	81
3.2. Variation de la minéralisation de l'atrazine avec sa dose d'application	81
3.3. Variation de la minéralisation de l'atrazine en fonction du nombre d'applications de l'herbicide	83
3.4. Evolution de la taille de la population dégradant l'atrazine	86
3.5. Caractérisation de l'extractibilité et de la nature des résidus	87
IV. Discussion et conclusion	95
Chapitre 4 : Contribution à la caractérisation de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine	
I. Introduction	101
II. Protocole expérimental	101
III. Résultats et discussion	103
3.1. Evolution de la répartition de la ¹⁴ C-atrazine au cours des incubations	103
3.2. Etude de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine	107
IV. Conclusion	113
Conclusion de la deuxième partie	115

Troisième partie

Influence de la disponibilité en carbone et en azote exogènes sur le devenir de l'atrazine dans deux sols : variation avec la microflore responsable de la dégradation

Introduction 117

Chapitre 5 : Variation du devenir de l'atrazine en fonction de la nature du substrat carboné et la disponibilité de l'azote

Dependence of atrazine degradation rate on C and N availability in soils : variation with the responsible microflora 121

Chapitre 6 : Variation du devenir de l'atrazine avec la nature de la source d'azote

Dependence of atrazine behaviour in soils on available nitrogen forms 145

Chapitre 7 : Variation de la dégradation de l'atrazine avec la concentration en carbone et en azote dans le milieu

How increasing availability of C and N affects atrazine behaviour in soils 163

Conclusion de la troisième partie 185

Conclusion générale 187

Références bibliographiques 191

Annexes 202

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dès qu'un pesticide atteint le sol, il se distribue dans les trois phases du sol : solide, liquide et vapeur. Cette répartition dépend des caractéristiques du pesticide appliqué et de celles du sol. La part du pesticide la plus mobile est celle localisée dans les phases liquide et vapeur, et constitue la part du pesticide disponible (Barriuso et al., 1994). Généralement la fraction présente dans la solution du sol est celle qui est disponible pour atteindre sa cible, dont dépend l'efficacité du produit. Mais également, cette fraction disponible peut être dégradée par voie physico-chimique sous l'influence de divers facteurs (rayonnement solaire, constituants du sol), et par voie biologique sous l'action des microorganismes du sol. Egalement d'un point de vue environnemental, cette fraction disponible est susceptible de migrer dans les horizons profonds du sol et d'atteindre les eaux profondes.

La dégradation, qui comprend la minéralisation de la molécule mère mais aussi sa transformation en dérivés, et la stabilisation par formation de résidus non extractibles dits résidus liés sont deux voies de dissipation qui sont responsables de la diminution de la concentration du pesticide dans la solution du sol. Comme d'autres polluants organiques, les pesticides et leurs produits de dégradation évoluent vers des résidus de moins en moins disponibles (Schiavon, 1980 ; Scheunert, 1992), cette évolution est considérée comme un processus de stabilisation responsable de l'immobilisation des pesticides dans le sol. La rétention est souvent la première étape de cette stabilisation. Généralement la matière organique participe à la rétention des pesticides (Hamaker et Thompson, 1972 ; Khan, 1980 ; Boyd et al., 1989), qui est corrélée avec les teneurs en carbone organique des sols (Calvet, 1988). Ce phénomène de rétention s'accroît en cas d'amendements organiques (Shea, 1989 ; Alva et al., 1990 ; Scheunert, 1992).

Les interactions initiales responsables de la rétention des pesticides après leur arrivée dans le sol sont principalement de nature physico-chimique et sont considérées comme réversibles; elles correspondent aux réactions d'adsorption et de désorption (Calvet, 1989). Cependant, les phénomènes de rétention ne sont pas complètement réversibles pour certains pesticides, et la réversibilité diminue avec le temps de séjour des molécules dans le sol (Barriuso et al., 1992). Les interactions entre les constituants des sols et les pesticides évoluent donc probablement au cours du temps. Par conséquent, cette évolution se traduit par une stabilisation des polluants et de leurs produits de dégradation qui forment progressivement des résidus de moins en moins disponibles (Schiavon, 1980 ; Calderbank, 1989 ; Barriuso et

al., 1992). De nombreux travaux ont montré que la proportion des résidus non extractible des polluants organiques, par rapport à la totalité des résidus restant dans le sol, augmentent avec le temps (Lichtenstein et al., 1977 ; Schiavon, 1988 ; Bertin et Schiavon, 1989).

La plupart des pesticides qui parviennent au sol sont dégradés par voie microbienne (Cook, 1987 ; Bollag et Liu, 1990). Cette dégradation microbiologique des pesticides est un facteur important pour leur persistance dans les sols. Deux voies de biodégradation microbienne des pesticides peuvent être distinguées (Soulas, 1985) : (1) la dégradation par voie métabolique, le pesticide fournit le carbone et l'azote et / ou l'énergie nécessaire à la croissance de la microflore microbienne. Dans ce cas la microflore métabolisante est spécifique ; (2) la dégradation par co-métabolisme où la population microbienne impliquée ne peut se développer que dans la mesure où les microorganismes trouvent dans le milieu un autre substrat plus facilement accessible. Cette dégradation est incomplète ou ne progresse pas à une vitesse suffisante pour que des quantités appréciables d'énergie puissent être récupérées par les populations microbiennes.

La capacité de la microflore du sol à dégrader une molécule herbicide dépend de nombreux facteurs. Pour que le pesticide soit dégradé, il faut qu'il soit biodisponible. La diminution de sa biodisponibilité dans la solution du sol due aux phénomènes de rétention et de diffusion, explique le ralentissement de la dégradation (Schiavon, 1980 ; Scow et Huston, 1992 ; Chung et al., 1993 ; Barriuso et al., 1994).

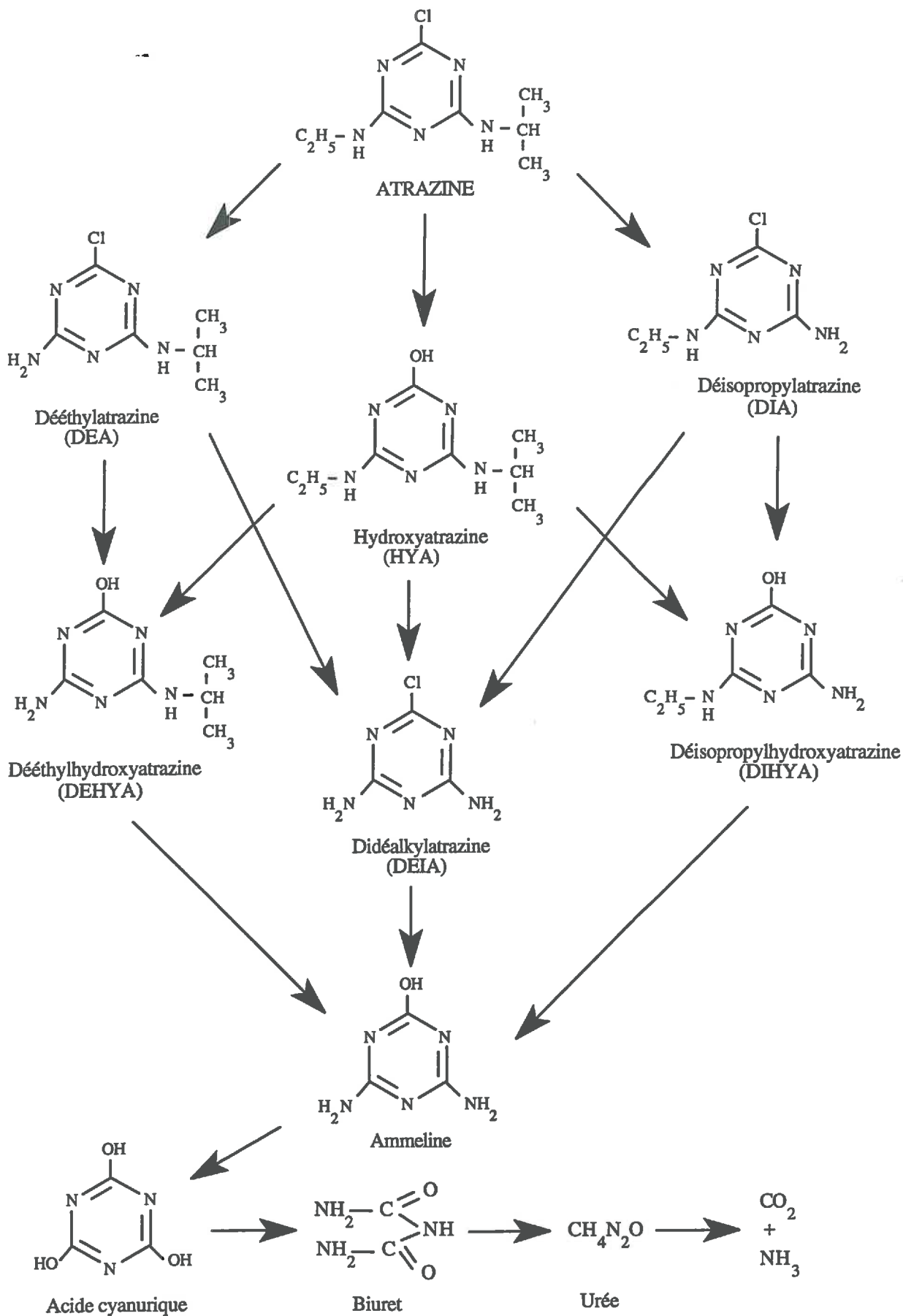
La simple observation agronomique suggère des modifications d'activité de la population dégradante qui est souvent conditionnée par l'historique de traitement du sol. Dans certaines conditions, on peut avoir un phénomène d'adaptation des populations microbiennes qui peut se traduire par une augmentation de la vitesse de dégradation du produit liée à la sélection de souches de microorganismes ayant des systèmes enzymatiques spécialisés dans la dégradation d'un pesticide (Fournier, 1989 ; Charnay, 1993). La dégradation accélérée des pesticides résulte de l'adaptation de la microflore du sol à la dégradation des xénobiotiques après plusieurs applications. Elle a été largement étudiée lors des dix dernières années, principalement à cause de ses conséquences vis-à-vis de la protection des cultures (Suett et al., 1996). Ce phénomène a été mis en évidence notamment pour des nématicides (Verhagen et al., 1996 ; Smelt et al., 1996), des fongicides (Bailey et Coffey, 1986), des insecticides comme le carbofuran (Charnay, 1993 ; Morel-Chevillet et al., 1996 ; Ambrosoli et al., 1996), et des herbicides comme le linuron, l'alachlor, le monolinuron, la propyzamide, la métamitron (Walker et Welch, 1991, 1992). Cette dégradation accélérée peut s'étendre à des

pesticides de la même famille à structure chimique proche (Mueller et al., 1989 ; Tal et al., 1990). On parle alors de phénomène d'adaptation croisée de la microflore.

L'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropyl-amino-s-triazine) est un herbicide de la famille des s-triazines couramment utilisé dans la culture de maïs. L'atrazine est considérée comme relativement persistante dans les sols avec des temps de demi-vie allant de 35 à 50 jours (Walker, 1978 ; Green et al., 1993 ; Obrador et al., 1993). La mobilité des polluants dans le sol est directement liée à leurs caractéristiques de rétention. L'atrazine étant relativement peu retenue dans le sol, elle peut migrer en profondeur et contaminer les eaux profondes (Barriuso et al. 1996).

Les premiers travaux sur la dégradation biologique de l'atrazine ont montré une minéralisation plus importante des radicaux alkylés (Kaufman et Kearney, 1970) que du cycle triazinique (Dao et al., 1979). Par la suite, Metzger et al. (1987), Mandelbaum et al. (1993a) et Radosevich et al. (1995) ont observé une dégradation importante du cycle triazinique. La dégradation de l'atrazine et de ses métabolites fait intervenir des réactions de N-déalkylation, d'hydroxylation et de clivage du noyau s-triazinique (figure 1). Certains travaux anciens ont montré que l'activité fongique avait un rôle important dans la déalkylation (Kaufman et Blake, 1970 ; Wolf et Martin, 1975). En revanche, l'hydroxylation a longtemps été considérée comme une voie de dégradation physico-chimique (Armstrong et al., 1967 ; Skipper et Volk, 1972). Cependant des travaux récents démontrent la participation de l'activité biologique (fongique ou bactérienne) dans ce processus (Mandelbaum et al., 1993b ; Mougin et al., 1994 ; Bouquard et al., 1997). L'hydroxylation et la déalkylation sont les deux principales voies de la dégradation de l'atrazine avant le clivage du cycle triazinique (Hickey et al., 1994 ; Radosevich et al., 1995 ; Van Zwieten et Kennedy, 1995). Toutefois, le clivage du cycle triazinique se produit seulement après l'hydroxylation (Kaufman et Kearney, 1970 ; Goswami et Green, 1971 ; Gan et al., 1996). Des microorganismes capables de dégrader très rapidement et entièrement l'atrazine ont été isolés dans différents travaux (tableau 1). Ils utilisent l'atrazine comme seule source de carbone et d'azote (Cook et Hütter, 1981 ; Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994), comme seule source de carbone (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1993, 1995) ou comme seule source d'azote (Mandelbaum et al., 1993a ; Radosevich et al., 1995).

Figure 1: Voies de dégradation de l'atrazine dans le sol d'après Kruger et al. (1993).



Plus récemment, l'étude de Barriuso et Houot (1996) rapporte la possibilité de minéralisation accélérée de l'atrazine. Ils montrent la relation entre la vitesse de dégradation de l'atrazine et sa fréquence d'application au champ. Cette dégradation est très rapide et va jusqu'à la minéralisation complète du cycle triazinique de l'atrazine. L'éventualité de la dégradation accélérée de l'atrazine a été confirmée par Perkovich et al. (1996), Vanderheyden et al. (1996) et Pussemier et al. (1997). Topp et al. (1995) mettent également en évidence la minéralisation rapide de l'atrazine dans des sédiments.

La teneur en matière organique des sols influe sur la rétention des pesticides appliqués (Shea, 1989; Alva et al., 1990; Scheunert, 1992), ce qui conditionne leur biodisponibilité et leur dégradation. Ainsi Yanze-Kontchou et Gschwind (1995) ont montré que l'adsorption de l'atrazine et sa dégradation sont influencées par la teneur en matière organique des sols. La dégradation de l'atrazine varie avec la disponibilité en carbone et en azote. Un apport d'azote minéral important inhibe la minéralisation de l'atrazine (Alvey et Crowley, 1995). Dans un sol où vraisemblablement existe une microflore spécifique responsable de la dégradation rapide de l'atrazine, sa vitesse de dégradation augmente en cas de stress azoté et en présence de carbone facilement métabolisable ; en revanche, elle ralentit en présence d'azote minéral disponible (Abdelhafid, 1994). Les amendements organiques en augmentant la rétention de l'atrazine, diminuent sa biodisponibilité et ralentissent sa dégradation (Alvey et Crowley, 1995 ; Barriuso et al., 1997 ; Houot et al., 1998). Paya-Perez et al. (1992) ont montré que la rétention de l'atrazine augmente avec le degré de maturité de la matière organique. En revanche, dans une autre situation où a également été mise en évidence une microflore spécifique responsable de la dégradation, des épandages de lisiers accélèrent la dégradation de l'atrazine (Topp et al., 1996). Enfin, dans un sol où la dégradation de l'atrazine se fait par co-métabolisme, des apports de différents substrats minéraux ou carbonés stimulent la dégradation de l'atrazine (Hance, 1973).

Les objectifs de ce travail visent à caractériser la minéralisation accélérée de l'atrazine observée dans le sol brun lessivé de Grignon. La minéralisation accélérée de l'atrazine est liée à l'existence d'une microflore spécifique capable d'utiliser l'atrazine vraisemblablement comme source d'azote. Cette capacité résulte-t-elle de l'existence d'une microflore spécifiquement adaptée à l'atrazine, ou cette microflore est-elle capable de dégrader d'autres triazines ou d'autres pesticides azotés ? A quelle vitesse la minéralisation accélérée de l'atrazine se met-elle en place dans un sol, ou encore, combien d'applications d'atrazine sont-elles nécessaires avant de modifier la cinétique de minéralisation de l'atrazine dans un sol ? Quelles sont les étapes intermédiaires de la dégradation de l'atrazine dans notre sol ? Si la

Tableau 1 : Récapitulatif des différents auteurs ayant étudiés la dégradation de l'atrazine et de ses métabolites sur milieux de culture, avec des microorganismes isolés dégradants l'atrazine.

Auteurs	Microorganismes mis en jeu	Réactions impliquées
Skipper et al. (1967)	bactéries	hydroxylation
Kaufman et Blake (1970)	champignons	déalkylation / hydroxylation
Giardina et al. (1980)	<i>Nocardia</i> sp.	déalkylation
Cook et Hütter (1981)	<i>Pseudomonas</i> sp.	déalkylation
Giardina et al. (1982)	<i>Nocardia</i> sp.	déalkylation
Behki et Khan (1986)	<i>Pseudomonas</i> sp.	déalkylation
Behki et al. (1993)	<i>Rhodococcus</i> Strains	déalkylation
Korpraditskul et al. (1993)	bactéries	déalkylation
Mandelbaum et al. (1993a*, 1993b*)	bactéries	hydroxylation
Assaf et Turco (1994)*	consortium microbien	hydroxylation
Behki et Khan (1994)*	<i>Rhodococcus</i> Strains	déalkylation
Hickey et al. (1994)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	hydroxylation / déalkylation
Yanze-Kontchou et Gschwind (1994)*	<i>Pseudomonas</i> Strain	hydroxylation / déalkylation
De Souza et al. (1995)*	<i>Pseudomonas</i> sp.	hydroxylation
Mandelbaum et al. (1995)*	<i>Pseudomonas</i> sp.	hydroxylation / déalkylation
Radosevich et al. (1995)*	bactéries	hydroxylation / déalkylation
Van Zwieten et Kennedy (1995)*	<i>Rhodococcus</i> sp.	hydroxylation / déalkylation
Bouquard et al. (1997)	<i>Rhizobium</i> sp.	hydroxylation

* dégradation et / ou minéralisation rapide

dégradation de l'atrazine, qui est utilisée comme source d'azote par les microorganismes, est réprimée par un apport d'azote minéral, est ce que des différences de disponibilité en azote dans les sols peuvent influencer la capacité de leur microflore à dégrader l'atrazine ? Ou faut-il un apport massif d'azote exogène pour modifier la dégradation de l'atrazine ? Est ce que la nature de l'azote apporté influence son effet ? Est ce que ces apports organiques ou minéraux exogènes modifient de la même façon le devenir de l'atrazine dans les sols où sa dégradation se fait par métabolisme ou co-métabolisme ?

Dans la **première partie**, on s'intéressera à l'influence de la disponibilité du carbone et de l'azote de la matière organique endogène des sols sur la dégradation de l'atrazine. Pour cela, on étudiera le devenir de l'atrazine dans des sols similaires au plan pédologique, où les pratiques culturales de fertilisation ont créé des différences dans le statut organique des sols et donc des différences de quantités de carbone et d'azote facilement minéralisables. On comparera l'atrazine à d'autres pesticides azotés afin de tester la capacité de la microflore qui dégrade rapidement l'atrazine à utiliser l'azote d'autres pesticides.

Dans la **seconde partie**, on essaiera de déterminer à quelle vitesse peut apparaître la minéralisation accélérée de l'atrazine, combien d'applications d'atrazine sont-elles nécessaires pour voir apparaître la minéralisation accélérée de l'atrazine ? Par quelles étapes passe la minéralisation accélérée de l'atrazine ?

Dans la **troisième partie**, on étudiera l'influence de la disponibilité en carbone et en azote exogène sur l'évolution de l'atrazine en fonction de la microflore responsable de la dégradation de l'atrazine dans deux sols. L'un présente une microflore adaptée à la minéralisation accélérée de l'atrazine, l'autre ne possède pas une telle microflore. On s'intéressera à trois points :

- Quelle est l'influence de la nature des sources de carbone et d'azote sur le devenir de l'atrazine ?
- Quel est le niveau d'apport en carbone et en azote nécessaire pour qu'on observe un effet sur le devenir de l'atrazine ?
- Comment interagissent les apports de carbone et d'azote sur la dégradation de l'atrazine ?

Dans toute la thèse sauf au premier chapitre, l'atrazine utilisée est uniformément marquée au ^{14}C sur le cycle triazinique, ce qui permet de suivre la minéralisation du cycle triazinique de l'atrazine, d'estimer la part de l'atrazine initiale stabilisée sous forme de résidus inextractibles, enfin de caractériser les métabolites et d'évaluer la voie de dégradation de la molécule.

PREMIERE PARTIE

**Minéralisation accélérée de l'atrazine dans les sols ;
comparaison avec d'autres pesticides azotés et lien
avec la dynamique de la matière organique endogène
des sols**

Introduction

L'atrazine a longtemps été considérée comme relativement persistante dans les sols avec des temps de demi-vie allant de 35 à 50 jours (Walker, 1978 ; Green et al., 1993 ; Obrador et al., 1993). Récemment, une étude rapporte la relation entre la vitesse de dégradation de la molécule et sa fréquence d'application au champ (Barriuso et Houot, 1996). Cette dégradation est très rapide et va jusqu'à la minéralisation complète du cycle triazinique par une microflore spécifique adaptée à cet herbicide dans des sols prélevés sous monoculture de maïs, traités tous les ans au champ par l'atrazine. L'éventualité de la dégradation accélérée de l'atrazine a été confirmée par Pussemier et al. (1997) et Vanderheyden et al. (1997).

La dégradation accélérée d'un pesticide peut s'étendre à des pesticides de la même famille à structure chimique proche ; on parle alors de phénomène d'adaptation croisée (Mueller et al., 1989 ; Tal et al., 1990). Concernant l'atrazine, ce phénomène a été observé par Barriuso et Houot (1996) qui montrent que dans un sol où l'atrazine se minéralise rapidement, la simazine, autre triazine, se minéralise également rapidement. L'adaptation de la microflore du sol semble cependant ne s'étendre qu'aux chloro-triazines.

Dans un travail préliminaire, on a montré que la dégradation de l'atrazine apparaît liée à la disponibilité en carbone et en azote dans le milieu (Abdelhafid, 1994). Lorsque l'atrazine est utilisée comme seule source de carbone et d'azote, sa dégradation est rapide. Cette dégradation est stimulée par un apport de glucose. En revanche, la présence d'azote minéral ralentit la dégradation de l'atrazine. En maintenant des pratiques culturales distinctes dans un sol, on peut modifier le statut organique des sols et en particulier la quantité d'azote potentiellement minéralisable (Houot et Chaussod, 1995). Cette différence peut-elle créer des différences de vitesse de dégradation de l'atrazine ? L'hypothèse est la suivante : si l'atrazine est minéralisée par des microorganismes qui utilisent son azote, sa dégradation devrait être influencée par la disponibilité en azote minéral dans le milieu.

Les objectifs de cette première partie sont de répondre à deux questions :

- Si la dégradation de l'atrazine est liée à la disponibilité en carbone et en azote dans le milieu, est-ce que la différenciation de la dynamique de la matière organique des sols induite par des pratiques culturales différentes dans un sol initialement homogène suffit à induire des différences de vitesse de dégradation de l'atrazine ?

- Si dans un sol, on observe une dégradation accélérée de l'atrazine par une microflore utilisant l'azote de l'atrazine comme source d'azote et que cette dégradation accélérée est liée à la disponibilité en azote dans le milieu, la dégradation accélérée d'autres pesticides azotés peut-elle aussi s'observer ? En d'autres termes, la microflore responsable de la dégradation rapide de l'atrazine est-elle capable de dégrader d'autres pesticides azotés en vue d'utiliser leur azote, et cette dégradation est-elle plus ou moins rapide en fonction de la disponibilité en azote dans le milieu ?

Chapitre 1 : Dissipation comparée de différents pesticides azotés dans deux sols pédologiquement identiques mais à statut organique différent

I. Introduction

Dans ce premier chapitre, nous abordons la réponse aux deux questions posées dans l'introduction de la première partie. Le devenir de différents pesticides azotés est étudié dans des sols provenant de parcelles du dispositif "Dehérain" à Grignon. Celui-ci a été créé en 1875 pour étudier l'effet de fertilisations minérales et organiques sur les rendements d'une rotation blé-betterave (Morel et al., 1984). Dans ce dispositif, les modes de fertilisation distincts ont créé des statuts organiques différents dans les divers traitements. Cela se traduit par des teneurs en matière organique, en biomasse microbienne différentes (Houot et Chaussod, 1995) mais également par des quantités d'azote potentiellement minéralisable différentes (Houot et al., 1989 ; Houot et Chaussod, 1995). Depuis 1987, la rotation blé-betterave a été remplacée par une monoculture de maïs. Les parcelles de ce dispositif sont traitées à l'atrazine (1.5 kg ha^{-1}) depuis la mise en place de la culture de maïs. La minéralisation de l'atrazine est donc potentiellement rapide dans toutes les parcelles. L'atrazine étant utilisée comme source d'azote, sa vitesse de minéralisation pourrait être modulée par la disponibilité de l'azote dans les sols provenant de traitements différents.

Les parcelles du dispositif "Dehérain" ne reçoivent que de l'atrazine. La microflore des sols n'est donc potentiellement adaptée qu'à cette molécule. La possibilité d'adaptation croisée de la microflore à dégrader d'autres triazines sera testée, ainsi que la capacité de la microflore à dégrader d'autres pesticides azotés de familles différentes. Dans tous les cas, l'effet de la disponibilité en azote minéral dans les sols sur la dégradation des différents pesticides sera pris en compte.

II. Matériel et méthodes

2.1. Sols et molécules

Les sols proviennent du dispositif expérimental "Dehéraïn" situé à Grignon (Yvelines, France). Il est situé dans le fond du Vallon du rû de Gally, sur un terrain très légèrement incliné vers le nord. Son sol est de type brun calcaire colluvial. Le champ d'expériences a été créé en 1875 pour étudier l'effet de fertilisations minérales et organiques sur les rendements d'une rotation blé-betterave (Morel et al., 1984). Depuis 1987, la rotation blé-betterave a été remplacée par une monoculture de maïs. Les parcelles de ce dispositif sont traitées à l'atrazine (1.5 kg ha^{-1}) depuis la mise en place de la culture de maïs. Les traitements de ce dispositif comprennent différents niveaux de fertilisation azotée. Les deux sols utilisés proviennent de deux parcelles recevant deux niveaux de fertilisation minérale : 0 kg N ha^{-1} dans la parcelle D4 et 174 kg N ha^{-1} dans la parcelle D10. Les horizons de surface (0-20 cm) sont prélevés en Mars 1995 et tamisés à 5 mm. Les principales caractéristiques physico-chimiques des deux sols sont données dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Caractéristiques physico-chimiques des horizons de surface (0-20cm) des sols provenant des deux parcelles du dispositif "Dehéraïn". (Analyses réalisées au laboratoire d'Analyses de sols d'Arras).

Sols	Fertilisation kg N ha^{-1}	Granulométrie			C organique g kg^{-1}	N total	CaCO_3	pH (eau)
		Argiles	Limons	Sables				
D4	0	259	470	250	9.0	1.01	72	8.4
D10	174	255	488	265	10.7	1.24	34	8.2

Douze pesticides azotés ont été utilisés dans cette expérience appartenant à différentes familles, tous appliqués sur le sol et efficaces par voie systémique. Tous sont des pesticides azotés, certains sont des hétérocycles azotés (atrazine, simazine, terbutryne, metribuzine, terbacile, triticonazole, dimefuron) d'autres non (diuron, isoproturon, pendiméthaline, trifluraline, carbétamide). Ces pesticides sont tous des herbicides sauf le triticonazole qui est un fongicide. Les caractéristiques de ces molécules sont données dans le tableau 1.2 et en annexe 1.

2.2. Incubations

Tableau 1.2 : Principales caractéristiques des pesticides azotés utilisés (Dabène et al., 1995 ; Hornsby et al., 1996 ; Barriuso et al., 1997 ; Beigel, 1997).

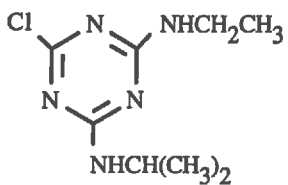
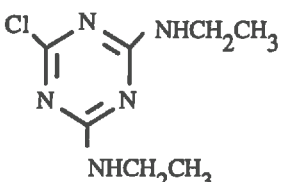
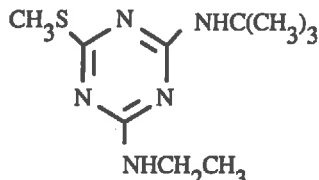
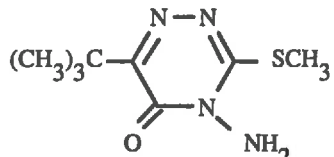
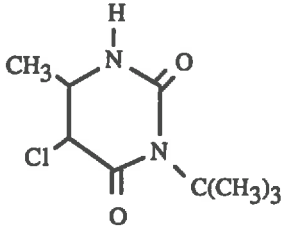
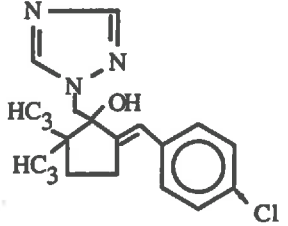
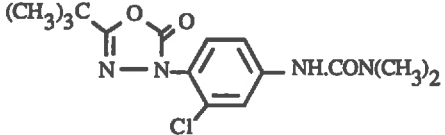
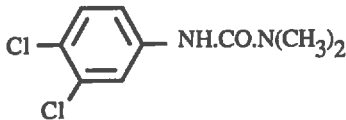
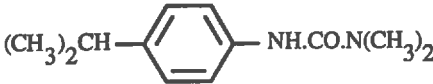
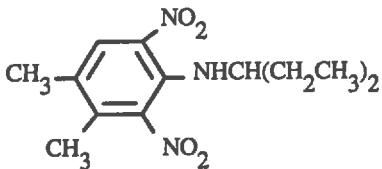
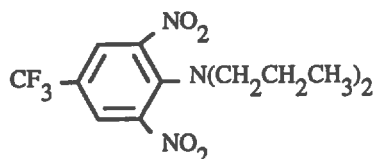
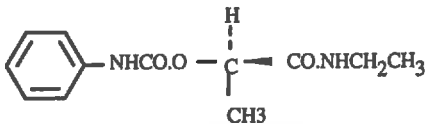
Molécules	Formule	Poids moléculaire (g)	Solubilité (mg l ⁻¹ eau)	K _{oc} (l kg ⁻¹)	Dose agronomique (kg ha ⁻¹)
<i>Pesticides heterocycliques azotés</i>					
Triazines					
Atrazine		215.7	33	57-174	1.5
Simazine		201.7	6.2	130-2200	1.5
Terbutryne		241.4	25	740-15600	2.5
Triazinones					
Métribuzine		214.3	1200	55-88	0.5-0.8
Uraciles					
Terbacile		216.7	710	55	0.6
Triazoles					
Triticonazole		317.8	8.4	480	0.12
Dérivés Oxadiazoles					
Dimefuron		338.8	16	102	3.5-4.0

Tableau 1.2 : Suite des principales caractéristiques des pesticides azotés utilisés.

Molécules	Formule	Poids moléculaire (g)	Solubilité (mg l ⁻¹ eau)	K _{oc} (l kg ⁻¹)	Dose agronomique (kg ha ⁻¹)
<u>Pesticides azotés non heterocycliques</u>					
<u>Urées substituées</u>					
Diuron		233.1	42	383-480	1.5-2.0
Isoproturon		206.3	70	80-230	1.8
<u>Dinitroanilines</u>					
Pendiméthaline		281.3	0.3	4000-29000	1.3
Trifluraline		335.5	< 1	120-13700	1.2-1.4
<u>Carbamates</u>					
Carbétamide		236.3	3.5	60-118	2.1-3.0

Des échantillons de sol frais équivalents à 40 g de sol sec sont incubés en présence de pesticides dans des flacons sérum de 500 ml fermés hermétiquement, à raison de trois répétitions, pour une durée de 28 jours, en conditions contrôlées de laboratoire (28°C, obscurité et humidité équivalente à 85% de la capacité de rétention). La teneur en eau à la capacité de rétention a été déterminée par Menasseri (1994), elle est en moyenne de 25% pour les sols de Grignon. Les quantités de pesticides appliquées sont calculées de façon à apporter la même quantité d'azote pour toutes les molécules (tableau 1.3). La référence est l'atrazine apportée à raison de 2 mg kg⁻¹ de sol (environ 4 fois la dose agronomique) soit 0.65 mg N kg⁻¹ de sol. Les molécules suffisamment solubles sont apportées en solution dans l'eau (atrazine, terbutryne, métribuzine, terbacile, isoproturon). L'humidité du sol est alors ajustée avec la solution du pesticide. Pour d'autres molécules moins solubles (simazine, triticonazole, diméfurone, diuron, carbétamide), une solution méthanolique est préparée puis diluée 4 fois dans l'eau. La solution diluée est appliquée au sol. La pendiméthaline et la trifluraline sont apportées dans 0.5 ml d'une solution méthanolique étant donnée leur très faible solubilité dans l'eau. L'humidité des sols est ensuite ajustée à l'eau. Des échantillons de sol témoins sans apport de pesticides sont également incubés dans les mêmes conditions. Leur humidité est ajustée comme les sols recevant les pesticides : eau ou eau + méthanol. Des piluliers sont introduits dans les flacons d'incubation contenant 10 ml de NaOH 0.25 N permettant de piéger le CO₂ provenant de la minéralisation du carbone organique. Après 7, 14 et 28 jours d'incubations les piluliers de soude sont prélevés pour l'analyse du C-CO₂.

2.3. Extraction de l'azote minéral

Simultanément, l'azote minéral de chaque échantillon est extrait (après 0, 14 et 28 jours d'incubation) par agitation dans 200 ml de KCl 1 M, pendant 1 heure, sur un agitateur rotatif. Après décantation et filtration sur des filtres en microfibrilles de verre (Whatman), les surnageants sont recueillis. Les extraits au KCl sont congelés jusqu'à leur analyse.

2.4. Extractions de pesticides

Immédiatement après l'apport de pesticides et en fin d'incubation (après 28 jours d'incubation), les échantillons du sol contenant des résidus de pesticides sont extraits avec 100 ml de méthanol. Après 16h d'agitation par retournement à 25 ± 1°C, les extraits sont récupérés par filtration sur papier Whatman 5 et évaporés à sec à 60°C sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi 461).

Tableau 1.3 : Concentrations des solutions de pesticides utilisées pour leur apport au début des incubations. Volumes de solutions et quantités apportées des différents pesticides au début des incubations. Ces quantités sont calculées de façon à apporter partout la même dose d'azote.

Molécules	Conditions d'apport	Concentration (mg l ⁻¹)	Volume apporté (ml 40 g ⁻¹ sol sec)	Quantité de pesticide apportée (mg kg ⁻¹ sol sec)	Quantité d'N apportée (mg N kg ⁻¹ sol sec)
Atrazine	eau	20.0	4	2.00	0.65
Simazine	eau / méthanol	18.7	4	1.87	0.65
Terbutryne	eau	22.4	4	2.24	0.65
Métribuzine	eau	24.8	4	2.48	0.65
Terbacile	eau	50.2	4	5.02	0.65
Triticonazole	eau / méthanol	49.1	4	4.91	0.65
Dimefuron	eau / méthanol	39.3	4	3.93	0.65
Diuron	eau / méthanol	54.0	4	5.40	0.65
Isoproturon	eau	47.8	4	4.78	0.65
Pendiméthaline	méthanol	348.0	4	4.35	0.65
Trifluraline	méthanol	415.1	0.5	5.18	0.65
Carbétamide	eau / méthanol	54.8	0.5	5.48	0.65

2.5. Methodes d'analyses

a. CO₂

Le CO₂ issu de la respiration au cours des incubations de sols, piégé dans la soude est dosé par colorimétrie en flux continu sur un auto analyseur Skalar (Breda, Pays Bas) selon la méthode décrite par Chaussod et al. (1986). Le CO₂ dissous est volatilisé par addition d'acide sulfurique 0.5 N à la soude. Le CO₂ est ensuite injecté dans une solution tamponnée de Na₂CO₃ et NaHCO₃ contenant un indicateur coloré, la phénolphtaléine. L'injection du CO₂ provoque une diminution du pH de la solution tampon et décolore la phénolphtaléine, ce qui est mesuré à 550 nm au spectrophotomètre.

b. Azote minéral

L'azote minéral en solution est dosé par colorimétrie en flux continu sur l'auto analyseur Skalar, en utilisant la méthode au bleu d'indophénol pour le dosage de NH₄⁺ (Krom, 1980) et de Griess Ilosvay pour le dosage de NO₃⁻ (Keeney et Nelson, 1982) après réduction des nitrates en nitrites sur une colonne de cadmium cuivré.

c. Pesticides

Toutes les molécules pesticides sauf l'atrazine et la trifluraline sont analysées en Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sur une colonne Nova-Pack C18 (4.6 x 150 mm) à l'aide d'un appareil Waters (600 E Multisolvant) muni d'un passeur automatique d'échantillons (TM 717 Autosampler). Le résidu d'évaporation de l'extrait méthanol est repris dans 3 ml de méthanol et filtré à 0.45 µm. La liste des molécules ainsi analysées et les conditions de chromatographie sont résumées dans le tableau 1.4. Le volume injecté est de 50 µl et le débit de 0.9 ml min⁻¹.

L'atrazine et la trifluraline sont dosées en Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Pour l'atrazine, le résidu sec après évaporation de l'extrait méthanolique est repris dans 3 ml d'une solution d'hexane contenant du métazachlore à 10.2 mg l⁻¹ utilisé comme étalon interne. Pour la trifluraline, l'extrait méthanolique est additionné de 500 ml d'eau, 100 ml d'une solution aqueuse saturée de NaCl et 5 ml d'hexane contenant 5.7 mg l⁻¹ de pendiméthaline comme étalon interne ; après 40 min d'agitation sur une table agitatrice, la

Tableau 1.4 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse des pesticides par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

Molécules	Longueur d'onde (nm)	Solvant (Méthanol / Eau)	Temps de rétention (min.)
Simazine	219	48 / 52	12.7
Terbutryne	224	80 / 20	8.0
Métribuzine	294	48 / 52	12.4
Terbacile	279	48 / 52	13.5
Triticonazole	262	80 / 20	6.7
Dimefuron	255	68 / 32	8.0
Diuron	255	68 / 32	7.5
Isoproturon	240	68 / 32	6.2
Pendiméthaline	240	80 / 20	21.0
Carbétamide	233	48 / 52	8.5

solution d'hexane est récupérée à l'aide d'une ampoule à décanter. Les conditions de chromatographie de l'atrazine et de la trifluraline sont les suivantes : appareil HRGC 5300 (CARLO ERBA), colonne DB-5 de 30 m de longueur et 0.32 mm de diamètre, injecteur à 250°C, détecteur thermoionique à 270°C, débit d'Hélium à la sortie de la colonne est de 1.55 ml min⁻¹, volume injecté de 1 µl, programme de température pour l'atrazine : 20°C min⁻¹ de 55°C à 140°C ; 5°C min⁻¹ de 140°C à 160°C ; 5°C min⁻¹ de 160°C à 255°C et pour la trifluraline : 20°C min⁻¹ de 55°C à 140°C ; 20°C min⁻¹ de 140°C à 160°C ; 5°C min⁻¹ de 160°C à 250°C.

III. Résultats et discussion

3.1. Activité de la microflore totale

Les quantités de carbone et d'azote minéralisées sont de 153 et 174 mg C kg⁻¹ sol sec, 9 et 13 mg N kg⁻¹ sol sec dans les échantillons témoins des parcelles D4 et D10 respectivement, en fin d'incubation (figures 1.1). La minéralisation du carbone organique total et de l'azote sont légèrement supérieures dans les échantillons de sol de la parcelle fertilisée, dont les teneurs en carbone et en azote organique sont plus élevées, que celles de la parcelle non fertilisée. La fertilisation minérale au champ permet une production végétale plus importante, ce qui se traduit après la récolte par un enfouissement d'une plus grande quantité de résidus de culture et permet d'augmenter le niveau de matière organique dans le sol et la minéralisation de carbone et d'azote.

L'apport de méthanol modifie les cinétiques du carbone (figure 1.1). Quand le pesticide est apporté dans une solution méthanolique diluée avec de l'eau comme pour la simazine, le triticonazole, le diméfuron, le diuron et le carbétamide, on observe une phase de latence durant les deux premières semaines d'incubation, puis une accélération de la minéralisation du carbone organique qui atteint 533 et 735 mg C kg⁻¹ sol sec après 28 jours d'incubation dans D4 et D10 respectivement. Cela s'expliquerait par l'effet du méthanol sur la microflore microbienne qui provoque la mortalité d'une partie de la population microbienne. Cela constitue ensuite une source de carbone facilement métabolisable qui entraînerait une augmentation de la respiration globale. Dans le cas de la pendiméthaline et la trifluraline, la minéralisation du carbone est très importante dès les premiers jours d'incubations. Ces deux pesticides ont été appliqués dans des solutions méthanoliques en ajustant l'humidité avec de l'eau, ce qui peut être un facteur favorable pour accélérer la minéralisation du carbone.

Figure 1.1 : Cinétiques de minéralisation du carbone et de l'azote dans les échantillons témoins sans pesticide dont l'humidité est ajustée avec de l'eau, du méthanol dilué avec de l'eau ou du méthanol et d'eau, dans les deux sols provenant des parcelles du dispositif "Dehérain" (D4 et D10). Les écarts-types des mesures sont indiqués lorsque ils sont plus larges que les symboles.

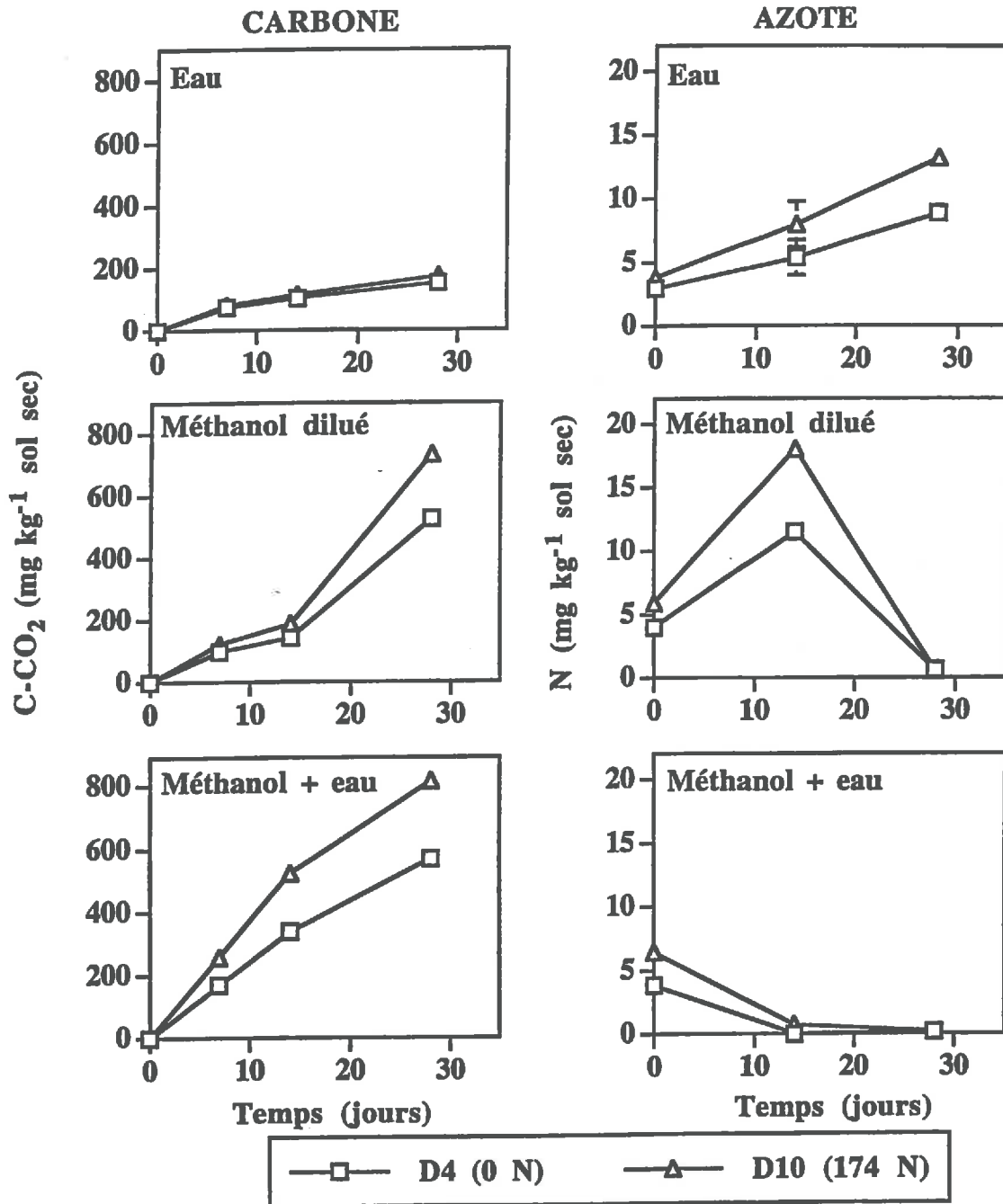


Figure 1.2. : Cinétiques de minéralisation du carbone organique total au cours d'incubations de sols provenant de parcelles du dispositif Dehérain (D4 et D10), en conditions contrôlées de laboratoire en présence ou non de pesticides. Les écarts-types des mesures sont indiqués quand ils sont plus larges que les symboles.

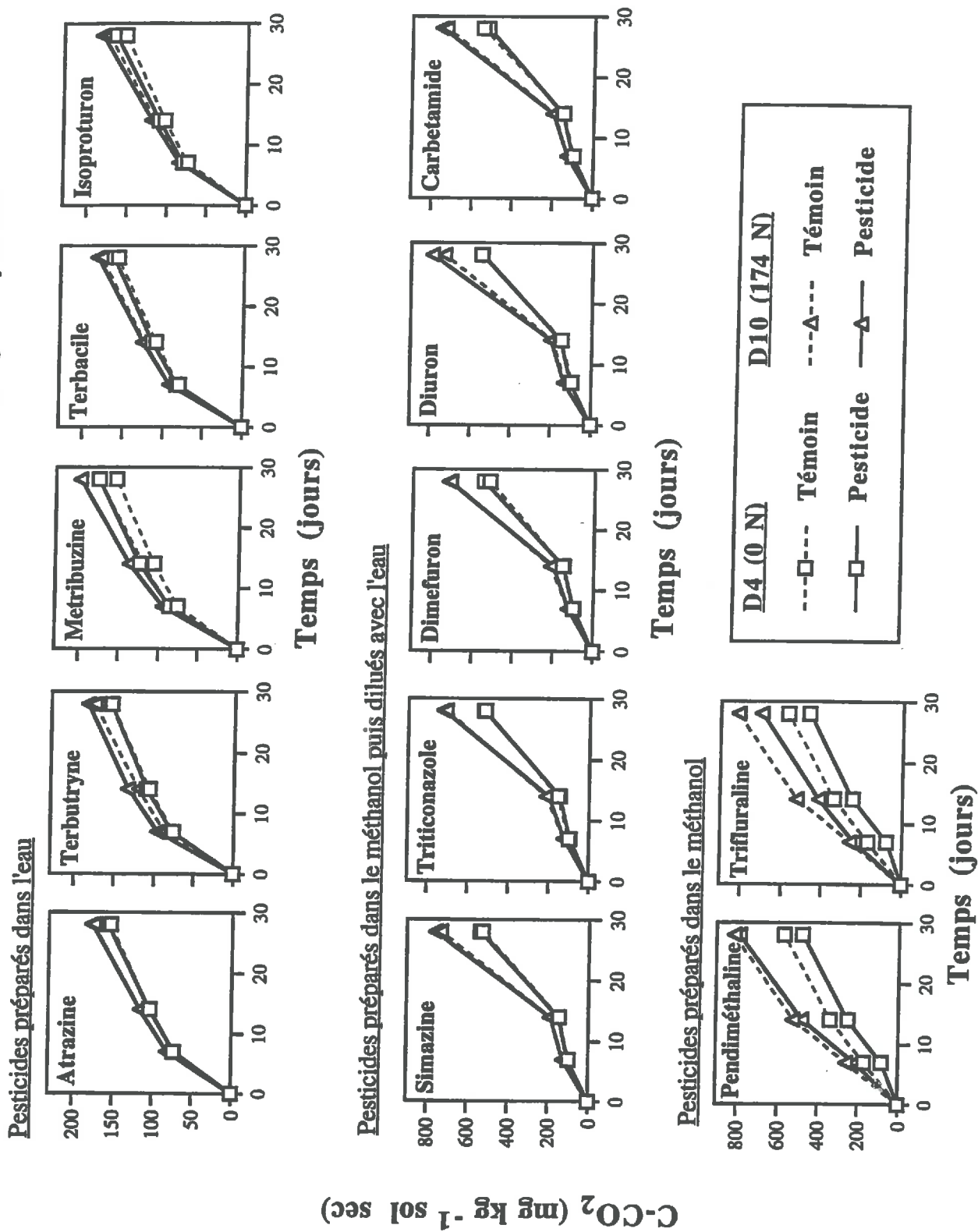
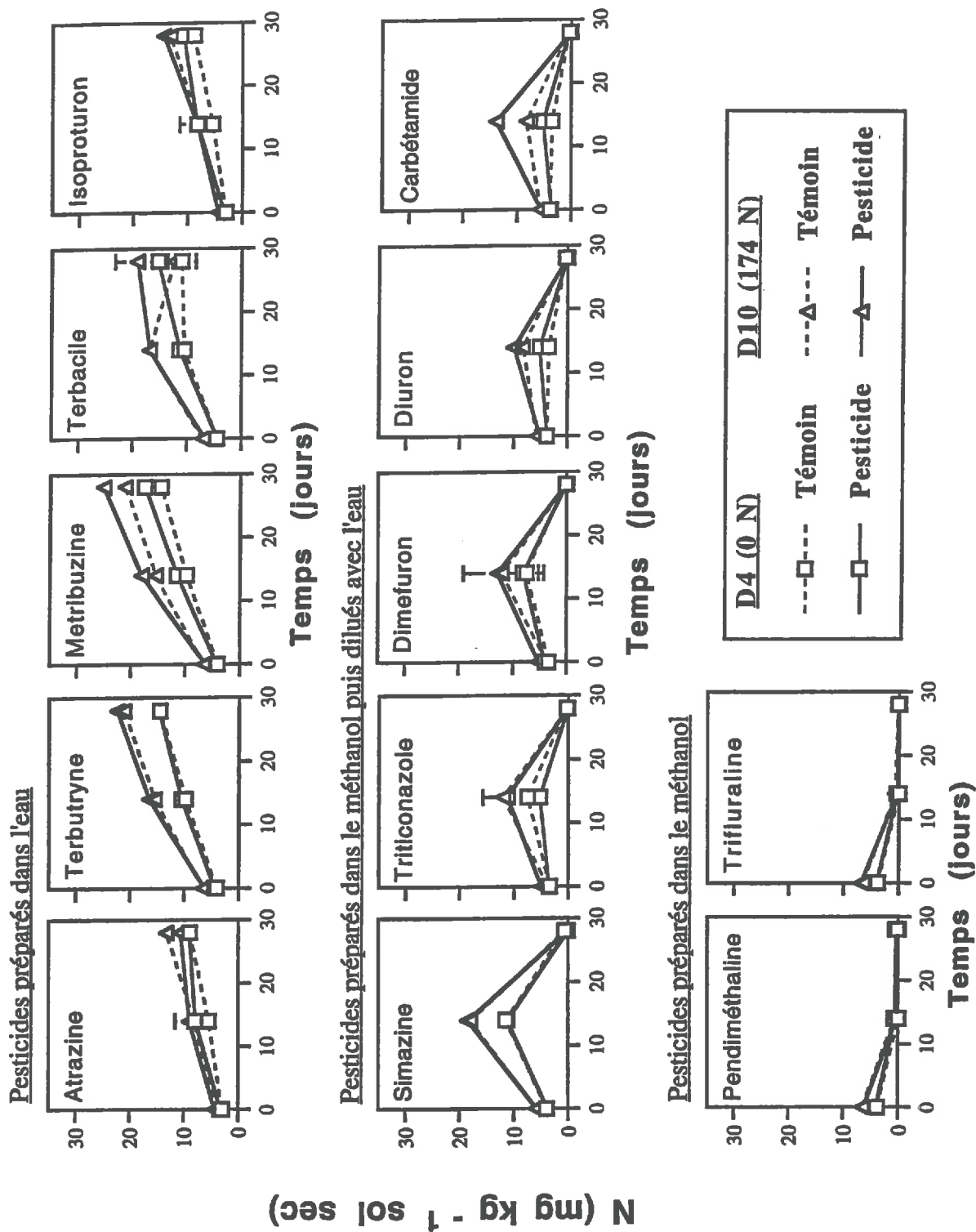


Figure 1.3 : Cnétiques d'évolution de l'azote minéral au cours d'incubations de sols provenant de parcelles du dispositif Dehérain (D4, D10), en conditions contrôlées de laboratoire en présence ou non de pesticides. Les écarts-types des mesures sont indiqués quand ils sont plus larges que les symboles.



Montavon (1984) et Fournier (1989) suggèrent la mortalité d'une partie de la population microbienne due à la toxicité de l'herbicide ou du méthanol en l'occurrence ; cette lyse de la microflore sera utilisée comme source de carbone facilement accessible aux survivants nécrophages et entraînerait une augmentation de la respiration globale des sols dans le cas des sols traités. Toutefois, la stimulation de la minéralisation du carbone qui correspond à une activité microbienne intense en cas d'apport de méthanol se traduit par des phénomènes d'immobilisation nette de l'azote minéral qui diminue au cours des incubations (figure 1.1). Les différents pesticides apportés ont très peu d'effet sur l'activité de la microflore totale des sols des deux parcelles (figures 1.2 et 1.3), sauf dans le cas de la pendiméthaline et la trifluraline où une diminution significative est observée pour les cinétiques de minéralisation du carbone. Hart et Brookes (1996) ont montré que l'application des mêmes pesticides au champ à long terme n'a pas d'effet significatif sur la biomasse microbienne et son activité, ainsi que sur la minéralisation de la matière organique du sol.

3.2. Dissipation des pesticides au cours des incubations

Immédiatement après l'apport, 85 à 100% des quantités de pesticides apportées sont extractibles (tableau 1.5). Après 28 jours d'incubation, les quantités extraites représentent 2 à 84% des quantités apportées (Figure 1.4 et tableau 1.5).

L'atrazine et la simazine disparaissent rapidement dans les sols. Il en est de même pour le carbétamide pour lequel environ 10% restent extractibles après 28 jours. Cette dissipation correspond sans doute à une dégradation microbienne (Cook, 1987 ; Bollag et Liu, 1990). La fraction résiduelle des pesticides augmente dans le sens trifluraline, terbutryne, pendiméthaline, isoproturon, metribuzine, dimefuron, terbacile, diuron et triticonazole. Dans ce travail expérimental on parlera de dissipation de pesticide, ce qui inclut la dégradation du pesticide et sa stabilisation sous forme de résidus non extractibles. Si on admet que les dissipations des différents pesticides dans les sols se font selon des cinétiques d'ordre 1, modèle souvent utilisé (Walker, 1987 ; Walker et al., 1989 ; Weed et al., 1995), il est possible d'estimer des durées de demi-vie des molécules au cours des incubations. La cinétique de dissipation d'une molécule s'écrit :

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Figure 1.4 : Quantité restante de pesticides utilisés après 28 jours d'incubations de sols provenant de parcelles D4 (0 N) et D10 (174 N) du dispositif "Dehérain".

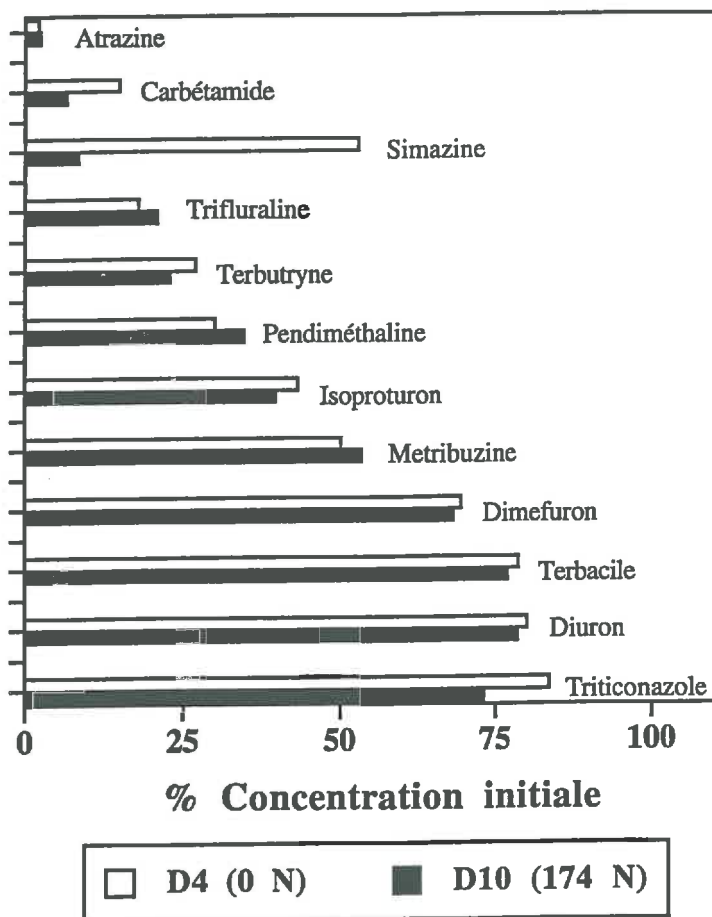


Tableau 1.5 : Fraction extractible des pesticides immédiatement après l'apport et après 28 jours d'incubation dans des sols provenant de parcelles du dispositif "Dehérain" (D4 et D10). Résultats exprimés en % de la concentration initiale.

Molécules	<u>Juste après l'apport du pesticide</u>		<u>Après 28 jours d'incubation</u>	
	D4	D10	D4	D10
Atrazine	95.2 ± 5.4	84.0 ± 1.6	2.2 ± 0.4	2.5 ± 0.2
Carbétamide	100.0 ± 2.1	100.0 ± 2.1	14.9 ± 0.1	6.7 ± 1.3
Simazine	100.0 ± 1.3	100.0 ± 3.2	52.7 ± 1.9	8.6 ± 0.0
Trifluraline	100.0 ± 13.6	100.0 ± 2.3	18.0 ± 1.9	21.0 ± 0.2
Terbutryne	95.7 ± 3.2	92.6 ± 0.2	27.0 ± 3.3	23.0 ± 2.4
Pendiméthaline	86.3 ± 6.3	85.0 ± 0.1	30.1 ± 1.4	34.7 ± 0.5
Isoproturon	93.7 ± 2.0	94.1 ± 2.2	43.1 ± 2.5	39.6 ± 0.1
Metribuzine	100.0 ± 1.1	100 ± 0.6	50.2 ± 1.0	53.5 ± 0.1
Dimefuron	99.8 ± 0.5	99.1 ± 1.5	69.5 ± 1.1	68.3 ± 2.0
Terbacile	99.9 ± 1.7	99.3 ± 2.3	78.7 ± 1.6	77.0 ± 0.8
Diuron	100.0 ± 0.5	100.0 ± 1.2	80.3 ± 3.7	78.6 ± 0.6
Triticonazole	100.0 ± 6.1	100.0 ± 2.4	83.7 ± 4.6	73.2 ± 3.6

Tableau 1.6 : Temps de demi-vie ($T_{1/2}$) estimés dans les deux sols étudiés (D4 et D10) comparés aux valeurs relevées dans la littérature correspondant à des estimations faites au laboratoire et au champ (Dabène et al., 1995 ; Hornsby et al., 1996).

Molécules	$T_{1/2}$ estimé (jours)		$T_{1/2}$ littérature (jours)	
	D4	D10	Laboratoire	Champ
Atrazine	5	5	70 à 77	60
Carbétamide	10	7	7	10-35
Simazine	30.5	8	110	60
Trifluraline	11	12.5	93-149	60
Terbutryne	14.8	13	15.2-84	42
Pendiméthaline	16	18	-	90
Isoproturon	23	21	9 à 17	12-32
Metribuzine	28	31	6 et 40	40
Dimefuron	53	51	-	170-180
Terbacile	80.8	74	-	50-175
Diuron	88	80.8	-	90
Triticonazole	109	62	-	180

où C ($\mu\text{g kg}^{-1}$) est la concentration du produit extractible au temps t (jours), C_0 est la concentration initiale du produit et k (jour^{-1}) est le coefficient de vitesse de dissipation.

La durée de demi-vie ($T_{1/2}$) est définie comme étant le temps nécessaire pour réduire de moitié la concentration initiale d'un produit. Elle est donnée par :

$$T_{1/2} = \text{Ln } 2 / k$$

Les durées de demi-vie calculées pour tous les pesticides étudiés sont données dans le tableau 1.6 et comparées à celles relevées dans la littérature. Les durées de demi-vie de l'atrazine et de la simazine sont nettement inférieures à celles de la littérature. Burkhard et Guth (1981) donnent des valeurs de temps de demi-vie pour l'atrazine de 53 et 113 jours dans deux sols différents incubés en conditions de laboratoire. Cela laisse supposer la présence dans les sols étudiés ici d'une microflore capable de dégrader activement le cycle triazinique dans ces sols. Barriuso et Houot (1996) ont en effet montré que dans un sol recevant régulièrement de l'atrazine au champ, la minéralisation de l'atrazine et de la simazine est rapide au cours des incubations de laboratoire. Cette dégradation accélérée est liée à la présence d'une chloro-substitution sur le noyau triazinique. En effet, la terbutryne qui est une triazine non chlorée se dégrade beaucoup plus lentement. Nos résultats semblent confirmer ces observations car le temps de demi-vie de la terbutryne calculé correspond aux temps rencontrés dans la bibliographie. Pour les autres molécules, les temps de demi-vie sont équivalents à ceux relevés dans la littérature à l'exception de la trifluraline où le temps de demi-vie calculé au laboratoire dans notre expérimentation (11 et 13 jours dans les parcelles D4 et D10 respectivement) est inférieur à ceux cités dans la littérature (93 à 149 jours).

Les parcelles du dispositif "Dehérain" sont cultivées en maïs depuis 1987 et reçoivent annuellement de l'atrazine au champ. Cela a conduit au développement d'une microflore adaptée à la dégradation de cette molécule. Cette dégradation accélérée s'observe sur des molécules de la même famille, si elles sont chloro-substituées (Barriuso et Houot, 1996 ; Barriuso et al., 1997). En revanche, les autres molécules ne sont pas appliquées au champ. Il n'y a donc pas eu développement de populations microbiennes adaptées à la dégradation des molécules. Leur temps de demi-vie correspond aux valeurs moyennes observées dans les autres sols. La dégradation accélérée d'une molécule pesticide est liée à son historique de traitement au champ (Walker et Welch, 1991, 1992 ; Barriuso et Houot, 1996 ; Arthur et al., 1997 ; Pussemier et al., 1997). D'autre part, la microflore adaptée à la dégradation de

l'atrazine n'est capable de dégrader rapidement que peu d'autres molécules comme d'autres triazines chloro-substituées.

Pour l'ensemble des molécules, les fractions extractibles à la fin des incubations ne sont pas significativement différentes dans les deux parcelles, à l'exception de la simazine, du carbétamide et du triticonazole pour lesquels la fraction extractible est plus élevée dans la parcelle non fertilisée (D4) que dans la parcelle fertilisée (D10). Cela semble infirmer notre hypothèse : si la dégradation rapide d'un pesticide azoté est liée à l'utilisation de l'azote de la molécule par la microflore dégradante, celle-ci devrait être modulée par la plus ou moins grande disponibilité de l'azote dans le milieu. Ici l'inverse s'observe. La dégradation est toujours plus rapide dans le sol provenant de la parcelle fertilisée où la disponibilité en azote est plus importante. L'activité microbienne est plus intense dans cette parcelle fertilisée comme en témoigne la minéralisation du carbone et de l'azote plus importante. Cela pourrait expliquer la disparition plus rapide de certaines molécules qui se dégraderaient par co-métabolisme (Hance, 1973 ; Fournier, 1989).

IV. Conclusion

La dégradation de l'atrazine est très rapide dans les deux sols, elle est similaire dans le sol fertilisé et le sol non fertilisé après 28 jours d'incubation. Cette dégradation rapide est liée à la présence d'une population microbienne active, adaptée à la dégradation de l'atrazine dans les deux sols qui sont traités avec l'atrazine depuis huit ans. La simazine qui est une triazine très proche de l'atrazine est également dégradée rapidement. Pour le reste des molécules, la dégradation est plus ou moins importante mais peu différente des valeurs rencontrées dans la bibliographie. La microflore adaptée à la dégradation de l'atrazine ne serait donc pas capable de dégrader rapidement d'autres molécules mis à part des molécules très proches comme la simazine. Il semblerait que la dégradation rapide de pesticide ne soit pas liée à la dynamique globale de la matière organique du sol et à la disponibilité de l'azote de la matière organique endogène du sol. La minéralisation du carbone et de l'azote est légèrement supérieure dans le sol fertilisé par rapport au sol non fertilisé. En revanche, la dissipation des molécules est similaire dans les deux sols voire plus rapide dans la parcelle fertilisée. Mis à part pour l'atrazine et la simazine dont la dissipation rapide des molécules semble liée à la présence d'une microflore spécifique adaptée à la dégradation du noyau triazinique, la dégradation des autres molécules se ferait plutôt par co-métabolisme et serait alors liée au niveau d'activité

biologique totale dans le sol. Celui-ci est plus intense dans la parcelle fertilisée que dans celle non fertilisée, ce qui expliquerait la dissipation plus rapide dans la parcelle fertilisée.

Dans ces résultats nous n'avons parlé que de la dissipation de l'atrazine et d'autres pesticides azotés au laboratoire. L'utilisation de molécules marquées au ^{14}C permet de donner des résultats plus précis sur le devenir des molécules au cours des incubations, en particulier cela permet de distinguer minéralisation et stabilisation sous forme de résidus liés non extractibles, cela fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2 : Relation entre l'historique cultural de parcelles et le devenir de l'atrazine : Comparaison avec d'autres pesticides azotés

I. Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'étudier plus précisément l'influence du passé cultural de sols sur l'évolution comparée de l'atrazine et de deux autres pesticides azotés au cours d'incubations au laboratoire. Deux critères sont considérés pouvant influencer l'évolution de l'atrazine : (1) la fréquence d'application au champ : l'application annuelle permet l'adaptation d'une fraction de la population microbienne à la dégradation de l'atrazine ; (2) la dynamique de la matière organique : un faible potentiel de minéralisation de l'azote stimulerait la dégradation de l'atrazine pour l'utilisation de son azote par la microflore.

Dans ce chapitre on testera la capacité des sols à dégrader deux autres pesticides hétérocycliques azotés : la simazine et le triticonazole. La simazine est une autre triazine proche de l'atrazine qui se dégrade rapidement dans les mêmes sols que l'atrazine (Barriuso et Houot, 1996) permettant de tester la possibilité d'adaptation croisée (Wilson, 1984 ; Rundyanski et al., 1987 ; Mueller et al., 1989 ; Tal et al., 1990). En revanche, le triticonazole est totalement différent de l'atrazine. Sa dégradation rapide signifierait la dégradation potentielle de nombreux pesticides hétérocycliques azotés. Dans le chapitre précédent, le devenir de douze pesticides avait été étudié afin de tester la capacité potentielle d'un sol adapté à la dégradation de l'atrazine à dégrader d'autres molécules pesticides riches en azote, la dégradation accélérée de l'atrazine étant liée à l'utilisation de son azote par les microorganismes dégradants. Cette étude n'avait mis en évidence que la possibilité d'une dégradation accélérée de la simazine autre triazine proche de l'atrazine, confirmant la possibilité d'adaptation croisée de la microflore du sol (Barriuso et Houot, 1996). Cependant les résultats étaient incomplets car n'utilisant pas de molécules marquées au ^{14}C , et ne permettaient que de donner des indications sur la dissipation des molécules dans les sols. Ici les molécules sont marquées au ^{14}C ce qui permet de préciser le devenir des molécules : minéralisation, formation de métabolites extractibles intermédiaires de la dégradation des molécules mères, stabilisation sous forme de résidus non extractibles ou résidus liés. Dans ce

chapitre, le nombre de sols augmente également et permet de mieux appréhender l'effet éventuel des pratiques culturales sur le devenir des pesticides étudiés.

II. Matériels et méthodes

2.1. Sols

Les sols proviennent de parcelles de deux dispositifs situés dans le domaine de la ferme expérimentale de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon (Yvelines). Les deux parcelles (D4 et D10) du dispositif "Dehérain" présentées au chapitre 1 sont à nouveau utilisées. Trois parcelles supplémentaires sont utilisées, localisées sur un plateau, à une altitude de 130 m dont l'assise est le calcaire lutétien, recouvert par un loess épais de 3 m environ (Cadot, 1993). Les caractéristiques géologiques et pédologiques du site sont données en annexe 2.1. Les trois parcelles incluent :

- une monoculture de maïs depuis 1980 (M80) sur laquelle l'atrazine est appliquée annuellement. Cette parcelle est restée nue entre 1992 et 1995.
- une rotation maïs-blé mise en place en 1973 (M-B73) qui reçoit de l'atrazine un an sur deux.
- une monoculture de blé mise en place en 1965 (B65) qui ne reçoit jamais d'atrazine.

Dans les trois parcelles du plateau, des engrais minéraux sont appliqués : 120 kg N ha⁻¹ et 150 kg P et K ha⁻¹. Les horizons de surface (0-20 cm) de sols sont prélevés en Octobre 1995 et tamisés à 5 mm juste après le prélèvement. Les principales caractéristiques physico-chimiques des sols utilisés sont données dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Caractéristiques physico-chimiques des horizons de surface (0-20 cm) des cinq sols provenant de parcelles expérimentales situées à Grignon. (Analyses réalisées au laboratoire d'Analyses de sols d'Arras).

Parcelles	Succession de culture	Granulométrie			C organique	N total	CaCO ₃	pH (eau)
		Argiles	Limons	Sables				
		g kg ⁻¹						
M80	Monoculture de maïs	171	729	86	11.4	1.27	21	8.0
M-B73	Rotation maïs-blé	261	584	140	14.2	1.42	13	7.9
B65	Monoculture de blé	241	445	171	17.4	1.66	61	8.0
D4	Monoculture de maïs	259	470	250	9.0	1.01	72	8.4
D10	Monoculture de maïs	255	488	265	10.7	1.24	34	8.2

2.2. Molécules pesticides

Trois molécules sont utilisées : l'atrazine, la simazine et le triticonazole présentées au chapitre précédent. L'atrazine est marquée uniformément sur le cycle triazinique (activité spécifique : $0.67 \text{ GBq mmol}^{-1}$, pureté $> 95\%$) est achetée chez Amersham (France, SA). La simazine est également uniformément marquée sur le cycle triazinique (activité spécifique : $0.20 \text{ GBq mmol}^{-1}$, pureté $\leq 95\%$). Elle est fourni gracieusement par Ciba-Geigy (France). Le triticonazole est marqué sur le noyau triazole (activité spécifique : 1.12 GBq , pureté $> 92\%$). Il est fourni gracieusement par Rhône-Poulenc (Lyon, France). Une solution d'atrazine à 8.0 mg l^{-1} et 6.1 MBq l^{-1} est préparée dans l'eau. Une solution de simazine à 20.0 mg l^{-1} et 10.0 MBq l^{-1} est préparée dans le méthanol. Une solution de triticonazole à 20.0 mg l^{-1} et 12.0 MBq l^{-1} est préparée dans le méthanol. Les étalons d'atrazine et de ses métabolites (hydroxyatrazine : HYA ; dééthylatrazine : DEA ; déisopropylatrazine : DIA ; dééthyldéisopropylatrazine : DEIA) proviennent de chez ChemService (West Chester, PA, USA).

2.3. Incubations en absence de pesticides

La minéralisation du carbone et de l'azote du sol est étudiée dans les cinq sols au cours d'incubations de 90 jours sans apport de pesticides en conditions contrôlées de laboratoire. Des échantillons de sols frais équivalents à 40 g de sol sec sont incubés à $28 \pm 1^\circ\text{C}$, à l'obscurité en conditions aérobies dans des flacons à sérum de 500 ml fermés hermétiquement. L'humidité des échantillons de sol est ajustée à 85% de la capacité de rétention avec de l'eau MilliQ (Millipore). Le CO_2 issu de la minéralisation du carbone organique est piégé dans 10 ml de soude 0.25 N contenus dans des piluliers placés dans les flacons. Ces piluliers sont prélevés et changés après 3, 7, 14, 28, 56 et 90 jours d'incubation. Des flacons à sérum identiques et vides ne contenant que des piluliers de soude permettent de tenir compte de la carbonatation initiale de la soude et du CO_2 contenu dans l'atmosphère du flacon.

Après 0, 7, 14, 28, 56 et 90 jours d'incubation, l'azote minéral des sols est extrait par agitation dans 200 ml de K_2SO_4 0.025 M , pendant 1 heure, sur un agitateur rotatif. Après décantation, les surnageants sont recueillis après filtration sur des filtres en microfibrilles de verre (Whatman). Les extraits au K_2SO_4 sont congelés jusqu'à leur analyse. Les méthodes d'analyse du CO_2 et de l'azote minéral sont décrites au chapitre précédent.

2.4. Incubations en présence de pesticides

Le devenir de trois pesticides dans les sols des cinq parcelles est suivi au cours d'incubations dans les mêmes conditions que précédemment (28 °C, obscurité, humidité équivalente à 85% de la capacité de rétention des sols) à raison de trois répétitions par sol. Des échantillons de sol frais équivalents à 20 g de sol sec sont incubés dans des flacons à serum de 500 ml pendant 90 jours. Pour les incubations en présence d'atrazine, 1.25 ml de la solution radioactive est ajouté par flacon, volume suffisant pour amener les échantillons à l'humidité d'incubation. La simazine et le triticonazole sont apportés à l'aide de la technique dite du volume de sol mort. Pour cela des échantillons de 1g de sol (sol séché dans l'étuve à 120°C pendant 24 heures puis broyé en broyeur mécanique à 2 mm) sont préparés dans des microtubes en verre ; 500 µl de solution méthanolique de pesticide sont apportés dans chacun d'eux et mis à évaporer 24 heures sous une hotte ventilée afin que le méthanol s'évapore. Ces micro-échantillons sont ensuite incorporés dans les échantillons de sol à incuber, et bien homogénéisés. L'humidité des sols incubés est ajustée ensuite avec de l'eau MilliQ (Millipore).

Le $^{14}\text{C-CO}_2$ provenant de la minéralisation de chaque pesticide est piégé dans 2 ml de NaOH 1N contenu dans des flacons à scintillation placés dans les flacons d'incubation. Après 3, 7, 14, 28, 42, 56 et 90 jours d'incubation, les piluliers de soude sont prélevés et renouvelés. Le $^{14}\text{C-CO}_2$ est mesuré dans les 2 ml de soude, après addition de 10 ml de liquide scintillant (Pico-fluor, Packard), à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Kontron instruments-Betamatic V avec correction de quenching par standardisation externe et correction du bruit de fond.

Après 0, 7*, 28, 42, 56 et 90 jours d'incubation, l'extractibilité de la radioactivité résiduelle est déterminée en réalisant quatre extractions successives : la première avec 50 ml de CaCl_2 0.01M suivie de trois extractions successives avec 50 ml de méthanol. A chaque extraction les mélanges sont agités par retournement à $25\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 16 h. Après centrifugation (4000 g, 10 min), les surnageants sont récupérés pour mesurer leur radioactivité. Les 9 extraits méthanoliques sont cumulés et évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor RE III, Büchi, Flawli, Suisse) puis repris dans 2 ml de méthanol pour l'atrazine et la simazine, et 2 ml d'un mélange méthanol / eau (65 / 35) pour le triticonazole. Les 3 extraits aqueux sont cumulés et concentrés sur des cartouches C18-200

* Après 7 jours d'incubation, l'extraction au CaCl_2 n'a pas été faite.

mg (Altech) préalablement activées avec 4 x 1.5 ml de méthanol puis 4 x 1.5 ml d'eau. L'élution des cartouches, après passage des extraits aqueux, a été réalisée avec 10 x 2 ml de méthanol ensuite évaporés sous vide et puis repris dans 2 ml de méthanol.

Après extraction, les culots de sol sont séchés à 40°C. La radioactivité résiduelle non extractible est dosée par mesure du $^{14}\text{CO}_2$ produit lors de la combustion de l'échantillon (Sample Oxidizer 307, Packard). Le $^{14}\text{CO}_2$ est récupéré dans 6 ml de Carbo-Sorb (Packard) auxquels sont ajoutés 12 ml de liquide scintillant (Permafluor E+, Packard). Les masses d'échantillon analysées varient entre 200 et 400 mg, dépendant de leur radioactivité résiduelle. Le rendement de combustion et l'efficacité de comptage sont calculés en utilisant des solutions standard de radioactivité connue.

2.5. Caractérisation de la radioactivité extractible

Après concentration, tous les extraits sont filtrés à 0.45 μm (filtres nylon pour seringue, Cameo 3N, 3 mm, MSI) et dosés en CLHP sur une colonne Nova-Pack C18 (4.6 x 250 mm), couplé à un détecteur de radioactivité (Radiomatic Flo-One Bêta A-500, Packard). Le matériel chromatographique est de chez Waters, équipé d'un passeur automatique d'échantillons (TM 717 Autosampler), d'un formateur de gradient (600 E System Controller).

Pour l'atrazine et la simazine, deux solvants sont utilisés, tamponnés à pH 7.4 avec de l'acétate d'ammonium 0.05 M : solvant A, mélange méthanol / eau 40/60 (vol/vol) ; solvant B, mélange méthanol / eau 80/20 (vol/vol). Le gradient est programmé de la façon suivante : 0 à 15 min, solvant A, 15 à 20 min, solvant B et 20 à 35 min, solvant A. Le volume injecté est de 100 μl , le débit de 1 ml min⁻¹. Le triticonazole est dosé en conditions isocratiques avec un éluant constitué de 65% de méthanol et 35% d'eau. Le volume d'injection est de 50 μl .

2.6. Caractérisations biologiques

2.6.1. Mesure de la biomasse microbienne totale

La biomasse microbienne est mesurée dans les sols au départ des incubations puis après 7, 28, 56 et 90 jours d'incubation sans pesticides par fumigation-extraction (Vance et al. 1987 ; Wu et al., 1990). Les échantillons de sol sont fumigés pendant 16 h en présence de

vapeurs de chloroforme, dans une enceinte à vide. Le chloroforme est préalablement rincé trois fois avec de l'eau déminéralisée afin d'éliminer l'éthanol dissous dans le chloroforme. Après fumigation, l'enceinte et les échantillons de sol sont débarassés des vapeurs de chloroforme par plusieurs rinçage de l'atmosphère de l'enceinte à vide. Les échantillons de sol sont transvasés dans des flacons à centrifugation en polyéthylène de 500 ml et extraits par agitation dans 200 ml de K_2SO_4 0.025 M pendant 1 heure sur un agitateur rotatif. La même extraction est réalisée sur des échantillons non fumigés. Les surnageants sont recueillis après centrifugation (8000 g, 10 min).

Le carbone organique est dosé dans les extraits au K_2SO_4 effectués sur les échantillons de sols fumigés et non fumigés, par oxydation catalytique à haute température (750°C) sur un catalyseur de platine. Le CO_2 formé est mesuré par détection infra-rouge (appareil Dohrman DC 190, USA). Le carbone minéral est préalablement éliminé par acidification du milieu à pH 2 avec de l'acide phosphorique H_3PO_4 . La teneur en carbone organique est dosée dans le K_2SO_4 ayant servi à l'extraction puis retranché des teneurs mesurées dans les extraits.

Le carbone de la biomasse est estimé à partir de l'augmentation (E_c) du carbone organique extractible après fumigation où $E_c = (C_{\text{organique}} \text{ extrait dans les échantillons fumigés} - C_{\text{organique}} \text{ extrait dans les échantillons non fumigés})$. Seule une fraction du carbone organique de la biomasse est extraite. Le carbone total de la biomasse est estimé par : $Biomasse = E_c / K_c$, le coefficient K_c est très variable selon les auteurs et les types de sol (Wu et al., 1990 ; Zagal, 1993). Nous avons estimé la biomasse avec $K_c = 0.48$ (Zagal, 1993).

2.6.2. Dénombrements de la microflore totale

Les microflores bactériennes et fongiques sont mesurées dans les sols initiaux puis après 7, 28, 56 et 90 jours d'incubation en absence de pesticide. Des suspensions-dilutions de sols sont réalisées dans du sérum physiologique ($NaCl$ 8.5 g l⁻¹). La dilution 10⁻¹ est préparée à partir de l'extraction de sol réalisée pour le suivi de l'azote minéral. Les dilutions suivantes se font à partir de cette première dilution dans des tubes stériles à raison de 0.5 ml pour 4.5 ml de sérum physiologique. Les dénombrements sont effectués sur milieu solide en boîtes de Pétri. Le milieu Nutrient Agar (Difco) à 23 g l⁻¹ est utilisé pour les numérations de bactéries totales. La population fongique totale est déterminée sur milieu Rose Bengal à 32 g l⁻¹ (Difco), en présence d'un bactéricide (120 µl d'une solution de streptomycine à 30 mg ml⁻¹ sont ajoutés à 120 ml de milieu). L'ensemencement se fait en surface sur le milieu gélosé

solide à l'aide de 0.1 ml des dilutions 10^{-5} à 10^{-7} pour les bactéries, 10^{-3} à 10^{-5} pour les champignons, à raison de trois répétitions par dilution. Les boîtes ensemencées sont placées dans une étuve à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48h pour les bactéries et 96h pour les champignons.

2.6.3. Numération des populations dégradant l'atrazine et la simazine

La taille de la microflore dégradant l'atrazine et la simazine est estimée dans les sols initiaux puis après 7, 28, 56 et 90 jours d'incubation en présence de pesticide, par la méthode du nombre le plus probable (Girard et Rougieux, 1967). Le milieu décrit par Mandelbaum et al. (1993a) est utilisé, qui a la composition suivante pour un litre de milieu : K_2HPO_4 , 1.6 g ; KH_2PO_4 , 0.4 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g ; NaCl , 0.1 g ; CaCl_2 , 0.02 g ; saccharose, 1 g ; citrate de sodium, 1 g ; 20 ml d'une solution de sels (EDTA , 2.5 g l^{-1} ; ZnSO_4 , 11.1 g l^{-1} ; FeSO_4 , 5.0 g l^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.54 g l^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g l^{-1} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g l^{-1} ; $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g l^{-1} et 5.0 ml de H_2SO_4 concentré), et 20 ml d'une solution de vitamines (thiamine-HCl, 5 mg l^{-1} ; biotine, 2 mg l^{-1} ; acide folique, 2 mg l^{-1} ; nicotinamide, 10 mg l^{-1} ; pyridoxine-HCl, 10 mg l^{-1}). Le milieu de base est stérilisé par autoclavage à 110°C pendant 30 min. Les solutions de sels et de vitamines sont stérilisées par filtrations à 0.22μ et stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation. La concentration de ^{14}C -atrazine dans ce milieu est de 25 mg l^{-1} , et celle de ^{14}C -simazine est de 5 mg l^{-1} , avec une radioactivité de 33.3 Bq par tube. Le milieu est réparti dans des tubes en verre à raison de 5 ml par tube et ensemencés avec 0.1 ml de suspensions-dilutions de sols de 10^{-2} à 10^{-6} à raison de trois tubes par dilution. La première dilution de sol (10^{-1}) est préparée directement à partir de la première extraction de pesticide au CaCl_2 . Après 28 jours d'incubations à $28 \pm 1^\circ\text{C}$, la radioactivité résiduelle dans chaque tube est mesurée au compteur à scintillation sur 0.5 ml mélangés avec 10 ml de liquide scintillant (Pico-fluor, Packard). Les tubes sont considérés comme positifs quand la radioactivité résiduelle est inférieure à 50% de celle de tubes témoins non inoculés. Le nombre le plus probable de microorganismes dégradant l'atrazine est alors déterminé à l'aide des tables de Mac Crady (Annexe 2.2).

III. Résultats et discussion

3.1. Activité microbienne totale

Figure 2.1 : Cinétiques de minéralisation du carbone et de l'azote au cours des incubations de sols des parcelles du dispositif "Dehéraïn" (D4 et D10) et du plateau (M80, M-B73 et B65). Les écarts-types des mesures sont indiqués lorsque ils sont plus larges que les symboles.

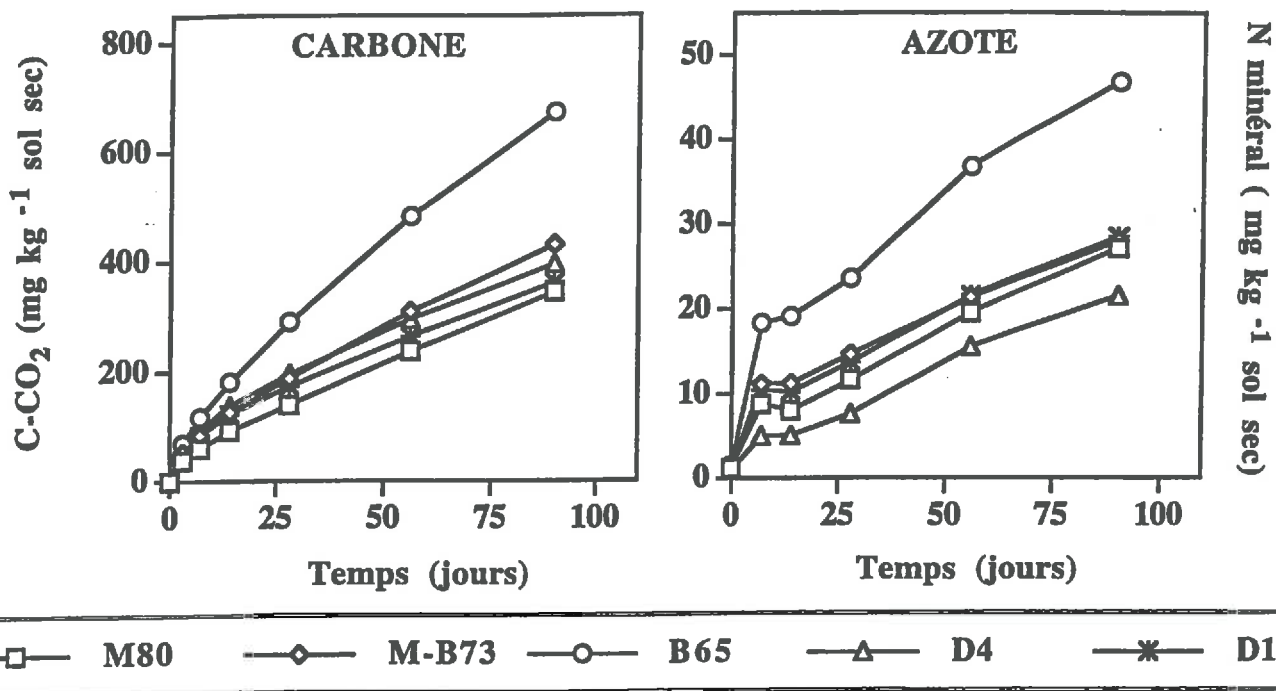
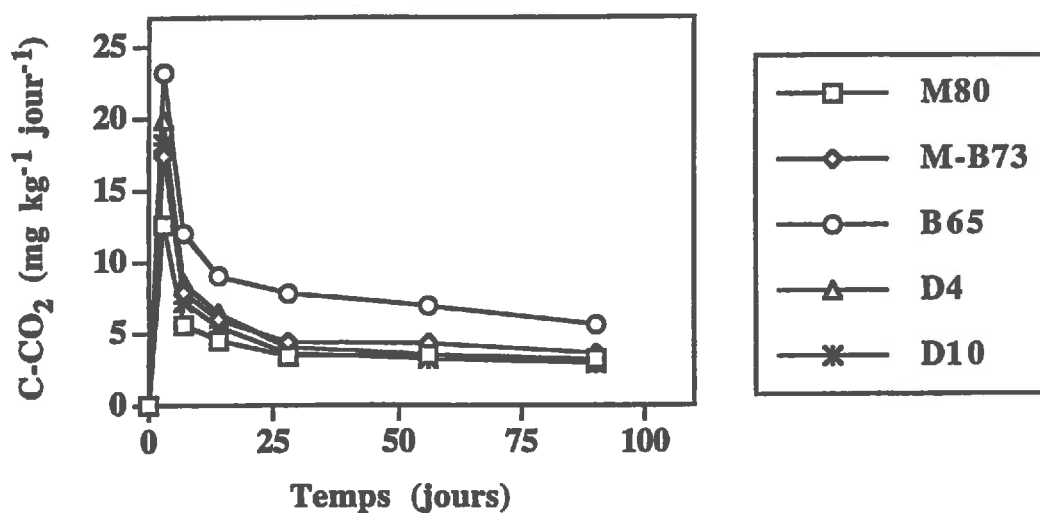


Figure 2.2 : Vitesses de minéralisation du carbone organique total au cours des incubations de sols des parcelles du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4, D10). Les écarts-types des mesures sont indiqués lorsque ils sont plus larges que les symboles.



L'activité microbienne totale dans les sols est évaluée par mesure de la minéralisation du carbone et de l'azote, de la biomasse microbienne et de la microflore totale. La minéralisation du carbone et de l'azote est plus importante dans la parcelle B65 qui présente les teneurs les plus élevées en carbone et en azote organique (figure 2.1). Les minéralisations de carbone et d'azote sont similaires dans les autres sols, sauf dans le cas du sol de la parcelle D4 où la minéralisation d'azote est inférieure par rapport aux autres sols. Dans toutes les parcelles, la minéralisation du carbone organique total représente 3 à 4 % du carbone organique initial du sol après 90 jours d'incubation et celle de l'azote représente environ 2% de l'azote organique initial du sol, valeurs similaires à celles trouvées lors de précédentes études dans les mêmes sols (Abdelhafid, 1994 ; Menasseri, 1994).

La vitesse de minéralisation du carbone organique est maximale dès le 3^{ème} jour pour tous les échantillons puis elle rediminue (figure 2.2). Elle est plus élevée dans le sol de la parcelle B65 du plateau qui a la teneur en carbone organique la plus importante. Au début des incubations, la vitesse de minéralisation du carbone organique est plus faible dans le sol de la parcelle M80 mais elle devient identique à celle mesurée dans les parcelles M-B73, D4 et D10 à l'issue des incubations.

Dans les sols initiaux, la biomasse microbienne augmente avec la teneur en carbone organique des sols ; elle est maximale dans la parcelle B65 (tableau 2.3). Cette biomasse microbienne représente 0.6% du carbone organique total dans le sol de la parcelle M80 ; 0.7% dans les sols des parcelles M-B73, D4 et D10 ; 0.8% dans le sol de la parcelle B65. Ces résultats sont faibles par rapport à ceux observés généralement (Jenkinson et Ladd, 1981 ; Chaussod et al., 1986). La biomasse microbienne la plus faible est mesurée dans la parcelle D4 non fertilisée confirmant la relation entre la taille de la biomasse microbienne et les pratiques culturales (Houot et Chaussod, 1995). La biomasse microbienne augmente légèrement pendant les 56 premiers jours d'incubation puis rediminue jusqu'à la fin de l'incubation dans tous les sols (figure 2.3).

Les dénombrements sur milieu solide de la microflore bactérienne et fongique ne permettent pas de différencier les parcelles. Dans toutes les parcelles 10^8 et 10^6 c.f.u. g^{-1} de sol sont dénombrés respectivement pour les bactéries et les champignons (tableau 2.4). La taille de ces populations reste constante pendant toute la durée des incubations.

3.2. Evolution de l'atrazine au cours des incubations

Tableau 2.3 : Evolution des biomasses microbiennes totales au cours des incubations de sols provenant du Plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehérain" (D4, D10).

Sols	Biomasse microbienne (mg C kg ⁻¹)					% C total à 90 j
	0 j	7 j	28 j	56 j	90 j	
<u>Plateau</u>						
M80	118.1 ± 2.8	128.3 ± 1.4	132.5 ± 1.5	165.2 ± 1.0	137.9 ± 0.7	0.6
M-B73	142.5 ± 1.1	216.6 ± 0.5	246.9 ± 0.9	259.8 ± 1.2	217.9 ± 0.9	0.7
B65	216.9 ± 1.2	275.6 ± 0.9	333.3 ± 0.8	351.9 ± 2.0	273.3 ± 1.3	0.8
<u>"Dehérain"</u>						
D4	105.8 ± 1.5	120.2 ± 0.6	136.3 ± 1.6	162.5 ± 1.7	122.5 ± 0.8	0.7
D10	123.1 ± 0.7	156.6 ± 0.9	187.9 ± 0.1	198.1 ± 1.9	164.8 ± 1.2	0.7

Figure 2.3 : Evolution de la biomasse microbienne au cours des incubations de sols des parcelles du dispositif "Dehérain" (D4 et D10) et du plateau (M80, M-B73 et B65).

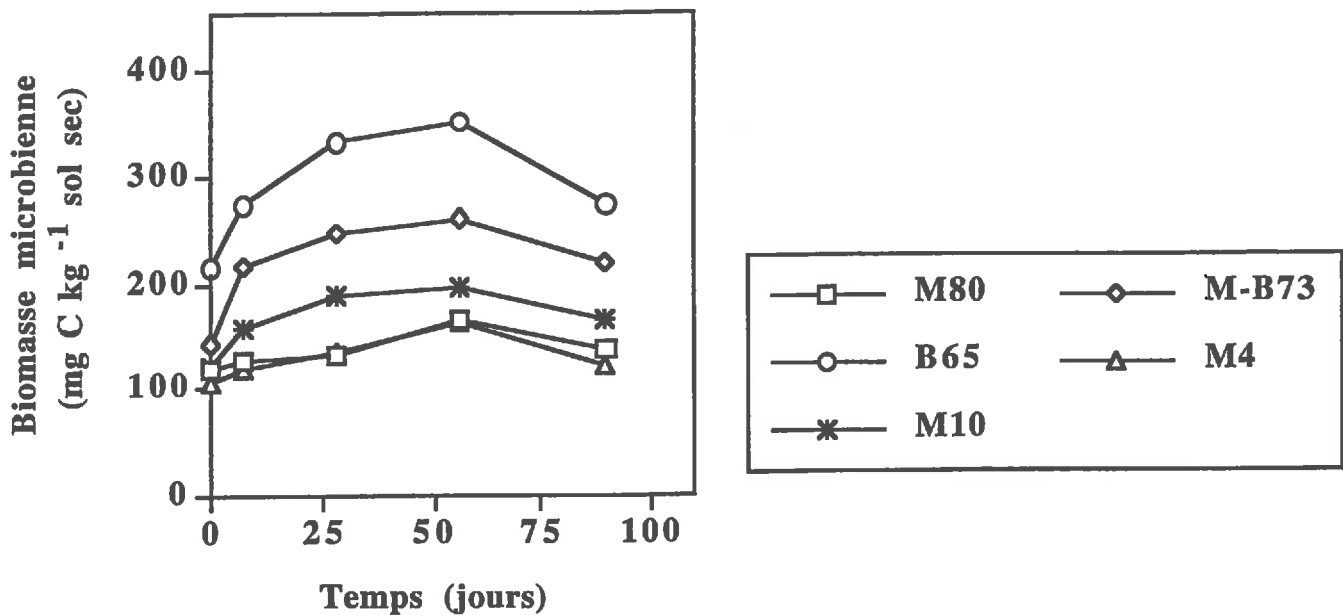
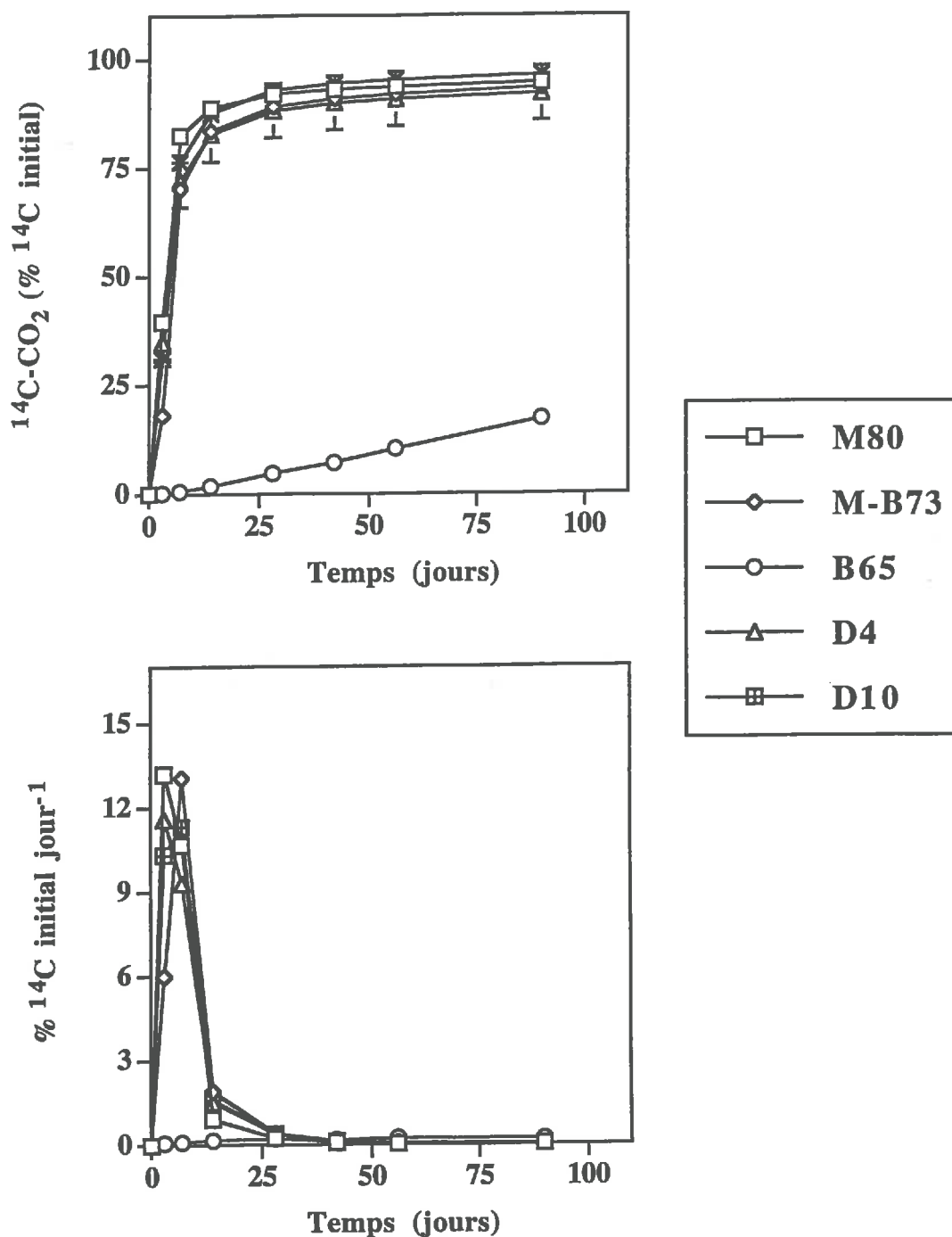


Tableau 2.4 : Evolution des dénombrements de la microflore bactérienne et fongique totale avant et au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73 et B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4 et D10) en absence des pesticides (en c.f.u. g⁻¹ de sol).

Sols	0 jour	7 jours	28 jours	56 jours	90 jours
<u>Microflore bactérienne</u>					
M80	1 10 ⁸ ± 1.1	2 10 ⁸ ± 4.9	1 10 ⁸ ± 2.7	9 10 ⁷ ± 6.3	1 10 ⁸ ± 3.1
M-B73	4 10 ⁸ ± 3.4	2 10 ⁸ ± 8.8	1 10 ⁸ ± 5.5	1 10 ⁸ ± 2.3	1 10 ⁸ ± 1.6
B65	1 10 ⁸ ± 2.8	1 10 ⁸ ± 4.2	1 10 ⁸ ± 8.5	2 10 ⁸ ± 1.8	2 10 ⁸ ± 1.4
D4	1 10 ⁸ ± 1.4	1 10 ⁸ ± 6.4	7 10 ⁷ ± 8.4	9 10 ⁷ ± 1.8	1 10 ⁸ ± 3.0
D10	2 10 ⁸ ± 3.1	8 10 ⁷ ± 3.4	2 10 ⁸ ± 2.2	9 10 ⁷ ± 4.3	9 10 ⁷ ± 4.4
<u>Microflore fongique</u>					
M80	1 10 ⁶ ± 1.8	9 10 ⁵ ± 2.5	2 10 ⁶ ± 1.4	3 10 ⁶ ± 1.0	2 10 ⁶ ± 0.6
M-B73	9 10 ⁵ ± 1.3	2 10 ⁶ ± 1.7	2 10 ⁶ ± 1.6	2 10 ⁶ ± 3.5	2 10 ⁶ ± 1.4
B65	2 10 ⁶ ± 3.5	3 10 ⁶ ± 1.8	1 10 ⁶ ± 1.4	3 10 ⁶ ± 1.2	3 10 ⁶ ± 1.1
D4	7 10 ⁵ ± 1.1	1 10 ⁶ ± 1.4	1 10 ⁶ ± 1.2	2 10 ⁶ ± 1.8	1 10 ⁶ ± 0.7
D10	2 10 ⁶ ± 2.0	2 10 ⁶ ± 1.1	1 10 ⁶ ± 1.5	1 10 ⁶ ± 0.7	1 10 ⁶ ± 2.1

Figure 2.4 : Cinétiques de minéralisation de l'atrazine et d'évolution de sa vitesse de minéralisation, au cours d'incubations de sols provenant des parcelles du dispositif "Dehérain" (D4 et D10) et du plateau (M80, M-B73 et B65). Les écarts-types des mesures sont indiqués quand ils sont plus larges que les symboles.



3.2.1. Minéralisation

La minéralisation de l'atrazine est très rapide dans tous les sols, sauf dans la parcelle B65 (figure 2.4). Dans les sols provenant des parcelles M80, M4 et M10, elle atteint 94.4%, 92.0% et 96.2% de la radioactivité initiale, après 90 jours d'incubation. Ces taux de minéralisation de l'atrazine sont beaucoup plus importants que ceux observés dans des travaux anciens (Wagner et Chahal, 1966 ; Kaufman et Kearney, 1970 ; Best et Weber, 1974 ; Dao et al., 1979). Récemment, certains travaux ont montré une minéralisation complète du cycle triazinique de l'atrazine par des microorganismes spécifiques utilisant l'atrazine comme seule source d'azote (Mandelbaum et al., 1993a ; Mandelbaum et al., 1995 ; Radosevitch et al., 1995). La relation entre la dégradation rapide de l'atrazine avec sa fréquence d'application au champ a été démontrée (Barriuso et Houot, 1996 ; Pussemier et al., 1997 ; Vanderheyden et al., 1997). Les parcelles M80, D4 et D10 sont en monoculture de maïs et reçoivent de l'atrazine tous les ans. Dans la rotation maïs-blé (M-B73) la minéralisation de l'atrazine atteint 93.2% de la radioactivité initiale. Cette parcelle était sous maïs l'année du prélèvement. La minéralisation de l'atrazine est beaucoup plus lente (25.0% de la radioactivité initiale) dans cette même parcelle l'année où elle est cultivée en blé (Abdelhafid, 1994). Il semblerait qu'il y ait des fluctuations très rapide de la population dégradante au champ. Les différences observées entre les quatre sols (M80, M-B73, M4, M10) ne sont pas significatives. Le niveau de fertilisation azotée semble peu influencer la minéralisation de l'atrazine. Dans la monoculture de blé, la minéralisation de l'atrazine reste faible ; elle atteint 17.1% de la radioactivité initiale en fin d'incubation, confirmant l'absence d'adaptation de la microflore à la dégradation de l'atrazine dans cette parcelle qui ne reçoit jamais d'atrazine au champ.

La vitesse de minéralisation de l'atrazine est maximale dès le 3^{ème} jour de l'incubation dans les trois monoculture de maïs (M80, M4 et M10) et au 7^{ème} jour dans la rotation maïs-blé (M-B73) (figure 2.4). Elle est plus élevée dans le sol de la parcelle M80 qui reçoit de l'atrazine annuellement depuis l'année 1980. Elle est légèrement plus faible dans les deux parcelles du dispositif "Dehérain" D4 et D10 qui reçoivent de l'atrazine chaque année depuis 1987. En revanche, la vitesse initiale de minéralisation de l'atrazine est nettement plus faible dans la parcelle M-B73 qui est sous rotation maïs-blé et qui reçoit de l'atrazine une année sur deux depuis 1973. Le nombre d'application d'atrazine au champ influence la vitesse initiale de minéralisation de l'atrazine. Au cours des incubations, les vitesses de minéralisation rediminuent dans les quatre sols et deviennent semblables à partir du 7^{ème} jour d'incubation.

Dans la parcelle B65 qui n'a jamais reçu d'atrazine, la vitesse de minéralisation reste très faible pendant toute la durée de l'incubation.

L'activité microbienne totale était la plus importante dans la parcelle B65 (biomasse microbienne supérieure et minéralisation du carbone et de l'azote plus intense). Il ne semble pas y avoir de lien entre l'activité globale estimée au travers des cinétiques de minéralisation du carbone et de l'azote et la dégradation de l'atrazine. Ces résultats sont en accord avec ceux de Schiavon (1980) et Dousset (1994), qui montrent que la dégradation de l'atrazine est indépendante du métabolisme du carbone du sol, contrairement aux travaux de Mc Cormick et Hiltbold (1966) et de Hance (1974). La dégradation rapide de l'atrazine dans les sols provenant des parcelles cultivées en maïs correspond au développement d'une population microbienne adaptée à la dégradation de l'atrazine (Barriuso et Houot, 1996), après plusieurs années d'application de cet herbicide sur la culture de maïs.

3.2.2. Population dégradante

La taille de la microflore dégradant l'atrazine est inférieure au seuil de détection dans les sols initiaux avant l'apport de l'atrazine (tableau 2.5). Elle est maximale dès le 7^{ème} jour d'incubation et atteint $2.5 \cdot 10^5$ germes g^{-1} de sol dans la parcelle M80, où la vitesse de minéralisation de l'atrazine est la plus élevée au début des incubations. Dans les parcelles M-B73, M4 et M10, la taille de la population dégradante est équivalente ; elle est maximale après 28 jours d'incubation ($0.3 \cdot 10^3$ à $8.3 \cdot 10^3$ germes g^{-1} de sol). Le niveau de population de la microflore dégradant l'atrazine semble lié au nombre et à la fréquence des applications au champ : annuelle depuis 1980 dans M80, annuelle depuis 1987 dans D4 et D10, un an sur deux depuis 1973 dans M-B73. Cela pourrait expliquer les différences de vitesse de minéralisation observées. Après 28 jours d'incubation, la taille de cette population dégradante diminue dans la parcelle M80. Elle devient inférieure au seuil de détection après 56 jours d'incubation dans les parcelles M-B73, M4 et M10. Dans la parcelle B65, aucune microflore dégradante n'est détectée pendant toute la durée de l'incubation. La non détection de la population dégradante dans les sols initiaux avant l'application de l'atrazine, semblerait montrer que l'atrazine doit être présente dans le sol un certain temps pour que la taille de la microflore dégradant l'atrazine soit supérieure au seuil de détection.

Tableau 2.5 : Numérations de la population dégradant l'atrazine en milieu liquide au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73 et B65) et du dispositif "Dehérain" (D4 et D10), exprimés en germes g⁻¹ de sol.

Sols	0 jour	7 jours	28 jours	56 jours	90 jours
<u>Plateau</u>					
M80	< sd*	2.5 10 ⁵ ± 0.0	3.5 10 ⁴ ± 2.3	0.7 10 ³ ± 0.4	0.6 10 ³ ± 0.4
M-B73	< sd	0.6 10 ³ ± 0.3	0.9 10 ³ ± 0.9	< 10	< 10
B65	< sd	< sd	< sd	< sd	< sd
<u>Dispositif "Dehérain"</u>					
D4	< sd	1.2 10 ³ ± 0.9	8.3 10 ³ ± 1.3	< sd	< sd
D10	< sd	0.3 10 ³ ± 0.0	2.0 10 ³ ± 1.4	< sd	< sd

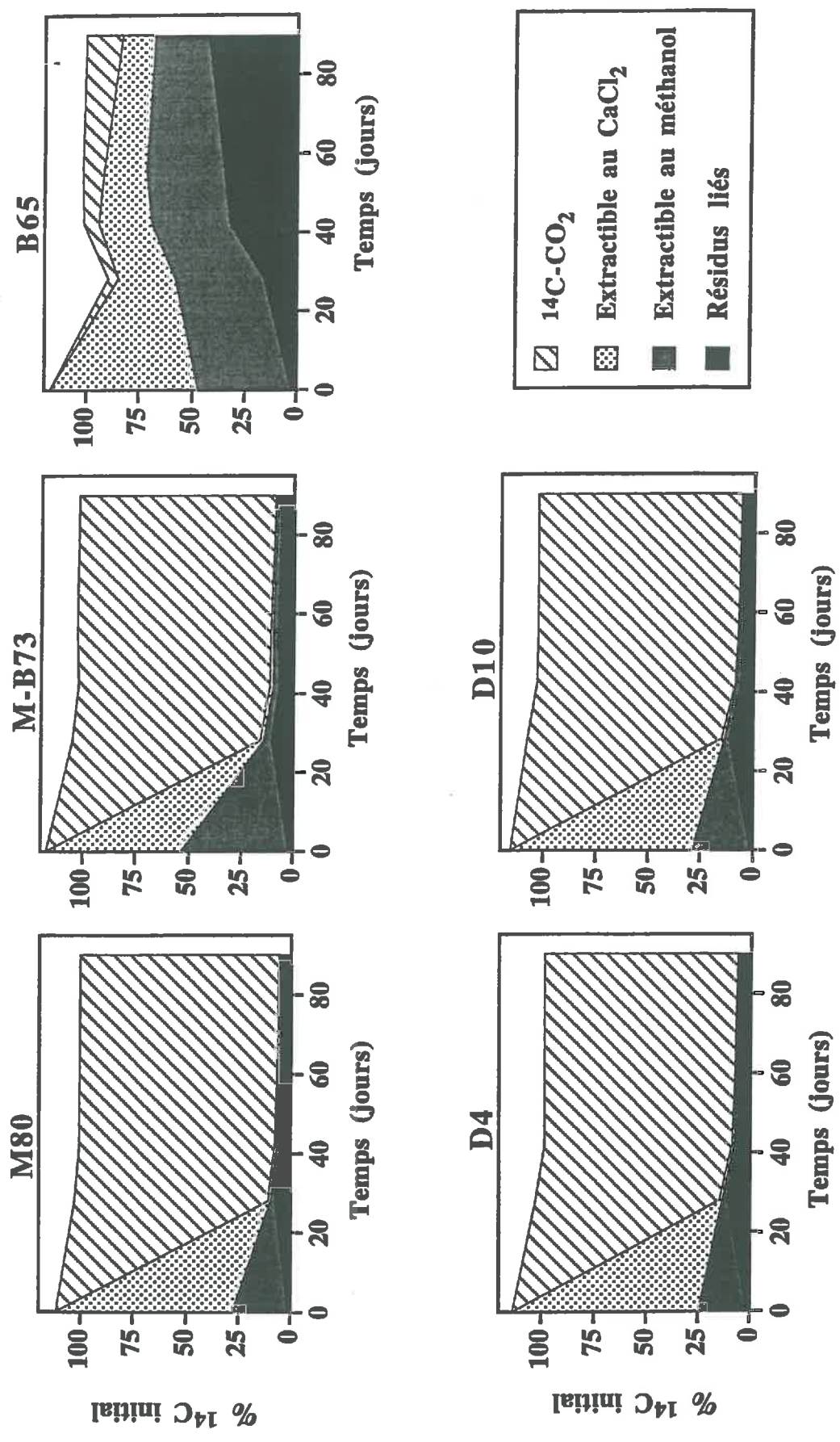
* seuil de détection

La taille de la population dégradante est indépendante de celle de la microflore totale. Contrairement à la microflore totale du sol qui reste constante, la microflore dégradante diminue au cours des incubations. Cela confirme les conclusions tirées dans la comparaison des cinétiques de minéralisation de la matière organique des sols et celles de minéralisation de l'atrazine. Il n'y a pas de lien entre l'activité microbienne totale du sol et l'activité spécifique de minéralisation de l'atrazine.

3.2.3. Distribution de la radioactivité totale

La figure 2.5 représente l'évolution au cours des incubations, de la distribution de la radioactivité entre les fractions minéralisée, extractible au CaCl₂ ou au méthanol et non extractible. Les résultats détaillés sont donnés en annexe 2.2. Immédiatement après l'apport du pesticide (0 jour), la presque totalité de l'atrazine apportée est extractible dans les cinq sols. Néanmoins la fraction extractible à l'eau est inférieure dans les sols provenant de la rotation maïs-blé (M-B73) et de la monoculture de blé (B65) par rapport aux sols des trois autres parcelles. Inversement la fraction extractible au méthanol est supérieure dans ces deux parcelles. Les sols de ces deux parcelles sont les plus riches en matière organique, confirmant l'importance du rôle de la matière organique dans la rétention des pesticides

Figure 2.5 : Evolution de la répartition de la radioactivité entre les fractions non extractible, extractible au CaCl_2 et au méthanol, et minéralisée de l'atrazine au cours des incubations dans les sols des parcelles du plateau (M80, M-B73 et B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4 et D10). Les résultats détaillés sont donnés en annexe 2.2.



(Schiavon, 1980 ; Shea, 1989 ; Calderbank, 1989 ; Scheunert, 1992). Dans les sols où la minéralisation de l'atrazine est très importante, les fractions extractibles diminuent rapidement au cours des incubations et représentent environ 2% de la radioactivité initiale dans les parcelles M80, M-B73, D4 et D10 en fin d'incubation. En revanche dans la parcelle B65, la minéralisation est faible et 40% de la radioactivité initiale restent extractibles en fin d'incubation. Simultanément, la fraction non extractible augmente dans toutes les parcelles. Elle reste faible dans les parcelles à forte minéralisation et représente 4.5, 6.6, 5.1 et 5.0% en fin d'incubation respectivement dans les parcelles M80, M-B73, D4 et D10. Dans la parcelle B65, la fraction non extractible est plus importante et représente 43.4% en fin d'incubation.

Au début de l'incubation, des quantités non négligeables de résidus liés sont mesurées. De ce fait cette stabilisation semble être un phénomène rapide. L'adsorption est la première étape dans la formation de résidus liés (Calderbank, 1989), d'où l'existence d'une relation entre stabilité et adsorption (Burkhard et Guth, 1981). Plusieurs travaux réalisés sur l'étude de la formation de résidus liés suggèrent différentes hypothèses : liaison covalente aux constituants du sol (Hsu et Bartha, 1976 ; Piccolo et al., 1992), piégéage dans des structures organiques colloïdales (Schiavon et al., 1977 ; Khan, 1982) ou incorporation dans la biomasse microbienne (Geller, 1980). Mais, cette stabilisation ne suppose pas un blocage définitif des résidus et certaines expériences ont montré qu'ils pouvaient être remobilisés (Demon, 1994) ou libérés par des microorganismes des sols, ou par des modifications physico-chimiques des constituants des sols (Khan et Ivarson, 1982 ; Schiavon et Soulas, 1983 ; Dec et al., 1990). Il semblerait que ces résidus liés se minéralisent différemment selon la nature des populations microbiennes actives lors de leur formation. La présence d'une population microbienne adaptée à dégrader l'atrazine est capable de les reminéraliser (Pons, 1994). Par contre dans un sol où il y a absence de cette population active, les résidus liés s'accumulent progressivement constituant une voie alternative à la minéralisation pour la dissipation des pesticides (Barriuso et Houot, 1996), ce qui est le cas dans la monoculture de blé.

3.2.4. Caractérisation de la radioactivité extractible

L'analyse chromatographique des extraits hydrosolubles et méthanoliques peut donner des informations sur la voie métabolique de dégradation de l'atrazine au cours des incubations de sols. Les résultats des fractions extractibles au méthanol et au CaCl_2 sont cumulés après l'analyse de chacune séparément, après 0, 28, 56 et 90 jours d'incubation.

Figure 2.6 : Evolution de la répartition de la radioactivité extractible de ¹⁴C-atrazine au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4, D10). Résultats exprimés en % de la radioactivité extractible.

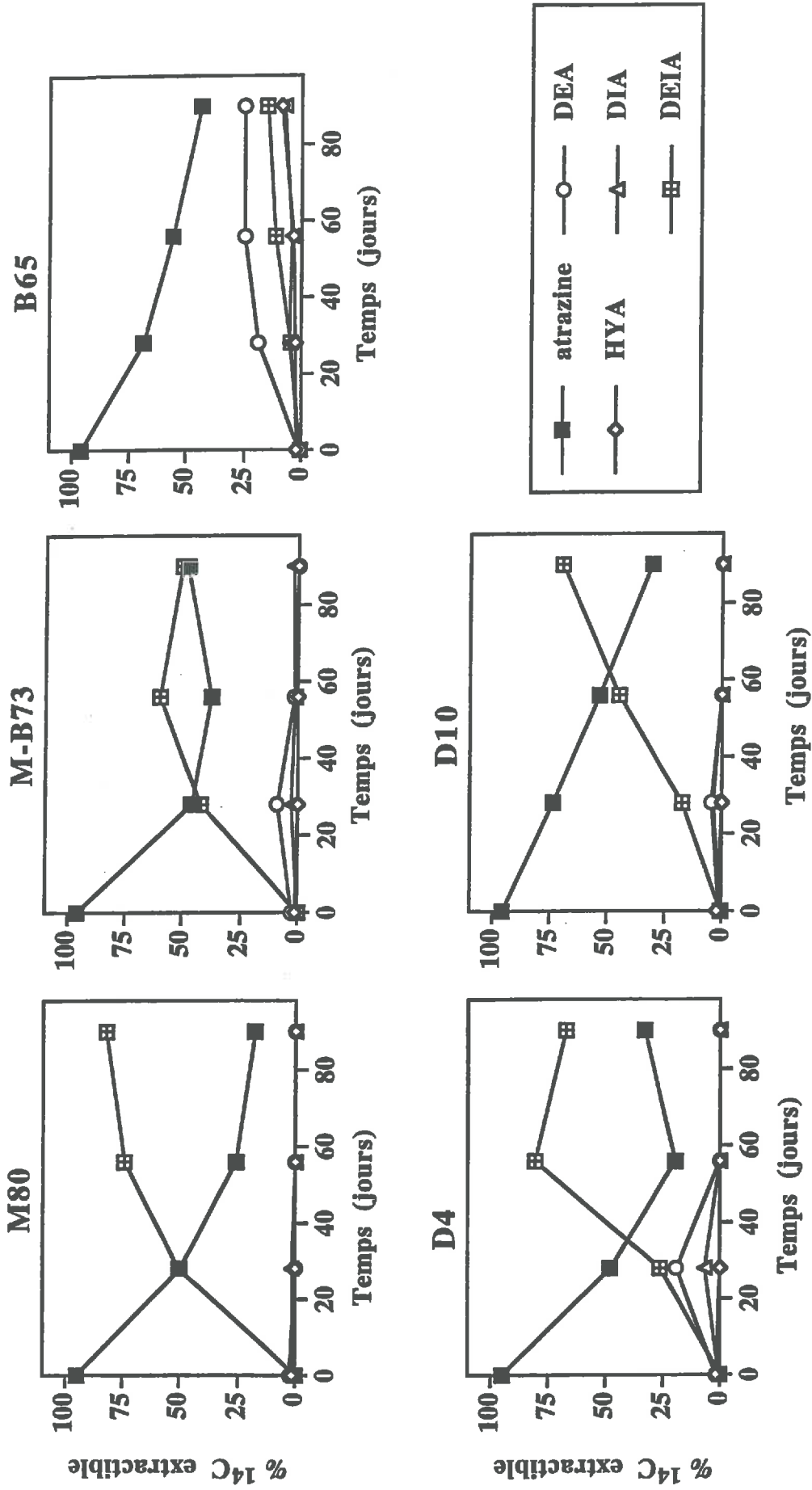
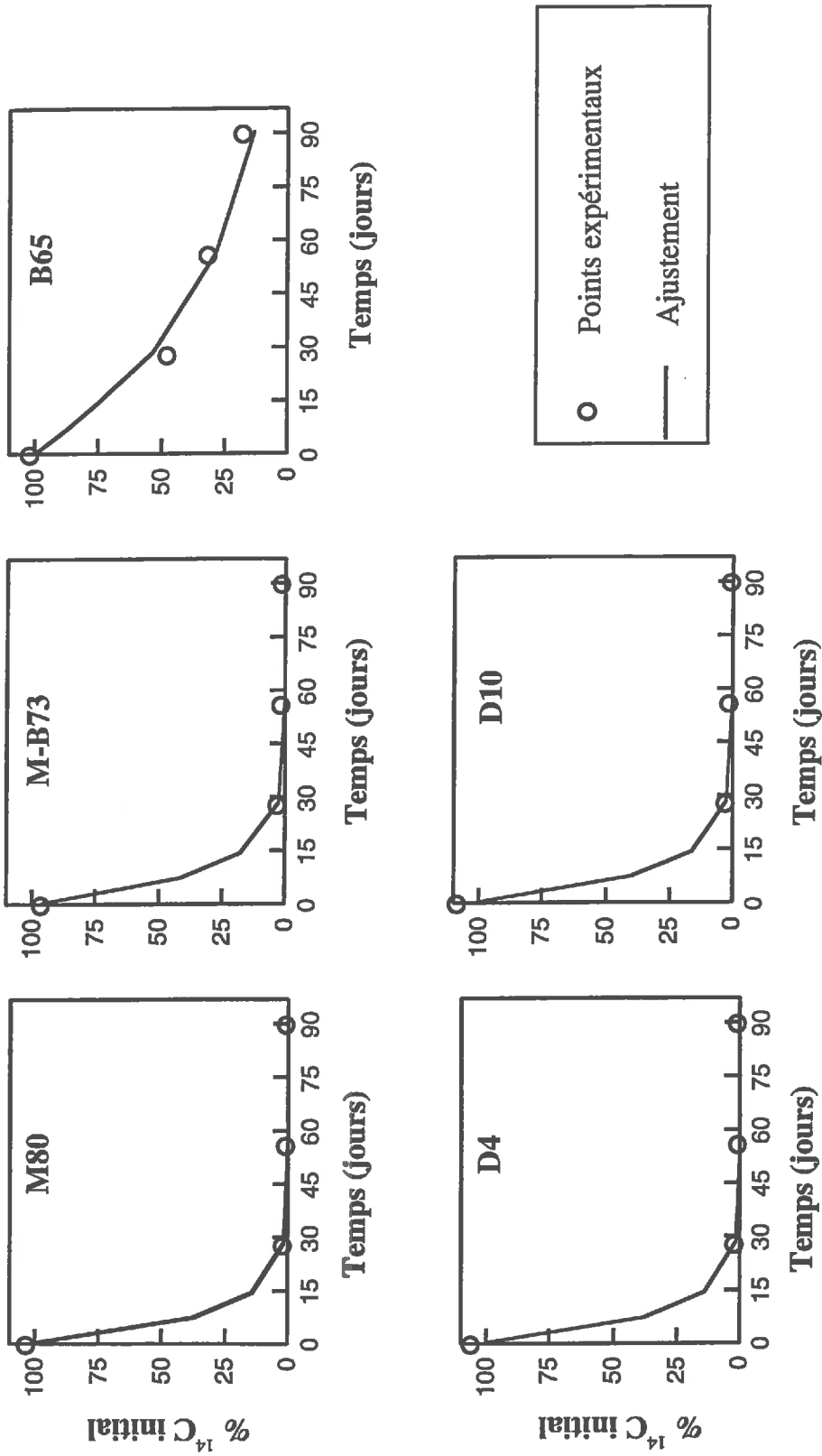


Tableau 2.6 :Caractérisation de la radioactivité extractible au cours des incubations de ¹⁴C-atrazine dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehérain" (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Sols	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
<u>Parcelle M80</u>					
0 j	95.0	1.5	2.5	0.8	0
28 j	49.7	0	0	1.5	50.3
56 j	25.8	0	0	0	74.2
90 j	17.8	0	0	0	82.2
<u>Parcelle M-B73</u>					
0 j	95.9	1.2	2.7	0	0.2
28 j	46.0	0	9.2	2.8	42.0
56 j	37.5	0	1.5	1.2	59.8
90 j	47.9	0	0	2.1	50.0
<u>Parcelle B65</u>					
0 j	95.8	2.2	0.9	0.4	0.4
28 j	68.6	2.6	19.0	5.1	4.6
56 j	55.8	3.5	24.9	4.2	11.6
90 j	43.7	8.8	25.0	7.4	15.2
<u>Parcelle D4</u>					
0 j	95.0	2.0	1.9	0.6	0.1
28 j	47.8	0	19.2	6.7	26.2
56 j	19.5	0	0	0	80.5
90 j	32.9	0	0	0	67.1
<u>Parcelle D10</u>					
0 j	95.6	2.2	1.1	0.6	0.5
28 j	73.6	0	4.7	3.7	17.4
56 j	53.2	0	0	0	44.7
90 j	30.5	0	0	0	69.5

Figure 2.7 : Comparaison des cinétiques simulées et expérimentales de l'atrazine dans la fraction extractible par rapport à la quantité initiale apportée, au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehéraïn (D4, D10).



Les résultats de l'analyse de ces fractions séparées sont donnés en annexes 2.5 et 2.6. Les métabolites détectés sont : hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA), dééthyl-déisopropylatrazine (DEIA). Un chromatogramme présentant les temps de rétention de l'atrazine et ses métabolites est donné en annexe 2.7. La solution d'atrazine initiale appliquée sur les sols contient quelques impuretés. L'atrazine représente 95 à 96% de la radioactivité extractible, l'HYA et la DEA 1 à 2%, la DIA et DEIA environ 0.5% de la radioactivité extractible (figure 2.6, tableau 2.6). Au cours des incubations, dans les sols provenant des monocultures de maïs et la rotation maïs-blé, l'HYA n'est jamais détecté. La proportion de l'atrazine diminue parallèlement à l'augmentation de la DEIA qui représente 50 à 80% de la radioactivité extractible en fin d'incubation. Après 56 jours d'incubation, la DEIA est l'unique métabolite détecté en grande quantité dans les sols provenant des monocultures de maïs (M80, M4, M10) et dans la rotation maïs-blé (M-B73). Dans la monoculture de blé (B65), la proportion d'atrazine dans la fraction extractible diminue également au cours de l'incubation. Les métabolites déalkylés sont majoritaires et leurs proportions augmentent avec le temps d'incubation, la DEA étant la plus abondante. En fin d'incubation, l'atrazine constitue 43.7%, l'HYA 8.8% et les métabolites dealkylés 47.6% de la radioactivité extractible (25.0% de DEA, 7.4% de DIA, 15.2% de DEIA).

Les temps de demi-vie ($T_{1/2}$) de l'atrazine au cours de ces incubations sont estimés selon le modèle de cinétique d'ordre 1 cité dans le chapitre 1. Le $T_{1/2}$ est estimé à partir de l'évolution de la molécule mère (atrazine) dans la fraction extractible exprimée par rapport à la quantité d'atrazine apportée initialement (figure 2.7). Les paramètres de la cinétique d'évolution de l'atrazine dans la fraction extractible sont estimés par regression non linéaire à l'aide du logiciel Sigma Plot (Jandel) et sont présentés dans le tableau 2.7. Le $T_{1/2}$ de l'atrazine est similaire dans les sols provenant des monocultures de maïs (M80, D4, D10), elle est de 5 jours. Cette durée est identique à celle estimée dans les deux sols du dispositif "Dehérain" au chapitre 1. Dans la rotation maïs-blé, le $T_{1/2}$ est similaire (6 jours). Ces durées de demi-vie de l'atrazine observées restent bien inférieures aux valeurs mesurées habituellement (Walker, 1978 ; Dabène et al., 1995). Le $T_{1/2}$ de l'atrazine est de 32 jours dans le sol de la monoculture de blé, où la minéralisation est plus lente.

Tableau 2.7 : Paramètres des cinétiques d'ordre 1 utilisées pour décrire l'évolution de la concentration de l'atrazine dans la fraction extractible au cours des incubations. Les concentrations sont exprimées en fonction de la radioactivité initiale. ($C = C_0 e^{-kt}$; C_0 : concentration initiale, k : constante de vitesse de dégradation et C : concentration à l'instant t).

Parcelles	k (jour ⁻¹)	r^2	$T_{1/2}$ (jours)
M80	0.14	0.99	5
M-B73	0.12	0.99	6
B65	0.02	0.98	32
D4	0.14	0.99	5
D10	0.13	0.99	5

La présence de métabolites déalkylés de l'atrazine a toujours été indicatrice de sa dégradation biologique, en général associée à des faibles taux de minéralisation (Kaufman et Kearney, 1970 ; Cook, 1987). En revanche, on a longtemps cru que l'hydroxyatrazine ne pouvait provenir que d'une dégradation abiotique (Armstrong et al., 1967 ; Skipper et al., 1967 ; Kaufman et Blake, 1970 ; Skipper et Volk, 1972). Récemment, l'origine biologique de l'hydroxyatrazine a été montrée associée à la dégradation rapide de la molécule, sa formation constituant le premier intermédiaire de la dégradation de l'atrazine (Mandelbaum et al., 1993b ; Assaf et Turco, 1994 ; Mandelbaum et al., 1995). Cependant, la déalkylation peut également être la première étape de la dégradation rapide de l'atrazine et la déalkylation et la déhalogénéation peuvent même se produire simultanément (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Shao et al., 1995 ; Stucki et al. 1995).

L'apparition de métabolites au cours des incubations conditionne la formation des résidus non extractibles. Ainsi les dérivés déalkylés présentent une plus grande capacité à former des résidus liés (Schiavon, 1988). En effet, l'inhibition des populations bactériennes s'accompagne de l'augmentation du dééthylatrazine susceptible de former des résidus liés (Khan et Saidak, 1981 ; Schiavon, 1988 ; Adams et Thurman, 1991). Cela pourrait favoriser l'augmentation des résidus liés dans le sol provenant de la monoculture de blé (B65) où la dééthylatrazine est le métabolite le plus abondant, en raison de l'absence de microorganismes capables de la minéralisation du cycle triazinique.

3.3. Evolution de la simazine au cours des incubations

3.3.1. Minéralisation

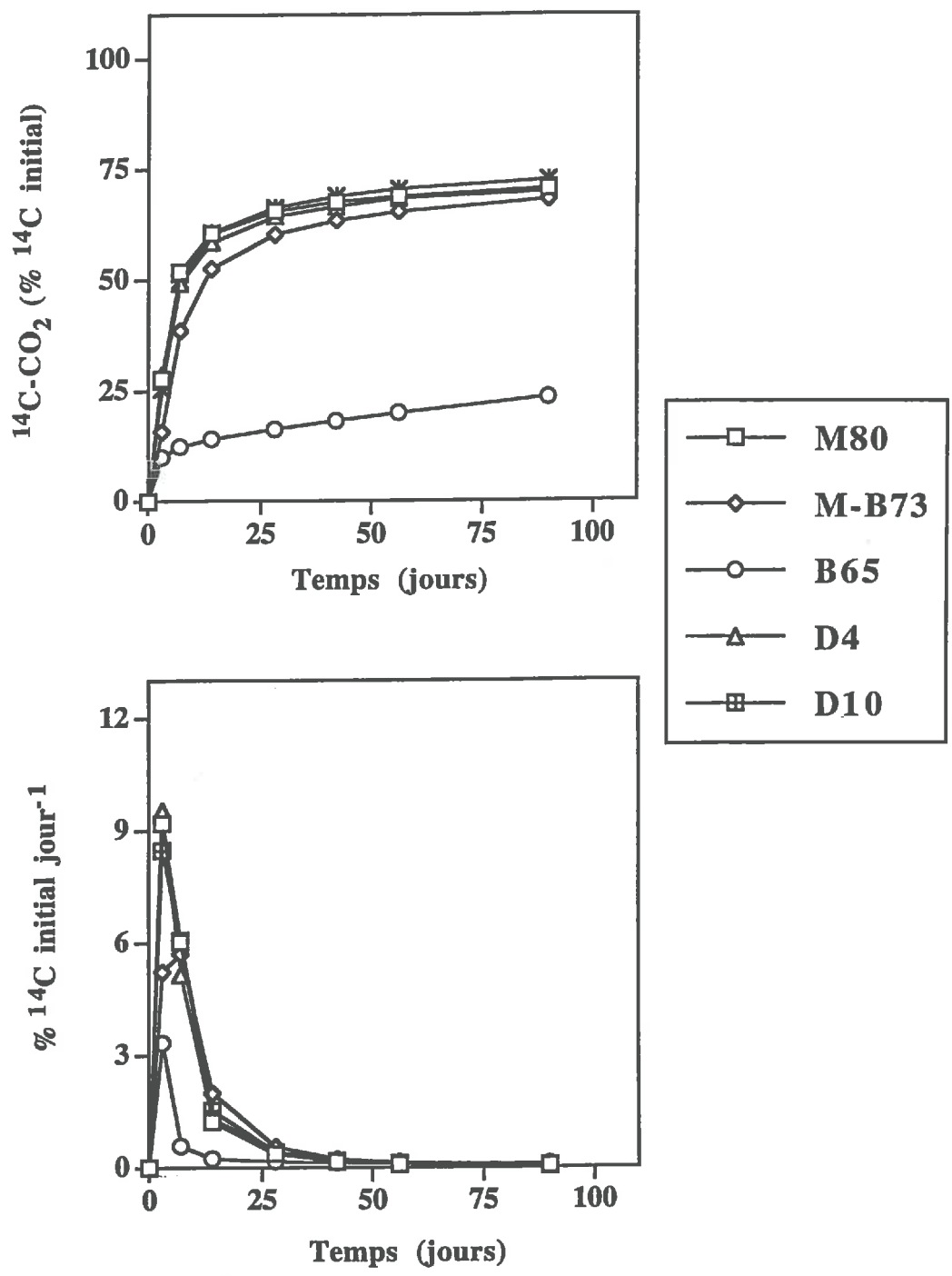
Les cinétiques de minéralisation de la simazine sont similaires à celles observées pour l'atrazine (figure 2.8). Après 90 jours d'incubation, la minéralisation de la simazine atteint environ 70% de la radioactivité initiale dans les trois sols des parcelles sous monoculture de maïs et la rotation maïs-blé. Toutefois, le taux de minéralisation reste plus faible par rapport à celui de l'atrazine qui atteignait plus de 90% de la radioactivité initiale. En revanche dans le sol provenant de la monoculture de blé (B65), la minéralisation de la simazine atteint 23.4% de la radioactivité initiale après 90 jours d'incubation. Dans ce sol, contrairement à l'atrazine la minéralisation est assez importante au départ de l'incubation. Il semblerait donc que la microflore dégradant l'atrazine soit capable de dégrader la simazine, triazine très proche de l'atrazine. Ces résultats confirment la capacité minéralisatrice des noyaux triaziniques chloro-substitués des sols utilisés, où la spécificité de la microflore est liée à la présence d'un substituant chloré (Barriuso et Houot, 1996 ; Barriuso et al., 1997).

Comme pour l'atrazine, la vitesse de minéralisation est maximale dès le 3^{ème} jour d'incubation pour les monocultures de maïs et après 7 jours d'incubation dans la rotation maïs-blé (figure 2.8). Les vitesses les plus importantes sont observées dans les sols des monocultures de maïs. Toutefois, elles restent inférieures à celles mesurées pour l'atrazine. La vitesse maximale de minéralisation est plus faible dans le sol de la rotation. La vitesse la plus faible est mesurée dans la monoculture de blé, toutefois celle-ci est nettement supérieure à la vitesse de minéralisation de l'atrazine dans le même sol. Après 7 jours d'incubation, les vitesses de minéralisation diminuent pour devenir proches de 0 dans toutes les parcelles en fin d'incubation.

3.3.2. Population dégradante

Dans les sols initiaux, contrairement à l'atrazine, des microorganismes capables de dégrader la simazine sont détectés dans certaines parcelles : de l'ordre de 10^3 germes g^{-1} sol dans les sols de parcelles M80, D4, M-B73 (tableau 2.8). Aucune microflore n'est détectée dans les sols de la monoculture de blé et la parcelle D10). La taille de la population dégradant la simazine est maximale au 7^{ème} jour d'incubation, comme pour l'atrazine. Elle est plus

Figure 2.8 : Cinétiques de minéralisation de la simazine et d'évolution de sa vitesse de minéralisation, au cours d'incubations de sols provenant des parcelles du dispositif "Dehérain" (D4 et D10) et du plateau (M80, M-B73 et B65). Les écarts-types des mesures sont indiqués quand ils sont plus larges que les symboles.



élevée dans la parcelle M80 ($4.8 \cdot 10^4$ germes g^{-1} de sol) que dans les parcelles M-B73, M4 et M10 où la population est de même niveau (environ 10^3 germes g^{-1} de sol). Dans la parcelle M80, la population dégradant la simazine est plus faible que celle dégradant l'atrazine alors que dans les trois autres parcelles les niveaux de population sont identiques pour l'atrazine et la simazine. Après 56 jours d'incubation, cette population est inférieure au seuil de détection dans les quatre sols. Enfin comme pour l'atrazine, dans la parcelle B65, aucune microflore dégradante n'est détectée pendant toute la durée de l'incubation.

Tableau 2.8 : Numération de la population dégradant la simazine en milieu liquide au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73 et B65) et du dispositif "Dehérain" (D4 et D10), les résultats sont exprimés en germes g^{-1} de sol.

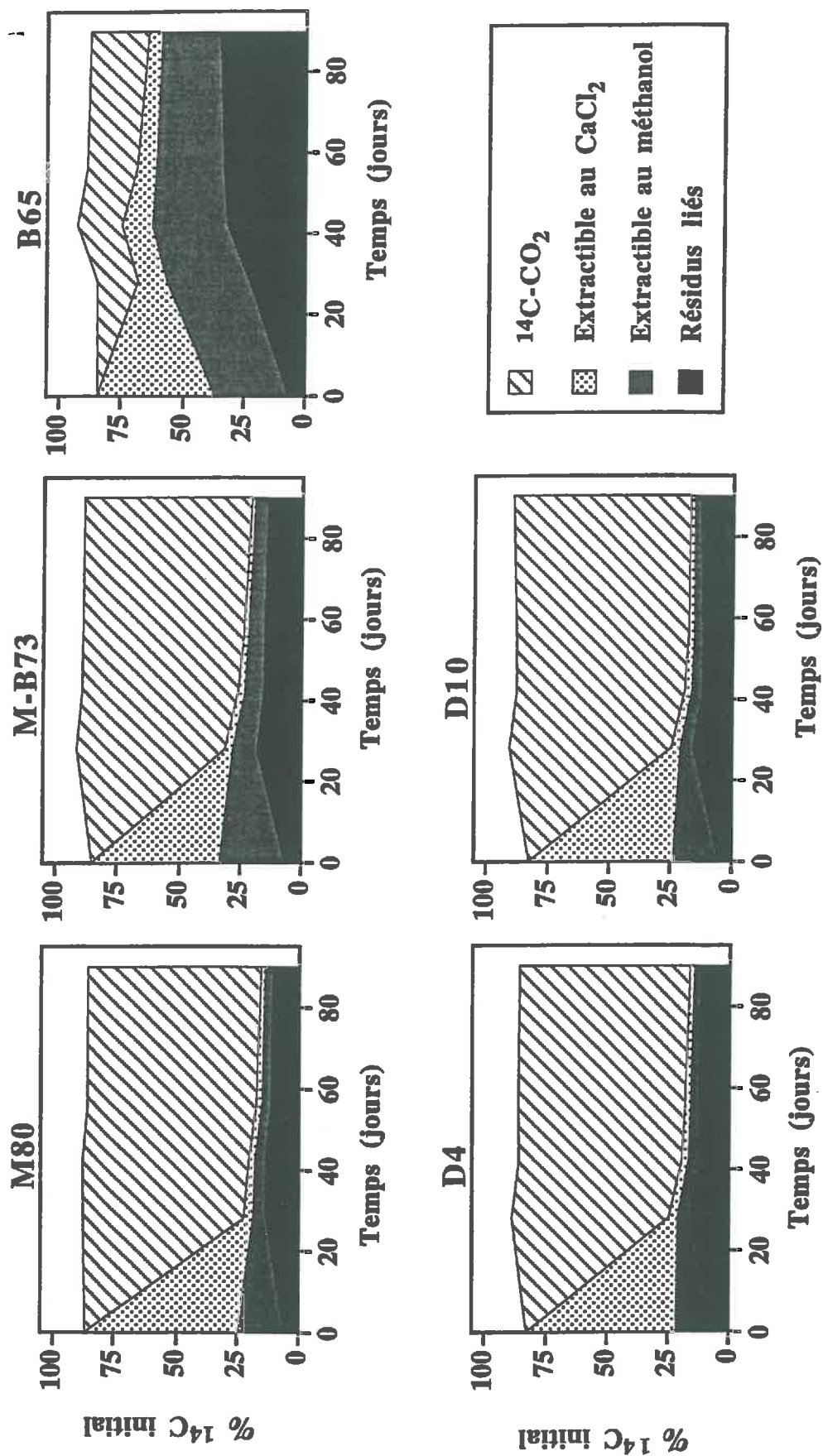
Sols	0 jour	7 jours	28 jours	56 jours	90 jours
<u>Plateau</u>					
M80	$2.3 \cdot 10^3 \pm 1.5$	$4.8 \cdot 10^4 \pm 3.6$	$9.5 \cdot 10^3 \pm 0.0$	< sd*	< sd
M-B73	$0.4 \cdot 10^3 \pm 0.2$	$1.7 \cdot 10^3 \pm 1.4$	$3.0 \cdot 10^3 \pm 2.3$	< sd	< sd
B65	< sd	< sd	< sd	< sd	< sd
<u>Dispositif "Dehérain"</u>					
D4	$0.3 \cdot 10^3 \pm 0.2$	$0.7 \cdot 10^3 \pm 0.4$	$0.8 \cdot 10^3 \pm 0.1$	< sd	< sd
D10	< sd	$1.0 \cdot 10^3 \pm 0.9$	$3.0 \cdot 10^3 \pm 2.0$	< sd	< sd

* seuil de détection

3.3.3. Distribution de la radioactivité totale

Les bilans de la distribution de la radioactivité initiale de la simazine apportée ne bouclent pas à 100% (figure 2.9). Cela est dû à la méthode du volume mort utilisée pour l'apport de cette molécule d'après un essai fait au laboratoire, les pertes ayant lieu au moment du transfert du sol mort dans le sol incubé. Les résultats détaillés sont donnés en annexe 2.3. Comme dans le cas de l'atrazine, les fractions extractibles de la simazine diminuent rapidement et sont faibles en fin d'incubation dans les sols où la minéralisation est très importante. Elles diminuent dans tous les sols au cours des incubations, soit en raison de la forte minéralisation dans les sols des monocultures de maïs ou de la rotation maïs-blé, soit en

Figure 2.9 : Evolution de la répartition de la radioactivité entre les fractions non extractible, extractible au CaCl_2 et au méthanol, et minéralisée de la simazine au cours des incubations dans les sols des parcelles du plateau (M80, M-B73 et B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4 et D10). Les résultats détaillés sont donnés en annexe 2.3.



raison de la formation de résidus liés. Celle-ci est très rapide. Immédiatement après l'apport de cet herbicide elle représente 6% de la radioactivité initiale dans les parcelles M80, M4 et M10, 7% dans les parcelles M-B73 et B65. Elle augmente rapidement pour se stabiliser entre 11 et 14% dans les sols de monoculture de maïs ou de la rotation maïs-blé. Dans la parcelle B65 (monoculture de blé), la proportion de résidus liés représente 35.5% de la radioactivité initiale en fin d'incubation, proportion inférieure à celle observée pour l'atrazine (43.4%).

L'extractibilité des résidus diminue avec le temps d'incubation pour l'atrazine et la simazine, ce qui indique une augmentation de rétention des résidus sur le sol avec le temps d'incubation (Lichtenstein et al., 1977 ; Khan, 1980 ; Bertin et Schiavon, 1989 ; Barriuso et al., 1991). La formation des résidus liés est plus rapide juste après l'apport de la simazine dans les sols par rapport à l'atrazine. La simazine présente un K_{oc} (130-2200) plus élevé que celui de l'atrazine (57-174), ce qui favorise l'adsorption rapide de la simazine. Ainsi, la proportion de résidus liés est plus élevée en fin d'incubation dans les monocultures de maïs et la rotation maïs-blé, étant donné que les taux de minéralisation dans ces sols sont moins élevés que ceux observés pour l'atrazine.

3.3.4. Caractérisation de la radioactivité extractible

Les résultats des fractions extractibles au méthanol et au $CaCl_2$ sont cumulés après l'analyse de chacune séparément. Les résultats de l'analyse de ces fractions séparées sont donnés en annexes 2.8 et 2.9. Les voies de dégradation de la simazine dans les sols sont semblables à celles de l'atrazine. Les voies de dégradation de la simazine sont présentées dans la figure 2.10, celles de l'atrazine sont déjà données dans la figure 1 de l'introduction générale. Trois métabolites sont détectés dans les extraits analysés provenant des incubations de sols avec la simazine (figure 2.11, tableau 2.9). Ils correspondent par ordre décroissant de temps de rétention à : M1 (14 min), M2 (6 min) et M3 (3min). Ces derniers correspondent aux mêmes temps de rétention que l'HYA, la DIA et la DEIA respectivement pour l'atrazine et pourraient correspondre à l'hydroxysimazine, la dééthylsimazine identique à la DIA et la didééthylsimazine identique à la DEIA. La solution initiale apportée au sol ne contient en fait que 70 à 75% de simazine, le reste de la radioactivité correspondant à 10% de M3 et 15% de M2 (tableau 2.9 et figure 2.11). La proportion de simazine diminue rapidement dans les monocultures de maïs au cours des incubations. La simazine a disparu de la fraction extractible dans les deux parcelles du dispositif "Dehérain" et ne représente plus que 14.6% dans le sol de la parcelle M80 en fin d'incubation. Parallèlement, la proportion de M3

Figure 2.10 : Voies de dégradation de la simazine dans le sol.

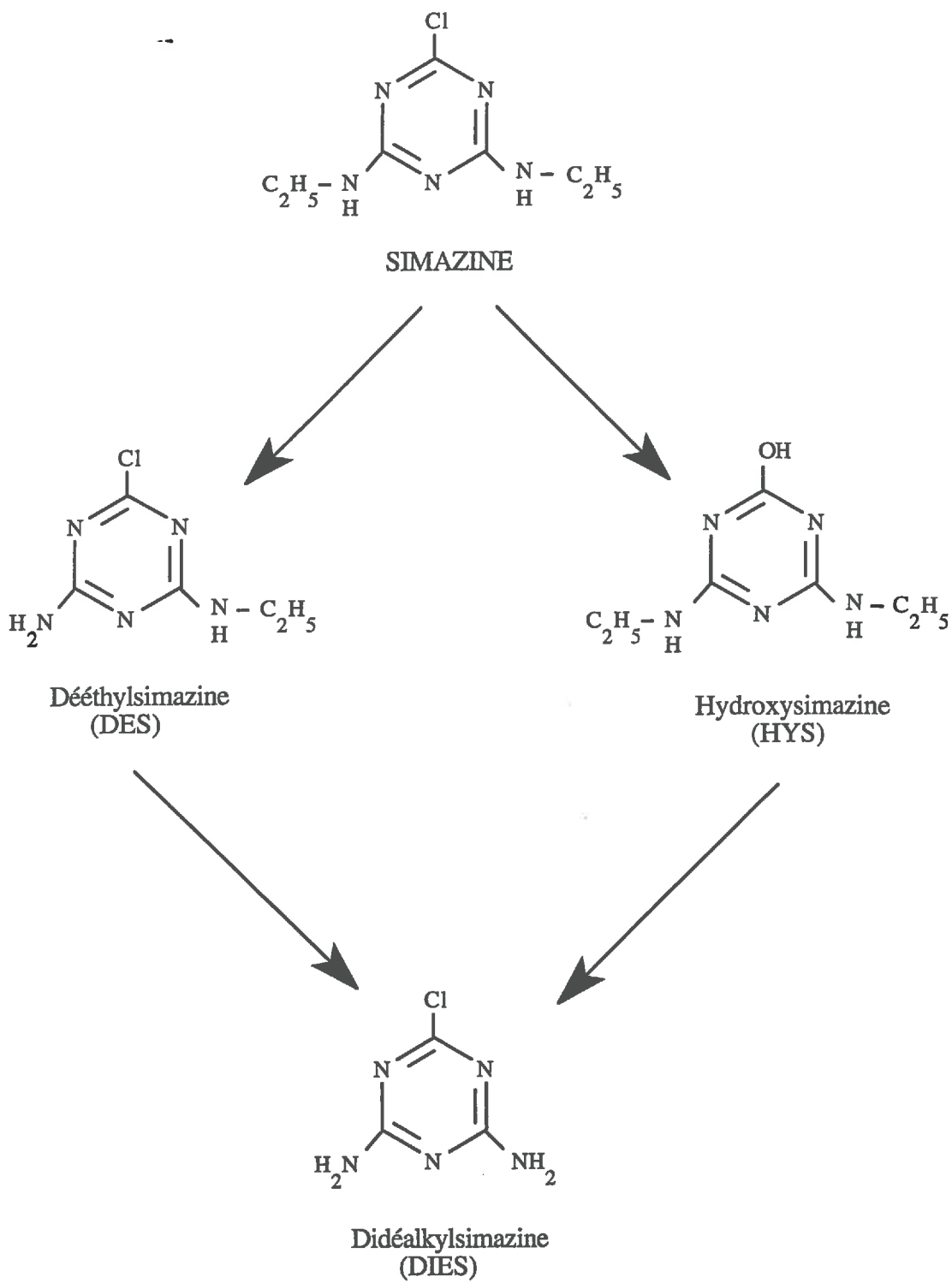


Figure 2.11 : Evolution de la répartition de la radioactivité extractible de ¹⁴C-simazine au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4, D10). Résultats exprimés en % de la radioactivité extractible.

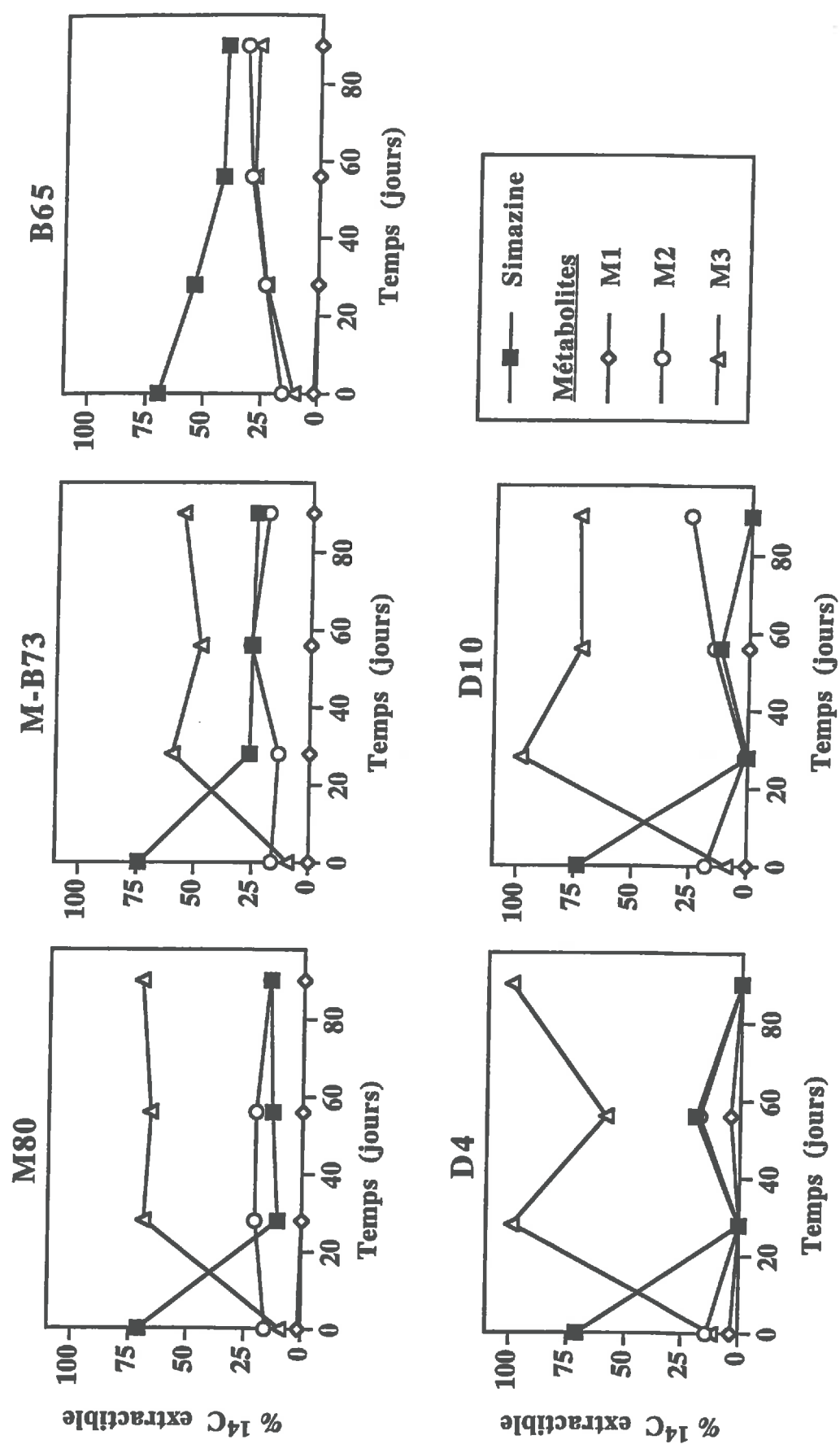


Tableau 2.9 : Caractérisation de la radioactivité extractible au cours des incubations de ¹⁴C-simazine dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehérain" (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Sols	Simazine	Métabolites		
		M1	M2	M3
<i>Parcelle M80</i>				
0 j	71.0	1.4	15.9	9.4
28 j	10.6	0	20.5	69.0
56 j	13.2	0	20.4	66.4
90 j	14.6	0	14.8	70.6
<i>Parcelle M-B73</i>				
0 j	74.2	0	16.4	9.1
28 j	26.4	0	13.7	60.0
56 j	25.7	0	26.2	48.1
90 j	24.4	0	19.2	56.4
<i>Parcelle B65</i>				
0 j	69.4	1.3	15.3	10.2
28 j	54.2	0	23.1	22.7
56 j	42.1	0	29.6	28.3
90 j	40.7	0	32.1	27.2
<i>Parcelle D4</i>				
0 j	70.8	3.5	14.2	11.6
28 j	0	0	0	99.1
56 j	19.4	4.1	17.8	58.6
90 j	0	0	0	100.0
<i>Parcelle D10</i>				
0 j	73.4	0	17.9	8.7
28 j	0	0	1.1	98.3
56 j	12.3	0	15.2	72.5
90 j	0	0	26.1	73.9

augmente et représente 70.6% de la radioactivité extractible alors que celle de M2 est relativement stable (14.8%). Dans le sol de la rotation maïs-blé, la diminution de la simazine est moins rapide. En fin d'incubation, elle représente encore 24.4% de la radioactivité extractible. Simultanément, l'augmentation de M3 stoppe à 56.4% de la radioactivité extractible. Dans le sol de la monoculture de blé, 40.7% de la radioactivité extractible sont encore sous forme de simazine à la fin des incubations. La proportion de M3 n'augmente que jusqu'à 27.2%. En revanche, la proportion de M2 augmente au cours de l'incubation et représente 32.1% de la radioactivité extractible en fin d'incubation.

Dans les monocultures de maïs et la rotation maïs-blé, la proportion de métabolite M2 de la simazine reste importante au cours de l'incubation en comparaison avec les résultats des incubations avec l'atrazine où la dééthylatrazine disparaît en fin d'incubation, sauf dans le cas de la parcelle D4 où le métabolite M2 disparaît également en fin d'incubation. La didéalkylation reste la voie métabolique la plus abondante pour les deux molécules. Comme pour l'atrazine dans la monoculture de blé, le métabolite monodéalkylé M2 de la simazine est en proportion majoritaire par rapport à celle de métabolite didéalkylé M3. Dans une étude faite par Behki et Khan (1994) sur la dégradation de la simazine par *Rhodococcus* Strain B-30, ce microorganisme dégrade la simazine avec l'accumulation d'un seul métabolite mono-N-déalkylé (2-chloro-4-(éthylamino)-6-amino-s-triazine).

Les durées de demi-vie de la simazine sont estimées comme pour l'atrazine à partir de l'évolution de la simazine dans la fraction extractible par rapport à la quantité initiale apportée de la simazine (figure 2.12). Les paramètres des cinétiques d'évolution de la concentration de la simazine dans la fraction extractible sont présentés dans le tableau 2.10. Les $T_{1/2}$ de la simazine ne sont pas très différents de ceux de l'atrazine. Les $T_{1/2}$ les plus courts sont mesurés dans les sols de monoculture de maïs (2 et 5 jours). Le $T_{1/2}$ est légèrement plus élevé dans la rotation maïs-blé (7 jours) et nettement plus élevé dans la monoculture de blé (35 jours). Dans les sols de parcelles D4 et D10, le $T_{1/2}$ de la simazine est de 2 jours, alors qu'au chapitre 1 le $T_{1/2}$ estimé dans les deux sols était de 8 et 30 jours.

Figure 2.12: Comparaison des cinétiques simulées et expérimentales de la simazine dans la fraction extractible par rapport à la quantité initiale apportée, au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10).

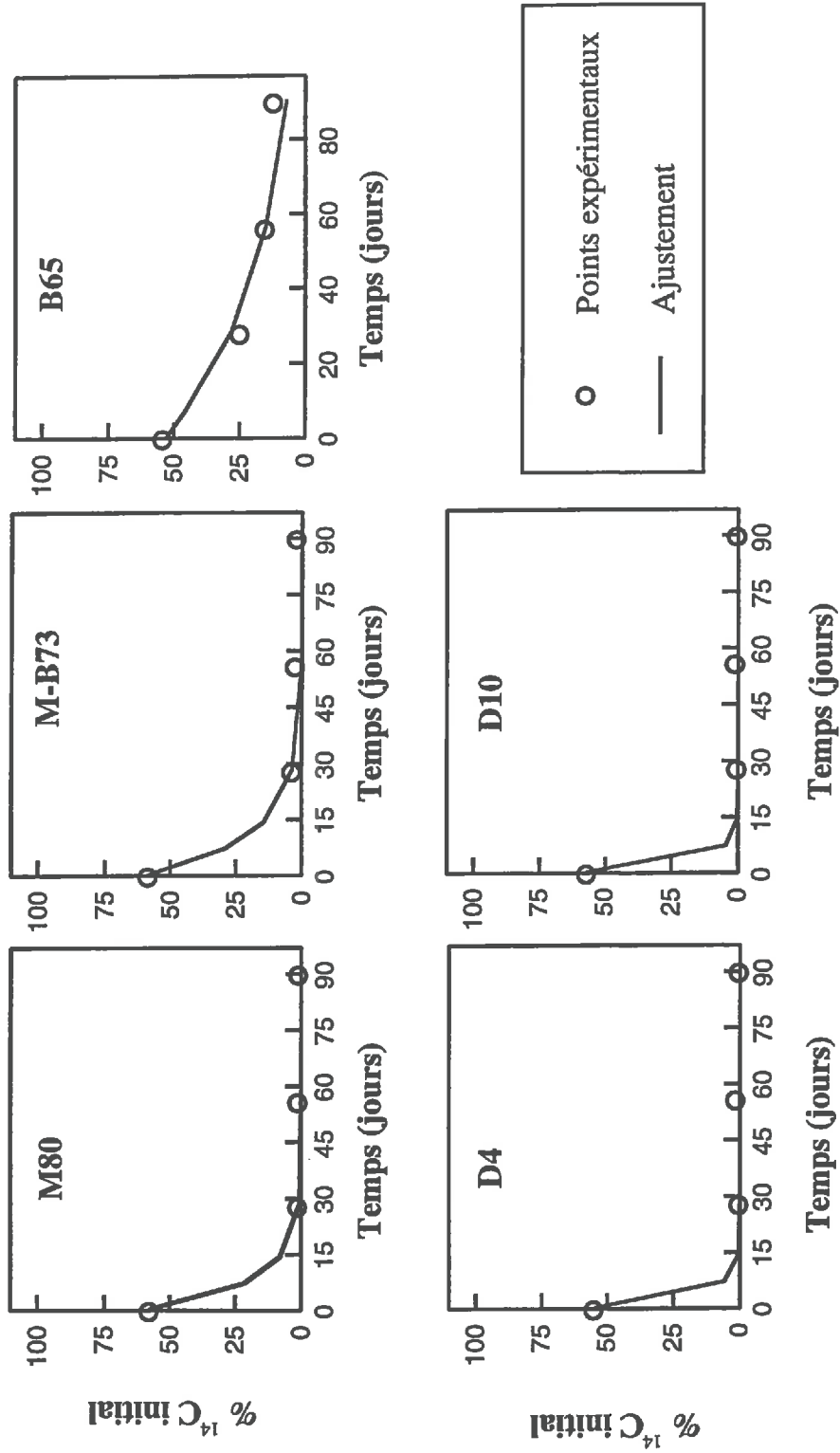


Tableau 2.10 : Paramètres des cinétiques d'ordre 1 utilisées pour décrire l'évolution de la concentration de la simazine dans la fraction extractible au cours des incubations. Les concentrations sont exprimées en fonction de la radioactivité initiale. ($C = C_0 e^{-kt}$; C_0 : concentration initiale, k : constante de vitesse de dégradation et C : concentration à l'instant t).

Parcelles	k (jour ⁻¹)	r^2	$T_{1/2}$ (jours)
M80	0.14	0.99	5
M-B73	0.10	0.99	7
B65	0.02	0.96	35
D4	0.32	0.99	2
D10	0.36	0.99	2

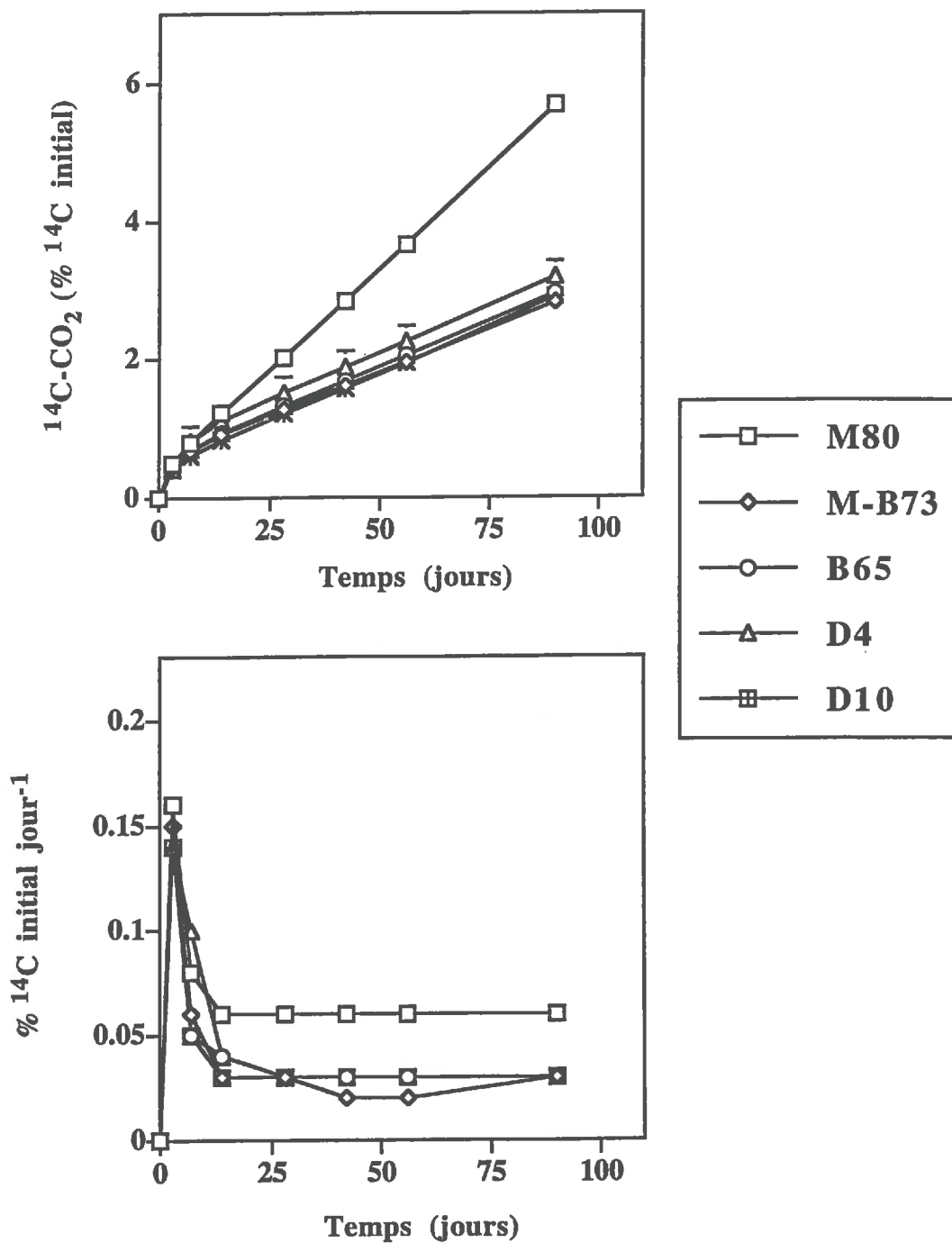
3.4. Evolution du triticonazole au cours des incubations

3.4.1. Minéralisation

La minéralisation du cycle triazole du triticonazole est très faible durant tout le temps de l'incubation (figure 2.13). Après 90 jours d'incubation, elle atteint seulement 3.0% de la radioactivité initiale apportée dans les échantillons de sol des parcelles M4, M10, M-B73 et B65. Par contre dans la parcelle M80, cette minéralisation est deux fois plus élevée, et atteint 6.0% de la radioactivité initiale, confirmant les résultats obtenus précédemment dans un sol similaire (Tarabelli, 1995 ; Beigel et al., 1998). Les fongicides de la famille des triazoles sont très stables dans les sols (Patil et al., 1988). Les champignons et les bactéries participent à la minéralisation du triticonazole, car lorsque l'activité bactérienne est inhibée, la dégradation est beaucoup plus faible (Tarabelli, 1995). La minéralisation du triticonazole peut être due à une microflore de type co-métabolisant. En effet, la dégradation de ce fongicide augmente avec l'addition d'un substrat carboné facilement métabolisable par les microorganismes (Charnay et al., 1998). Cela expliquerait sa minéralisation plus importante dans la parcelle où l'activité microbienne totale est plus forte (parcelle B65).

L'étude des vitesses de minéralisation du triticonazole montre que la vitesse maximale est atteinte dès le 3^{ème} jour de l'incubation dans tous les échantillons de sols étudiés (figure 2.13). Après 14 jours d'incubation, la vitesse de minéralisation est légèrement supérieure

Figure 2.13 : Cinétiques de minéralisation du triticonazole et d'évolution de sa vitesse de minéralisation, au cours d'incubations de sols provenant des parcelles du dispositif "Dehérain" (D4 et D10) et du plateau (M80, M-B73 et B65). Les écarts-types des mesures sont indiqués quand ils sont plus larges que les symboles.



dans la parcelle M80 par rapport aux autres parcelles. Ces vitesses de minéralisation diminuent après 7 jours d'incubation et elles restent équivalentes jusqu'à la fin de l'incubation.

3.4.2. Distribution de la radioactivité totale

Les bilans de la distribution de la radioactivité initiale du triticonazole apporté ne bouclent pas à 100%. Comme pour la simazine, cela est dû à la méthode du volume de sol mort utilisée pour l'apport de cette molécule. Etant donné que la minéralisation du triticonazole est très faible dans les sols étudiés, les fractions extractibles et non extractibles sont plus importantes (figure 2.14). Les résultats détaillés sont donnés en annexe 2.4. La fraction extractible au méthanol est plus élevée que la fraction extractible au CaCl_2 , cette dernière diminuant au cours des incubations. Elle représente 13% à 19% de la radioactivité initiale en fin d'incubation, alors que la fraction extractible au méthanol représente 36% à 43% de la radioactivité initiale. Immédiatement après l'apport du triticonazole, la proportion des résidus liés est plus élevée dans le sol de la monoculture de blé et la rotation maïs-blé où elle représente 4% de la radioactivité initiale. Ces deux sols ont les teneurs les plus élevées en matière organique qui a un rôle important dans la rétention des pesticides (Shea, 1989; Alva et al., 1990; Scheunert, 1992). Dans les monocultures de maïs (M80, D4, D10), la fraction non extractible représente 3% de la radioactivité initiale. Cette fraction non extractible (résidus liés) augmente au cours de l'incubation pour atteindre 21% à 30% de la radioactivité initiale en fin d'incubation, dans tous les sols. Des proportions similaires sont observées par Beigel et al. (1998) qui trouvent aussi qu'une fraction de résidus liés est formée immédiatement après application du triticonazole dans le sol, et que la proportion de résidus liés augmente avec le temps d'incubation.

3.4.4. Caractérisation de la radioactivité extractible

Concernant le triticonazole, les métabolites n'ont pas été identifiés, deux pics chromatographiques ont été observés, en plus de celui correspondant à la molécule mère. Les temps de rétention pour ces deux pics sont de 6 min pour M1 et 3 min pour M2. Les résultats de l'analyse des fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol séparés sont donnés en annexes 2.10 et 2.11. La solution initiale contient entre 90 et 93% de triticonazole, le reste de la radioactivité étant également réparti entre les deux métabolites (figure 2.15 et tableau 2.11). Dans tous les sols des parcelles, la proportion de triticonazole diminue avec le temps d'incubation plus rapidement dans le sol de la monoculture de blé (50.7% de la radioactivité

Figure 2.14 : Evolution de la répartition de la radioactivité entre les fractions non extractible, extractible au CaCl_2 et au méthanol, et minéralisée du triticonazole au cours des incubations dans les sols des parcelles du plateau (M80, M-B73 et B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4 et D10). Les résultats détaillés sont donnés en annexe 2.4.

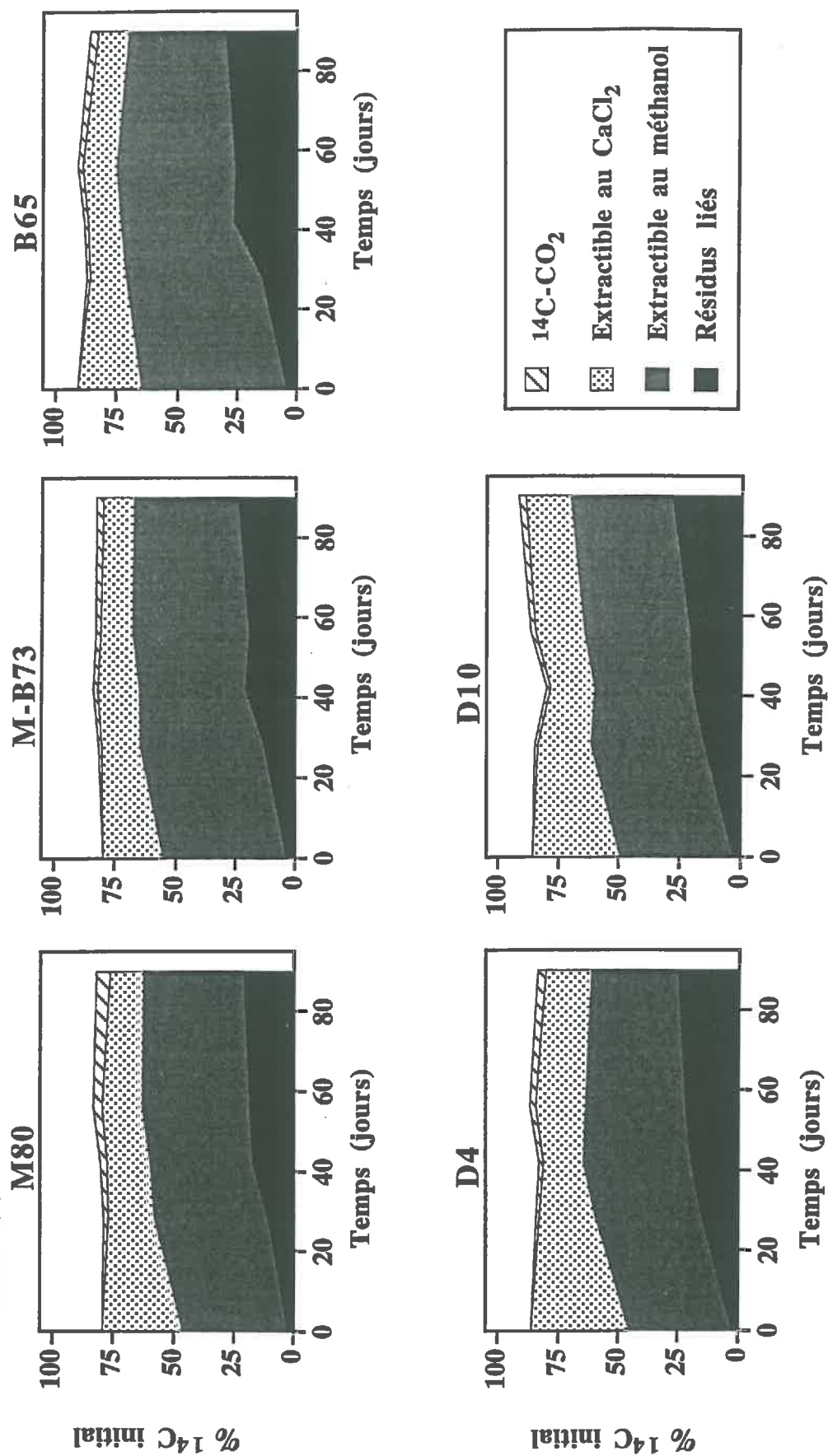


Figure 2.15 : Evolution de la répartition de la radioactivité extractible de ¹⁴C-triticonazole au cours des incubations de sois du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehéraïn" (M4, M10). Résultats exprimés en % de la radioactivité extractible.

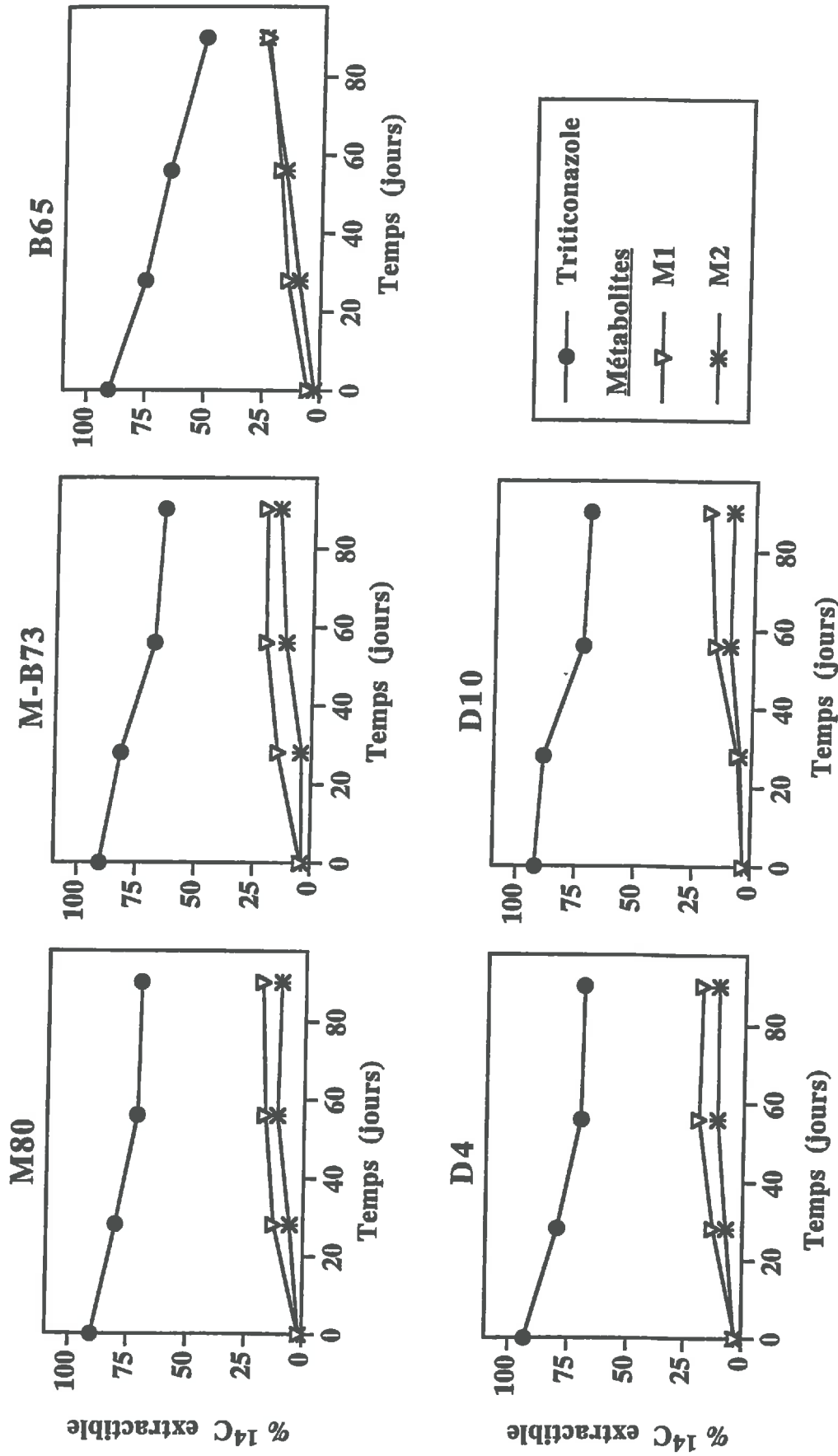


Tableau 2.11 : Caractérisation de la radioactivité extractible au cours des incubations de ¹⁴C-triticonazole dans les sols du dispositif plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif "Dehéraïn" (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Sols	Triticonazole	Métabolites	
		M1	M2
<u>Parcelle M80</u>			
0 j	90.5	1.7	1.7
28 j	80.4	13.0	5.9
56 j	71.4	16.9	11.6
90 j	70.5	18.7	10.5
<u>Parcelle M-B73</u>			
0 j	90.4	4.3	3.9
28 j	81.7	14.7	4.6
56 j	67.9	20.3	11.7
90 j	64.3	20.9	14.9
<u>Parcelle B65</u>			
0 j	90.5	5.4	2.4
28 j	75.1	14.2	9.3
56 j	65.2	18.1	15.7
90 j	50.7	24.1	25.2
<u>Parcelle D4</u>			
0 j	93.2	2.6	3.3
28 j	79.5	12.8	7.1
56 j	69.7	19.3	11.2
90 j	68.9	18.4	11.3
<u>Parcelle D10</u>			
0 j	91.8	3.0	3.1
28 j	88.6	6.1	5.1
56 j	72.3	16.4	10.0
90 j	69.9	19.5	9.4

extractible en fin d'incubation) que dans les sols des autres parcelles (64 à 70% de la radioactivité extractible en fin d'incubation). Parallèlement, les proportions des deux métabolites augmentent jusqu'à 10 à 25% de la radioactivité extractible, celle de métabolite M1 étant en général supérieure à M2. Ces deux métabolites ont également été détectés en faible proportion par Beigel et al. (1998).

Le $T_{1/2}$ du triticonazole est estimé comme pour l'atrazine et la simazine à partir de l'évolution de la molécule mère dans la fraction extractible par rapport à la quantité initiale apportée de triticonazole (figure 2.16). Les paramètres des cinétiques d'évolution de la concentration du triticonazole dans la fraction extractible sont présentés dans le tableau 2.12. Le $T_{1/2}$ du triticonazole est le plus faible dans le sol de la monoculture de blé (B65) où est observée la minéralisation la plus importante. Ensuite, les $T_{1/2}$ augmentent inversement par rapport aux taux de minéralisation observés au cours des incubations. Les valeurs obtenues pour cette molécule au cours de cette expérience sont du même ordre de grandeur de celles estimées dans le chapitre 1.

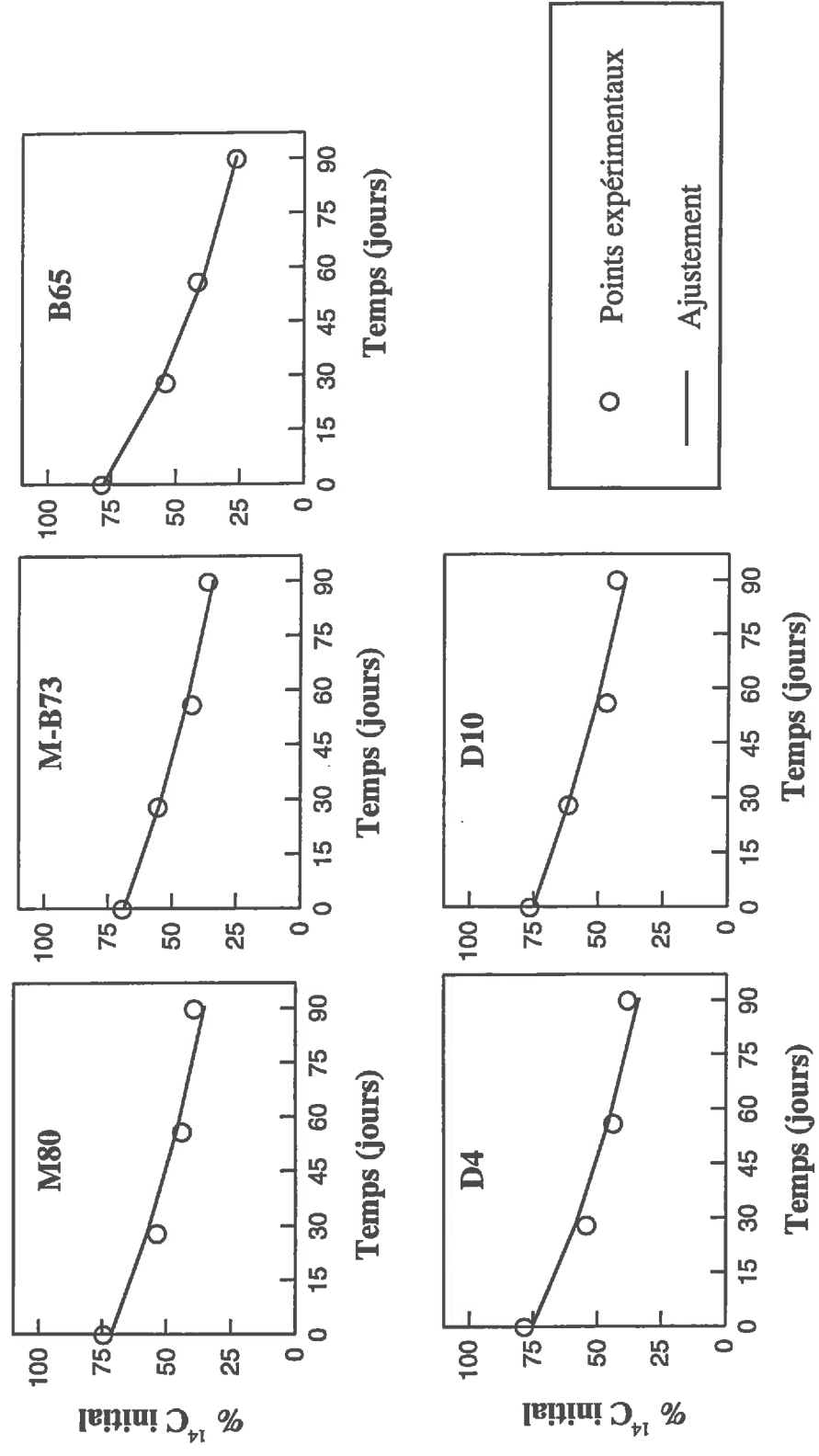
Tableau 2.12 : Paramètres des cinétiques d'ordre 1 utilisées pour décrire l'évolution de la concentration du triticonazole dans la fraction extractible au cours des incubations. Les concentrations sont exprimées en fonction de la radioactivité initiale. ($C = C_0 e^{-kt}$; C_0 : concentration initiale, k : constante de vitesse de dégradation et C : concentration à l'instant t).

Parcelles	k (jour ⁻¹)	r^2	$T_{1/2}$ (jours)
M80	0.01	0.94	89
M-B73	0.01	0.98	90
B65	0.01	0.99	58
D4	0.01	0.94	87
D10	0.01	0.96	99

IV. Conclusion

La minéralisation de l'atrazine est très rapide dans les sols sur lesquels l'herbicide a été fréquemment appliqué au champ, tandis qu'elle est très faible dans le sol qui ne l'a jamais

Figure 2.16: Comparaison des cinétiques simulées et expérimentales du triticonazole dans la fraction extractible par rapport à la quantité initiale apportée au cours des incubations de sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10)



reçu au champ ; sa dégradation est bien liée à sa fréquence d'application au champ (Barriuso et Houot, 1996). Les années d'application de cet herbicide dans le même sol ont provoqué le développement d'une population adaptée à sa dégradation. Dans la parcelle sous rotation maïs-blé, la minéralisation est également très importante l'année où elle est cultivée en maïs, avec toutefois un démarrage plus lent de la minéralisation au cours des premiers jours d'incubation. Cette minéralisation est beaucoup plus lente dans le même sol l'année où elle est cultivée en blé (Abdelhafid, 1994).

La taille de la population microbienne dégradante est indépendante de celle de la microflore totale, et il n'y a pas de relation entre l'activité microbienne totale du sol et l'activité spécifique de minéralisation de l'atrazine. Le niveau de fertilisation azotée semble peu influencer la minéralisation de l'atrazine. Dans les sols où la minéralisation rapide de l'atrazine est observée, la simazine, autre triazine très proche de l'atrazine se minéralise rapidement également. La microflore capable de dégrader l'atrazine dégrade également la simazine témoignant du processus d'adaptation croisée de la microflore (Mueller et al., 1989 ; Tal et al., 1990). Il semblerait que les sols utilisés présentent une exceptionnelle capacité minéralisatrice des noyaux triaziniques chloro-substitués, où la spécificité de la microflore est liée à la présence d'un substituant chloré (Barriuso et Houot, 1996 ; Barriuso et al., 1997). En revanche le triticonazole qui est un pesticide hétérocyclique azoté mais appartenant à la famille des triazoles, se minéralise très peu dans les mêmes sols : la minéralisation atteint seulement 3 à 6% de la radioactivité apportée initialement. La minéralisation du triticonazole se fait par co-métabolisme, car cette minéralisation est plus élevée là où l'activité microbienne est la plus importante.

La formation des résidus liés est une autre voie de dissipation des pesticides. La proportion des résidus liés est plus importante lorsque la dégradation est très faible dans le sol, et leur proportion augmente progressivement avec le temps d'incubation. La formation des résidus liés est rapide immédiatement après l'apport de pesticide dans le sol, elle est plus importante dans le sol dont la teneur en matière organique est plus élevée. En effet, dans le sol de la monoculture de blé qui présente la teneur en matière organique la plus élevée par rapport aux autres sols étudiés, la proportion de résidus liés en fin d'incubation représente 43, 36 et 30% de la radioactivité initiale respectivement pour l'atrazine, la simazine et le triticonazole.

Dans les sols où la minéralisation de l'atrazine est très rapide, la dééthyl-déisopropylatrazine est le métabolite le plus abondant. L'hydroxyatrazine n'est pas

détectée dans ces sols, il est possible que ce métabolite se forme rapidement puis soit immédiatement dégradé. En revanche dans le sol où la minéralisation de l'atrazine est faible (B65), des proportions non négligeables d'hydroxyatrazine sont observées ainsi que l'accumulation de quantités importantes de métabolites déalkylés, la dééthylatrazine étant la plus abondante. La proportion élevée de résidus liés formée dans ce sol peut être constituée par ces métabolites déalkylés comme l'ont montré Schiavon (1988) et Winkelmann et Klaine (1991). Dans le cas de la simazine, trois métabolites sont détectés qui semblent correspondre à l'hydroxysimazine, la dééthylsimazine et la didééthylsimazine. Les métabolites déalkylés sont les plus abondants.

Les durées de demi-vie des trois molécules, estimées à partir de leur évolution dans la fraction extractible par rapport à la quantité initiale du pesticide apportée, donnent des valeurs faibles de temps de demi-vie pour l'atrazine et la simazine dans les sols où une dégradation rapide est observée, par rapport aux valeurs observées dans la littérature (Walker, 1978 ; Walker et al., 1983 ; Walker et Roberts, 1993 ; Dabène et al., 1995). Les durées de demi-vie estimées de l'atrazine et la simazine ne sont pas très différentes dans les différents sols, elles sont de 2 à 5 jours dans les monocultures de maïs, de 6 à 7 jours dans la rotation maïs-blé et de 32 à 35 jours dans la monoculture de blé. En revanche, les durées de demi-vie du triticonazole estimées dans les mêmes sols sont plus élevées et sont de 58 à 99 jours.

Conclusion de la première partie

En conclusion, la fréquence d'application de l'atrazine au champ est le facteur prépondérant dans la mise en place de la dégradation accélérée de cet herbicide. Ainsi dans le sol d'une monoculture de blé, la dégradation de l'atrazine est lente, alors que dans le sol provenant de monocultures de maïs ou sous rotation maïs-blé, la dégradation de l'atrazine est très rapide. Cette dégradation va jusqu'à la minéralisation complète du cycle triazinique de la molécule. Les seuls métabolites détectés au cours des incubations de sols adaptés à la minéralisation de l'atrazine sont des métabolites déalkylés sans que l'on puisse conclure quant à la voie métabolique de dégradation de l'atrazine. Dans un précédent travail, nous avons montré que la disponibilité en carbone et en azote du milieu influençait le devenir de l'atrazine d'un sol (Abdelhafid, 1994). Il a été montré d'autre part, que les microorganismes responsables de la minéralisation complète de l'atrazine utilisaient l'azote de la molécule comme source d'azote (Mandelbaum et al., 1995 ; Radosevich et al., 1995) et que la présence d'azote minéral inhibait la minéralisation de l'atrazine (Alvey et Crowley, 1995). Cependant, il semble qu'une forte concentration en azote minéral soit nécessaire et la simple minéralisation de l'azote organique du sol ne suffit pas à moduler la minéralisation de l'atrazine. D'autre part, des différences de disponibilité de l'azote de la matière organique du sol dues à la différenciation de leur statut organique liée à des pratiques de fertilisation différentes n'ont pas d'influence sur la cinétique de minéralisation de l'atrazine.

Dans les sols adaptés à la minéralisation rapide de l'atrazine, on observe également celle de la simazine, autre chloro-triazine. Cela confirme les résultats de Barriuso et Houot (1996) et la possibilité d'adaptation croisée de la microflore des sols. Il a déjà été montré pour d'autres pesticides que lorsque des microorganismes étaient capables de dégrader entièrement un pesticide, ils pourraient également dégrader des molécules proches de la même famille (Mueller et al., 1989 ; Charnay, 1993). Pour ces deux molécules, atrazine et simazine, les temps de demi-vie calculés (5 à 7 jours) sont beaucoup plus courts que ceux rencontrés habituellement dans la bibliographie (70 à 110 jours, Dabène et al., 1995). En revanche, les autres molécules testées se dégradent toutes plus lentement et la dégradation tend à être plus rapide dans les parcelles les plus riches en matière organique qui sont celles qui ont une activité microbiologique globale la plus importante. Elles se dégraderaient donc plutôt par co-métabolisme. Pour ces autres molécules, les temps de demi-vie estimés correspondent à ceux rencontrés habituellement dans la bibliographie. Là encore dans les sols étudiés, une minéralisation d'azote plus faible ne stimule pas la dégradation des divers pesticides azotés étudiés.

DEUXIÈME PARTIE

**Vitesse de mise en place de la minéralisation accélérée
de l'atrazine - Contribution à la caractérisation de la
voie métabolique de dégradation de l'atrazine dans les
sols**

Introduction

De manière générale, les produits phytosanitaires doivent contrôler leurs cibles biologiques pendant le cycle de végétation, sans laisser de résidus toxiques dans le sol à la fin de la saison. Mais certains facteurs comme la variation des situations agronomiques et surtout les conditions climatiques, peuvent influencer sur la dispersion ainsi que sur la dégradation de ces produits. Cependant, l'éventuelle accélération des phénomènes dégradatifs limite dans une large mesure les risques de contamination durable de l'environnement. Pour cela, l'augmentation des capacités biologiques du sol à dégrader certains pesticides a souvent été évoquée pour expliquer le phénomène de dégradation accélérée. Cette dernière résulte de l'adaptation de la microflore du sol à la dégradation du produit après plusieurs applications. Ce phénomène d'augmentation de la vitesse de dégradation d'un produit appliqué dans les mêmes conditions de laboratoire a d'abord été rapporté par Audus en 1949 dans son étude sur la détoxification du 2,4-D. Ainsi Audus (1951) observait la disparition totale de la phase de latence précédant la phase active de dégradation du 2, 4-D ou du MCP après plusieurs additions successives de produits. Par la suite, d'autres travaux ont mis en évidence l'importance de traitements répétés des sols sur l'adaptation à la dégradation de pesticides (Rahman et al., 1979 ; Wilson, 1984 ; Bailey et Coffey, 1986 ; Roeth, 1986 ; Skipper et al., 1986 ; Kaufman, 1987). Lors des dernières années, la dégradation accélérée des pesticides a été largement étudiée, principalement à cause de ses conséquences vis-à-vis de la protection des cultures (Charnay, 1993 ; Suett et al., 1996).

Bien que l'atrazine soit un herbicide largement utilisé depuis longtemps, la plupart des études sur sa dégradation rapportaient jusqu'à récemment des vitesses lentes de dégradation. Dans un essai de laboratoire dans des sols prétraités ou non, les taux de dégradation étaient égaux (Walker et Welch, 1991). Récemment, plusieurs auteurs ont montré qu'il était possible après enrichissement de la population microbienne en germes dégradants, d'isoler des microorganismes capables de dégrader rapidement l'atrazine (Yanze Kontchou et Gschwind, 1993, 1995 ; Mandelbaum et al., 1993b ; Assaf et Turco, 1994 ; Behki et Khan, 1994 ; De Souza et al., 1995 ; Van Zwieten et Kennedy, 1995 ; Kauffmann et Mandelbaum, 1996). Barriuso et Houot (1996) rapportent pour la première fois la relation entre la vitesse de dégradation de l'atrazine et sa fréquence d'application au champ. Les années d'application de cet herbicide dans un même sol peuvent provoquer le développement d'une population adaptée à sa dégradation. Ce phénomène peut se développer dans de nombreux sols, un pH

supérieur à 7 semblant être le seul critère déterminant dans la mise en place de l'adaptation de la microflore à la dégradation de l'atrazine (Pussemier et al., 1997 ; Houot et Barriuso, 1998).

D'après les résultats observés dans le chapitre précédent dans un sol qui n'a jamais reçu d'atrazine au champ, la dégradation de l'atrazine est lente. L'adaptation de la microflore de ce sol après plusieurs applications successives au laboratoire devrait se traduire par une augmentation de la vitesse de dégradation de l'herbicide, ce qui sera étudié dans cette partie. La dose de traitement d'un produit peut également influencer de façon contradictoire sur la croissance de la population microbienne dégradante. En effet, elle peut s'avérer toxique pour une partie de la microflore concernée. Cependant, le fait d'appliquer des doses élevées de pesticides de façon répétée peut favoriser le développement de cette microflore. Dans cette partie, l'influence d'applications répétées d'atrazine à des doses croissantes sur la vitesse et l'intensité de la minéralisation de l'atrazine, sur un sol où sa dégradation est initialement lente est testée.

D'autre part, dans la partie précédente, on ne pouvait conclure quant à la voie métabolique de dégradation de l'atrazine. On a longtemps cru que l'hydroxyatrazine ne pouvait provenir que d'une dégradation abiotique (Armstrong et al., 1967 ; Skipper et al., 1967 ; Kaufman et Blake, 1970 ; Skipper et Volk, 1972). Récemment, l'origine biologique de l'hydroxyatrazine a été montrée, associée à la dégradation rapide de la molécule, sa formation constituant le premier intermédiaire de la dégradation (Mandelbaum et al., 1993b ; Assaf et Turco, 1994 ; Mandelbaum et al., 1995). L'isolement de microorganismes dégradant l'atrazine a fait l'objet de plusieurs études (tableau 1 dans l'introduction générale). Ces microorganismes isolés sont capables de dégrader l'atrazine rapidement voire d'aller jusqu'à la minéralisation complète du cycle triazinique. De Souza et al. (1995) et Boundy-Mills et al. (1997) ont cloné les gènes des enzymes responsables des premières étapes de la dégradation de l'atrazine chez *Pseudomonas* sp ADP. Cependant, la déalkylation peut également être la première étape de la dégradation rapide de l'atrazine et la déalkylation et la déhalogénéation peuvent même se produire simultanément (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Shao et al., 1995 ; Stucki et al. 1995). L'absence d'hydroxyatrazine dans la fraction résiduelle de la radioactivité extractible après 28 jours d'incubation ne signifie pas que la dégradation de l'atrazine ne se fasse pas par l'intermédiaire de celle-ci. Sa dégradation rapide après sa formation pourrait empêcher sa détection dans la radioactivité extractible. C'est pourquoi dans le second chapitre de cette partie, l'analyse fréquente de la radioactivité résiduelle extractible au cours des 20 premiers jours d'incubation de l'atrazine dans un sol adapté, devrait nous permettre de

détecter les métabolites constituant les premiers intermédiaires dans la voie de dégradation de l'atrazine et qui n'avaient pas été observés lors de l'étude précédente.

Chapitre 3 : Vitesse de mise en place de la minéralisation accélérée de l'atrazine

I. Introduction

L'objectif de ce chapitre est double :

- Mettre en évidence l'adaptation possible de la microflore d'un sol qui n'a jamais reçu d'atrazine au champ à la dégradation de cet herbicide après plusieurs applications successives au laboratoire. Cette adaptation devrait se traduire par l'accélération et l'augmentation de la dégradation de l'atrazine au cours des applications successives.

- Tester l'influence de la dose d'atrazine appliquée sur la rapidité d'adaptation de la microflore du sol à la dégradation de l'atrazine. L'effet des applications successives d'atrazine à différentes doses est également étudié, dans un sol dont la microflore est déjà adaptée à la dégradation de l'atrazine après plusieurs applications au champ.

II. Matériel et méthodes

2.1. Sols - molécule

Les horizons de surface (0-20 cm) sont prélevés en Décembre 1996 dans deux parcelles du plateau à Grignon. La parcelle B65 sous monoculture de blé a déjà été utilisée dans la première partie au chapitre 2. L'autre parcelle est sous monoculture de maïs depuis 1962. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 3.1. Les sols sont tamisés à 5 mm et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques des horizons de surface (0-20 cm) des sols provenant de deux parcelles du plateau de Grignon sous monoculture de blé et de maïs utilisées dans les chapitres 3 à 7. (Analyses réalisées au laboratoire d'Analyses de sols d'Arras).

Sols	Succession de culture	Granulométrie					CaCO ₃	pH (eau)
		Argiles	Limons	Sables	C organique	N total		
		(————— g kg ⁻¹ —————)						
M62	Monoculture de maïs	253	623	91	11.5	1.20	33	8.2
B65	Monoculture de blé	241	445	171	17.4	1.66	61	8.0

Trois solutions de ^{14}C -atrazine sont préparées dans le méthanol : solution A à 50 mg l⁻¹ et 11.5 MBq l⁻¹, solution B à 500 mg l⁻¹ et 11.8 MBq l⁻¹, solution C à 2500 mg l⁻¹ et 11.9 MBq l⁻¹. Trois solutions d'atrazine non marquée aux mêmes concentrations sont également préparées.

2.2 Incubations

Comme dans la partie précédente, le devenir de l'atrazine est étudié au cours d'incubations réalisées avec l'équivalent de 20 g de sol sec. Deux doses d'atrazine sont appliquées pour le sol de la monoculture de maïs : 0.5 mg kg⁻¹ de sol (D0.5) correspondant à la dose agronomique et 25 mg kg⁻¹ de sol (D25) et trois doses pour le sol de la monoculture de blé : 0.5 mg kg⁻¹ de sol (D0.5), 5 mg kg⁻¹ de sol (D5) et 25 mg kg⁻¹ de sol (D25). Cinq applications successives sont réalisées. A chaque application, la méthode du sol mort est utilisée. 200 µl des solutions méthanoliques d'atrazine marquée au ^{14}C ou non sont appliqués à 500 mg de sol séché à l'étuve à 120°C pendant 24 h puis broyé mécaniquement à 2 mm (sol mort) dans des microtubes en verre. Le méthanol est évaporé sous une hotte ventilée pendant 24 h. Puis le sol mort est incorporé au 20 g de sol à incuber. Le mélange est bien homogénéisé et placé dans des flacons fermés hermétiquement. Les incubations se font à l'obscurité à 28°C pendant 28 jours. L'humidité des sols est ajustée à 85% de la capacité de rétention, avec de l'eau MilliQ. Les applications d'atrazine se font tous les 28 jours. A chaque application trois flacons reçoivent de la ^{14}C -atrazine, les autres sont traités à l'atrazine froide avec la même méthode du sol mort. Sur les échantillons ayant reçu la ^{14}C -atrazine, le ^{14}C -CO₂ dégagé est piégé dans 2 ml de NaOH 1 N et mesuré périodiquement par scintillation liquide après addition de 10 ml de liquide scintillant (Ultima Gold XR, Packard), après 3, 7, 14 et 28 jours. Des incubations similaires dites de longue durée de sols traités avec les différentes doses de ^{14}C -atrazine sont également réalisées sur toute la durée de l'expérimentation (140 jours). L'humidité des échantillons de sols incubés est mesurée et ajustée au cours des incubations.

Après 28 jours d'incubation en présence de ^{14}C -atrazine aux différentes doses, la radioactivité résiduelle extractible au CaCl₂ est déterminée selon le même protocole que celui présenté au chapitre 2. La fraction de la radioactivité résiduelle extractible au méthanol est également déterminée pour les deux dernières applications et les incubations de longue durée. Pour ces dernières, la radioactivité non extractible est également déterminée afin de réaliser un bilan de la radioactivité appliquée. La caractérisation de la radioactivité extractible est

effectuée par HPLC selon le protocole décrit précédemment avec un volume d'injection de 800 μ l.

2.3. Numérations de la microflore dégradant l'atrazine

Simultanément en fin d'incubation après chaque application, des numérations de la microflore dégradant l'atrazine sont réalisées avec la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP), décrite au chapitre 2. Le même milieu est utilisé mais sans addition de saccharose. L'atrazine dans ce milieu est à 20 mg l⁻¹ et 33.3 Bq par tube. La dilution 10⁻¹ de sol est préparée à partir de l'extraction au CaCl₂. Les suspensions-dilutions de sols de 10⁻² à 10⁻⁴ sont utilisées pour la première application ; pour les autres applications les dilutions utilisées sont de 10⁻² à 10⁻⁴ avec D0.5 et de 10⁻³ à 10⁻⁶ avec D5 et D25.

III. Résultats

3.1. Mise en évidence de problèmes expérimentaux

Le calcul des bilans de radioactivité à l'issue des quatrième et cinquième applications et pour les incubations de longue durée, met en évidence un important défaut de bilan pour les doses 5 et 25, sans doute lié à des pertes lors du transfert des sols morts au sol incubé. Les résultats obtenus sont donnés en annexe 3. Afin de pouvoir exploiter les résultats de suivi de minéralisation de l'atrazine, la méthode suivante est utilisée :

- Pour les 4^{ème} et 5^{ème} applications, et pour les incubations de longue durée, les résultats de minéralisation sont exprimés en % de la radioactivité récupérée en fin d'incubation.

- Pour les trois premières applications le bilan de radioactivité n'a pas été réalisé. On a alors utilisé pour "corriger" les cinétiques de minéralisation de l'atrazine, la moyenne des radioactivités totales récupérées pour chaque dose. Les résultats de minéralisation d'atrazine sont alors exprimés en % de cette moyenne de récupération.

Tous les résultats exprimés en % de la radioactivité initiale censée avoir été appliquée sont présentés en annexe 3.

3.2. Variation de la minéralisation de l'atrazine avec sa dose d'application

Les figures 3.1 et 3.2 présentent les résultats de minéralisation d'atrazine au cours des incubations de longue durée. Dans le sol provenant de la monoculture de maïs, la

Figure 3.1 : Cinétiques de minéralisation de l'atrazine au cours d'incubation de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) au laboratoire, traités une seule fois avec les différentes doses d'atrazine. Les écarts-types de mesures sont indiqués lorsqu'ils sont plus larges que les symboles.

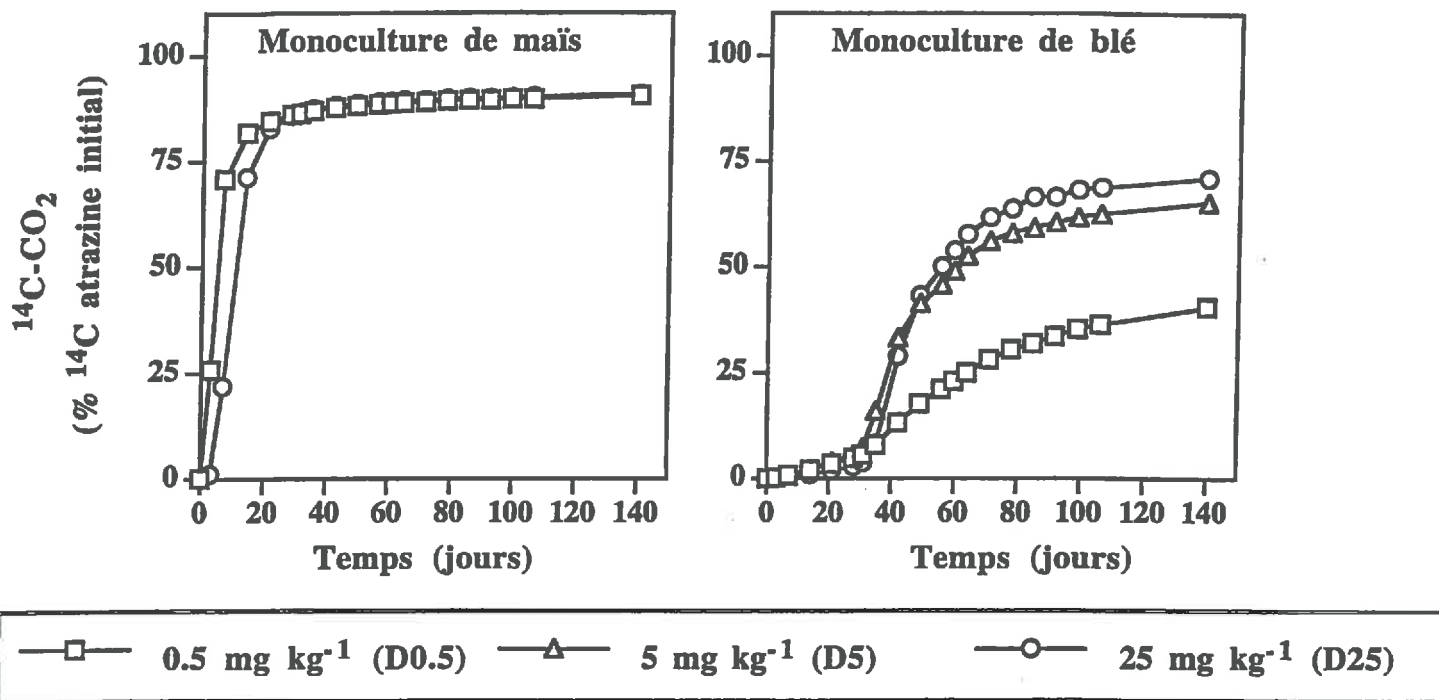
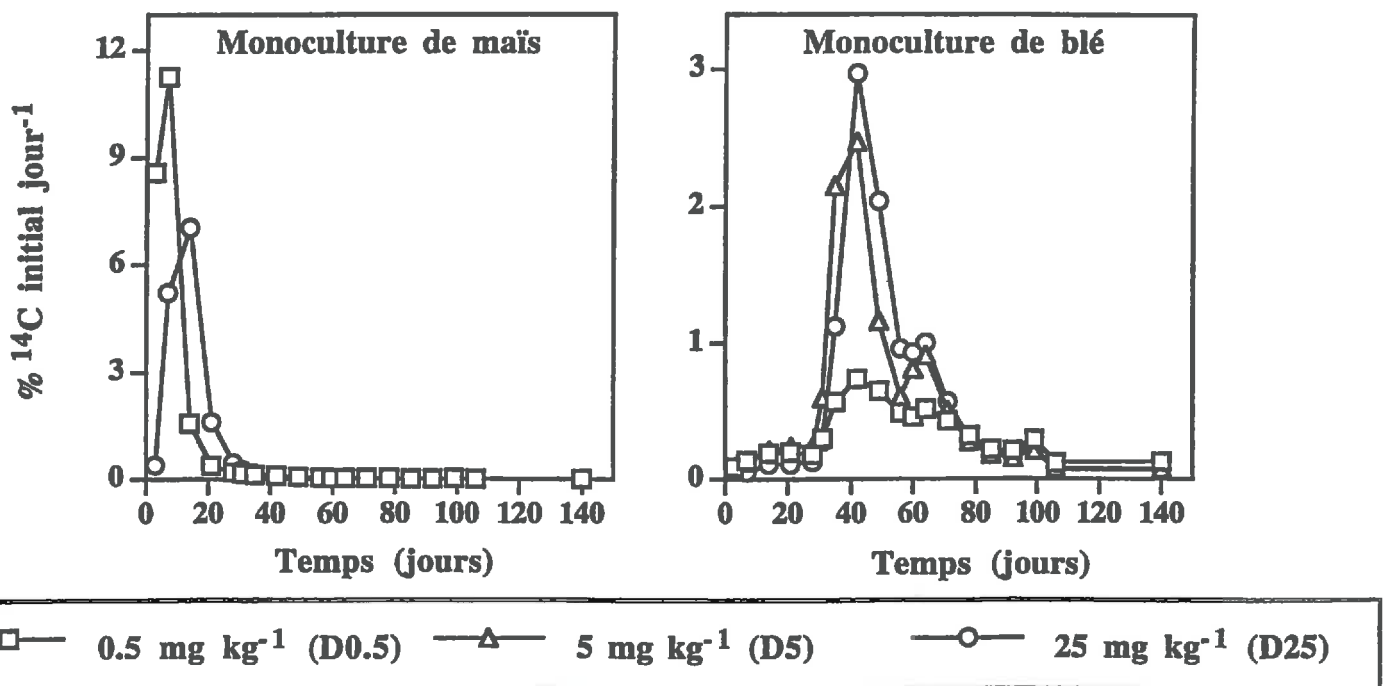


Figure 3.2 : Evolution des vitesses de minéralisation de l'atrazine au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) au laboratoire, traités une seule fois avec les différentes doses d'atrazine.



minéralisation de l'atrazine est très rapide et atteint 83% de l'atrazine initiale dès la troisième semaine d'incubation (figure 3.1). Elle atteint 90.5% en fin d'incubation. L'intensité de minéralisation de l'atrazine est identique aux deux doses d'application étudiées. La minéralisation rapide de l'atrazine appliquée à la dose agronomique (D0.5) confirme l'adaptation de la microflore du sol à la dégradation de cet herbicide, liée aux applications annuelles d'atrazine en conditions de plein champ. La vitesse de minéralisation de l'atrazine est moins élevée au début de l'incubation en présence de la forte dose d'application de l'atrazine, ensuite elle devient similaire pour les deux doses (figure 3.2). L'adaptation de la microflore à la dégradation de l'atrazine s'est faite dans les conditions de la faible dose qui correspond à la dose agronomique, ce qui explique le démarrage plus rapide de la minéralisation à cette dose. Cependant, cette microflore reste efficace à la forte dose d'application.

Dans le sol provenant de la monoculture de blé, la minéralisation de l'atrazine reste faible pendant les premiers jours de l'incubation et après 28 jours 4.8, 5.6 et 2.8% sont minéralisés pour les doses D0.5, D5 et D25 respectivement (figure 3.1). Après cette date, la vitesse de minéralisation augmente d'autant plus que la dose d'application est élevée (figure 3.2). En fin d'incubation, la minéralisation atteint 4.5, 65.3 et 71.0% de l'atrazine initiale aux doses D0.5, D5 et D25 respectivement. Le sol de cette parcelle n'est pas traité au champ à l'atrazine et la microflore n'est pas adaptée à la minéralisation de l'herbicide. Cependant il existe dans ce sol des microorganismes capables de minéraliser l'atrazine. Le niveau initial de cette population dégradante est très faible, ce qui explique la minéralisation lente au départ de l'incubation qui correspond à une phase de latence pendant laquelle augmente la taille de la population dégradante. Quand celle-ci est devenue suffisamment importante la minéralisation de l'atrazine augmente rapidement. L'intensité de la minéralisation augmente avec la dose d'application, sans doute en raison de l'augmentation de la taille de la population dégradante avec la dose d'application.

3.3. Variation de la minéralisation de l'atrazine en fonction du nombre d'applications de l'herbicide

Dans le sol non adapté provenant de la monoculture de blé si la minéralisation de l'atrazine reste faible au cours de la première application de la dose D0.5 (5.6% minéralisés après 28 jours d'incubation) son intensité augmente rapidement au fur et à mesure des applications pour atteindre 86.3% de l'atrazine appliquée à la cinquième application (figure 3.3). La vitesse initiale de minéralisation augmente également avec le nombre d'application

Figure 3.3 : Evolution de la cinétique de minéralisation de l'atrazine au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) au laboratoire, traités avec les différentes doses d'atrazine et en fonction du nombre d'applications de l'atrazine : 0.5 mg kg^{-1} (D0.5), 5 mg kg^{-1} (D5), 25 mg kg^{-1} (D25). Les écarts-types de mesures sont indiqués lorsqu'ils sont plus larges que les symboles.

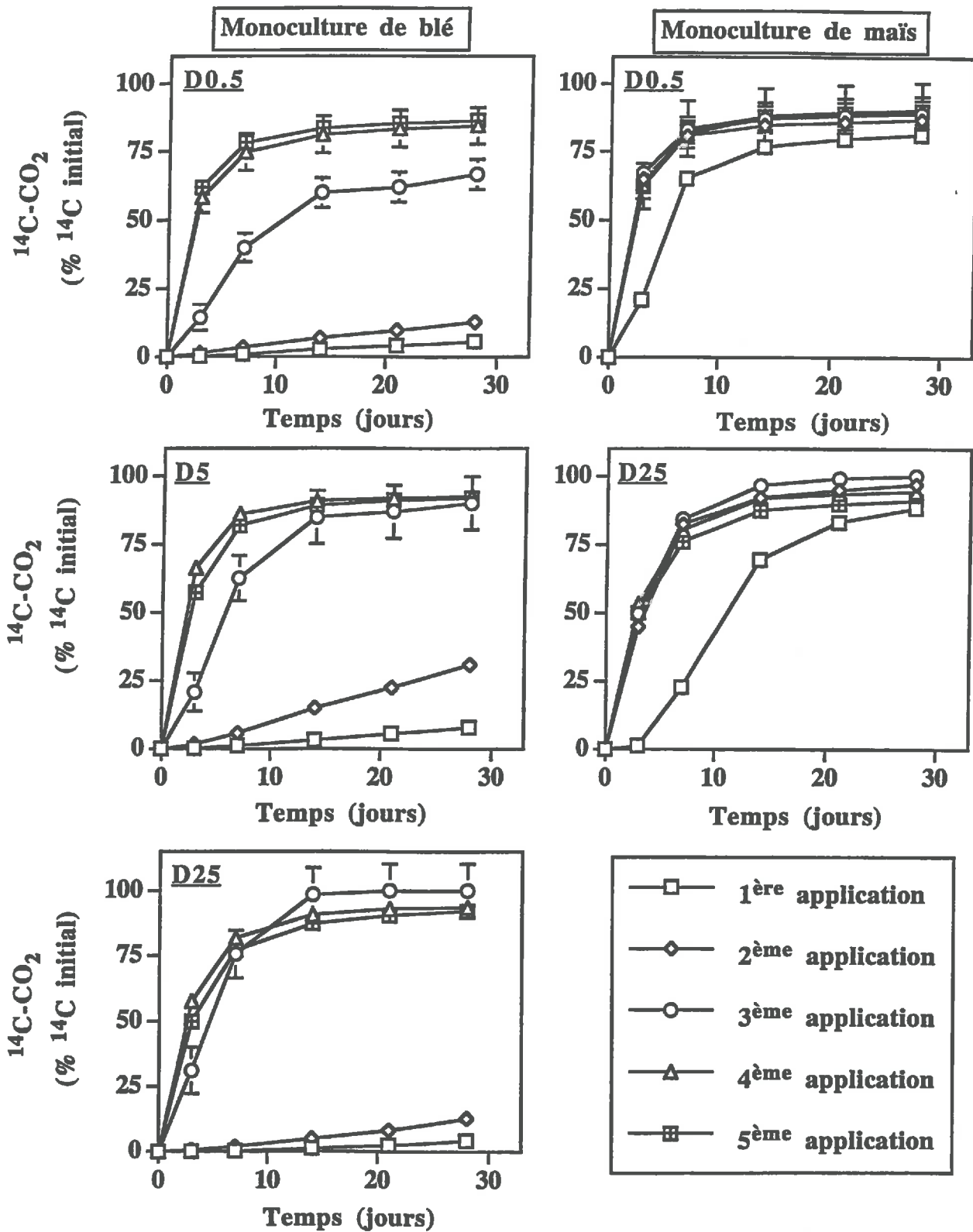
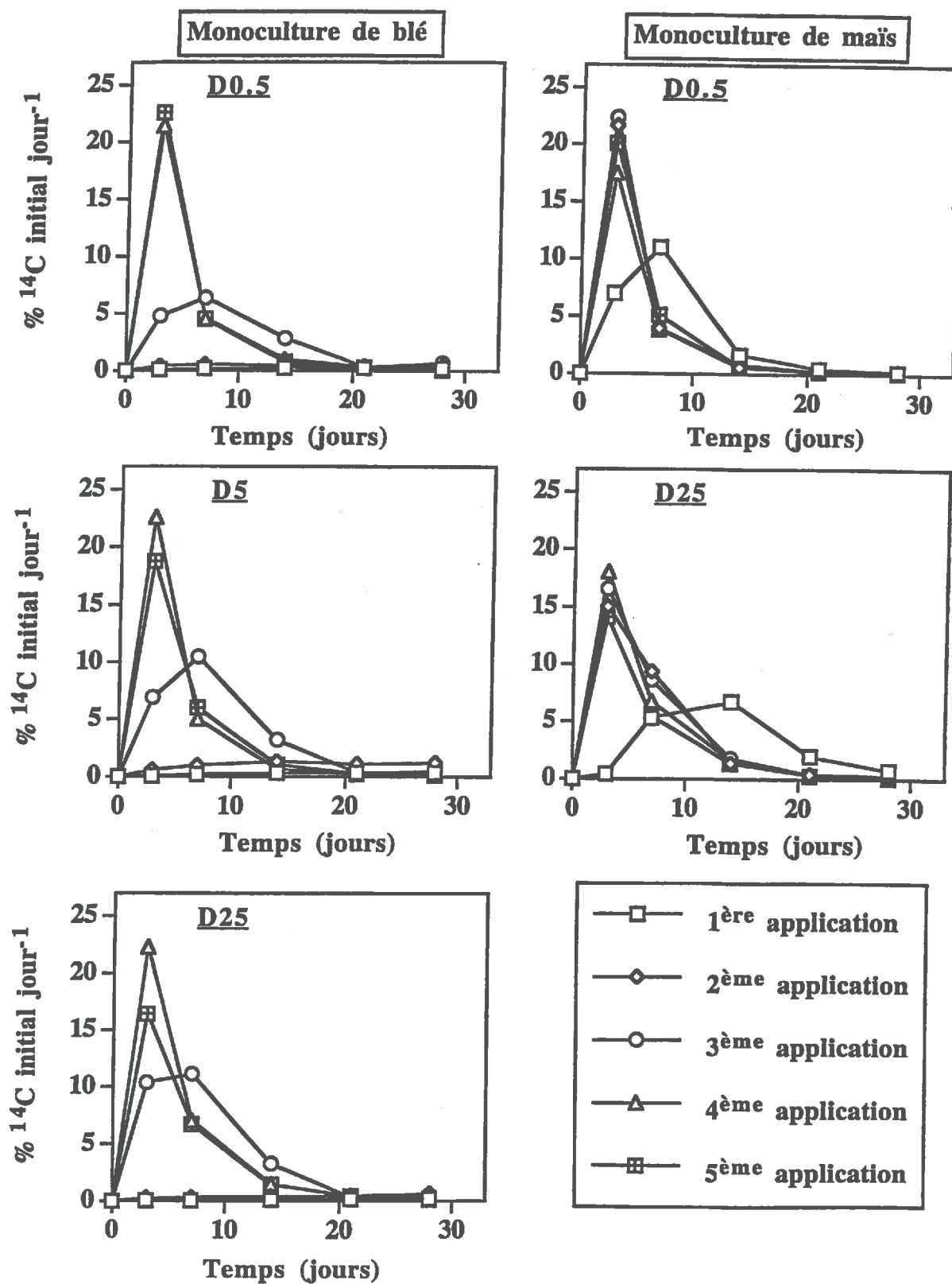


Figure 3.4 : Evolution des vitesses de minéralisation de l'atrazine au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) au laboratoire, traités avec les différentes doses d'atrazine et en fonction du nombre d'applications de l'atrazine : 0.5 mg kg⁻¹ (D0.5), 5 mg kg⁻¹ (D5), 25 mg kg⁻¹ (D25).



correspondant à la mise en place progressive de la microflore dégradante (figure 3.4). Les mêmes phénomènes (augmentation du taux final de minéralisation et de la vitesse de minéralisation) s'observent avec les doses supérieures à la dose agronomique D5 et D25. L'augmentation du taux de minéralisation de l'atrazine semble plus rapide aux doses D5 et D25 qu'à la dose agronomique, ce qui pourrait indiquer une adaptation plus rapide de la microflore à cette dose.

Dans le sol adapté provenant de la monoculture de maïs, la minéralisation de l'atrazine est rapide et atteint 81.3% de l'atrazine initiale dès la première application de la dose D0.5. Toutefois on observe une légère augmentation de la minéralisation au cours des applications successives de cette même dose pour atteindre environ 90% de l'atrazine appliquée au cours des trois dernières applications. Le sol est prélevé en Décembre 1996 et a donc été traité à l'atrazine 7 à 8 mois auparavant. La première application d'atrazine lors des incubations permet la remise en place de la population dégradante. Au cours des traitements successifs la population est immédiatement efficace ce qui augmente le taux de minéralisation. A la forte dose de traitement, le même phénomène s'observe.

3.4. Evolution de la taille de la population dégradant l'atrazine

La taille de la microflore dégradant l'atrazine est mesurée pour chaque application des différentes doses utilisées, après 28 jours d'incubation. Les résultats de la moyenne des trois répétitions sont donnés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Evolution en fonction du nombre d'application de la taille de la microflore dégradant l'atrazine après 28 jours d'incubation, dans les sols provenant des parcelles des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) en présence des différentes doses d'atrazine : 0.5 mg kg⁻¹ (D0.5), 5 mg kg⁻¹ (D5) et 25 mg kg⁻¹ (D25), après chaque application. Les résultats sont exprimés en germes par gramme de sol.

	Monoculture de maïs		Monoculture de blé		
	D0.5	D25	D0.5	D5	D25
	(germes g ⁻¹ sol)		
Première application	70 ± 0.0	14 10 ³ ± 0.0	< sd*	3 10 ³ ± 0.0	3 10 ³ ± 0.0
Deuxième application	< sd*	18 10 ³ ± 0.3	< sd	1 10 ³ ± 0.3	55 10 ³ ± 3.6
Troisième application	< sd	7 10 ³ ± 4.0	< sd	5 10 ³ ± 2.5	14 10 ⁴ ± 9.6
Quatrième application	< sd	14 10 ³ ± 0.9	< sd	1 10 ³ ± 0.2	5 10 ⁴ ± 2.5
Cinquième application	< sd	1 10 ³ ± 0.5	< sd	2 10 ³ ± 1.3	7 10 ³ ± 2.5

* seuil de détection

Dans le sol de la parcelle adaptée à la dégradation de l'atrazine (monoculture de maïs), la taille de la population dégradante est de seulement 70 germes par gramme de sol après la première application de la dose agronomique (D0.5). Après les applications suivantes de cette même dose, la population dégradante est trop faible et reste inférieure au seuil de détection. Cependant, ces microorganismes restent très efficaces pour la dégradation de l'atrazine. Dans ce même sol, l'application de la forte dose d'atrazine permet d'augmenter le niveau de population à environ 10^3 germes par gramme de sol et ceci dès la première application.

Dans le sol non adapté à la dégradation de l'atrazine (monoculture de blé), la population dégradante reste inférieure au seuil de détection quand l'atrazine est appliquée à la dose la plus faible. Ceci reste vrai pour toutes les applications successives malgré une augmentation de la dégradation de l'atrazine après la troisième application de cette dose. En revanche, la population dégradante est de l'ordre de $3 \cdot 10^3$ germes par gramme de sol dès la première application des deux doses supérieures dans ce même sol. En fait les incubations après la première application d'atrazine ne durent que 28 jours ; ensuite la deuxième application est faite. Cette durée correspond au temps de latence observé dans les incubations longues avant que s'accélère la minéralisation de l'atrazine. Il est probable que la deuxième application intervient au moment où le développement de la population dégradante aurait permis l'accélération de la minéralisation de l'atrazine. Au cours des applications suivantes le niveau de population se maintient autour de 10^3 germes par gramme de sol pour la dose 5 mg kg^{-1} . Pour la dose la plus forte, elle tend à augmenter et à atteindre 10^4 germes par gramme de sol dépassant alors le niveau de population dans la parcelle adaptée.

3.5. Caractérisation de l'extractibilité et de la nature des résidus

Dans les incubations de longue durée de sol provenant de la monoculture de maïs, la radioactivité non extractible (résidus liés) est similaire pour les deux doses appliquées (D0.5 et D25), et représente 7% de l'atrazine appliquée après 140 jours d'incubation (tableau 3.3). De même les fractions extractibles représentent 2 à 3% de la radioactivité initiale, en fin d'incubation pour les deux doses d'application. Dans les deux cas, ces proportions sont faibles en raison de la forte minéralisation de l'atrazine. L'analyse chromatographique montre que la fraction extractible au CaCl_2 est constituée d'un seul métabolite, la DEIA qui représente 100% de la radioactivité extractible (tableau 3.4). En revanche, la fraction extractible au méthanol est composée principalement de la molécule mère pour les deux doses (tableau 3.5). La DEIA est le métabolite majoritaire parmi les métabolites de l'atrazine

détectés dans cette fraction, sa proportion représente 16 et 20% de la radioactivité extractible pour les doses D0.5 et D25 respectivement.

Tableau 3.3 : Distribution de la radioactivité initiale provenant de la ^{14}C -atrazine, entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol et la fraction non extractible (résidus liés) en fin d'incubation de longue durée dans les sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65), en présence de différentes doses d'atrazine (D0.5, D5, D25). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité récupérée.

	Minéralisée	Extractible au CaCl_2	Extractible au méthanol	Résidus liés
	(————— % ^{14}C -atrazine récupérée —————)			
<u>Monoculture de maïs</u>				
D0.5	90.5 ± 1.0	0.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	7.2 ± 0.2
D25	90.8 ± 2.6	0.6 ± 0.0	1.3 ± 0.0	7.2 ± 0.0
<u>Monoculture de blé</u>				
D0.5	40.5 ± 1.0	6.0 ± 0.7	13.1 ± 1.5	40.3 ± 0.2
D5	65.3 ± 2.2	1.8 ± 0.1	5.1 ± 0.4	27.8 ± 0.3
D25	71.0 ± 2.4	1.6 ± 0.2	3.1 ± 0.3	24.3 ± 0.5

Dans le sol provenant de la monoculture de blé, la minéralisation de l'atrazine étant plus faible, les radioactivités extractible et non extractible représentent des proportions plus importantes. Elles diminuent avec l'augmentation de la minéralisation. La fraction non extractible (résidus liés) est plus importante avec la faible dose d'atrazine (D0.5) pour laquelle elle représente 40% de l'atrazine récupérée (tableau 3.3). De même la fraction extractible est plus importante avec cette dose (D0.5), elle représente 19% de l'atrazine récupérée, par rapport à la fraction extractible pour les deux doses supérieures (D5 et D25) où elle représente 5 à 7% de l'atrazine récupérée. La fraction extractible au CaCl_2 est constituée principalement de DEA et DEIA, leurs proportions augmentant pour les fortes doses (tableau 3.4). La DEIA est le métabolite le plus abondant pour les trois doses. Elle représente 32, 58 et 49% de la radioactivité extractible pour les doses D0.5, D5 et D25 respectivement. L'HYA représente 30% de la radioactivité extractible quand la faible dose est appliquée dans ce sol. Cette proportion diminue à 7% pour la dose D5 et elle n'est plus détectée pour la forte dose (D25), où un autre métabolite non identifié (NI) apparaît et représente 6% de la radioactivité extractible. Toutefois dans la fraction extractible au méthanol, l'atrazine reste présente en grande proportion et représente 39, 48 et 52% de la

Tableau 3.4 : Caractérisation de la radioactivité extractible au CaCl_2 en fin d'incubation de longue durée de ^{14}C -atrazine dans les sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites détectés sont : inconnu (NI à 16 min.), hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA) et dééthyldéisopropylatrazine (DEIA).

Traitements	Atrazine	NI	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— % ^{14}C -extractible —————)					
<u>Monoculture de maïs</u>						
D0.5	0	0	0	0	0	100
D25	0	0	0	0	0	100
<u>Monoculture de blé</u>						
D0.5	7	1	30	23	5	32
D5	0	0	8	35	0	58
D25	0	6	0	45	0	49

Tableau 3.5 : Caractérisation de la radioactivité extractible au méthanol en fin d'incubation de longue durée de ^{14}C -atrazine dans les sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites détectés sont : inconnu (NI à 16 min.), hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA) et dééthyldéisopropylatrazine (DEIA).

Traitements	Atrazine	NI	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— % ^{14}C -extractible —————)					
<u>Monoculture de maïs</u>						
D0.5	68	0	5	8	4	16
D25	73	0	8	0	0	20
<u>Monoculture de blé</u>						
D0.5	39	1	19	18	8	14
D5	48	2	13	13	6	17
D25	52	5	11	9	5	19

radioactivité extractible pour les doses D0.5, D5 et D25 respectivement (tableau 3.5). Dans cette fraction, la proportion de HYA, DEA et DIA diminue respectivement de 19 à 11%, de 18 à 9% et de 7 à 5% quand la dose d'atrazine appliquée augmente. En revanche, les proportions du métabolite inconnu et de DEIA augmentent respectivement de 1 à 5% et de 14 à 19% quand la dose d'atrazine appliquée augmente.

Dans les incubations courtes avec applications successives d'atrazine dans le sol de la monoculture de maïs, les proportions de la fraction extractible au CaCl_2 et au méthanol sont très faibles, étant donnée la forte minéralisation de l'atrazine dans ce sol, et ceci avec les deux doses (tableau 3.6, annexe 3). Il en est de même pour la fraction non extractible. Après la quatrième et la cinquième application, la formation des résidus liés représente environ 3 à 6% de l'atrazine appliquée pour les deux doses (tableau 3.6). Les proportions de la fraction extractible au CaCl_2 et au méthanol sont supérieures pour ces deux dernières applications, si on les compare avec celles observées en fin d'incubation de longue durée. En revanche, la proportion de la fraction non extractible est inférieure après 28 jours d'incubation, ce qui montre que la formation des résidus liés (fraction non extractible) augmente avec le temps d'incubation.

Tableau 3.6 : Distribution de la radioactivité provenant de la ^{14}C -atrazine, entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol et la fraction non extractible (résidus liés) en fin d'incubation dans les sols provenant de la monoculture de maïs (M62), après les quatrième et cinquième applications des différentes doses d'atrazine (D0.5, D25). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité récupérée.

Traitements	(————— % ^{14}C -atrazine récupérée —————)			
	Minéralisée	Extractible au CaCl_2	Extractible au méthanol	Résidus liés
<u>Quatrième application</u>				
D0.5	90.5 ± 5.1	1.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1	5.5 ± 0.0
D25	94.4 ± 2.3	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.3 ± 0.0
<u>Cinquième application</u>				
D0.5	90.2 ± 10.3	1.2 ± 0.1	3.0 ± 0.2	5.7 ± 0.1
D25	91.0 ± 3.7	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	5.6 ± 1.0

L'analyse chromatographique de la fraction extractible au CaCl_2 indique que cette fraction est constituée de métabolites déalkylés (DEA et DEIA) lorsque la faible dose d'atrazine est appliquée (tableau 3.7). La proportion de DEIA tend à dépasser celle de DEA. En présence de la forte dose, on retrouve les mêmes métabolites avec une tendance plus nette de dominance du DEIA. Dans quelques cas l'atrazine représente une proportion importante de la radioactivité extractible au CaCl_2 . Dans aucun cas, l'hydroxyatrazine n'est détectée. En revanche dans la fraction extractible au méthanol, l'atrazine reste le composant principal pour les deux doses, après les deux dernières applications (tableau 3.8). Elle représente 73 à 88% de la radioactivité extractible au méthanol. La DEA reste le métabolite déalkylé majoritaire dans cette fraction après les deux dernières applications de la faible dose d'atrazine. La DEIA est le seul métabolite détecté pour la forte dose d'application d'atrazine et représente respectivement 12 et 24% de la radioactivité extractible après la quatrième et la cinquième application.

Dans le sol provenant de la monoculture de blé, les résidus liés représentent 3 à 8% de l'atrazine appliquée après les deux dernières applications (tableau 3.9). La fraction extractible au méthanol est supérieure à celle extractible au CaCl_2 pour les trois doses. La proportion de la fraction non extractible est moins importante pour ces deux dernières applications après 28 jours d'incubation, par rapport à celle obtenue dans les incubations de longue durée. Dans celle-ci la proportion de résidus liés était élevée malgré des taux de minéralisation de l'atrazine assez importants. Cela confirme l'augmentation avec le temps de la stabilisation des molécules sous forme de résidus liés.

Les proportions de la fraction extractible au CaCl_2 sont plus élevées après les deux premières applications pour les trois doses d'atrazine, surtout avec la plus forte dose (D25), elles représentent 47 à 57% de l'atrazine récupérée (tableau 3.10). Après la troisième application, ces proportions diminuent avec l'augmentation de la minéralisation de l'atrazine. La caractérisation de la fraction extractible au CaCl_2 montre qu'elle est composée essentiellement d'atrazine pour les deux premières applications, dont la proportion augmente avec l'augmentation de la dose d'atrazine (tableau 3.10). Elle représente 32 à 80% de la radioactivité extractible. Elle disparaît pour les trois applications suivantes. L'hydroxyatrazine est présente dans les extraits hydrosolubles provenant des incubations d'atrazine dans le sol de la monoculture de blé, alors qu'elle n'avait pas été détectée dans les extraits hydrosolubles provenant du sol de la monoculture de maïs. Après la troisième application l'HYA représente même la majeure partie de la radioactivité extractible. Elle

Tableau 3.7 : Evolution en fonction du nombre d'application d'atrazine aux différentes doses de la fraction extractible au CaCl_2 (% ^{14}C -atrazine récupérée) et de la nature de la radioactivité après 28 jours d'incubation dans le sol provenant de la monoculture de maïs (M62). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites analysés sont : hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA) et dééthyldéisopropylatrazine (DEIA).

Traitements	Extractible au CaCl_2 (% ^{14}C -atrazine récupérée)	Atrazine (————— % ^{14}C -extractible —————)	HYA	DEA	DIA	DEIA
<u>Première application</u>						
D0.5	1.2 ± 0.2	0	0	38	0	62
D25	3.3 ± 1.0	17	0	47	0	36
<u>Deuxième application</u>						
D0.5	0.6 ± 0.1	0	0	36	0	64
D25	1.6 ± 0.3	46	0	0	0	54
<u>Troisième application</u>						
D0.5	0.6 ± 0.1	51	0	24	0	25
D25	0.6 ± 0.1	0	0	0		100
<u>Quatrième application</u>						
D0.5	1.6 ± 0.1	34	0	39	0	28
D25	1.2 ± 0.1	0	0	0	0	100
<u>Cinquième application</u>						
D0.5	1.2 ± 0.1	0	0	0	0	100
D25	1.0 ± 0.1	0	0	0	0	100

Tableau 3.8 : Caractérisation de la radioactivité extractible au méthanol après les quatrième et cinquième application d'atrazine aux différentes doses dans le sol provenant de la monoculture de maïs (M62). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites analysés sont : hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA) et dééthyl-déisopropylatrazine (DEIA).

Traitements	Atrazine (————— % ¹⁴ C-extractible —————)	HYA	DEA	DIA	DEIA
<u>Quatrième application</u>					
D0.5	73	0	14	6	8
D25	88	0	0	0	12
<u>Cinquième application</u>					
D0.5	83	2	7	2.3	5
D25	76	0	0	0	25

Tableau 3.9 : Distribution de la radioactivité provenant de la ¹⁴C-atrazine, entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl₂ et au méthanol et la fraction non extractible (résidus liés) en fin d'incubation dans les sols provenant de la monoculture de blé (B65), après les quatrième et la cinquième applications des différentes doses d'atrazine (D0.5, D25). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité récupérée.

Traitements	Minéralisée (————— % ¹⁴ C-atrazine récupérée —————)	Extractible au CaCl ₂	Extractible au méthanol	Résidus liés
<u>Quatrième application</u>				
D0.5	84.4 ± 6.8	2.8 ± 0.6	5.8 ± 0.8	7.5 ± 0.1
D5	92.6 ± 2.7	1.0 ± 0.1	2.3 ± 0.2	4.0 ± 0.2
D25	93.7 ± 2.3	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1
<u>Cinquième application</u>				
D0.5	86.3 ± 3.9	1.6 ± 0.3	5.6 ± 0.1	6.4 ± 0.0
D5	91.9 ± 3.4	0.8 ± 0.1	3.0 ± 0.2	4.3 ± 0.1
D25	92.3 ± 2.2	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	4.1 ± 0.1

Tableau 3.10 : Evolution en fonction du nombre d'application d'atrazine aux différentes doses de la fraction extractible au CaCl₂ (% ¹⁴C-atrazine récupérée) et de la nature de la radioactivité extractible au CaCl₂ après 28 jours d'incubation dans le sol provenant de la monoculture de blé (B65). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites analysés sont : hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA) et dééthyldéisopropylatrazine (DEIA).

Traitements	Extractible au CaCl ₂ (% ¹⁴ C-atrazine récupérée)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
		(----- % ¹⁴ C-extractible -----)				
<u>Première application</u>						
D0.5	5.9 ± 1.1	33	14	37	1	15
D5	27.8 ± 4.6	45	11	35	3	6
D25	47.2 ± 2.3	75	5	16	2	3
<u>Deuxième application</u>						
D0.5	23.8 ± 1.0	62	9	22	3	4
D5	23.2 ± 7.8	63	3	28	4	3
D25	56.8 ± 1.6	80	7	10	2	2
<u>Troisième application</u>						
D0.5	4.3 ± 0.5	10	46	27	3	15
D5	1.5 ± 0.7	0	62	12	0	26
D25	1.2 ± 0.2	0	76	0	0	25
<u>Quatrième application</u>						
D0.5	2.8 ± 0.6	0	52	15	0	33
D5	1.0 ± 0.1	0	0	0	0	100
D25	1.0 ± 0.2	0	0	0	0	100
<u>Cinquième application</u>						
D0.5	1.6 ± 0.3	0	0	0	0	100
D5	0.8 ± 0.1	5	51	17	0	27
D25	1.2 ± 0.3	0	0	0	0	100

disparaît au cours des applications suivantes et elle est remplacée par des métabolites plus polaires comme la DEIA. D'autre part, la DEA représente une proportion importante de la radioactivité extractible au cours des trois premières applications, proportion qui diminue quand la dose d'application augmente. Puis la DEA disparaît lors des deux dernières applications pour lesquelles on ne détecte plus que de la DEIA.

L'analyse chromatographique de la fraction extractible au méthanol après les deux dernières applications, montre que l'atrazine est encore présente dans cette fraction à des quantités importantes dans ce sol comme dans le sol de la monoculture de maïs (tableau 3.11). Avec la dose agronomique, environ 44% de la radioactivité extractible au méthanol sont sous forme d'atrazine. La proportion d'HYA est importante (31%) dans l'extrait correspondant à la plus faible dose d'application et diminue quand la dose d'application augmente. De même la proportion de DEA et DIA diminue quand la dose d'application augmente, celle du métabolite le plus polaire (DEIA) augmente au contraire et il est le seul métabolite présent à la plus forte dose d'application.

IV. Discussion et conclusion

Dans le sol provenant de la monoculture de maïs, la minéralisation de l'atrazine augmente rapidement. Elle est pratiquement maximale après seulement 21 jours d'incubation. Cela confirme que la microflore de ce sol est adaptée à minéraliser rapidement le cycle triazinique de cet herbicide (Barriuso et Houot, 1996). Une phase de latence de trois jours est observée avec la forte dose après la première application, les microorganismes du sol ne sont pas adaptés à recevoir une telle forte dose au champ. Au cours des applications successives dans ce sol, la minéralisation du cycle triazinique de l'atrazine démarre plus rapidement avec les deux doses. Toutefois, la taille de la population microbienne dégradant l'atrazine est faible avec la faible dose et devient inférieure au seuil de détection, après la deuxième application. En revanche avec la forte dose, la taille de la population dégradante est supérieure et reste constante au cours des cinq applications. Fournier (1989) a également montré un accroissement de la taille de la microflore dégradant le 2,4-D avec la dose de produit appliquée.

Dans le sol provenant de la monoculture de blé, la minéralisation de l'atrazine reste très faible après la première application et pour toutes les doses appliquées pendant 28 jours puis augmente dans les incubations de longue durée. Ceci confirme le faible niveau de population

Tableau 3.11 : Caractérisation de la radioactivité extractible au méthanol après les quatrième et cinquième application d'atrazine aux différentes doses dans le sol provenant de la monoculture de blé (B65). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites analysés sont : hydroxyatrazine (HYA), dééthylatrazine (DEA), déisopropylatrazine (DIA) et dééthyl-déisopropylatrazine (DEIA).

Traitements	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— % ¹⁴ C-extractible —————)				
<u>Quatrième application</u>					
D0.5	44	31	10	5	10
D5	80	8	4	0	7
D25	88	0	0	0	12
<u>Cinquième application</u>					
D0.5	43	27	11	6	13
D5	69	6	4	2	20
D25	76	0	0	0	25

de microorganismes capables de dégrader l'atrazine dans ce sol. Au cours des applications successives, la minéralisation du cycle triazinique de l'atrazine augmente et plus rapidement quand la dose d'application augmente. L'augmentation du taux de minéralisation indique la présence d'une microflore qui s'est adaptée à la minéralisation du cycle triazinique (Alexander et Scow, 1989). Pour la plus faible dose le maximum de minéralisation et la vitesse initiale de minéralisation augmentent avec le nombre d'applications. Toutefois, la taille de la population microbienne dégradant l'atrazine reste inférieure au seuil de détection au cours des applications successives. Pour les deux autres doses, le maximum de minéralisation est atteint dès la troisième application pour laquelle seule la vitesse initiale de minéralisation est plus faible que pour les applications successives. Ces différences de vitesse initiale correspondent à une phase de latence au cours de laquelle se développe la population microbienne dégradante. Cette population augmente dès la première application des fortes doses alors que l'activité de minéralisation ne s'est pas manifestée. Ce décalage entre mise en place et détection de population dégradante et activité est confirmé par les résultats des incubations de longue durée pour lesquelles on observe que la minéralisation augmente fortement pour les trois doses après une phase de latence assez longue.

L'analyse de variance effectuée sur les taux de minéralisation de l'atrazine après 3 et 28 jours d'incubation en présence des différentes doses et en fonction du nombre d'applications (tableau 3.12), révèle que pour les deux sols le nombre d'applications a plus d'influence sur la minéralisation de l'atrazine que la dose d'application (résultat du test F est plus élevé pour le nombre d'applications que pour la dose d'application). Toutefois les résultats diffèrent après 3 et 28 jours d'incubation pour les deux sols. Dans le sol de la monoculture de blé, le nombre d'applications reste toujours nettement le facteur influençant le plus le taux de minéralisation de l'atrazine. En revanche dans le sol de la monoculture de maïs, ni le nombre d'applications, ni la dose d'application n'influence le résultat de la minéralisation après 28 jours d'incubation. Dans tous les cas celle-ci est élevée. D'autre part dans cette parcelle, l'influence de la dose d'application sur le taux de minéralisation initial est plus significatif après les trois premiers jours d'incubation. Inversement dans le sol de la monoculture de blé, l'influence de la dose d'application sur le taux de minéralisation de l'atrazine ne devient significatif qu'après 28 jours d'incubation.

Tableau 3.12 : Analyse de la variance sur les mesures de cinétiques de minéralisation de l'atrazine, après 3 et 28 jours d'incubation, avec les différentes doses et le nombre d'applications successives, dans les deux sols provenant de monocultures de maïs et de blé.

	Monoculture de maïs		Monoculture de blé	
	<u>Test F</u>		<u>Test F</u>	
	3 j	28 j	3 j	28 j
Doses	73.7 ^{***}	2.0 ^{ns}	0.7 ^{ns}	24.1 ^{***}
Nombre d'applications	104.5 ^{***}	4.1 ^{ns}	269.3 ^{***}	687.9 ^{***}

^{ns} absence d'effet significatif ; ^{***} effet significatif avec $p < 0.0001$

L'effet du nombre d'applications successives dans le sol de la monoculture de blé est beaucoup plus important que dans le sol de la monoculture de maïs. En effet, la microflore du sol de la monoculture de maïs est déjà adaptée à dégrader l'atrazine puisque ce sol est déjà traité avec cet herbicide au champ depuis quelques années, alors que la microflore présente dans le sol de la monoculture de blé n'a jamais été en contact avec l'atrazine. Les cinq applications successives de l'atrazine au laboratoire dans ce sol ont permis le développement d'une microflore spécifique de la dégradation de cet herbicide, et la mise en place d'une minéralisation accélérée du cycle triazinique (Barriuso et Houot, 1996). L'éventualité de la dégradation accélérée de l'atrazine a été confirmée par Vanderheyden et al. (1997) et Pussemier et al. (1997). Le phénomène de dégradation accélérée a déjà été montré pour plusieurs pesticides (Charnay, 1993 ; Morel-Chevillet et al., 1996 ; Smelt et al., 1996 ; Suett et al., 1996 ; Verhagen et al., 1996).

Il semblerait que l'augmentation de la dose d'atrazine n'ait pas d'effet sur la minéralisation du cycle triazinique. Une fois que la microflore spécifique est présente dans le sol, elle est capable de dégrader l'atrazine à des fortes concentrations (Mandelbaum et al., 1995 ; Gan et al., 1996). L'hydroxylation et la déalkylation sont les deux principales voies de la décomposition de l'atrazine avant le clivage du cycle triazinique (Kaufman et Blake, 1970 ; Giardina et al., 1980, 1982). Dans le sol de la monoculture de maïs, on ne détecte pas l'hydroxyatrazine mais uniquement des métabolites déalkylés. Cela pourrait signifier que la dégradation se fait par l'intermédiaire de la déalkylation. Cependant, les proportions d'hydroxyatrazine détectées dans la fraction extractible de l'autre parcelle sont importantes et ceci surtout après les premières applications quand la minéralisation n'a pas atteint son maximum de vitesse. Puis l'hydroxyatrazine disparaît dans la fraction extractible. Cela

signifierait que la dégradation de l'atrazine passe par l'intermédiaire de la formation d'hydroxyatrazine qui serait ensuite immédiatement dégradée. Les travaux de Gan et al. (1996) ont confirmé que l'hydroxylation et le clivage du cycle triazinique sont les deux principales voies de la dégradation de l'atrazine, en utilisant des fortes concentrations en atrazine allant de 5 à 5000 mg kg⁻¹.

En conclusion, on a montré que dans ce type de sol, la microflore pouvait s'adapter à la minéralisation de l'atrazine et que cette adaptation pouvait se faire rapidement. La rapidité d'adaptation augmente avec la dose d'application de l'atrazine mais le niveau de population de microorganismes dégradant reflète mal l'activité de minéralisation. La fréquence d'application influence plus la minéralisation que la dose d'application. La dégradation de l'atrazine semblerait se faire par l'intermédiaire de la formation de métabolites déalkylés mais aussi hydroxylés. La dégradation très rapide de ces métabolites hydroxylés dans le sol initialement adapté à la minéralisation de l'atrazine empêcherait leur détection dans ce sol. Pour essayer de clarifier cela, un essai de caractérisation de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine est réalisé au chapitre suivant.

Chapitre 4 : Contribution à la caractérisation de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous n'avions pas conclu de façon certaine quant à la voie métabolique de dégradation de l'atrazine dans le sol de Grignon. En effet, l'absence de détection de métabolites hydroxylés ne signifie pas que la dégradation ne passe pas par ces intermédiaires. En effet, ils peuvent n'avoir qu'une durée de vie courte, la dégradation de la molécule se poursuivant rapidement. La dégradation très rapide des métabolites hydroxylés dans le sol adapté à la minéralisation de l'atrazine empêchait sans doute leur détection dans ce sol. L'objectif de ce chapitre est d'essayer de caractériser la voie métabolique de dégradation de l'atrazine dans les deux sols étudiés précédemment : celui où la dégradation de l'atrazine est très rapide allant jusqu'à la minéralisation complète du cycle triazinique, et dans celui où elle est lente. Comme précédemment, on réalise des incubations de sol en présence de ^{14}C -atrazine. La radioactivité extractible est caractérisée après des temps plus courts que précédemment, afin de détecter éventuellement la présence d'hydroxyatrazine dans les extraits provenant du sol adapté.

II. Protocole expérimental

Les horizons de surface (0-20 cm) sont prélevés en Janvier 1997 dans les deux mêmes parcelles de Grignon utilisées au chapitre 3 : la parcelle M62 sous monoculture de maïs et la parcelle B65 sous monoculture de blé. Les sols sont tamisés à 5 mm. Une solution aqueuse de ^{14}C -atrazine est préparée à 10 mg l^{-1} et 9.65 MBq l^{-1} .

Des incubations de sols sont réalisées selon le même protocole que précédemment (équivalent de 20 g de sol sec, obscurité, 28°C et 85% de la capacité de rétention en eau). L'humidité est ajustée avec 1 ml de la solution d'atrazine et complétée avec de l'eau MilliQ. Le ^{14}C - CO_2 est piégé dans 2 ml de NaOH 0.5 N. L'apport d'atrazine correspond à une dose de 0.5 mg kg^{-1} sol. Après 5 heures d'incubation puis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14 et 20 jours d'incubation, on mesure la répartition de la radioactivité résiduelle entre une fraction extractible dans 50 ml de CaCl_2 , une fraction extractible dans 50 ml de méthanol et la

Figure 4.1 : Cinétiques de minéralisation de l'atrazine au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65). Les écarts-types des mesures sont indiqués lorsqu'ils sont plus larges que les symboles.

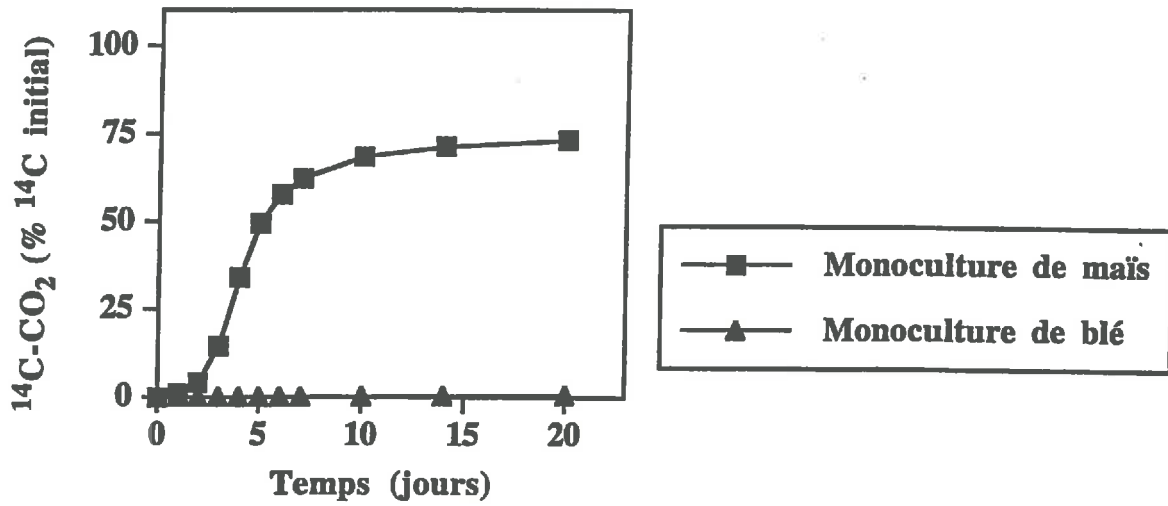
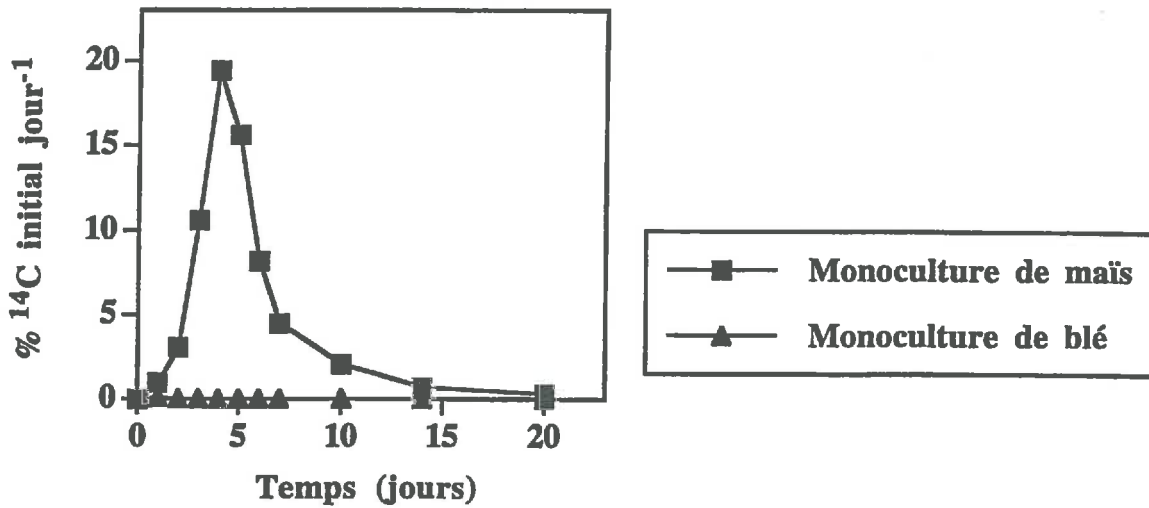


Figure 4.2 : Etude des vitesses de minéralisation de l'atrazine au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65).



radioactivité non extractible. A chaque date d'extraction trois flacons sont sacrifiés par sol. Les extraits sont analysés selon la méthode décrite dans le chapitre 3. Une mesure de l'extractibilité initiale de l'atrazine est également effectuée immédiatement après l'apport de l'atrazine. Le $^{14}\text{C-CO}_2$ est mesuré dans les 2 ml de NaOH aux mêmes dates que celles où sont faites les extractions.

III. Résultats et discussion

3.1. Evolution de la répartition de la ^{14}C -atrazine au cours des incubations

La minéralisation de l'atrazine est toujours rapide et plus importante dans le sol provenant de la monoculture de maïs, elle atteint 73.2% de la radioactivité initiale après 20 jours d'incubation (figure 4.1). La vitesse de minéralisation est maximale au 4^{ème} jour d'incubation (figure 4.2). En revanche dans la monoculture de blé, la minéralisation de l'atrazine est très faible pendant toute la durée de l'incubation, elle atteint seulement 0.7% de la radioactivité initiale en fin d'incubation. Ces résultats rejoignent les résultats déjà observés dans les chapitres précédents.

L'évolution de la distribution de la radioactivité résiduelle de la ^{14}C -atrazine est suivie aux mêmes dates de mesure que pour le suivi de la minéralisation dans les deux sols (figure 4.3 et tableaux 4.1 et 4.2). Dans le sol de la monoculture de maïs, pendant les cinq premiers jours d'incubation, la fraction extractible au CaCl_2 est plus importante que la fraction extractible au méthanol (tableau 4.2 et figure 4.3). Après le 6^{ème} jour d'incubation, les proportions des deux fractions deviennent équivalentes. Ces deux fractions extractibles diminuent très rapidement pendant les cinq premiers jours d'incubation en raison de l'augmentation de la fraction minéralisée. En fin d'incubation, 1.7% et 2.1% de la radioactivité initiale restent extractibles au CaCl_2 et au méthanol respectivement. La formation des résidus liés est rapide et représente déjà environ 10% de la radioactivité initiale juste après l'apport de l'atrazine et reste constante tout au long de l'incubation. Cependant cette fraction doit être légèrement surestimée car une seule extraction méthanolique a été effectuée au lieu des trois extractions habituelles.

Dans le sol provenant de la monoculture de blé, la fraction extractible au CaCl_2 est plus élevée que la fraction extractible au méthanol (tableau 4.2 et figure 4.3). Immédiatement après l'apport de l'atrazine, 62.9% et 20.7% de la radioactivité apportée sont extractibles

Figure 4.3 : Evolution de la distribution de la radioactivité initiale de ^{14}C -atrazine entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol (MeOH) et la fraction non extractible (résidus liés) au cours des incubations de sols des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65), en conditions contrôlées de laboratoire.

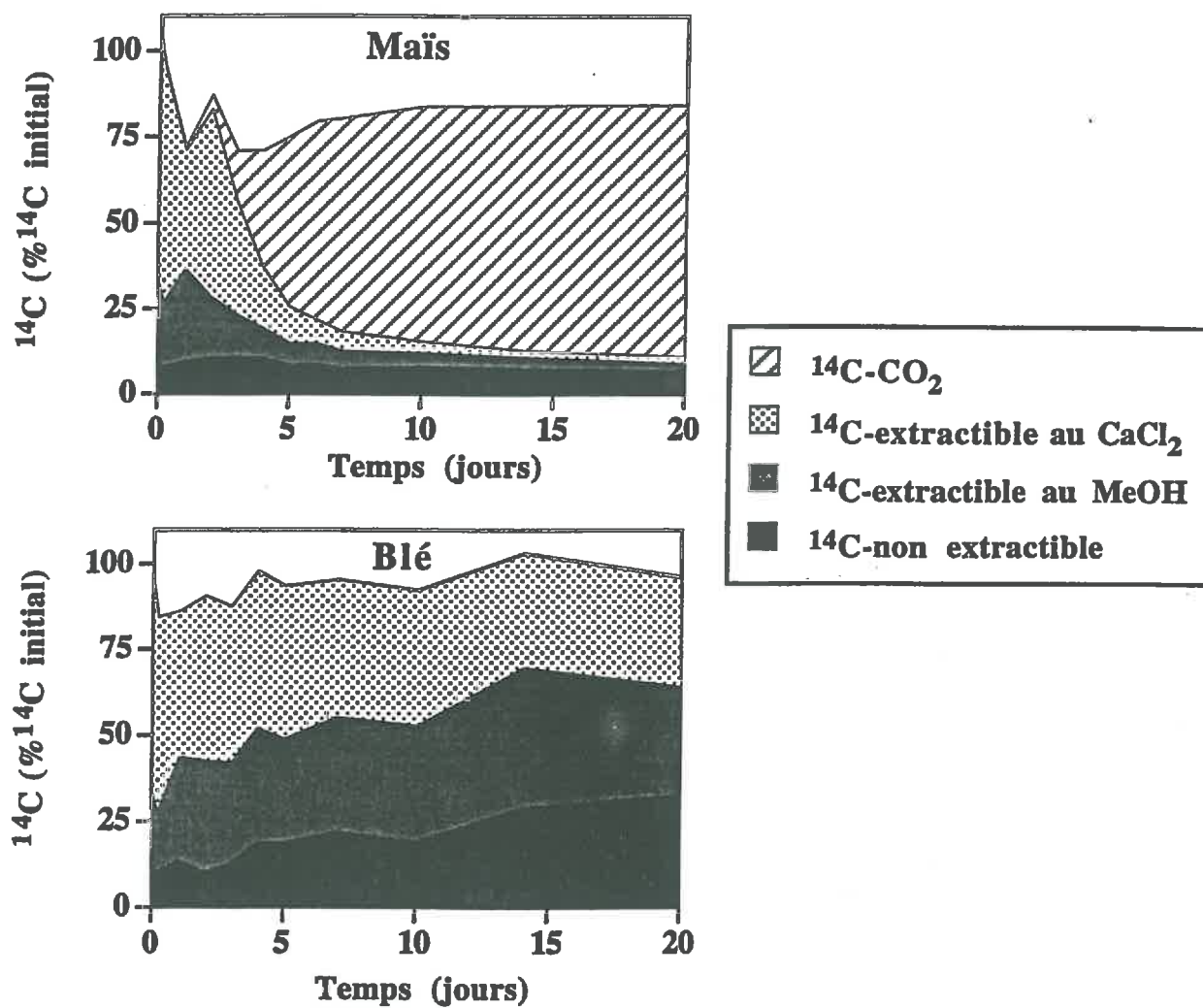


Tableau 4.1 : Distribution de la radioactivité initiale de ^{14}C -atrazine, entre les fractions minéralisée, extractible au CaCl_2 et au méthanol et non extractible (résidus liés) au cours des incubations dans le sol de la monoculture de maïs (M62). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale apportée.

Temps (jours)	Minéralisée	Extractible au CaCl_2	Extractible au méthanol	Résidus liés
	(----- en % du ^{14}C initial -----)			
0	0	71.9 ± 3.2	24.4 ± 1.5	8.2 ± 2.7
0.2	0.1 ± 0.0	68.0 ± 1.1	19.0 ± 0.5	8.3 ± 0.1
1	1.0 ± 0.1	34.3 ± 0.6	27.0 ± 5.1	9.9 ± 0.2
2	4.0 ± 0.3	54.4 ± 1.6	17.7 ± 0.3	11.0 ± 0.1
3	14.6 ± 0.8	32.9 ± 1.1	12.3 ± 1.1	11.2 ± 0.2
4	34.0 ± 1.1	17.6 ± 1.3	8.8 ± 1.0	10.8 ± 0.1
5	49.6 ± 1.2	10.5 ± 0.4	6.3 ± 0.3	8.8 ± 0.2
6	57.8 ± 1.3	6.7 ± 0.7	6.1 ± 0.6	9.0 ± 0.1
7	62.3 ± 1.3	5.3 ± 0.1	5.0 ± 0.3	7.9 ± 0.1
10	68.4 ± 1.3	3.2 ± 0.0	3.8 ± 0.3	8.4 ± 0.2
14	71.3 ± 1.3	1.8 ± 0.1	3.0 ± 0.2	7.9 ± 0.1
20	73.2 ± 1.3	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1	7.1 ± 0.1

Tableau 4.2 : Distribution de la radioactivité initiale de ^{14}C -atrazine, entre les fractions minéralisée, extractible au CaCl_2 et au méthanol et non extractible (résidus liés) au cours des incubations dans le sol de la monoculture de blé (B65). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale apportée.

Temps (jours)	Minéralisée	Extractible au CaCl_2	Extractible au méthanol	Résidus liés
	(----- en % du ^{14}C initial -----)			
0	0	62.9 ± 5.2	20.7 ± 2.2	12.5 ± 0.1
0.2	0.03 ± 0.01	56.4 ± 1.0	17.5 ± 1.2	10.6 ± 0.2
1	0.09 ± 0.01	42.4 ± 2.0	29.9 ± 0.1	13.9 ± 0.2
2	0.12 ± 0.01	48.1 ± 3.7	32.2 ± 3.3	10.4 ± 0.3
3	0.15 ± 0.01	45.2 ± 3.5	29.5 ± 5.2	12.9 ± 0.3
4	0.17 ± 0.01	45.6 ± 0.4	33.1 ± 1.8	19.1 ± 0.2
5	0.19 ± 0.01	44.5 ± 4.1	29.8 ± 5.8	19.2 ± 0.3
6	0.22 ± 0.01	42.1 ± 1.1	31.9 ± 1.4	20.5 ± 0.1
7	0.25 ± 0.01	40.0 ± 2.0	33.2 ± 1.0	22.2 ± 0.3
10	0.34 ± 0.01	39.3 ± 1.2	33.6 ± 0.2	19.4 ± 0.6
14	0.47 ± 0.02	33.2 ± 1.7	40.5 ± 1.4	29.3 ± 0.2
20	0.69 ± 0.03	31.6 ± 5.1	31.2 ± 6.3	33.0 ± 0.2

respectivement au CaCl_2 et au méthanol (tableau 4.2). Au cours des incubations, la fraction extractible au CaCl_2 diminue contrairement à la fraction extractible au méthanol qui augmente rapidement pendant les tout premiers jours de l'incubation pour se stabiliser autour de 30% de la radioactivité initiale. La formation de la fraction non extractible est rapide. Immédiatement après l'apport de l'atrazine dans ce sol, 12.5% de la radioactivité initiale sont déjà non extractibles. Cette fraction est plus élevée dans ce sol car sa teneur en matière organique est plus élevée par rapport au sol de la monoculture de maïs, ce qui favorise l'adsorption du pesticide et la formation des résidus liés (Bertin et Schiavon, 1989 ; Calderbank, 1989 ; Barriuso et al., 1991). La fraction non extractible augmente au cours de l'incubation. Après 20 jours d'incubation, les fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol représentent 31.0% de la radioactivité initiale, et les résidus liés 33.0% de la radioactivité initiale.

3.2. Etude de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine

Les voies de dégradation possibles de l'atrazine dans le sol sont présentées dans la figure 1, dans l'introduction générale. Les résultats des analyses chromatographiques des extraits obtenus au cours des incubations de ^{14}C -atrazine dans les sols provenant des monocultures de maïs et de blé sont présentés dans la figure 4.4 et les tableaux 4.3, 4.4, 4.5 et 4.6. Les résultats des extraits aqueux et méthanoliques sont cumulés (les résultats détaillés sont donnés en annexe 4). Au départ des incubations, l'atrazine représente 93% de la radioactivité extractible. Les 7% restant incluent 1.5 à 2% de HYA, 3% de DEA, 1% de DIA, 1% de DEIA.

Dans le sol provenant de la monoculture de maïs, pendant toute la durée de l'incubation, l'atrazine reste le principal constituant de la fraction extractible (tableau 4.3), mais sa proportion diminue de 93% au départ jusqu'à 36% après 10 jours d'incubation. Simultanément, les proportions de DEA, DIA et DEIA augmentent pour représenter 40, 13 et 9% de la fraction extractible. Alors que la proportion d'HYA était très faible voire absente quand la caractérisation de la fraction extractible n'était faite qu'en fin d'incubation, ici on voit sa proportion augmenter jusqu'à 8% de l'extractible après 4 jours d'incubation puis rediminuer. Cela tendrait à montrer que l'hydroxyatrazine serait un intermédiaire de la dégradation de l'atrazine dans ce sol. Celle-ci serait ensuite rapidement dégradée, ce qui expliquerait son absence dans les extraits finaux. En fin d'incubation, la proportion d'atrazine augmente à nouveau dans la fraction extractible alors que les proportions de métabolites déalkylés rediminuent. Quand les résultats sont exprimés en pourcentage de la

Figure 4.4 : Caractérisation de la radioactivité résiduelle extractible au cours de l'incubation de ^{14}C -atrazine dans les sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65). Les métabolites identifiés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyl-déisopropylatrazine (DEIA).

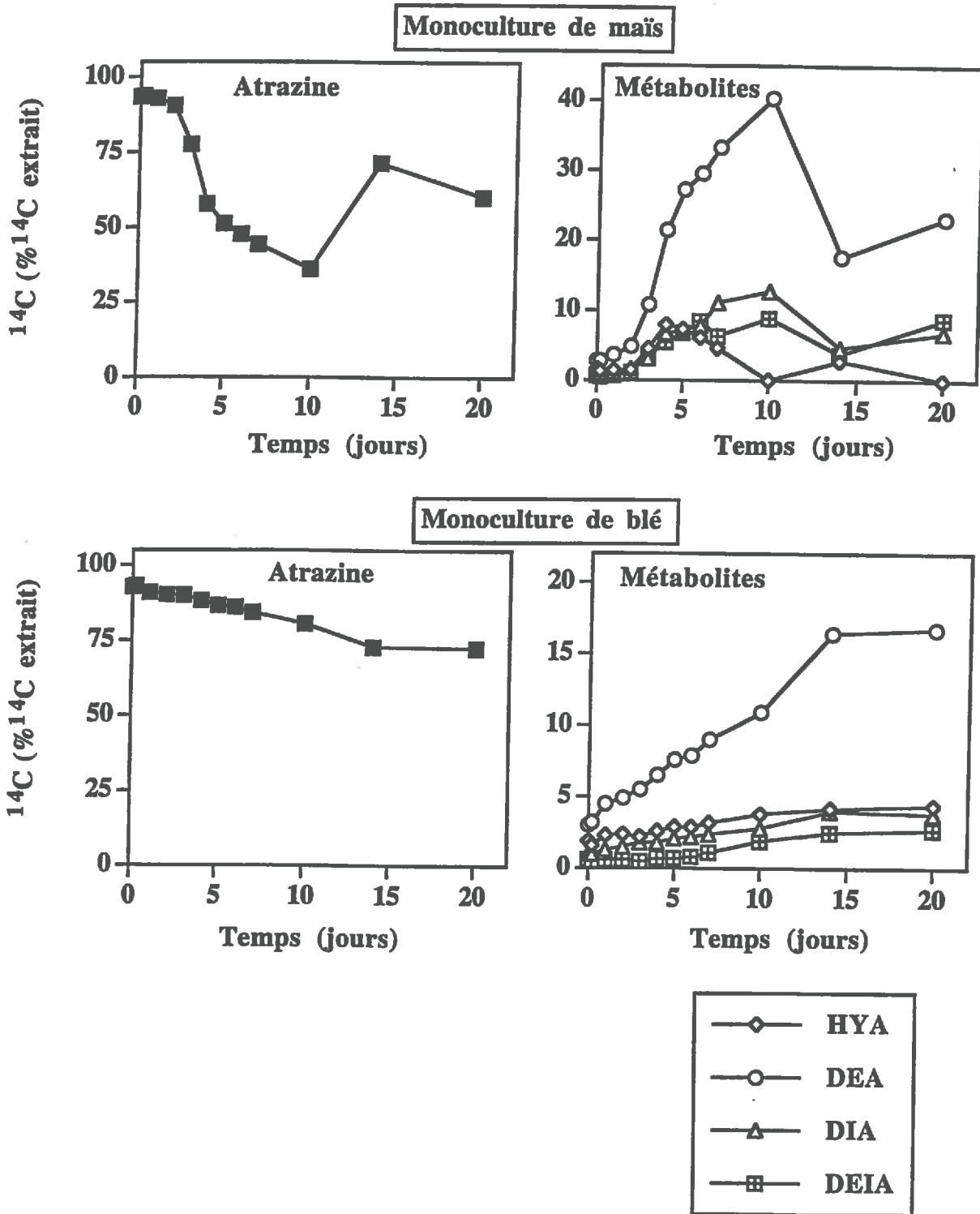


Tableau 4.3 : Caractérisation de la radioactivité extractible au cours de l'incubation de ^{14}C -atrazine dans le sol provenant de la monoculture de maïs (M62). Les résultats des extraits au CaCl_2 et au méthanol sont cumulés et exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites analysés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyldéisopropylatrazine (DEIA).

Temps (jours)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— en % du ^{14}C extractible —————)				
0	93.4	1.6	2.8	0.9	0.6
0.2	93.8	1.3	2.8	1.0	0.5
1	92.9	1.4	3.6	1.1	0.6
2	90.6	1.5	4.8	1.6	1.1
3	77.5	4.5	10.8	3.1	3.4
4	57.6	7.9	21.4	6.7	5.4
5	51.1	7.3	27.2	7.1	6.7
6	47.5	6.1	29.6	7.8	8.4
7	44.1	4.6	33.3	11.1	6.3
10	35.9	0	40.3	12.7	8.8
14	71.3	2.8	17.6	4.6	3.7
20	60.0	0	23.2	6.8	8.7

Tableau 4.4 : Caractérisation de la radioactivité extractible au cours de l'incubation de ^{14}C -atrazine dans le sol provenant de la monoculture de maïs (M62). Les résultats des extraits au CaCl_2 et au méthanol sont cumulés et exprimés en % de la radioactivité initiale apportée. Les métabolites analysés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyldéisopropylatrazine (DEIA).

Temps (jours)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— en % du ^{14}C initial —————)				
0	89.9	1.5	2.7	0.9	0.6
0.2	81.6	1.1	2.4	0.9	0.4
1	56.9	0.9	2.2	0.7	0.4
2	65.3	1.1	3.5	1.2	0.8
3	35.0	2.1	4.9	1.4	1.5
4	15.2	2.1	5.7	1.8	1.4
5	8.6	1.2	4.6	1.2	1.1
6	6.1	0.8	3.8	1.0	1.1
7	4.5	0.5	3.4	1.2	0.7
10	2.5	0	2.8	0.9	0.6
14	3.4	0.1	0.9	0.2	0.2
20	2.3	0	0.9	0.3	0.3

Tableau 4.5 : Caractérisation de la radioactivité extractible au cours de l'incubation de ^{14}C -atrazine dans le sol provenant de la monoculture de blé (B65). Les résultats des extraits au CaCl_2 et au méthanol sont cumulés et exprimés en % de la radioactivité extractible. Les métabolites détectés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyl-déisopropylatrazine (DEIA).

Temps (jours)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— en % du ^{14}C extractible —————)				
0	92.8	1.9	3.0	1.0	0.6
0.2	93.1	1.6	3.2	1.0	0.5
1	90.9	2.3	4.5	1.3	0.6
2	90.2	2.4	4.9	1.5	0.6
3	89.9	2.2	5.5	11.8	0.5
4	88.2	2.6	6.5	1.8	0.7
5	86.6	2.9	7.6	2.1	0.7
6	86.0	2.9	7.9	2.2	0.8
7	84.2	3.2	9.0	2.4	1.1
10	80.5	3.8	10.9	2.8	1.9
14	72.8	4.2	16.4	4.0	2.5
20	72.4	4.4	16.7	3.8	2.7

Tableau 4.6 : Caractérisation de la radioactivité extractible au cours de l'incubation de de ^{14}C -atrazine dans le sol provenant de la monoculture de blé (B65). Les résultats des extraits au CaCl_2 et au méthanol sont cumulés et exprimés en % de la radioactivité initiale apportée. Les métabolites détectés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyl-déisopropylatrazine (DEIA).

Temps (jours)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(----- en % du ^{14}C initial -----)				
0	77.6	1.6	2.5	0.8	0.5
0.2	68.8	1.2	2.3	0.8	0.4
1	65.7	1.7	3.2	0.9	0.5
2	72.4	1.9	3.9	1.2	0.5
3	67.2	1.6	4.1	1.3	0.4
4	69.4	2.0	5.1	1.4	0.5
5	64.3	2.1	5.6	1.6	0.5
6	63.6	2.2	5.8	1.7	0.6
7	61.6	2.4	6.6	1.7	0.8
10	58.7	2.8	8.0	2.0	1.4
14	53.7	3.1	12.1	2.9	1.8
20	45.5	2.8	10.5	2.4	1.7

radioactivité initiale (tableau 4.4), les mêmes évolutions sont observées : diminution très rapide de l'atrazine, faible accumulation transitoire des métabolites déalkylés et de l'hydroxyatrazine.

Dans le sol provenant de la monoculture de blé, la proportion d'atrazine dans la fraction extractible diminue tout au long de l'incubation mais plus lentement que dans l'autre sol (tableau 4.5 et figure 4.4). En fin d'incubation, l'atrazine représente encore 72% de la fraction extractible. Simultanément, les proportions de tous les métabolites augmentent pendant toute la durée de l'incubation. En fin d'incubation la DEA représente 16.7%, la DIA 3.8%, la DEIA 2.7% et l'HYA 4.0%.

Par rapport à la radioactivité initiale, la proportion d'atrazine diminue jusqu'à 46%. La proportion de DEA est plus importante que dans le sol de la parcelle de maïs et représente 10.5% de la radioactivité initiale (tableau 4.6). L'hydroxyatrazine s'accumule tout le long de l'incubation et représente 3% en fin d'incubation. La DIA et DEIA restent dans des faibles proportions de la radioactivité initiale et représentent respectivement 2.4 et 1.7%, après 20 jours d'incubation.

IV. Conclusion

La dégradation de l'atrazine implique l'hydroxylation, la déalkylation et le clivage du cycle triazinique (Kaufman et Blake, 1970 ; Giardina et al., 1980, 1982). L'étude de la voie métabolique de dégradation de l'atrazine dans le sol de la monoculture de maïs montre que la déalkylation et l'hydroxylation peuvent avoir lieu simultanément avant la minéralisation complète du cycle triazinique (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Shao et al., 1995 ; Stucki et al., 1995). Une accumulation transitoire de l'hydroxyatrazine et de la dééthylatrazine est observée, ce qui tendrait à montrer que les deux voies de dégradation existent dans ce sol. La simple caractérisation de la fraction extractible après 140 jours d'incubation ne permettait pas de le montrer au chapitre précédent. En effet, la formation d'hydroxyatrazine est rapidement suivie de la poursuite de la dégradation en particulier par l'ouverture et la minéralisation du cycle triazinique et l'accumulation d'hydroxyatrazine est transitoire.

De même, l'hydroxylation et la déalkylation sont observées dans le sol de la monoculture de blé mais ne sont pas suivies de la minéralisation du cycle triazinique qui est très faible

dans ce sol. L'atrazine, l'hydroxyatrazine et les métabolites déalkylés sont alors les principaux constituants de la fraction extractible. L'hydroxyatrazine est détectée en petites quantités par rapport aux résultats observés au chapitre précédent, après adaptation de ce sol à la minéralisation du cycle triazinique. Toutefois, la déalkylation reste la voie principale de cette dégradation dans le sol de la monoculture de blé avec une proportion plus élevée de dééthylatrazine (17% de la radioactivité extractible) en fin d'incubation. L'accumulation de la dééthylatrazine est le résultat classique d'une dégradation incomplète de l'atrazine (Couch et al., 1965 ; Kaufman et Blake, 1970 ; Wolf et Martin, 1975).

Des isollements de souches bactériennes à partir du sol de la monoculture de maïs sont en cours. La méthode utilisée est décrite en annexe 4.3. La caractérisation des souches isolées est effectuée dans le laboratoire du Dr E. Topp au Pest Management Research Centre (London, Ontario, Canada).

Conclusion de la deuxième partie

En conclusion, nous avons montré que la microflore du sol limono-argileux du plateau de Grignon échantillonné dans une parcelle cultivée en blé et n'ayant jamais reçu d'atrazine au champ, pouvait s'adapter rapidement à la dégradation complète de l'atrazine allant jusqu'à la minéralisation du cycle triazinique. La fréquence d'application de l'atrazine semble plus importante que la dose d'application. Dans ce type de sol, les deux voies métaboliques de dégradation de l'atrazine proposées dans la bibliographie via la déalkylation initiale (Kaufman et Blake, 1970 ; Behki et Khan, 1994) ou l'hydroxylation initiale (Mandelbaum et al., 1993b ; Assaf et Turco, 1994) pourraient avoir lieu simultanément. La détection de l'hydroxyatrazine est fugace quand le sol est adapté à la dégradation de l'atrazine. Celle-ci s'accumule quand le sol n'est pas adapté initialement. La caractérisation des microorganismes dégradants l'atrazine est en cours.

TROISIÈME PARTIE

**Influence de la disponibilité en carbone et en azote
exogènes sur le devenir de l'atrazine dans les sols :
variation avec la microflore responsables de la
dégradation**

Introduction

Les amendements organiques sont des pratiques agricoles susceptibles de modifier le comportement des produits phytosanitaires (Khan, 1980 ; Calderbank, 1989 ; Martinez Inigo et Almendros, 1992 ; Barriuso et al., 1997). Dans de très nombreux types de sols, les amendements organiques influent sur la rétention des pesticides appliqués (Shea, 1989; Alva et al., 1990 ; Scheunert, 1992). Ce phénomène de rétention pourrait dépendre de la nature des matières organiques et notamment de leur degré d'évolution (Gaillardon et al., 1983; Benoit, 1994 ; Dousset, 1994). Paya-Perez et al. (1992) montrent que la rétention de l'atrazine augmente avec le degré de maturité de la matière organique. Cette augmentation de la rétention des pesticides a pour première conséquence la réduction de leur dégradation en raison de la diminution de la proportion de pesticide en solution, donc de la part du pesticide disponible pour les microorganismes (Doyle et al., 1978).

D'autre part, l'apport de matières organiques modifie l'activité microbienne d'un sol, ce qui peut avoir diverses conséquences sur le devenir d'un pesticide. Dans un sol, où existe une microflore spécifique adaptée à la minéralisation rapide de l'atrazine, un apport de matières organiques humifiées (paille compostée et compost d'ordures ménagères) ralentit la dégradation de l'atrazine, du fait de la forte diminution de sa disponibilité vis-à-vis de la microflore dégradante. En revanche, quand l'atrazine est d'abord préincubée avec la paille compostée, la prédégradation de l'herbicide stimule la minéralisation du cycle triazinique quand le mélange est apporté au sol (Houot et al., 1998).

L'effet de l'addition de matières organiques au sol peut aussi se traduire par une augmentation de la dégradation des pesticides dans le sol. En général, l'augmentation de la dégradation des pesticides après l'apport de matières organiques, est expliquée par l'augmentation de l'activité globale de la microflore due à la présence de matière organique facilement utilisable, favorisant des voies de dégradation des pesticides par co-métabolisme (Hance, 1973 ; Fournier, 1989). En effet, leur vitesse de dégradation dépend de la taille et l'activité de la population microbienne totale d'un sol. Dans ce cas, l'addition d'amendements organiques, susceptibles d'entraîner un développement général de la population microbienne, pourrait contribuer à un accroissement du potentiel de dégradation de la population microbienne du sol, en partie parce qu'elle permet à un nombre d'espèces microbiennes plus diversifiées de coexister. Ainsi dans un sol où la dégradation de l'atrazine se fait par co-

métabolisme, des apports de différents substrats minéraux ou carbonés stimulent la dégradation de l'atrazine (Hance, 1973).

Par contre pour des pesticides dont la dégradation est le résultat de processus métaboliques liés à l'existence d'une microflore dégradante spécialisée, des phénomènes de répression métabolique pourraient se manifester en présence d'une source de carbone ou d'azote plus facilement utilisable (Fournier, 1989). D'autre part, ces amendements profitent davantage à des espèces non dégradantes et contribuent à renforcer le phénomène de compétition entre la microflore totale et la microflore dégradante. En revanche, dans une autre situation où a également été mise en évidence une microflore spécifique responsable de la dégradation, des épandages de lisiers accélèrent la dégradation de l'atrazine (Topp et al., 1996).

Alvey et Crowley (1995) montrent que l'effet d'apport de matières organiques sur la minéralisation de l'atrazine dépend de la nature de la matière organique et surtout dépend de la présence simultanée de carbone et d'azote. Dans un travail préliminaire, nous avons montré que dans un sol où existe une microflore spécifique responsable de la minéralisation rapide de l'atrazine, sa vitesse de dégradation augmente en cas de stress azoté et en présence de carbone facilement métabolisable; en revanche, elle ralentit en présence d'azote minéral disponible (Abdelhafid, 1994).

L'objectif de cette partie est de comparer l'effet de l'addition de différentes matières organiques sur le devenir de l'atrazine dans les mêmes deux sols que précédemment : l'un où l'atrazine se dégrade rapidement, l'autre où l'atrazine se dégrade lentement. Une dégradation rapide de l'atrazine signifie qu'il existe dans le sol une microflore adaptée à cette dégradation, utilisant l'atrazine comme source de carbone, d'azote ou d'énergie. L'apport de matières organiques devrait modifier le devenir du pesticide, d'une part en augmentant sa rétention donc en diminuant la fraction disponible pour la microflore responsable de la dégradation, d'autre part en proposant à la microflore une autre source de carbone, d'azote ou d'énergie. Dans ce cas l'apport de matière organique devrait ralentir la dégradation de l'atrazine. Quand la dégradation est lente, elle se fait vraisemblablement par co-métabolisme et il n'y a donc pas de microflore adaptée spécifiquement à la dégradation de cette molécule. Dans ce cas l'apport de matière organique, en stimulant l'activité de l'ensemble de la microflore pourrait stimuler la dégradation de l'atrazine.

L'effet de la disponibilité en carbone sera croisé à celui de celle en azote (chapitre 5). L'utilisation de différentes matières organiques permettra de mettre en évidence l'effet de la qualité de la source carbonée ou azotée sur l'évolution de l'atrazine dans les deux sols (chapitres 5 et 6). Enfin, on essaiera de mettre en évidence un seuil de concentration en carbone et en azote disponible nécessaire à l'apparition de modifications dans le comportement de l'atrazine (chapitre 7).

Chapitre 5 : Variation du devenir de l'atrazine en fonction de la nature du substrat carboné et de la disponibilité de l'azote

DEPENDENCE OF ATRAZINE DEGRADATION RATE ON C AND N AVAILABILITY IN SOILS: VARIATION WITH THE RESPONSIBLE MICROFLORA

RAHIMA ABDELHAFID, SABINE HOUOT and ENRIQUE BARRIUSO
I.N.R.A., Unité de Science du Sol, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France.

Soumis à "Soil Biology and Biochemistry"
(Avril 1998)

DEPENDENCE OF ATRAZINE DEGRADATION RATE ON C AND N AVAILABILITY IN SOILS: VARIATION WITH THE RESPONSIBLE MICROFLORA

Summary - The effect of C and N availability on atrazine behaviour was studied in two soils: in one soil, hereafter referred to as « adapted », accelerated mineralization of atrazine was observed and related to repeated field applications of atrazine; the other soil, referred to as « non adapted », had the same physico-chemical characteristics but never received atrazine in field conditions and atrazine mineralization remained slow in this soil. The dissipation of ^{14}C -atrazine via degradation and formation of non extractable, "bound" residues was followed during laboratory incubations in soils alone or amended with different organic amendments (OAs). The OAs were chosen from their C availability, ranging from very easily biodegradable (glucose) to more slowly mineralizable (cellulose and straw) and humified organic matter (compost). The addition of OAs was crossed with the availability of mineral N during the incubations. The results differed in the two soils. In the non adapted soil, OA addition stimulated atrazine mineralization which always remained much lower than in the adapted soil. However, significant partial degradation via dealkylation was observed which increased when mineral N was added. In the adapted soil, the OAs alone had few effects on atrazine behaviour. In both soils, mineral N decreased atrazine mineralization. When OAs and mineral N were added simultaneously, atrazine stabilization as bound residues was noticeable only in the adapted soil. This increased stabilization could be related to atrazine retention onto growing microbial biomass. In both soils, mainly dealkylated metabolites were detected in the extractable radioactivity. Atrazine dealkylation by co-metabolism was enhanced by soil C amendment but triazine ring mineralization resulted from the adaptation of micro-organisms after repeated herbicide applications. Their activity was regulated by N availability in soil.

INTRODUCTION

Microbial degradation is the principal mechanism of atrazine [6-chloro-N²-ethyl-N⁴-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine] dissipation from the environment (Esser *et al.*, 1975). Although this herbicide has been termed as recalcitrant (Kaufman and Kearney, 1970), a large variety of soil micro-organisms are known to degrade atrazine partially by N-dealkylation or dehalogenation reactions (Kaufman and Kearney, 1970; Behki and Khan,

1986; Mougin *et al.*, 1994). Recently, complete and rapid mineralization of the triazine ring has been reported (Mandelbaum *et al.*, 1993a; Assaf and Turco, 1994; Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995) and the possible adaptation of the soil microflora to atrazine degradation after repeated applications in field conditions has been demonstrated (Barriuso and Houot, 1996; Vanderheyden *et al.*, 1997). Microbial growth has been observed with atrazine as sole C source (Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994; Behki and Khan, 1986; Stucki *et al.*, 1995). However, the recent evidence of a rapid triazine ring mineralization seems to imply the development of micro-organisms using triazine nitrogen as N source (Cook and Hütter, 1981; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995). Two pathways of atrazine degradation have been proposed: via dealkylation or dehalogenation (Cook *et al.*, 1985; Cook, 1987; Mandelbaum *et al.*, 1993b; Assaf and Turco, 1994). Nevertheless, ring cleavage apparently occurs only after hydroxylation and substitution of Cl by OH (Kaufman and Kearney, 1970). The formation of hydroxyatrazine has been thought to be of chemical origin occurring in acidic conditions and involving acid functions of humic substances (Khan, 1978). However, recently microbial formation of hydroxyatrazine has been demonstrated (Mandelbaum *et al.*, 1993b; de Souza *et al.*, 1995; de Souza *et al.*, 1996).

The addition of organic amendments (OAs) to soils can modify the rate and pathways of pesticide degradation. Pesticides generally sorb readily to organic matter. Thus OAs promoting sorption reduce pesticide bioavailability and slow their biodegradation (Barriuso *et al.*, 1997). On the other hand, OAs can accelerate pesticide degradation probably through a general stimulation of the microbial biomass, thus accelerating co-metabolism transformations (Hance, 1973; Topp *et al.*, 1996).

The purpose of the present work was to test the effect of C and N availability on atrazine behaviour in two soils: in one soil, enhanced mineralization of atrazine was observed and related to repeated field application of atrazine; the other soil had the same physico-chemical characteristics but had never received atrazine in field conditions and atrazine mineralization remained slow in this soil (Barriuso and Houot, 1996). The dissipation of ¹⁴C-atrazine via degradation and formation of non extractable, so-called "bound" residues was followed during laboratory incubations in soils alone or amended with different OAs. The OAs were chosen according to their C availability. The effect of OAs was crossed with the availability of mineral N during the incubations.

Table 5.1 : Main soil physico-chemical characteristics. Results are expressed on a dry weight basis

	Clay	Silt	Sand	Organic C	Total N	CaCO ₃	pH (water)
	(————— g kg ⁻¹ —————)						
Continuous maize plot	253	623	91	11.5	1.2	33	8.2
Continuous wheat plot	241	445	171	17.4	1.7	61	8.0

MATERIALS AND METHODS

Soil and organic amendments

Two experimental plots located next to each other in Grignon (Yvelines, France) were sampled in the upper 20 cm in April 1996. Both soils were Typic Eutrochrept (Table 5.1). One plot has been cultivated with continuous maize since 1962 and has been treated yearly with atrazine used at recommended agronomic doses. The other plot has been under continuous wheat since 1965, and has never received atrazine in field conditions. Fresh soils were immediately passed through a 5 mm sieve after sampling.

Four organic amendments were compared: glucose (400 g C kg⁻¹), cellulose (440 g C kg⁻¹), wheat straw (416 g C kg⁻¹ and 4.2 g N kg⁻¹) and a municipal solid waste compost (187 g C kg⁻¹ and 9.8 g N kg⁻¹). The cellulose was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The wheat straw came from the experimental farm of Grignon. It was ground in a plant-blender to a 2 mm maximum particle size. The compost was obtained after 12 days of accelerated fermentation and 6 weeks of maturation. It was air dried and passed through a 2 mm sieve; the smaller fraction was used.

Chemicals

Analytical standards of atrazine and its metabolites (hydroxyatrazine, HYA; deethylatrazine, DEA; deisopropylatrazine, DIA; deethyl-deisopropylatrazine, DEIA) were purchased from ChemService (West Chester, PA, USA). The [*U-ring*-¹⁴C]atrazine (specific activity 659 MBq mmol⁻¹; radiopurity greater than 97%) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). Two solutions of ¹⁴C-atrazine were prepared: solution A in 0.01M CaCl₂ at 10 mg l⁻¹ and 0.11 MBq l⁻¹, solution B in water at 6.25 mg l⁻¹ and 9.94 MBq l⁻¹.

Incubation experiment

Laboratory incubations of ¹⁴C-atrazine with fresh soil samples equivalent to 10 g of dry soil were conducted with or without addition of OA and with or without addition of mineral N, in triplicate and in hermetically stoppered jars at 28 ± 1°C, at a water content adjusted to 85% of the field capacity, during 50 days. Cellulose, straw and compost were added in powder and glucose and mineral N in solution. The amount of OA was calculated in order to approximately double the organic C content of the soil in the mixtures: 400 mg of straw and cellulose, 400 mg of glucose (0.8 ml of a solution at 500 g l⁻¹) and 500 mg of compost. Mineral N was added to half of the jars in order to decrease the C to N ratio of the OAs to

below 6. The same amount of mineral N was added to all the supplemented jars corresponding to 25 mg of N (0.8 ml of a solution of NH_4NO_3 at 90 g l^{-1}). Atrazine was added to each jar in order to reach a concentration of 0.5 mg kg^{-1} of soil (0.8 ml of solution B and 7.95 kBq were added per jar), corresponding to the dose applied in field conditions. The water content of the mixtures was adjusted with MilliQ water (Millipore, Milford, MA, USA) taking into account the water added with the solutions of atrazine, glucose or mineral N. Similar incubations were carried out with 400 mg of cellulose or straw and 500 mg of compost alone receiving the same amount of atrazine and at a humidity equivalent to 85% of their water holding capacity.

The evolved $^{14}\text{C-CO}_2$ and total C-CO_2 were trapped in 5 ml of 0.5 M NaOH placed in the incubation jars. The traps were periodically sampled and replaced during the incubation. Total C-CO_2 was analyzed by colorimetry on a continuous flow analyser (Skalar, Breda, the Netherlands) and $^{14}\text{C-CO}_2$ was determined by scintillation counting (Kontron Betamatic V; Kontron Ins., Montigny le Bretonneux, France) using Picofluor scintillation cocktail (Packard, Meriden, CT, USA).

Analysis of the ^{14}C -atrazine residues

At the end of the incubations, all the samples treated with ^{14}C -atrazine were extracted for 16 h with 50 ml of 0.01M CaCl_2 in water using end-over-end shaking at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark. After centrifugation at 4000 g for 10 min, the supernatant was removed and the residues extracted again for 16 h with 50 ml of methanol using end-over-end shaking, three successive times. The extracted radioactivity was measured in the water and the methanol extracts. The non extractable radioactivity, corresponding to the "bound residues" was measured by scintillation counting of the $^{14}\text{C-CO}_2$ evolved after combustion of the solid residues after methanol extraction (Sample Oxidizer 307, Packard, Meriden, CT, USA). The water extracts were concentrated by solid-liquid extraction with Lichrolut EN-(200 mg) cartridges (Merck, Darmstadt, Germany). The cartridges were eluted with 20 ml of methanol then evaporated until dryness under vacuum with a Rotavapor RE 111 (Büchi, Flawil, Switzerland). The residue was then dissolved in 1 ml of the first solvent used for the HPLC analysis, 40/60 methanol/water (vol./vol.) buffered with 50 mM ammonium acetate with pH adjusted to 7.4. The three methanol extracts of the three replications were pooled then concentrated until dryness by evaporation under vacuum, the residue was then dissolved in 2 ml of the first HPLC solvent. Samples for HPLC analyses were filtered through a Cameo

13N syringe nylon filter of 0.45 μm (MSI, Westboro, MA, USA). ^{14}C -atrazine and ^{14}C -metabolites were analyzed by HPLC on a Novapak C18 column (5 μm , 250 mm x 4.6 mm - Waters, Milford, MA, USA) with a Waters instrument (600E Multisolvent Delivery System, 717 Autosampler) equipped with a UV detector at 222 nm, coupled on-line with a radioactive flow detector (Packard-Radiomatic Flo-one A550). The mobile phase was methanol/water buffered with 50 mM ammonium acetate with pH adjusted to 7.4. The chromatography started with 40/60 methanol/water (vol./vol.) for 15 min, then 80/20 methanol/water for 5 min. The mobile phase flow was 1.0 ml min⁻¹, and the injected sample volume was 300 μl .

Sorption experiments

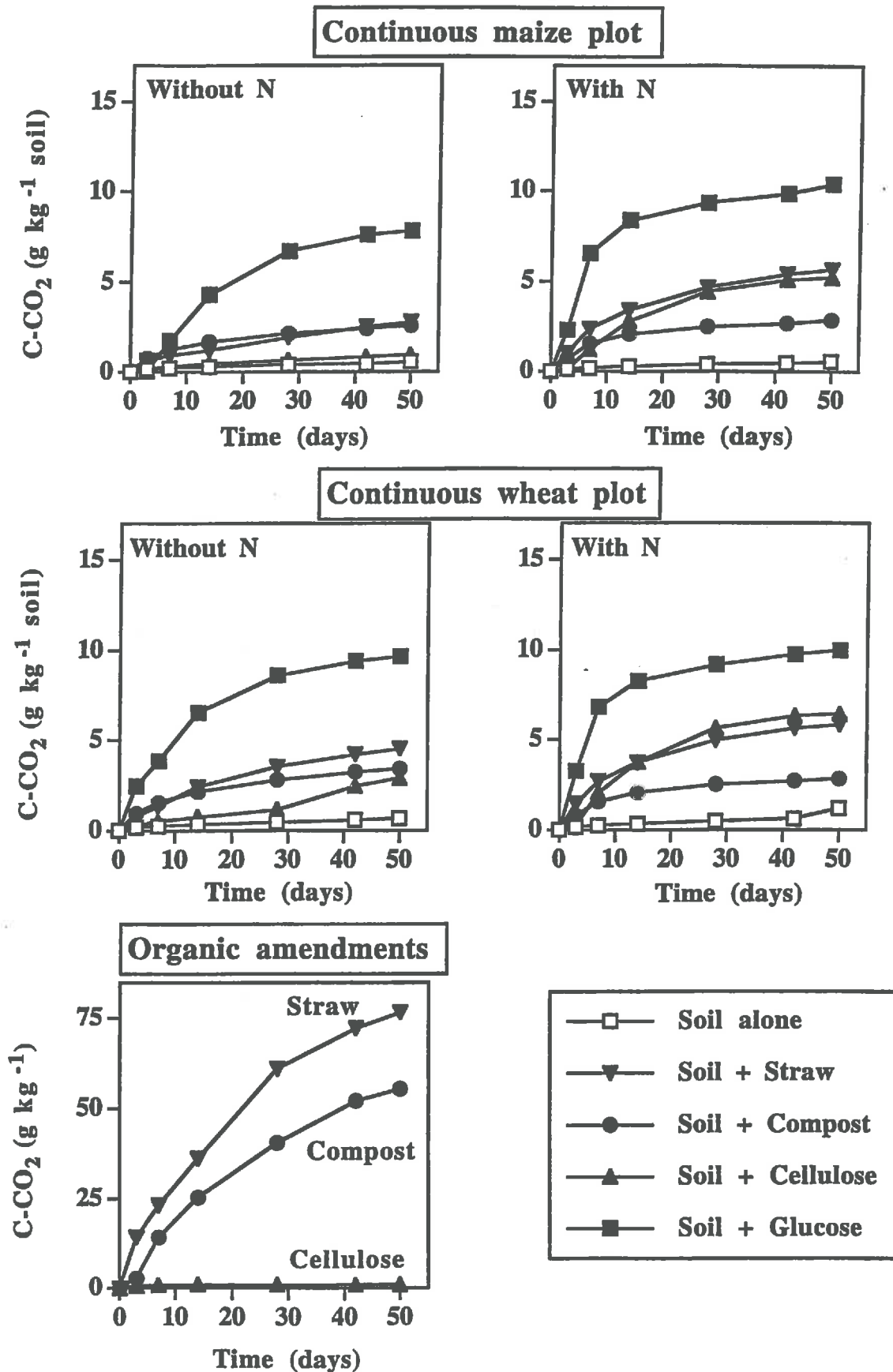
Ten millilitres of solution A of atrazine were added to 5 g of air-dried soil alone or soil-OA mixtures (in the same proportions as in the incubation experiments: 200 mg of straw or cellulose, 250 mg of compost) into 25 ml Corex glass centrifuge tubes with Teflon caps. Sorption experiments were also conducted with the OAs alone (same amounts as previously). Triplicate samples were carried out. After shaking for 24 hours at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, the samples were centrifuged at 7000 g for 20 min and the atrazine concentrations in solutions were calculated from the supernatant radioactivity measurements with the liquid scintillation counter. The amount of sorbed atrazine (S in mg kg⁻¹) was calculated from the difference of the atrazine concentration in solution before and after sorption. The sorption coefficient K_d (l kg⁻¹) was calculated as $K_d = S/C_e$ where C_e (in mg l⁻¹) was the concentration of the equilibrium solution after sorption. The sorption coefficient on an organic carbon unit basis, K_{oc} , was calculated as $K_{oc} = 100 * K_d / C$, where C is the organic C content in %.

RESULTS AND DISCUSSION

Total heterotrophic microbial activity

The kinetics of total organic carbon mineralization reflected the total heterotrophic microbial activity in soils, OAs or soil-OA mixtures. Addition of OAs increased the organic C mineralization similarly in the two soils which presented the same global heterotrophic activity (Fig. 5.1). When only soil was incubated, 5% of the soil organic C was mineralized by the end of the incubations. The OAs varied in terms of their C biodegradability and their C to N ratios. For compost and straw without soil, 30% and 18% of the initial C content was mineralized, respectively. With cellulose alone, C mineralization was negligible with only 0.2% of the initial C mineralized. This was probably due to N deficiency and lack of active micro-organisms on the manufactured cellulose. During the incubations of the soil-OA

Figure 5.1 : Impact of organic amendments and mineral N on total C-CO₂ mineralization during incubation in soil from the continuous maize or wheat plots. Results are expressed in g C-CO₂ kg⁻¹ soil. Standard deviations are indicated only where larger than symbols.



mixtures, the increase of C mineralization as compared to the soil alone was attributed to the mineralization of the OAs and corresponded to 2, 14, 22 and 44% of the initially added C for cellulose, straw, compost and glucose respectively. Straw C mineralization was similar with or without soil, suggesting that no interactions occurred between soil and straw. In contrast, the addition of compost to soil decreased its mineralization rate confirming the results of Serra-Wittling *et al.* (1996). When incubated with soil, the mineralization of cellulose increased but remained very low. The high biodegradability of glucose resulted in a high mineralization rate even in absence of mineral N.

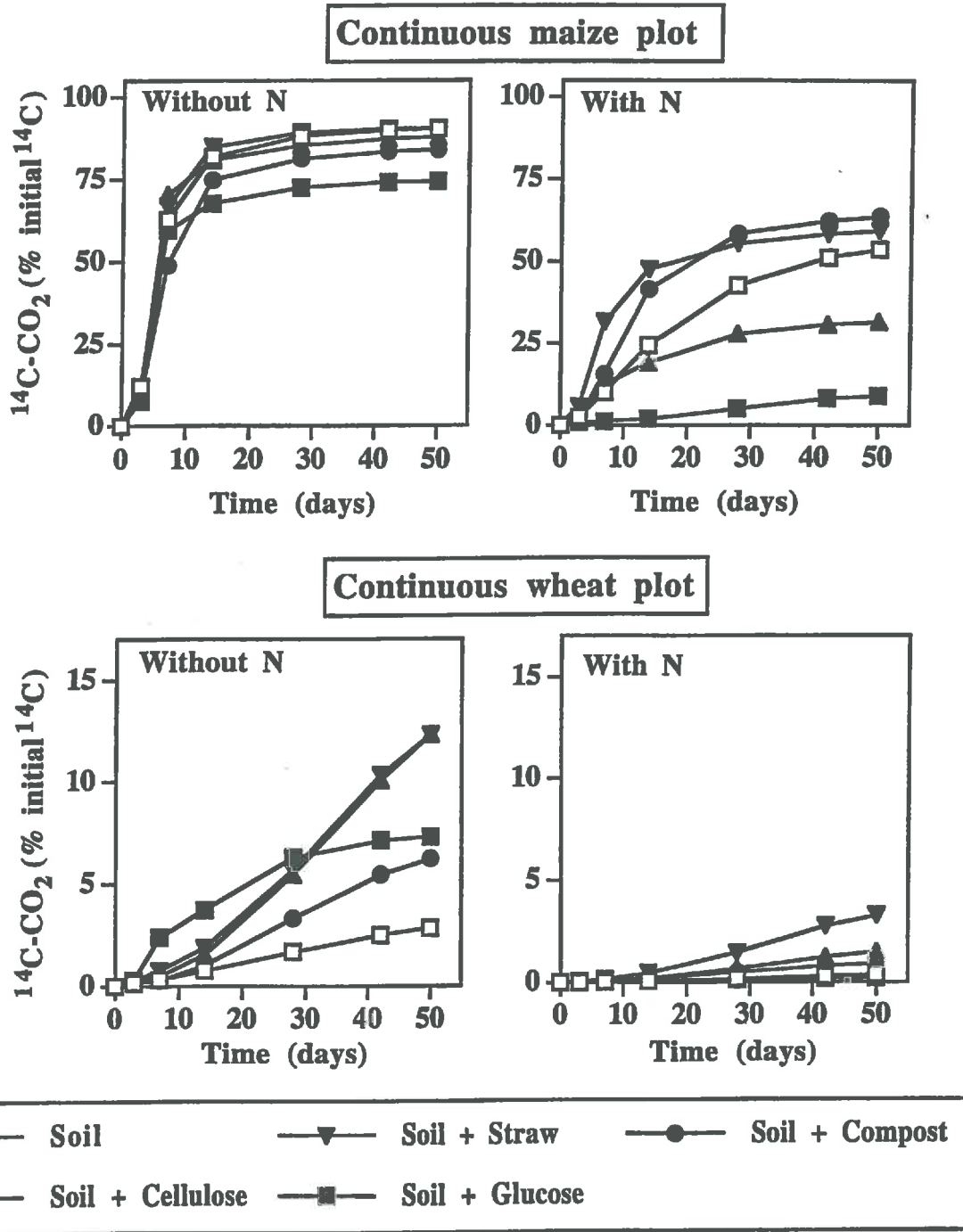
Mineral N addition did not modify C mineralization in the soils alone (Fig. 5.1). In contrast, the addition of mineral N, known to be often the limiting factor of OA mineralization (Alexander, 1977), increased the C mineralization for cellulose, straw and glucose which reached 27, 32 and 61% of the initially added C, respectively. The initial organic materials used for composting had undergone humification during the composting process, resulting in a compost organic matter humified as in a soil, with a relatively low C to N ratio (C/N=19.1). Thus compost C mineralization was not stimulated by N addition, and reached 25% of the initial C by the end of the incubation. When supplemented with mineral N, the kinetics of C mineralization of straw and cellulose became identical, indicating the dominant activity of cellulolytic micro-organisms during the initial phase of straw degradation (Alexander, 1977).

Atrazine behaviour in soils

During the incubation with soil from the continuous maize plot, atrazine mineralization increased rapidly and reached a plateau after only 14 days (Fig. 5.2). At the end of the incubation, 90.3% of the initially added radioactivity was mineralized, 3.8% remained extractable and 6.7% was unextractable and stabilized as bound residues (Table 5.2). No atrazine was found in the extractable fraction which included mainly dealkylated metabolites (in % of the extracted radioactivity: 5.3% of DEA; 23.7% of DIA; 63.2% of DEIA) and only 8.7% of HYA (Table 5.3 and Fig. 5.3).

During the incubation with soil coming from the continuous wheat plot, atrazine mineralization increased progressively throughout all the incubation but remained very low (Fig. 5.2). Only 2.8% of the initially added radioactivity was mineralized at the end of the incubation, 65.3% remained extractable and 32.6% formed bound residues (Table 5.4). Atrazine was the main component of the extractable fraction (82.4% of the extractable radioactivity) with 15.3% of the extractable radioactivity present as dealkylated metabolites

Figure 5.2 : Impact of organic amendments and mineral N on mineralization of ^{14}C -atrazine during incubation in soil from the continuous maize or wheat plots. Results are expressed as percent of the initial radioactivity. Standard deviations are indicated only where larger than symbols.



(9.1% of DEA, 4.1% of DEIA and 2.1% of DIA) and 2.4% as HYA (Table 5.5 and Fig. 5.3).

These results confirmed the presence of a microflora able to open and entirely mineralize the triazine ring of atrazine in the continuous maize plot but not in the continuous wheat plot in relation to the frequency of atrazine application in field conditions (Barriuso and Houot, 1996). The plots cultivated with continuous maize and wheat will be hereafter referred to as adapted and non adapted soil, respectively. Dealkylation of the amino-groups used to be presented as the major mechanism involved in atrazine microbial degradation and was associated with low rates of triazine ring degradation (Kaufman and Kearney, 1970). More recently, rapid atrazine degradation and triazine ring mineralization have been demonstrated and dehalogenation has been shown to be the first step of atrazine degradation in many studies with a consortium of microorganisms or isolated strains (Mandelbaum *et al.*, 1993a; Assaf and Turco, 1994; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995). However, dealkylation could also be the first step of a rapid atrazine degradation and both dealkylation and dehalogenation can occur simultaneously (Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994; Shao *et al.*, 1995; Stucki *et al.*, 1995). Both hydroxyatrazine and dealkylated metabolites were detected in the extracts after incubation in the adapted and non adapted soils. However, micro-organisms responsible for triazine ring mineralization were present only in the adapted soil. In the non adapted soil, the bound residues reached 32.6% of the initial radioactivity and constituted an alternative pathway of atrazine dissipation (Barriuso and Houot, 1996).

Nitrogen effect on atrazine behaviour in soils

In the adapted soil from the continuous maize plot, the addition of mineral N significantly decreased the amount of atrazine mineralized to 53.5% of the initial radioactivity (Fig. 5.2). Simultaneously, the extractable fraction and the bound residues significantly increased to 28.3% and 17.7% of the initial radioactivity, respectively (Table 5.2). In the non adapted soil from the continuous wheat plot, the same tendencies were observed but to a lesser extent. The decrease of the mineralized fraction to 0.4% remained significant, but not the increase of the extractable fraction to 69.5% and of the bound residues to 33.5% of the initial radioactivity (Table 5.4). Atrazine can be used as N source by degrading micro-organisms (Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995). In the adapted soil, the addition of a large concentration of mineral N inhibits atrazine degradation (Alvey and Crowley, 1995; 1996) either by offering an alternative source of N or by influencing the synthesis or the activity of the enzymes responsible for triazine ring degradation (Entry *et al.*,

Table 5.2 : Distribution of the initial radioactivity from ^{14}C -atrazine into the mineralized, extractable (water plus methanol extracts) and bound residue fractions after 50 days of incubation in the soil from the continuous maize plot.

--	Mineralized CO_2	Extractable residues	Bound residues
Continuous maize plot	(————— % of initial ^{14}C -atrazine —————)		
<u>Without mineral N</u>			
Soil	90.3 ± 2.3 a*	3.8 ± 0.3 a	6.7 ± 0.1 a
Soil + straw	90.4 ± 4.8 ab	4.0 ± 0.4 a	7.0 ± 0.5 a
Soil + compost	83.9 ± 2.0 b	5.4 ± 0.5 b	10.5 ± 0.6 b
Soil + cellulose	87.7 ± 1.6 ab	5.3 ± 0.7 ab	6.9 ± 0.2 a
Soil + glucose	74.2 ± 2.7	7.8 ± 1.6 b	9.5 ± 0.1 b
<u>With mineral N</u>			
Soil	53.5 ± 2.1	28.3 ± 2.6	17.7 ± 0.4 c
Soil + straw	59.2 ± 2.0 c	19.4 ± 1.6 c	19.8 ± 1.5 c
Soil + compost	63.5 ± 2.2 c	18.8 ± 1.8 c	20.0 ± 0.7 c
Soil + cellulose	31.5 ± 2.7	41.1 ± 2.9	25.7 ± 0.2
Soil + glucose	8.9 ± 2.4	58.1 ± 4.4	30.6 ± 0.4

* Means within a column followed by the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$) according to Student test.

Table 5.3 : Characterization of the extracted radioactivity at the end of the incubation in the soil coming from the continuous maize plot. Results of water and methanol extractions were cumulated and expressed in percent of extracted radioactivity. Atrazine and four metabolites were detected: hydroxyatrazine (HYA), deethylatrazine (DEA), deisopropylatrazine (DIA) and deethyldeisopropylatrazine (DEIA).

	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
Continuous maize plot	(————— % of extracted ¹⁴ C —————)				
<u>Without mineral N</u>					
Soil	0.0	8.7	5.3	23.7	63.2
Soil + straw	33.3	0.0	12.5	16.8	37.3
Soil + compost	0.0	3.5	14.8	0.0	79.4
Soil + cellulose	0.0	9.4	14.7	0.0	74.3
Soil + glucose	0.0	36.5	6.2	12.8	43.5
<u>With mineral N</u>					
Soil	0.0	9.0	7.5	11.6	71.9
Soil + straw	4.3	0.0	8.9	6.4	80.4
Soil + compost	1.0	1.3	3.0	15.5	79.1
Soil + cellulose	1.8	0.1	14.9	20.8	62.4
Soil + glucose	0.0	21.2	8.6	18.5	50.6

Table 5.4 : Distribution of the initial radioactivity from ^{14}C -atrazine between the mineralized, extractable (water plus methanol extracts) and bound residue fraction after 50 days of incubation in the soil from the continuous wheat plot.

Continuous wheat plot	Mineralized CO_2	Extractable residues	Bound residues
	(————— % of initial ^{14}C -atrazine —————)		
<u>Without mineral N</u>			
Soil	2.8 ± 0.3 a*	65.3 ± 1.9 a	32.6 ± 1.3 a
Soil + straw	12.3 ± 0.5 b	52.4 ± 2.7 b	38.4 ± 1.5 b
Soil + compost	6.2 ± 0.7 c	49.5 ± 3.1 b	47.9 ± 1.0 cd
Soil + cellulose	12.3 ± 1.8 b	52.0 ± 5.6 b	36.8 ± 0.6 b
Soil + glucose	7.3 ± 0.3 c	52.9 ± 7.7 ab	38.3 ± 1.4 b
<u>With mineral N</u>			
Soil	0.4 ± 0.1 d	69.5 ± 4.6 ac	33.5 ± 1.5 a
Soil + straw	3.3 ± 0.2 a	49.4 ± 2.4 b	50.2 ± 0.9 c
Soil + compost	0.9 ± 0.1	56.6 ± 6.3 abc	47.7 ± 1.6 cd
Soil + cellulose	1.5 ± 0.1	56.7 ± 3.0 b	45.8 ± 1.0 d
Soil + glucose	0.2 ± 0.01 d	54.0 ± 4.8 b	45.7 ± 0.6 d

* Means within a column followed by the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$) according to Student test.

1993). Nitrogen has been found to regulate the synthesis or the activity of peroxidases (Li *et al.*, 1994; Kaal *et al.*, 1995), enzymes which could be active in atrazine degradation (Mougin *et al.*, 1994). As a consequence of the decrease in atrazine mineralization, atrazine dissipation via bound residue formation increased in this soil. In the non adapted soil, the large proportion of bound residues already formed in soil alone was not significantly modified by the addition of mineral N. The proportions of the different metabolites were not modified after addition of mineral N which did not change the pathway of atrazine degradation in either soil (Tables 5.3 and 5.5; Fig. 5.3).

Atrazine behaviour in organic amendments

When atrazine was incubated with only compost, straw or cellulose, the mineralization of the triazine ring remained lower than 1% of the initial radioactivity (Table 5.6). With cellulose, straw and compost, respectively 95.1, 75.5 and 44.3% of the initial radioactivity remained extractable. The proportion of bound residues was larger with compost (68.3% of the initial radioactivity) than with straw (28.0% of the initial radioactivity). Few bound residues were formed with cellulose (0.6% of the initial radioactivity). Atrazine sorption on straw was greater than on compost and was very low on cellulose (Table 5.7). Normalization of the sorption coefficients to the organic carbon content of the sorbant (K_{oc} values) revealed that compost organic matter had a higher affinity for atrazine than straw organic matter. This physico-chemical reactivity was probably related to the larger proportion of bound residues formed with compost (Table 5.6). Sorption could be the initial stabilization process leading to the formation of highly stabilized non-extractable residues. With cellulose, all the radioactivity remained extractable and mainly as parent atrazine (Fig. 5.3 and Table 5.8). With compost, 44.3% of the initial radioactivity remained extractable and atrazine was also the main component of the extract. With straw, 75.5% of the initial radioactivity was extracted at the end of the incubation, in which only 31.5% was atrazine. The other detected metabolites were mainly DIA with lower proportions of other dealkylated metabolites.

The three OAs had different effects on atrazine behaviour. Cellulose did not interact with atrazine: no retention nor degradation of atrazine occurred. Compost developed mainly physico-chemical interactions responsible for the stabilization of a large proportion of the initial atrazine. However little biological transformation of atrazine was detected. Straw had a double effect on atrazine behaviour, confirming previous results obtained with composted straw (Houot *et al.*, 1998): stabilization via bound residue formation and partial biological transformation since a large proportion of metabolites was detected. However, fresh and

Figure 5.3 : Impact of organic amendments and mineral N on the ^{14}C extractable residues at the end of the incubations in soil from the continuous maize or wheat plots. Results are expressed as percent of the initial radioactivity added as ^{14}C -atrazine.

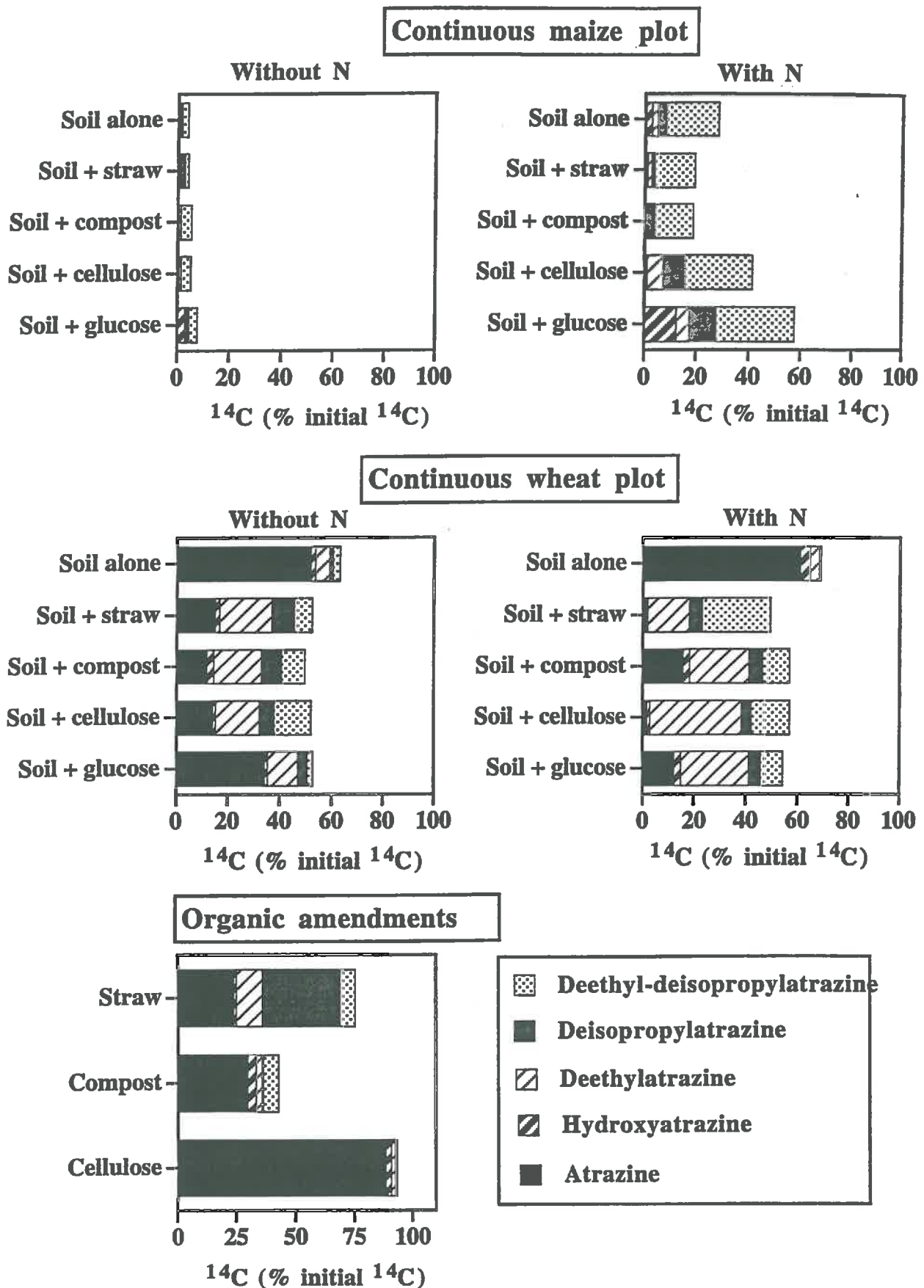


Table 5.5 : Characterization of the extracted radioactivity at the end of the incubation in the soil coming from the continuous wheat plot. Results of water and methanol extractions were cumulated and expressed in percent of extracted radioactivity. Atrazine and four metabolites were detected: hydroxyatrazine (HYA), deethylatrazine (DEA), deisopropylatrazine (DIA) and deethyldeisopropylatrazine (DEIA).

	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
Continuous wheat plot	(————— % of extracted ¹⁴ C —————)				
<u>Without mineral N</u>					
Soil	82.4	2.4	9.1	2.1	4.1
Soil + straw	28.7	3.3	38.3	16.5	13.1
Soil + compost	24.1	5.5	36.7	15.7	18.1
Soil + cellulose	27.1	2.3	32.4	10.6	27.6
Soil + glucose	64.6	1.9	22.2	6.9	4.2
<u>With mineral N</u>					
Soil	87.3	4.0	5.9	1.0	1.3
Soil + straw	2.8	1.0	32.6	10.2	52.7
Soil + compost	27.8	4.4	40.1	9.3	18.1
Soil + cellulose	3.0	1.8	62.7	6.3	26.0
Soil + glucose	22.4	5.1	48.4	8.5	15.7

Table 5.6 : Distribution of the initial radioactivity from ^{14}C -atrazine between the mineralized, extractable (water plus methanol extracts) and bound residue fraction after 50 days of incubation with the organic amendments.

	Mineralized CO_2	Extractable residues	Bound residues
	(————— % of initial ^{14}C -atrazine —————)		
Straw	0.8 ± 0.4	75.5 ± 7.2	28.0 ± 0.2
Compost	0.3 ± 0.1	44.3 ± 8.9	68.3 ± 1.2
Cellulose	0.2 ± 0.02	95.1 ± 1.5	0.6 ± 0.03

composted straws did not have the same biological activity. When atrazine was incubated with composted straw, mainly hydroxyatrazine was formed (Houot *et al.*, 1998). Here with fresh straw, mainly dealkylated metabolites were detected.

Atrazine behaviour in amended soils

The effect of soil amendment with the OAs on atrazine behaviour differed in the adapted and non adapted soils. In the adapted soil from the continuous maize plot, the addition of OAs modified little the kinetics of atrazine mineralization which only significantly decreased to 83.9 and 74.2% of the initial radioactivity, respectively when compost and glucose were added (Fig. 5.2). With these two OAs, stabilization of the initial radioactivity via bound residue formation slightly but significantly increased (Table 5.2). In contrast, in the non adapted soil, all the OAs significantly increased atrazine mineralization up to 6.2% for compost, 7.3% for glucose and 12.3% for straw and cellulose (Fig. 5.2). The addition of OAs also significantly increased the bound residues to 36.8 to 38.4% of the initial radioactivity for straw, cellulose and glucose and 47.9% for compost (Table 5.4).

These results clearly confirmed that the effect of OAs on pesticide behaviour varied with the nature and the reactivity of the organic matter and with the microorganisms responsible for the pesticide transformation (Alvey and Crowley, 1995; Benoit *et al.*, 1996). The first effect of OA is usually to increase pesticide sorption. In the present work, straw and compost increased atrazine retention in both soils, but cellulose did not (Table 5.7). The increase in pesticide sorption can thus decrease its availability for microbial degradation (Doyle *et al.*, 1978). This was observed in the adapted soil mainly for compost, confirming the results of a previous study (Barriuso *et al.*, 1997). In contrast, the addition of straw to the adapted soil did not modify atrazine mineralization although there was a potential increase in atrazine retention. However, the affinity of straw organic C for atrazine was lower than that of soil C as shown by the larger K_{oc} coefficient measured in soil than in soil-straw mixture (Table 5.7). Thus, even if adsorbed on straw organic matter, atrazine remained available for microbial degradation in the adapted soil where the degrading microflora was very active.

Organic amendments can also increase pesticide degradation by stimulating the microbial activity (Entry and Emmingham, 1995; Topp *et al.*, 1996). Indeed, in the non adapted soil, all the OAs stimulated both total microbial activity and atrazine mineralization. However both activities could not be directly related since the different OAs did not have the same effect on total CO₂ and ¹⁴CO₂ evolution, confirming the results of Alvey and Crowley (1995). In this

Table 5.7 : Distribution coefficients K_d and K_{oc} for atrazine sorption on organic amendments, soils and soil-organic amendment mixtures.

	K_d (l kg ⁻¹)	K_{oc} (l kg ⁻¹ C)
<u>Organic amendment</u>		
Straw	15.01 ± 0.43	36.1 ± 1.0
Compost	10.10 ± 1.59	54.2 ± 8.5
Cellulose	1.32 ± 0.12	3.0 ± 0.3
<u>Continuous maize plot</u>		
Soil alone	0.54 ± 0.01	47.1 ± 0.7
Soil + straw	1.16 ± 0.05	42.9 ± 1.7
Soil + compost	0.99 ± 0.13	49.8 ± 6.4
Soil + cellulose	0.58 ± 0.05	20.6 ± 1.7
<u>Continuous wheat plot</u>		
Soil alone	0.77 ± 0.04	44.2 ± 2.2
Soil + straw	1.33 ± 0.03	40.8 ± 1.0
Soil + compost	1.18 ± 0.02	46.5 ± 0.7
Soil + cellulose	0.78 ± 0.04	23.1 ± 1.1

soil, the largest proportion of bound residues was observed with compost (Table 5.4), probably because of its greater affinity for atrazine than the other OAs (Table 5.7).

In the adapted soil, the addition of OAs modified little the nature of the extractable radioactivity (Table 5.3 and Fig. 5.3). Atrazine was only detected after incubation with straw (33.3% of the extractable radioactivity but only 1.3% of the initial radioactivity). The proportion of hydroxyatrazine increased in the incubation with glucose (36.5% of the extractable radioactivity), possibly due to an increase in chemical hydrolysis accompanying acidification (Khan, 1978). Alvey and Crowley (1995) observed a significant decrease in pH in glucose-amended soil incubations.

In the non adapted soil, the OAs increased the partial degradation of atrazine since the extractable atrazine represented only 34.2% of the initial radioactivity when glucose was added and 12 to 15% with the other OAs (Table 5.5). Mainly dealkylated metabolites were detected in the extracted radioactivity with all the OAs. In this soil, in spite of low triazine ring mineralization, the degradation of atrazine was strongly stimulated by the OAs. In the non adapted soil, atrazine behaviour was similar when straw or cellulose were added. The largest increases in atrazine partial degradation and mineralization were observed with these two OAs, which could mean that cellulolytic micro-organisms, mainly fungi (Wagner and Broder, 1993), were active in atrazine degradation. Many examples of atrazine and other s-triazine dealkylation by fungi have been published (Kaufman and Blake, 1970; Levanon, 1993; Hickey *et al.*, 1994; Mougin *et al.*, 1994; Masaphy *et al.*, 1996; Mougin *et al.*, 1997) but their capacity to mineralize the triazine ring has never been demonstrated. In the non adapted soil, micro-organisms responsible for the triazine ring opening and mineralization were little stimulated by the addition of OAs.

Nitrogen effects on atrazine behaviour in amended soils

The addition of mineral N simultaneously with the OAs modified their effects. In all cases, atrazine mineralization decreased significantly as compared to the same treatment without mineral N (Fig. 5.2). This confirmed the inhibitory effect of mineral N on atrazine mineralization when present in a large quantity (Alvey and Crowley, 1995). In the adapted soil, the addition of OAs and mineral N differentiated the effects of the OAs (Table 5.2). Atrazine mineralization was very low in the presence of glucose (8.9%), reached 31.5% with cellulose, 59.2% with straw and 63.5% with compost (53.5% with soil and mineral N only). Simultaneously, the bound residues increased in all the treatments significantly: 17.7% in the soil, 19.8 and 20.0% with straw and compost, 25.7% with cellulose and

Table 5.8 : Characterization of the extracted radioactivity at the end of the incubation with the organic amendments only. Results of water and methanol extractions were cumulated and expressed in percent of extracted radioactivity. Atrazine and four metabolites were detected: hydroxyatrazine (HYA), deethylatrazine (DEA), deisopropylatrazine (DIA) and deethyldeisopropylatrazine (DEIA).

	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(————— % of extracted ¹⁴ C —————)				
Straw	31.5	1.5	14.5	43.8	8.7
Compost	67.3	7.9	5.6	1.4	14.6
Cellulose	93.1	2.3	1.8	0.3	0.6

30.6% with glucose. Again little atrazine was detected in the extractable fractions where mainly dealkylated metabolites were detected with more DEIA than DEA or DIA (Table 5.3). Again with glucose, a larger proportion of HYA was observed. In the adapted soil, when straw or cellulose was added with mineral N, the total heterotrophic activity as revealed by the kinetics of total C-CO₂ mineralization was similar and probably dominated by cellulolytic micro-organisms. However, atrazine mineralization remained larger during the incubation with straw than with cellulose, suggesting that the triazine ring mineralization was not due to the cellulolytic micro-organisms.

In the non adapted soil, the mineralization of atrazine was stopped when mineral N was added, except with straw where 3% of the initial atrazine was mineralized. However, the addition of mineral N increased the partial degradation of atrazine and only 1% of the initial radioactivity remained as atrazine with straw, 2% with cellulose, 12% with glucose and 16% with compost (Fig. 5.3). Mainly dealkylated metabolites were detected, with more DEA than DEIA (Table 5.5).

Addition of OAs with mineral N increased atrazine stabilization as bound residues in the adapted soil (7 to 10% of bound residues without mineral N, 18 to 30% with N) but not in the non adapted one (33 to 48% of bound residues without N, 34 to 50% with N). In the adapted soil, the bound residue proportion increased with the total microbial activity as revealed by the kinetics of total CO₂ mineralization. This relation between bound residue formation and microbial activity has already been reported in other studies (Benoit and Barriuso, 1997) and was only observed in the adapted soil when both OAs and N were added. The addition of OAs without mineral N stimulated the mineralization of C but the microbial biomass probably increased little, limited by the available N. In contrast, the large availability of C and N when both OAs and mineral N were added, resulted in a large increase of the microbial biomass (Zagal and Persson, 1994). Cell walls and membranes of micro-organisms are reactive and constitute an available surface for pesticide retention (Benoit and Barriuso, 1997). In the adapted soil, the increase in bound residue formation could be due to atrazine retention onto the surface of the growing microbial biomass after OA and N addition. Sorensen (1983), studying the effect of OAs on the size and the persistence of soil microbial biomass found that the increase in microbial biomass was larger after glucose and cellulose addition to soils than with straw. This confirmed our hypothesis about the importance of microbial biomass in bound residue formation which increased more with glucose and cellulose than with the other OAs. This increased retention could then play a role in decreasing atrazine mineralization, because of the decreased availability of the molecule.

The direct inhibitory effect of mineral N, mentioned before, probably also helped decreasing atrazine mineralization. In the non adapted soil, the formation of bound residues was already substantial without addition of OAs, and their effect was less evident.

In summary, the effect of OAs and N availability on atrazine degradation in soils varied in relation with the micro-organisms active in atrazine degradation. In the soil adapted to atrazine degradation because of the repeated applications in field conditions, the OAs alone had little effect on atrazine behaviour. In the soil non adapted to atrazine mineralization since never treated in field conditions, OA addition stimulated atrazine mineralization which always remained lower than in the adapted soil. However, large atrazine dealkylation was observed which increased when mineral N was added. In the non adapted soil, the OAs promoted dealkylation but not mineralization. In both soils, mineral N decreased atrazine mineralization, probably by inhibiting the enzymes responsible for triazine ring opening and mineralization or their synthesis.

Acknowledgements - This work was financially supported by the INRA program "AIP-Etude et Gestion de l'Ecosystème Sol". The authors thank J.N. Rampon and V. Bergheaud for their technical assistance, and Dr Edward Topp for reading the manuscript.

**Chapitre 6 : Variation du devenir de l'atrazine avec la nature de
la source d'azote**

**DEPENDENCE OF ATRAZINE BEHAVIOUR IN SOILS ON AVAILABLE
NITROGEN FORMS**

ABDELHAFID RAHIMA, HOUOT SABINE and BARRIUSO ENRIQUE
I.N.R.A., Unité de Science du Sol, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France.

Soumis à "Soil Biology and Chemistry"
(Avril, 1998)

DEPENDENCE OF ATRAZINE BEHAVIOUR IN SOILS ON AVAILABLE NITROGEN FORMS

Summary - The effect of N availability on atrazine behaviour was studied in a soil which had (adapted) or had not (non adapted) been exposed to atrazine in field conditions, resulting in an accelerated degradation of atrazine in the adapted soil and in a slow degradation of the herbicide in the non adapted soil. The dissipation of ^{14}C -atrazine via degradation and formation of non extractable "bound" residues was monitored during laboratory incubations in soils alone or supplemented with different sources of N. The N forms were chosen from their N availability. In the non adapted soil, less than 1% of the initial radioactivity was mineralized with all the N sources except for pyrazine. The most available sources of N were the mineral forms and greatly decreased atrazine mineralization in the adapted soil to between 6 and 8% of the initial radioactivity, where as in the control soil 93% of the initial radioactivity was mineralized. Arginine, adenine and albumin enhanced total microbial activity and N availability and had intermediate effects on atrazine mineralization. Pyrazine N was only slightly mineralized and had little effect on atrazine mineralization. In both soils, the extractable radioactivity was negatively correlated with the mineralized radioactivity and increased when atrazine mineralization decreased. The proportion of bound residues increased with the total microbial activity in both soils and the largest proportions of bound residues were measured with addition of albumin, arginine, adenine and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ which promoted the highest CO_2 mineralization. Although there was little mineralization of biuret N, atrazine mineralization was greatly decreased when this N source was added, probably because it is one of the last intermediaries in atrazine degradation.

INTRODUCTION

Atrazine [6-chloro-N²-ethyl-N⁴-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine] is a herbicide still widely used to control numerous broad-leaved weeds and has been frequently detected in ground and surface waters. Microbial degradation is the principal process of atrazine dissipation in soils (Esser *et al.*, 1975). A large variety of soil micro-organisms are known to degrade atrazine partially by N-dealkylation or dehalogenation reactions (Kaufman and Kearney, 1970; Behki and Khan, 1986; Mougín *et al.*, 1994). Complete and rapid mineralization of the triazine ring has also been reported (Mandelbaum *et al.*, 1993; Assaf and Turco, 1994; Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994; Mandelbaum *et al.*, 1995;

Radosevich *et al.*, 1995), and the possible adaptation of the soil microflora to atrazine degradation has been demonstrated after repeated applications in field conditions (Barriuso and Houot, 1996; Vanderheyden *et al.*, 1997). Microbial growth has been measured with atrazine as sole C source (Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994; Behki and Khan, 1986; Stucki *et al.*, 1995). However, the rapid triazine ring mineralization seems to imply the development of micro-organisms using triazine nitrogen as N source (Cook and Hütter, 1981; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995).

Nitrogen availability influences atrazine behaviour in soils and the effect varies with the form and amount of N present. A large concentration of mineral N greatly decreased atrazine mineralization in soil when added alone or with organic amendments (Entry *et al.*, 1993; Alvey and Crowley, 1995; Abdelhafid *et al.*, 1998). However, it enhanced the partial degradation of atrazine and only triazine ring mineralization was prevented (Abdelhafid *et al.*, 1998). The inhibition of enzymatic systems responsible for triazine ring degradation has been proposed to explain the effect of mineral N on atrazine mineralization (Entry *et al.*, 1993; Abdelhafid *et al.*, 1998) since mineral N is known to inhibit enzymes like peroxydases or other lignin-degrading enzyme systems (Li *et al.*, 1994; Kaal *et al.*, 1995) which could play a role in degrading various herbicides including atrazine (Mougin *et al.*, 1994). On the other hand, when added in an organic form, N can enhance atrazine mineralization. For example, the equivalent amount of N as in the previously mentioned examples, applied as dairy manure and including a large proportion of organic N, stimulated atrazine mineralization (Topp *et al.*, 1996). In this case, the greater availability of nutrients allowed a larger number of atrazine degraders in the soil amended with the dairy manure. The effect of N is then associated to the availability of the carbon in the organic amendment.

The purpose of the present work was to study how the addition of different forms of N influenced atrazine behaviour in two soils: in one soil, enhanced mineralization of atrazine has been observed and related to repeated field applications of atrazine; the other soil had the same physico-chemical characteristics but never received atrazine in field conditions and atrazine mineralization remained slow (Barriuso and Houot, 1996; Abdelhafid *et al.*, 1998). The dissipation of ^{14}C -atrazine via degradation and formation of non extractable "bound" residues was followed during laboratory incubations in soils alone or amended with the different forms of N. The N compounds were chosen from their N availability, their effect on total microbial activity or their connection to the atrazine degradation pathway. For example, the effect of biuret, one of the last metabolites during atrazine degradation, was studied on atrazine behaviour.

Table 6.1 : Main soil physico-chemical characteristics. Results are expressed on a dry weight basis

	Clay	Silt	Sand	Organic C	Total N	CaCO ₃	pH (water)
	(————— g kg ⁻¹ —————)						
Continuous maize plot	253	623	91	11.5	1.2	33	8.2
Continuous wheat plot	241	445	171	17.4	1.7	61	8.0

MATERIALS AND METHODS

Soils

Two experimental plots with the same Typic Eutrochrept soil, located at Grignon (Yvelines, France) were sampled in the upper 20 cm in February 1997 (Table 6.1). One plot has been cultivated continuously with maize since 1962 and has been treated yearly with atrazine used at recommended agronomic doses. The other plot has been under continuous wheat since 1965, and has never received atrazine in field conditions. Fresh soils were immediately passed through a 5 mm sieve after sampling.

Chemicals

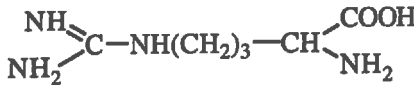
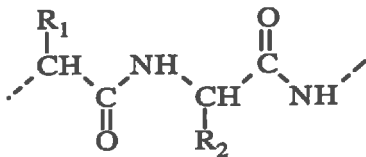
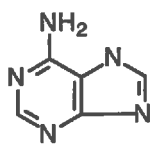
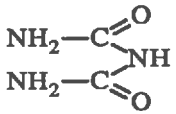
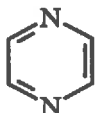
Analytical standards of atrazine and its metabolites (hydroxyatrazine, HYA; deethylatrazine, DEA; deisopropylatrazine, DIA; deethyl-deisopropylatrazine, DEIA) were purchased from ChemService (West Chester, PA, USA). The [U-ring- ^{14}C]atrazine (specific activity 659 MBq mmol $^{-1}$; radiopurity greater than 97%) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK).

Seven sources of nitrogen were used: two mineral forms ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), an amino-acid (arginine), a protein (albumin), the biuret and two N-heterocycles, a purine (adenine) and a diazine (pyrazine). The molecules are presented in Table 6.2 with their C and N contents.

Incubation experiment

Laboratory incubations of [^{14}C]atrazine with fresh soil samples equivalent to 10 g of dry soil were conducted in triplicate, in hermetically stoppered jars at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, during 50 days with or without addition of the different N compounds. The amount of the different N compounds was calculated in order to add 25 mg of N in each jar (Table 2). Water solutions of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ at 250 g l $^{-1}$, of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 200 g l $^{-1}$, of arginine at 128 g l $^{-1}$, of albumin at 277 g l $^{-1}$ and of pyrazine at 120 g l $^{-1}$ were prepared and 0.6 ml of the solutions was added per jar. Adenine and biuret were not soluble enough in water and 60 mg of biuret and 48 mg of adenine were added as powder per jar and mixed to soil. [^{14}C]atrazine was added to each jar in order to reach a concentration of 0.5 mg kg $^{-1}$ of soil (0.5 ml of a solution of ^{14}C -atrazine prepared in water at 10 mg l $^{-1}$ and 19.4 MBq l $^{-1}$), corresponding to the field dose. The soil water content was adjusted to 85% of the field capacity with the atrazine and nitrogen solutions. In the control incubation (soil without N addition) and in the incubations with adenine and biuret, the soil water content of the mixtures was adjusted with the atrazine

Table 6.2 : Compounds used as N-sources: molecular structures, C and N contents and amount added per gram of soil, calculated to bring 2.5 mg of N per gram of soil in all the treatments.

Nitrogen sources		C (mg g ⁻¹)	N (mg g ⁻¹)	Added amount (mg g ⁻¹)	Added C (mg g ⁻¹)
Calcium Nitrate	Ca(NO ₃) ₂	0.0	170.6	15.0	0.00
Ammonium Sulfate	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0	211.9	11.8	0.00
Arginine		413.3	321.5	7.7	3.18
Albumin		483.8	163.9	16.6	8.03
Adenine		444.1	518.1	4.8	2.13
Biuret		232.8	407.5	6.0	1.40
Pyrazine		599.3	349.6	7.2	4.31

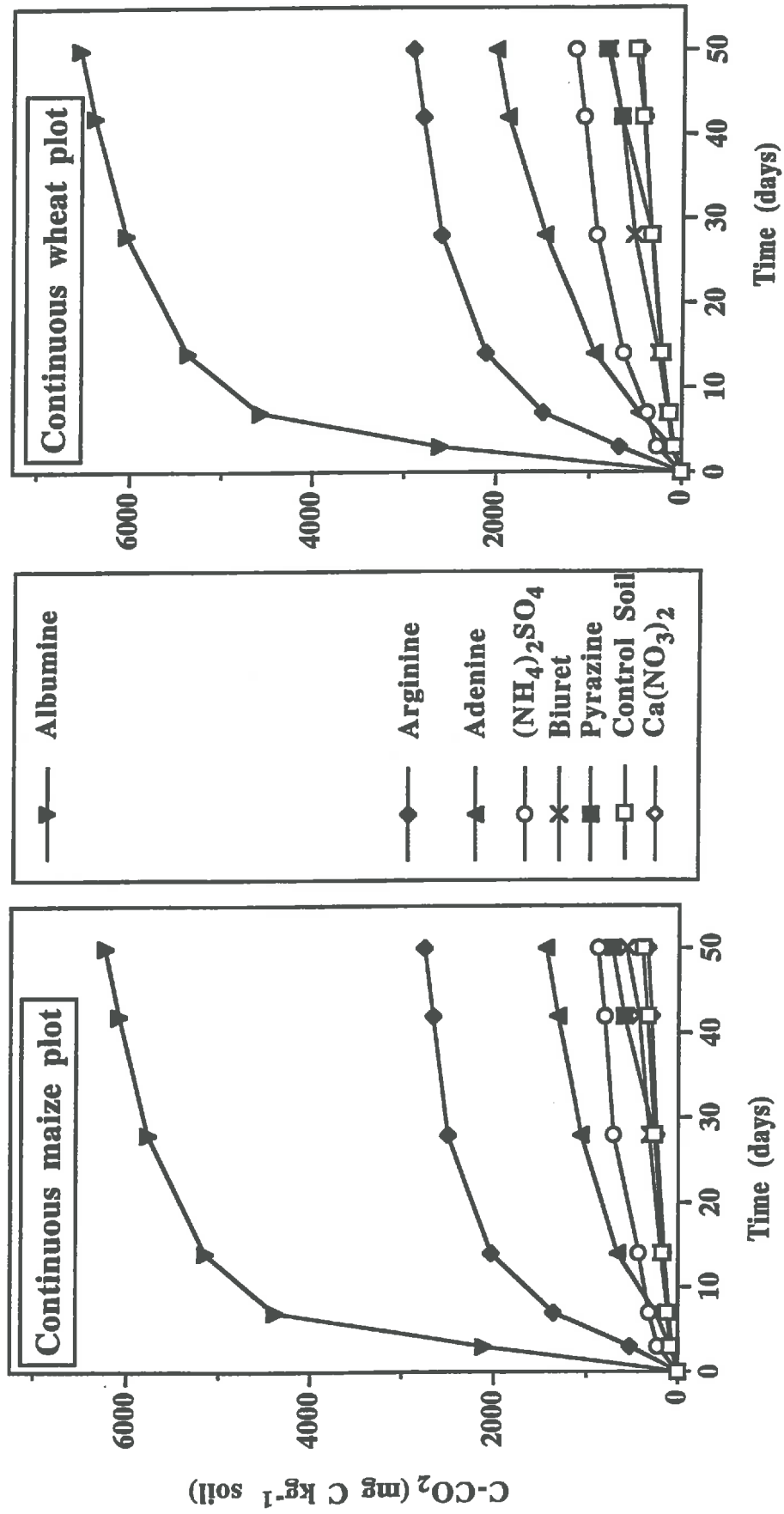
solution and 0.6 ml of MilliQ water (Millipore, Milford, MA, USA).

The evolved $^{14}\text{C-CO}_2$ and total C- CO_2 were trapped in 5 ml of 1 M NaOH placed in the incubation jars. The traps were periodically sampled and replaced during the incubation. Total C- CO_2 was analyzed by colorimetry on a continuous flow analyser (Skalar, Breda, the Netherlands) and $^{14}\text{C-CO}_2$ was determined by scintillation counting (Kontron Betamatic V; Kontron Ins., Montigny le Bretonneux, France) using Picofluor scintillation cocktail (Packard, Meriden, CT, USA). Mineral N was extracted after 7, 14 and 50 days of incubation with 50 ml of 1 M KCl and analyzed by colorimetry on the continuous flow analyser.

Analysis of the [^{14}C]atrazine residues

At the end of the incubations, all the samples treated with ^{14}C -atrazine were extracted for 16 h with 50 ml of 0.01M CaCl_2 in water using end-over-end shaking at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark. After centrifugation at 4000 g for 10 min, the supernatant was removed and the residues extracted again for 16 h with 50 ml of methanol using end-over-end shaking, three successive times. The extracted radioactivity was measured in the water and the methanol extracts. The non extractable radioactivity, corresponding to the « bound » residues was measured by scintillation counting of the [^{14}C] CO_2 evolved after combustion of the solid residues after methanol extraction (Sample Oxidizer 307, Packard, Meriden, CT, USA). The water extracts were concentrated by solid-liquid extraction with Lichrolut EN-(200 mg) cartridges (Merck, Darmstadt, Germany). The cartridges were eluted with 20 ml of methanol then evaporated until dryness under vacuum with a Rotavapor RE 111 (Büchi, Flawil, Switzerland). The residue was then dissolved in 1 ml of the first solvent used for the HPLC analysis, 40/60 methanol/water (vol./vol.) buffered with 50 mM ammonium acetate with pH adjusted to 7.4. The three methanol extracts of the three replications were pooled then concentrated until dryness by evaporation under vacuum, the residue was then dissolved in 2 ml of the first HPLC solvent. Samples for HPLC analyses were filtered through a Cameo 13N syringe nylon filter of 0.45 μm (MSI, Westboro, MA, USA) and analyzed by HPLC on a Novapak C18 column (5 μm , 250 mm x 4.6 mm - Waters, Milford, MA, USA) with a Waters instrument (600E Multisolvant Delivery System, 717 Autosampler) equipped with a UV detector at 222 nm, coupled on-line with a radioactive flow detector (Packard-Radiomatic Flo-one A550). The mobile phase was methanol/water buffered with 50 mM ammonium acetate with pH adjusted to 7.4. The chromatography started with 40/60

Figure 6.1 : Kinetics of total C-CO₂ mineralization during incubation with soil from the continuous maize or wheat plots, supplemented with different N sources. Results are expressed in mg C-CO₂ kg⁻¹ soil. Standard deviations are indicated where larger than symbols.



methanol/water (vol./vol.) for 15 min, then 80/20 methanol/water for 10 min. The mobile phase flow was 1.0 ml min^{-1} , and the injected sample volume was $800 \mu\text{l}$.

RESULTS AND DISCUSSION

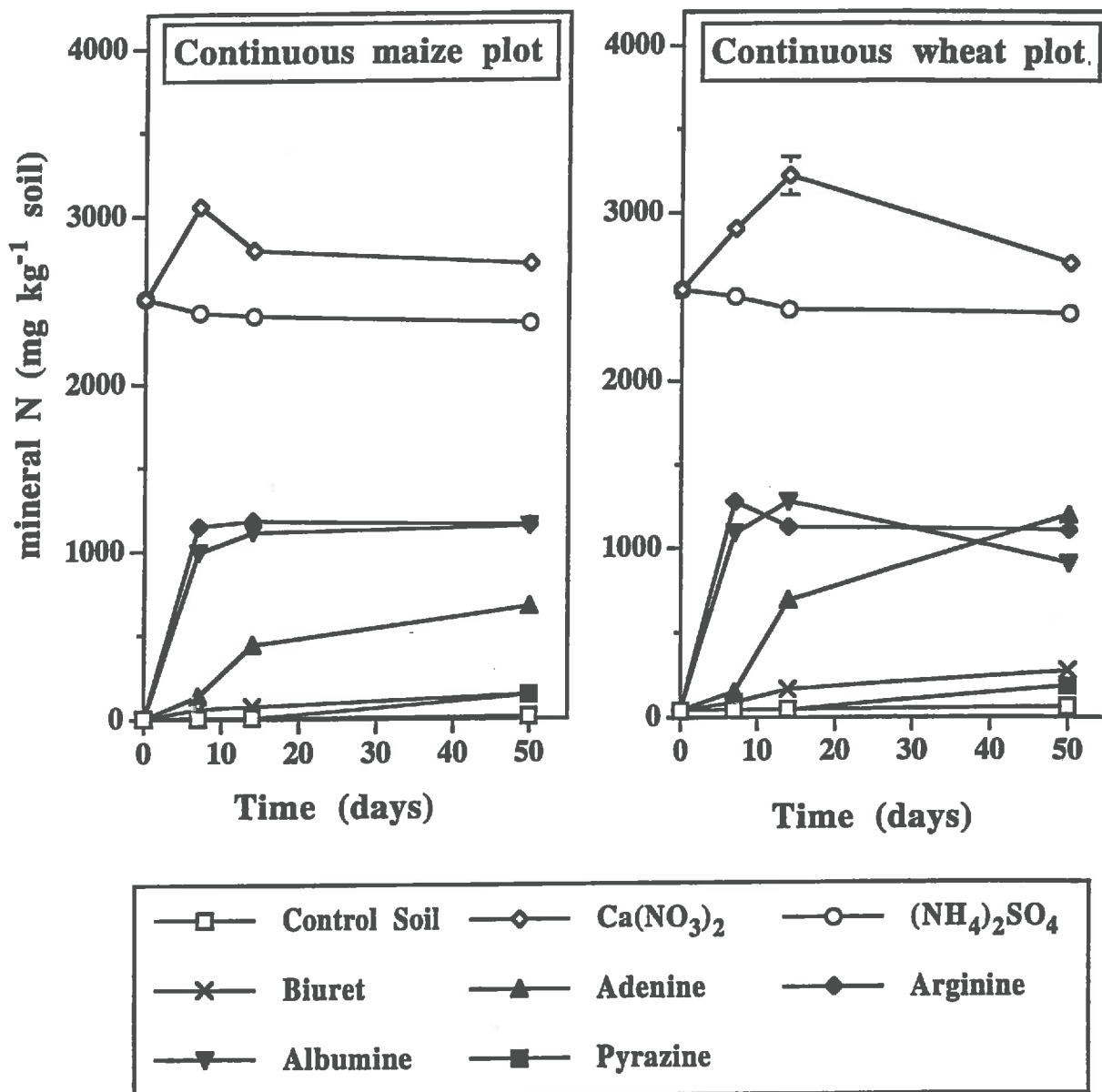
Total microbial activity

Total microbial activity was evaluated from the kinetics of total C mineralization (Fig. 6.1). For both soils, 3% of the total organic C was mineralized at the end of the control incubations (soil alone). The addition of the different N compounds modified similarly the C mineralization in the two soils. Total C mineralization was not affected by $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ addition but was doubled when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added. All the organic forms of N enhanced the C mineralization with different intensities. The rate of mineralization of the added organic matters was estimated from the increase of C-CO₂ evolved during the incubation of amended soils as compared to the soils alone, assuming that no interactions occurred between indigenous and exogenous organic matter mineralization. At the end of the incubations, 8, 12, 49, 73 and 74% respectively of pyrazine, biuret, adenine, arginine and albumin organic C were mineralized. The pyrazine was the least biodegradable form of organic C; the amino-acid and the protein were the most labile forms of organic C.

The evolution of mineral N ($\text{N-NH}_4 + \text{N-NO}_3$) was followed in the different treatments (Fig. 6.2) and was similar in the two soils. At the end of the control incubations, 1% of the soil organic N was mineralized in both soils. All the N compounds increased mineral N concentrations in soils, except pyrazine and biuret which were the least biodegradable organic matters. Mineral N remained constant when $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added. As for C, the rates of N mineralization of the organic N compounds were estimated from the increase in mineral N during the incubations of amended soils as compared to the soils alone, assuming that the addition of exogenous organic matter did not modify the indigenous N cycle. With adenine, N mineralization reached 26% of the added amount and 45% with albumin and arginine; in the three cases, mineral N was mainly present as ammonium. With pyrazine and biuret, only 5% of the initial organic N was mineralized at the end of the incubations, including as much ammonium as nitrate. The availability of C and N in the various organic matters increased in the same order: pyrazine < biuret < adenine ≤ albumin = arginine.

Atrazine mineralization

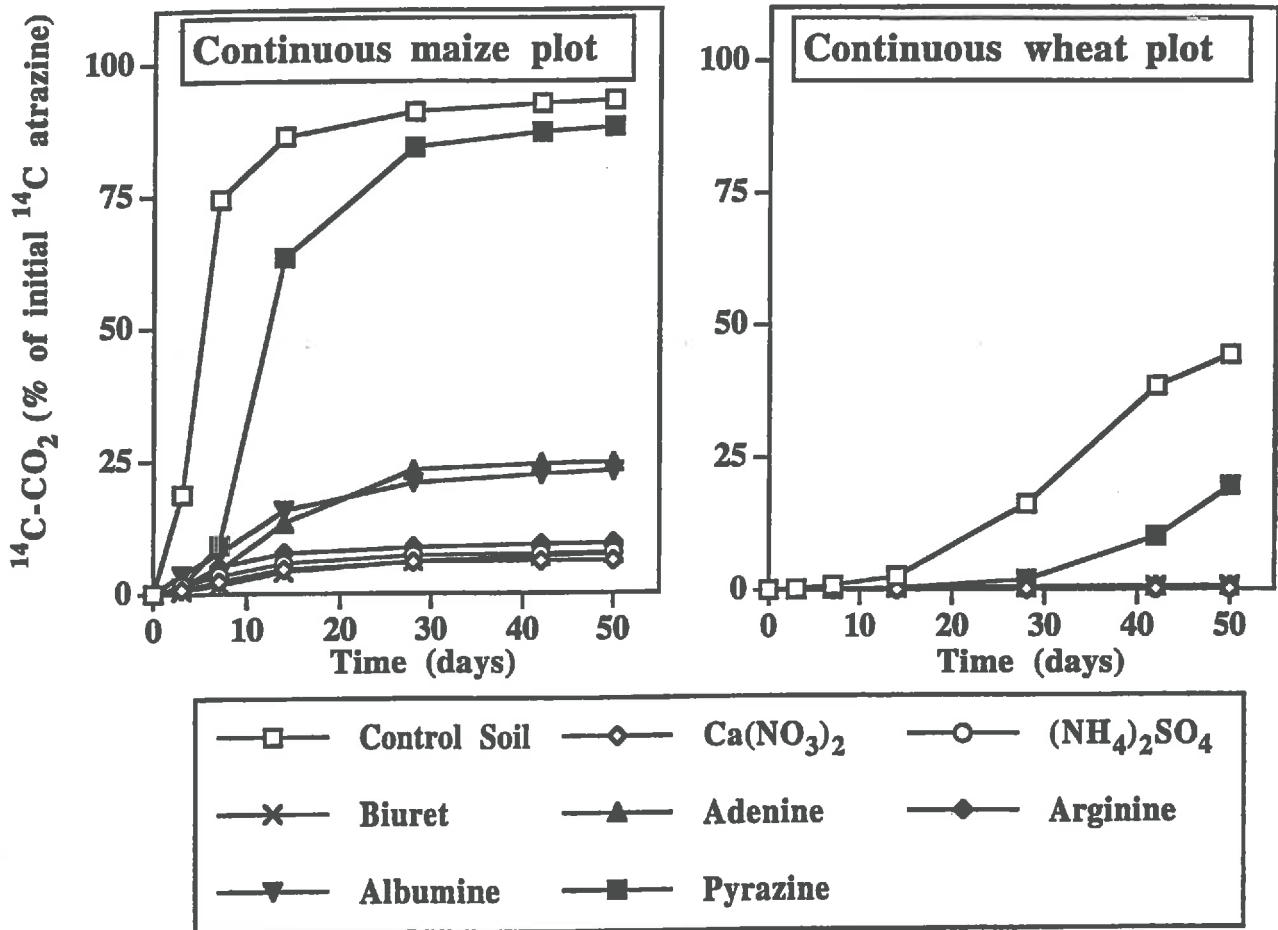
Figure 6.2 : Kinetics of total mineral N evolution during incubation with soil from the continuous maize or wheat plots, supplemented with different N sources. Results are expressed in mg N kg⁻¹ soil. Standard deviations are indicated where larger than symbols.



Atrazine mineralization increased rapidly in the soil from the continuous maize plot and reached 93.0% of the initially added radioactivity at the end of the incubations (Fig. 6.3 and Table 6.3). This was in relation with the adaptation of the soil microflora to atrazine degradation after the repeated field applications of the herbicide (Barriuso and Houot, 1996). This soil will be referred to hereafter as « adapted soil ». In the soil from the continuous wheat plot, atrazine mineralization started after a lag phase of 14 days and reached 44.2% of the initial radioactivity at the end of the incubation (Fig. 6.3 and Table 6.3). The atrazine mineralization rate was higher than previously measured in the same soil where it usually remained lower than 5% in similar experiments (Barriuso and Houot, 1996; Abdelhafid *et al.*, 1998). This soil from a continuous wheat plot never received atrazine in field conditions. The development of a microflora adapted to atrazine mineralization never occurred previously and this soil has usually been referred to as « non adapted ». However, since the two plots are next to each other, contamination from one soil to the other may have occurred which could explain the larger rate of atrazine mineralization observed during the incubation.

All the different N compounds decreased atrazine mineralization significantly in both soils. In the adapted soil, the intensity of the decrease varied with the form of N added and the rate of atrazine mineralization was negatively correlated with the mineral N content of the soil in the different treatments at the end of the incubations ($r = 0.797$, significant for $P=0.05$). The largest decreases in atrazine mineralization were observed with the two mineral N forms and 7.6 and 6.1% of the initial radioactivity were mineralized with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, respectively. With the same concentration of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Alvey and Crowley (1995) also observed a large inhibition of atrazine mineralization. For the organic N compounds, in most cases the decrease of atrazine mineralization increased with the availability of C and N in the molecules: 88.0, 22.9, 24.5, 9.3% of the initial atrazine were mineralized in the adapted soil with pyrazine, albumin, adenine and arginine respectively. Pyrazine was the least available form of N; arginine, albumin and adenine were the most easily degraded molecules (Fig. 6.1 and 6.2). The only exception was observed with biuret. In spite of the low availability of N in biuret as revealed by the small concentrations in mineral N, only 7.3% of the initial atrazine was mineralized at the end of the incubation. Biuret is one of the last metabolites in atrazine degradation pathway (Cook *et al.*, 1985) and large concentrations of this product could have inhibited the enzymatic transformations occurring in atrazine degradation. Large concentrations of the final product of enzymatic transformations often inhibit the enzymatic reactions.

Figure 6.3 : Kinetics of [^{14}C]atrazine mineralization during incubation with soil from the continuous maize or wheat plots, supplemented with different N sources. Results are expressed as percent of the initial radioactivity. Standard deviations are indicated where larger than symbols.



In the non adapted soil from the continuous wheat plot, atrazine mineralization remained lower than 1% of the initial radioactivity in all the treatments with N, except with the pyrazine with which 19.4% of the initial atrazine was mineralized at the end of the incubation. As in the adapted soil, the low availability of N in pyrazine affected little the activity of the microorganisms responsible for atrazine mineralization.

Characterization of the residual radioactivity

In the adapted soil from the continuous maize plot, only 2.3% of the initial radioactivity remained extractable and 6.6% formed bound residues at the end of the incubation of soil alone (Table 6.3). Atrazine represented 61.8% of the extracted radioactivity (Fig. 6.4) and only dealkylated metabolites were detected (18.5% of DEA, 11.2% of DEIA and 8.2% of DIA). In the non adapted soil from the continuous wheat plot, 25.6% of the initial radioactivity was extracted at the end of the incubation and 29.2% formed bound residues. Atrazine represented only 37.8% of the extracted radioactivity (Fig. 6.4). Dealkylated metabolites were the most abundant (24.6% of DEA, 11.0% of DEIA and 7.4% of DIA). However, 19.0% of the extracted radioactivity was present as HYA.

Two atrazine degradation pathways have been proposed, via dealkylation of N-alkyl substituents or via dechlorination and hydroxylation (Kaufman and Kearney, 1970; Mandelbaum *et al.*, 1993a ; Assaf and Turco, 1994; Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995; Shao *et al.*, 1995; Stucki *et al.*, 1995). As previously observed (Abdelhafid *et al.*, 1998), atrazine degradation seemed to occur via dealkylation in the adapted soil since only dealkylated metabolites were analyzed. However, hydroxylation seemed to be necessary before the triazine ring opening (Kaufman and Kearney, 1970) and the detection of HYA in the non adapted soil could mean that in the adapted soil the formation of HYA is immediately followed by further degradation which could explain that this metabolite was not observed.

In the non adapted soil, the extractable fraction was smaller than in a previous study (Abdelhafid *et al.*, 1998), in relation with the observed increase of atrazine mineralization in this soil which did not affect bound residue formation representing 30% of the initial radioactivity in both studies. The larger proportion of bound residues in the soil from the wheat plot than in the soil from the maize plot was related to the lower atrazine mineralization in this soil and to its larger C content.

Table 6.3 : Distribution of the initial radioactivity from [¹⁴C]atrazine between the mineralized fraction, the extractable (water and methanol extracts cumulated) and bound residues at the end of the incubations in soils coming from the continuous wheat and maize plots

	¹⁴ C-CO ₂ (—————)	Extractable residues % of initial [¹⁴ C]atrazine	Bound residues (—————)
<i>Continuous Maize Plot</i>			
Control Soil	93.0 ± 0.6	2.3 ± 0.1	6.6 ± 0.1
Soil + pyrazine	88.0 ± 2.2	6.4 ± 0.5	9.1 ± 0.4
Soil + Albumin	22.9 ± 2.9 (a*)	44.1 ± 4.5 (a)	29.5 ± 0.1 (a)
Soil + Adenine	24.5 ± 1.6 (a)	48.2 ± 2.0 (a)	29.3 ± 0.4 (a)
Soil + Arginine	9.3 ± 0.4	54.9 ± 9.4 (a,b)	35.6 ± 0.6
Soil + (NH ₄) ₂ SO ₄	7.6 ± 0.5 (b)	61.0 ± 2.8 (b,d)	31.2 ± 0.1
Soil + Biuret	7.3 ± 0.7 (b,c)	72.1 ± 2.3 (c)	21.8 ± 0.2
Soil + Ca(NO ₃) ₂	6.1 ± 0.4 (c)	67.2 ± 1.9 (c,d)	26.4 ± 0.1
<i>Continuous Wheat Plot</i>			
Control Soil	44.2 ± 2.8	25.6 ± 3.5 (a)	29.2 ± 0.6 (a)
Soil + pyrazine	19.4 ± 1.7	34.9 ± 13.4 (a,b)	29.3 ± 0.1 (a)
Soil + Albumin	0.3 ± 0.04	56.7 ± 4.2 (b,c)	41.8 ± 0.1
Soil + Adenine	0.7 ± 0.2 (a**)	57.4 ± 4.9 (b,d)	37.7 ± 1.3 (b,c)
Soil + Arginine	0.1 ± 0.0 (b)	60.9 ± 0.7 (b,e)	40.4 ± 0.6 (b)
Soil + (NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 ± 0.0	62.8 ± 3.2 (c,d,e)	37.5 ± 0.5 (c)
Soil + Biuret	0.6 ± 0.1 (a)	67.7 ± 2.3 (d)	31.0 ± 0.1 (d)
Soil + Ca(NO ₃) ₂	0.1 ± 0.0 (b)	67.7 ± 3.2 (d)	32.6 ± 1.0 (d)

* and ** For each soil, means followed by the same letter within the same column do not differ significantly (P=0.05) according to Student test.

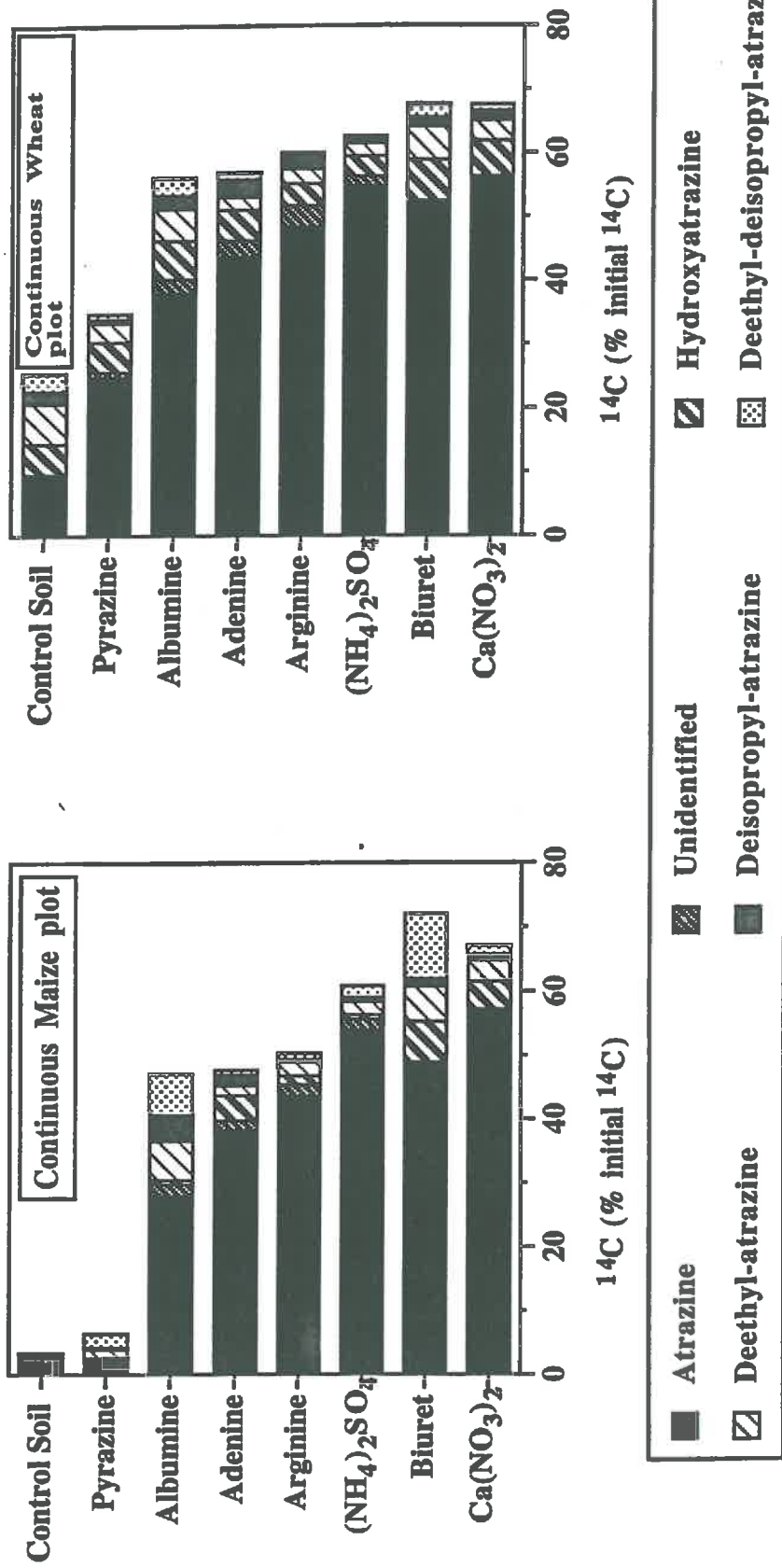
In both soils, addition of all the N compounds decreased atrazine mineralization. Simultaneously, more radioactivity remained at the end of the incubations, mainly under extractable forms (Table 6.3). In both soils, the mineralized radioactivity was negatively correlated with the extractable radioactivity ($r = 0.978^{**}$ and 0.933^{**} in the soil from the continuous maize and wheat plots respectively, both significant at $P = 0.01$).

In the adapted soil, the extractable radioactivity varied from 2.3% in the soil alone to 72.1% when biuret was added. The largest residual extractable radioactivities were measured in the incubations with the mineral forms of N and the biuret, which had the largest depressive effect on atrazine mineralization. With all the N compounds, HYA was present in the extractable radioactivity (Fig. 6.4). This could confirm that HYA was an intermediary in atrazine degradation in the adapted soil. The addition of N decreased triazine ring degradation, allowing the accumulation of previously undetected metabolites. However, the addition of the different N compounds inhibited atrazine mineralization but also its partial degradation. Atrazine was always the main component analyzed in the extracted fractions and its proportion in the extracted fraction increased with the radioactivity extracted. An unidentified metabolite of atrazine was detected with albumin, adenine, arginine and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fig. 6.4). It was chromatographed after 16 min between hydroxyatrazine (13 min) and atrazine (21 min).

In the non adapted soil, the addition of N compounds increased the extractable fraction from 34.9% with pyrazine to 67.7% with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and biuret. Again, the largest extracted fractions were measured with the mineral N forms and biuret. As in the adapted soil, the extracted radioactivity was mainly atrazine whose proportion in the extracts increased in relation to the radioactivity extracted. The proportions of HYA were larger than in the adapted soil. The same unidentified metabolite was detected in larger proportions in the same treatments than previously.

In both soils, the bound residues proportion increased when atrazine mineralization decreased (Table 6.3). In the non adapted soil from the continuous wheat plot, the proportion of bound residues was positively correlated with the total microbial activity as estimated with the total C-CO₂ evolved during the incubation ($r=0.891$, significant with $P=0.01$). In the adapted soil, the same tendency was observed but was not significant. The largest fractions of bound residues were observed with the most easily mineralized organic forms of nitrogen (albumin, arginine, adenine) and with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ which stimulated C mineralization as compared to the control soils. This confirmed the microbial contribution to

Figure 6.4 : Characterization of the extractable residues at the end of the incubations with soil from the continuous maize or wheat plots, supplemented with different N sources. Results are expressed as percent of the initial radioactivity. Results of methanol and water extraction were cumulated.



pesticide bound residue formation in soils (Benoit and Barriuso, 1997; Abdelhafid *et al.*, 1998).

In summary, atrazine behaviour during incubation in soils was greatly influenced by N availability both in adapted and non adapted soils. Nitrogen availability of the different N compounds was estimated by the evolution of mineral N during the incubations and was similar in the two soils. It increased in the order: pyrazine < biuret < adenine \leq albumin = arginine. The rate of atrazine mineralization was negatively correlated with the mineral N content of the soils at the end of the incubations and decreased with N availability in the different N compounds. Large concentrations of mineral N inhibited atrazine mineralization. The addition of biuret decreased atrazine mineralization similarly despite its low mineralization during the incubations. In both cases, this was probably related to the inhibition of the enzymes responsible for atrazine degradation. The increase in mineral N availability also inhibited partial degradation of atrazine. Both extractable radioactivity and the proportion of atrazine in the extracts at the end of the incubations increased when atrazine mineralization rate decreased. Stabilization of radioactivity as bound residues was higher in the non adapted soil because of its larger C content. However, in both soils, the increase in stabilization via bound residue formation after adding the different N compounds was related to the total soil microbial activity.

Acknowledgements - This work was financially supported by the INRA program "AIP-Etude et Gestion de l'Ecosystème Sol". The authors thank J.N. Rampon and V. Bergheaud for their technical assistance, and Dr Edward Topp for reading the English text.

Chapitre 7 : Variation de la dégradation de l'atrazine avec la concentration en carbone et en azote dans le milieu

HOW INCREASING AVAILABILITY OF C AND N AFFECTS ATRAZINE BEHAVIOUR IN SOILS

ABDELHAFID RAHIMA, HOUOT SABINE and BARRIUSO ENRIQUE
LN.R.A., Unité de Science du Sol, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France.

Soumis à "Biology and Fertility of Soils"
(Mai 1998)

How increasing availabilities of C and N affect atrazine behaviour in soils

Abstract The effect of increasing amount of glucose and mineral N on atrazine behaviour was studied in a soil which had (adapted) or had not (non adapted) been exposed to atrazine in field conditions, resulting in an accelerated degradation of atrazine in the adapted soil and in a slow degradation of the herbicide in the non adapted soil. The dissipation of ^{14}C -atrazine via degradation and formation of non extractable "bound" residues was followed during laboratory incubations in soils supplemented or not with increasing amounts of glucose and mineral N. In both soils, glucose addition up to 16 g C kg^{-1} of soil did not modify atrazine mineralization but increased the formation of bound residues, probably in relation with atrazine retention onto the growing microbial biomass. Atrazine dealkylation was enhanced when large amount of glucose was added. In both soils, the addition of the largest dose of mineral N (2.5 g N kg^{-1} of soil) decreased atrazine mineralization. Simultaneous addition of glucose and mineral N enhanced their effects. When the largest doses of mineral N and glucose were added, atrazine mineralization stopped in both soils and the proportion of bound residues increased. Glucose and mineral N addition more influenced atrazine mineralization in the adapted soil than in the non adapted one as revealed by an analysis of variance, with a predominant effect of the level of glucose added. The competition for space and nutrients between atrazine degrading microorganisms and total heterotrophic microflora probably contributed to the decrease in atrazine mineralization.

Key Words Atrazine . Soil . Mineralization . Glucose . Mineral N .

Introduction

Atrazine [6-chloro- N^2 -ethyl- N^4 -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine] is a herbicide still widely used to control numerous broad-leaved weeds and has been frequently detected in ground and surface waters. Microbial degradation is the principal process of atrazine dissipation in soils (Esser et al. 1975). A large variety of soil micro-organisms are known to degrade atrazine partially by N-dealkylation or dehalogenation reactions (Kaufman and Kearney 1970; Behki and Khan 1986; Mougín et al. 1994). Complete and rapid mineralization of the triazine ring has been also reported (Mandelbaum et al. 1993a; Assaf and Turco 1994; Yanze-Kontchou and Gschwind 1994; Mandelbaum et al. 1995; Radosevich et al. 1995), and the possible adaptation of the soil microflora to atrazine

degradation has been demonstrated after repeated applications in field conditions (Barriuso and Houot 1996; Vanderheyden et al. 1997). Microbial growth has been measured with atrazine as sole C source (Behki and Khan 1986; Yanze-Kontchou and Gschwind 1994; Stucki et al. 1995). However, the rapid triazine ring mineralization seems to imply the development of micro-organisms using triazine nitrogen as N source (Cook and Hütter 1981; Mandelbaum et al. 1995; Radosevich et al. 1995).

In a previous work (Abdelhafid et al. 1998), the effect of C and N availability on atrazine behaviour was studied in two soils: in one soil, hereafter referred to as "adapted", accelerated mineralization of atrazine was observed and related to repeated field applications of atrazine; the other soil, referred to as "non adapted", had the same physico-chemical characteristics but never received atrazine in field conditions and atrazine mineralization remained slow in this soil (Barriuso and Houot 1996). The mineralization of ^{14}C -atrazine was followed during laboratory incubations in soils alone or amended with different organic amendments (OAs). The OAs were chosen from their C availability, ranging from very easily biodegradable (glucose) to more slowly mineralizable (cellulose and straw) and humified organic matter (compost). The results differed in the two soils. In the non adapted soil, OA addition stimulated atrazine mineralization which always remained much lower than in the adapted soil. However, significant partial degradation via dealkylation was observed which increased when mineral N was added with the OAs. In the adapted soil, the OAs had few effects on atrazine behaviour.

The effect of N addition varies with the form and amount of added N. Organic form of N as dairy manure stimulated atrazine mineralization (Topp et al. 1996). In this case, the larger availability in nutrients allowed a larger number of atrazine degraders in the soil amended with the dairy manure. On the other hand, large concentration of mineral N greatly decreased atrazine mineralization in soil when added alone or with organic amendments (Entry et al. 1993; Alvey and Crowley 1995; Abdelhafid et al. 1998). The inhibition of enzymatic systems responsible for triazine ring degradation has been proposed to explain the effect of mineral N on atrazine mineralization (Entry et al. 1993) since mineral N is known to inhibit enzymes like peroxydases or other lignin-degrading enzyme systems (Li et al. 1994; Kaal et al. 1995) which could participate to the degradation of various herbicides including atrazine (Mougin et al. 1994).

The purpose of the present work was to test the effect of increasing addition of easily available C and N on atrazine behaviour in the same two soils (adapted and non adapted)

Table 7.1 : Main soil physico-chemical characteristics. Results are expressed on a dry weight basis

	Clay	Silt	Sand	Organic C	Total N	CaCO ₃	pH (water)
	(————— g kg ⁻¹ —————)						
Continuous maize plot	253	623	91	11.5	1.2	33	8.2
Continuous wheat plot	241	445	171	17.4	1.7	61	8.0

used in the study previously mentioned (Abdelhafid et al. 1998). The dissipation of ^{14}C -atrazine via degradation and formation of non extractable "bound" residues was followed during laboratory incubations in soils alone or added of increasing amounts of glucose and NH_4NO_3 .

Materials and methods

Soils

The two experimental plots described in the previous study (Abdelhafid et al. 1998) were sampled in February 1997 in the upper 20 cm. Both plots are located at Grignon (Yvelines, France) under the same Typic Eutrochrept soil (Table 7.1). One plot has been cultivated with continuous maize since 1962 and has been treated yearly with atrazine used at recommended agronomic doses. Accelerated mineralization of atrazine has been observed in this soil which will be hereafter referred to as "adapted". The other plot has been under continuous wheat since 1965, and never received atrazine in field conditions. Atrazine mineralization remained slow in this soil which will be referred to as "non adapted". Fresh soils were immediately passed through a 5 mm sieve after sampling.

Chemicals

Analytical standards of atrazine and its metabolites (hydroxyatrazine, HYA; deethylatrazine, DEA; deisopropylatrazine, DIA; deethyl-deisopropylatrazine, DEIA) were purchased from ChemService (West Chester, PA, USA). The [*U*-ring- ^{14}C]atrazine (specific activity 659 MBq mmol $^{-1}$; radiopurity greater than 97%) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK).

Incubation experiment

Laboratory incubations of ^{14}C -atrazine with fresh soil samples equivalent to 10 g of dry soil were conducted in triplicate, in hermetically stoppered jars at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, during 50 days with or without addition of glucose and mineral N. Twelve solutions of glucose and NH_4NO_3 were prepared in water with four levels of glucose concentration (G_0 : 0 g C l $^{-1}$, G_1 : 2.6 g C l $^{-1}$, G_2 : 26.6 g C l $^{-1}$ and G_3 : 266.6 g C l $^{-1}$) and three levels of NH_4NO_3 concentration (N_0 : 0 g N l $^{-1}$, N_1 : 4.2 g N l $^{-1}$ and N_2 : 42 g N l $^{-1}$). For each treatment, 0.6 ml of solution was added to the soil. The final concentrations of added C were 0, 0.16, 1.6 and 16 g kg $^{-1}$ of soil for G_0 , G_1 , G_2 and G_3 , respectively. These of added N were 0, 250 and 2500 mg kg $^{-1}$ of soil for N_0 , N_1 and N_2 , respectively. Then 0.5 ml of a solution

of ^{14}C -atrazine prepared in water at 10 mg l^{-1} and 19.4 MBq l^{-1} was added in each jar to reach a concentration of 0.5 mg kg^{-1} of soil, corresponding to the field dose. The evolved ^{14}C - CO_2 was trapped in 2 ml of 1 M NaOH placed into the incubation jars. The traps were periodically sampled and replaced during the incubations. Total ^{14}C - CO_2 was determined by scintillation counting (Kontron Betamatic V; Kontron Ins., Montigny le Bretonneux, France) using Picofluor scintillation cocktail (Packard, Meriden, CT, USA).

Similar incubations were realized in triplicate without ^{14}C -atrazine but with addition of glucose and NH_4NO_3 . Total C- CO_2 was trapped in 5 ml of 1M NaOH, periodically sampled and replaced during the incubations. Total C- CO_2 was analyzed by colorimetry on a continuous flow analyzer (Skalar, Breda, Netherlands). After 7, 14 and 50 days of incubation, the microbial biomass was measured using the fumigation-extraction method (Vance et al. 1987; Wu et al. 1990) and mineral N was extracted with 50 ml of 0.025 M K_2SO_4 and analyzed by colorimetry on the continuous flow analyzer.

Analysis of the ^{14}C -atrazine residues

At the end of the incubations, all the samples treated with ^{14}C -atrazine were extracted for 16 h with 50 ml of 0.01M CaCl_2 in water using end-over-end shaking at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark. After centrifugation at 4000 g for 10 min, the supernatant was removed and the residues extracted again for 16 h with 50 ml of methanol using end-over-end shaking, three successive times. The extracted radioactivity was measured in the water and the methanol extracts by liquid scintillation counting. The non extractable radioactivity, corresponding to the "bound" residues was measured by scintillation counting of the ^{14}C - CO_2 evolved after combustion of the solid residues after methanol extraction (Sample Oxidizer 307, Packard, Meriden, CT, USA). The water extracts were concentrated by solid-liquid extraction with Lichrolut EN-(200 mg) cartridges (Merck, Darmstadt, Germany). The elution of the cartridges was realized with 20 ml of methanol then evaporated until dryness under vacuum with a Rotavapor RE 111 (Büchi, Flawil, Switzerland). The residue was then dissolved in 1 ml of the first solvent used for the HPLC analysis, 40/60 methanol/water (vol./vol.) buffered at pH 7.4 with 50 mM ammonium acetate. The three methanol extracts of the three replications were pooled then concentrated until dryness by evaporation under vacuum, the residue was then dissolved in 2 ml of the first HPLC solvent. Samples for HPLC analyses were filtered through a Cameo 13N syringe nylon filter of $0.45 \mu\text{m}$ (MSI, Westboro, MA, USA) and analyzed on a Novapak C18 column ($5 \mu\text{m}$, 250 mm x 4.6 mm - Waters, Milford, MA, USA) with

a Waters instrument (600E Multisolvant Delivery System, 717 Autosampler) equipped with a UV detector at 222 nm, coupled on-line with a radioactive flow detector (Packard-Radiomatic Flo-one A550). The mobile phase was methanol/water buffered with 50 mM ammonium acetate with pH adjusted to 7.4. The chromatography started with 40/60 methanol/water (vol./vol.) for 15 min, then 80/20 methanol/water for 10 min. The mobile phase flow was 1.0 ml min^{-1} , and the injected sample volume was $800 \mu\text{l}$.

Results and Discussion

Total heterotrophic microbial activity

The kinetics of total organic carbon mineralization and of total mineral N evolution, and the evolution of total microbial biomass during the incubations were used to evaluate the heterotrophic microbial activity. In the non amended soils (treatment G_0-N_0), 3% of total organic C and 1% of total organic N were mineralized during the incubations (Fig. 7.1 and 7.2). The initial microbial biomass represented 2% of the total organic C (250 and 440 mg C kg^{-1} in soil coming from the continuous maize and wheat plot, respectively) and remained relatively constant during the incubations (Fig. 7.3). The addition of only mineral N (treatments G_0-N_0 to N_2) slightly increased soil organic C mineralization (Fig. 7.2), but simultaneously decreased the total microbial biomass (Fig. 7.3).

Total organic C mineralization increased with the addition of glucose similarly in the two soils (Fig. 7.1). A lag phase was observed at the beginning of the incubations with the largest glucose concentration and without mineral N (G_3-N_0). At the end of the G_2 and G_3 incubations without mineral N (G_2-N_0 and G_3-N_0), 60 to 70% of the added C was mineralized. The lowest amount of added glucose (G_1-N_0) did not modify the level of microbial biomass in soils (Fig. 7.3). With G_2 (G_2-N_0), the microbial biomass increased to 420 and 560 mg C kg^{-1} , respectively in soil coming from the continuous maize and wheat plot. With G_3 (G_3-N_0), the microbial biomass increased during the first 14 days of incubation up to $1750 \text{ mg C kg}^{-1}$ in the soil coming from the wheat plot, then decreased but remained larger than at the beginning of the incubation. In the other soil, it increased only to 485 mg C kg^{-1} . Simultaneously, the mineral N decreased in both soils in relation with N immobilization process into the increasing microbial biomass (Fig. 7.2).

The addition of mineral N together with glucose few modified the kinetics of C mineralization as compared to the treatments with glucose only (Fig. 7.2). It slightly increased C mineralization and made disappeared the initial lag phase at the beginning of

Figure 7.1 : Effect of increasing mineral N addition (N_0 to N_2) on total C-CO₂ mineralization for each level of glucose addition (G_0 to G_3) during incubation in soil from the adapted (maize plot) or non adapted (wheat plot) soils. Results are expressed in g C-CO₂ kg⁻¹ soil. Standard deviation are indicated where larger than symbols.

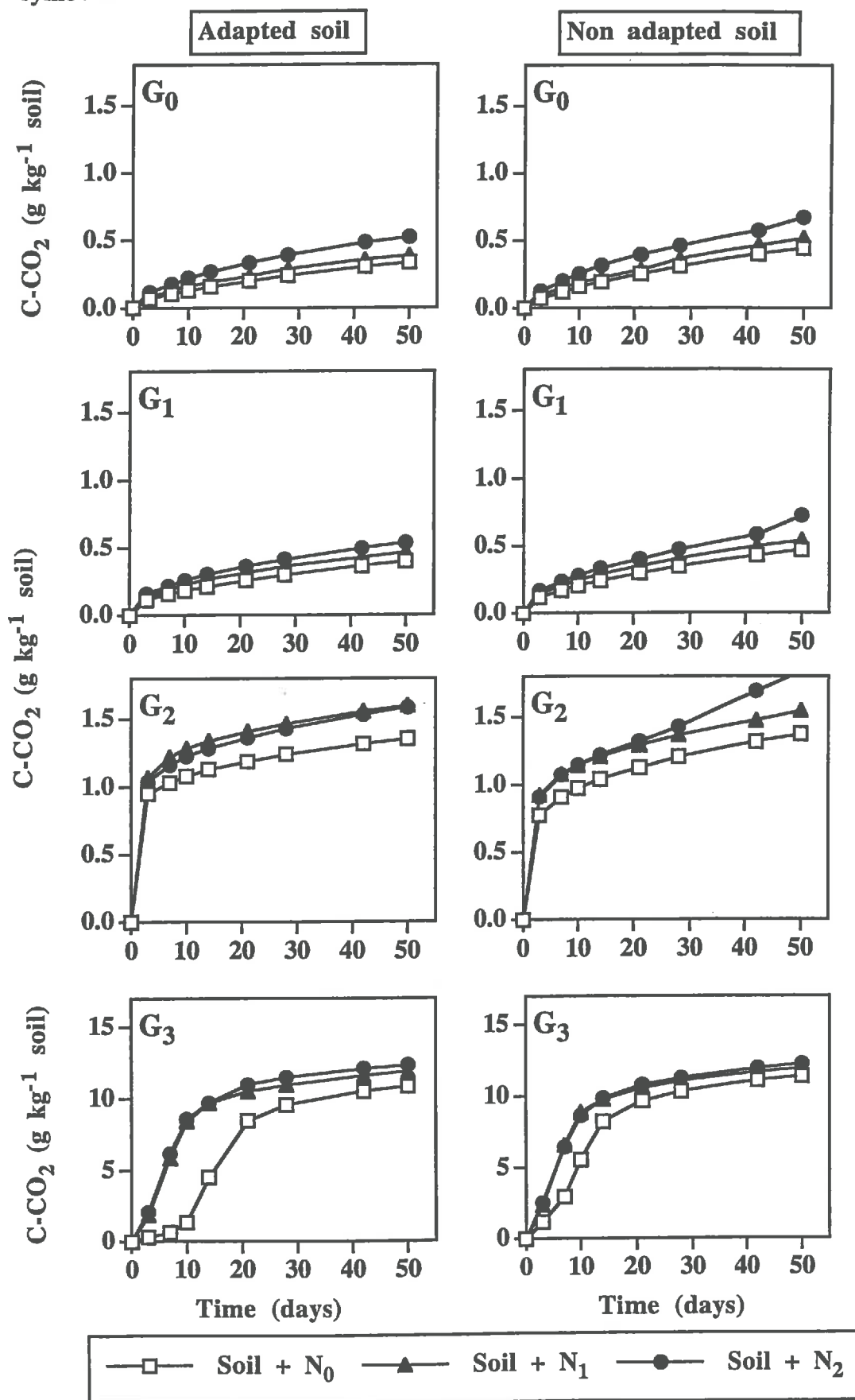


Figure 7.2 : Effect of increasing glucose addition (G_0 to G_3) on mineral N evolution for each level of mineral N addition (N_0 to N_2) during incubation in soil from the adapted (maize plot) or non adapted (wheat plot) soils. Results are expressed in mg N kg^{-1} soil. Standard deviation are indicated where larger than symbols.

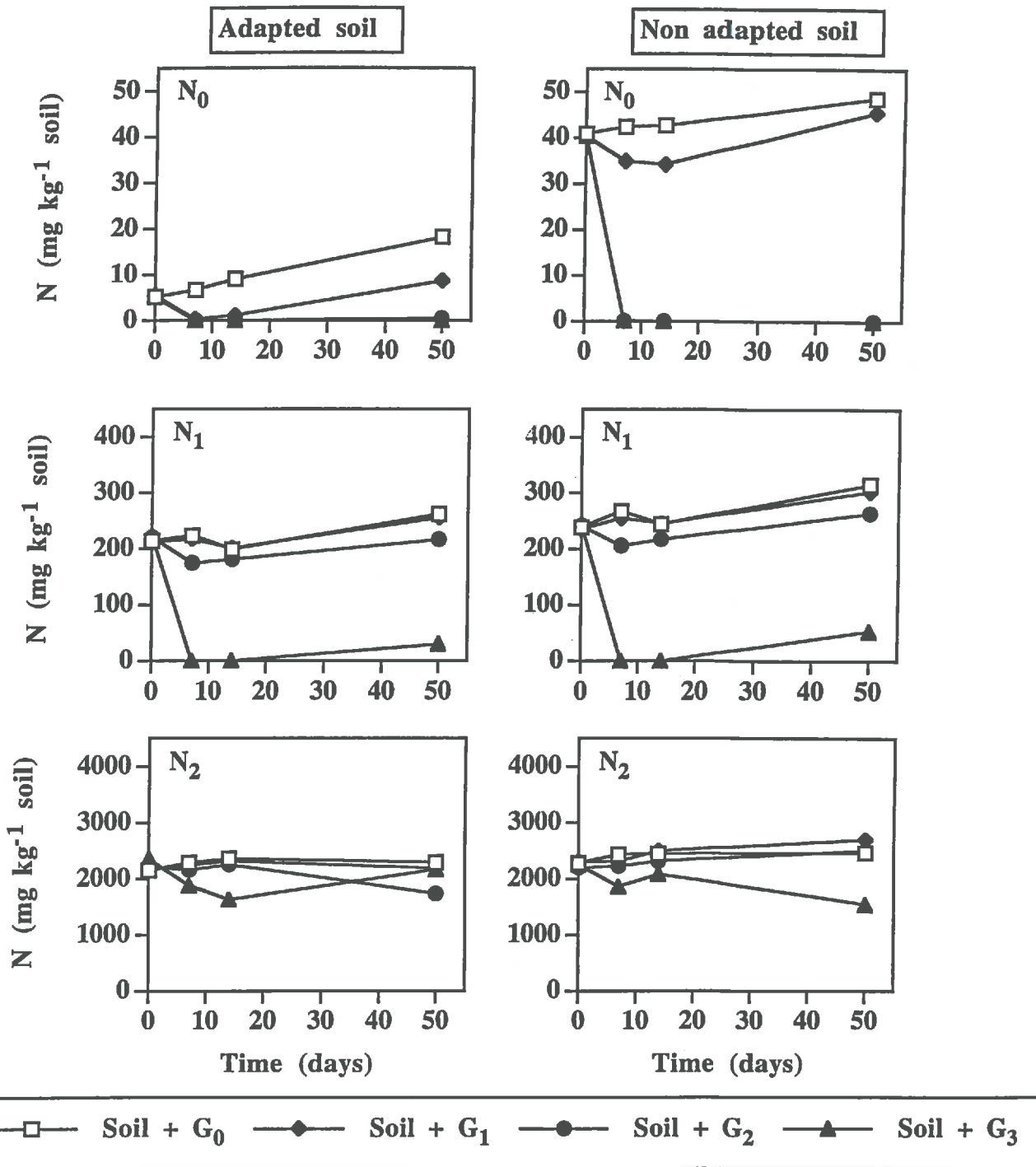
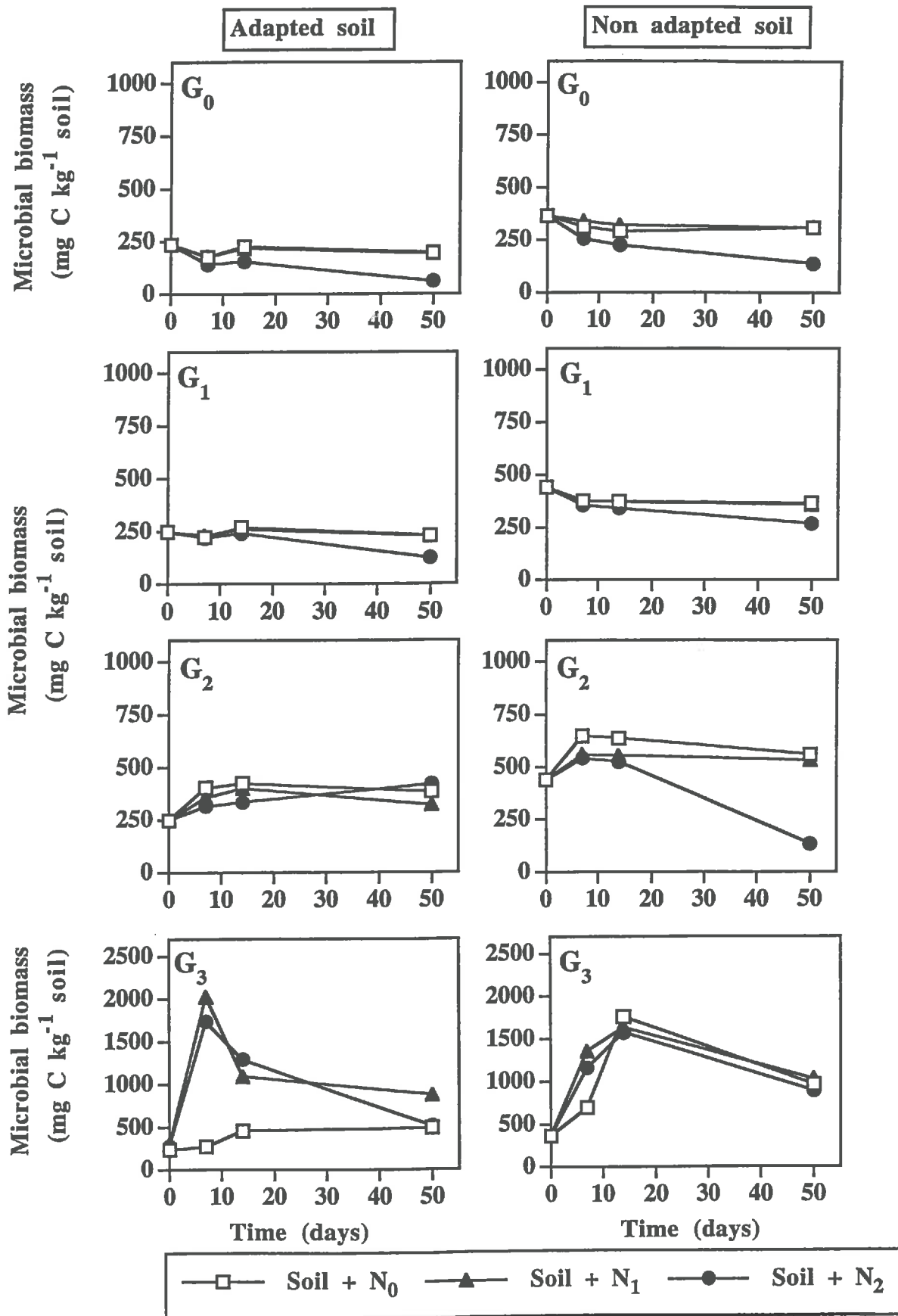


Figure 7.3 : Effect of increasing mineral N addition (N_0 to N_2) on total microbial biomass for each level of glucose addition (G_0 to G_3) during incubation in soil from the adapted (maize plot) or non adapted (wheat plot) soils. Results are expressed in mg C kg^{-1} soil. Standard deviation are indicated where larger than symbols.



the incubations with the largest amount of added glucose (G_3-N_1 and N_2). Similarly, it few modified the evolution of the microbial biomass (Fig. 7.3). The only exception was observed in the soil from the maize plot where the addition of mineral N increased the microbial biomass to $2000 \text{ mg C kg}^{-1}$ during the incubation with the largest concentration of glucose (G_3-N_2 and N_3).

Mineral N immobilization increased with the amount of glucose added (Fig. 7.2). When no mineral N was added to the soils, mineral N concentration in soil transitorily decreased with G_1 (treatment G_1-N_0) and disappeared during the incubation with G_2 and G_3 (treatments G_2-N_0 and G_3-N_0). When the lowest dose of mineral N was added simultaneously to the largest dose of glucose (G_3-N_1), mineral N disappeared but large concentrations remained throughout all the incubations with N_2 (G_0 to G_3-N_2) and only a transitorily decrease in mineral N concentration was observed with G_3 (G_3-N_2).

An analysis of variance confirmed that glucose addition more influenced total C mineralization and microbial biomass than mineral N addition. F values corresponding to glucose were always larger than these corresponding to mineral N (Table 7.2).

Atrazine behaviour in soils without amendments

Atrazine mineralization increased rapidly in the adapted soil coming from the continuous maize plot and reached 90% of the initially added ^{14}C -atrazine at the end of the incubation without amendments (treatment G_0-N_0). In the non adapted soil coming from the continuous wheat plot, atrazine mineralization remained slow and reached only 9% of the initial ^{14}C -atrazine at the end of the incubation (Fig. 7.4). These results confirmed the presence of microorganisms responsible for the rapid mineralization of the triazine ring in the adapted soil and their absence in the non adapted soil (Barriuso and Houot 1996; Abdelhafid et al. 1998).

In the adapted soil, 4.0% of the initially added ^{14}C -atrazine remained extractable at the end of the incubation without amendments and 6.6% formed bound residues (treatment G_0-N_0 in Table 7.3). Atrazine was the main detected component in the extracted fraction but represented only 2.5% of the initial radioactivity while 1.4% was dealkylated metabolites (Table 7.3).

In the non adapted soil, 62.5% of the initially added ^{14}C -atrazine remained extractable at the end of the incubation without amendments and 34.0% formed bound residues (treatment G_0-N_0 in Table 7.4). Atrazine remained the main detected component

Table 7.2 : Summary of analysis of variance for total mineralized C-CO₂, mineral N, microbial biomass and ¹⁴C-atrazine mineralization rate at the end of the incubation in the adapted and non adapted soil, and for the different amount of glucose and mineral N added.

	F value			
	CO ₂ (mg C kg ⁻¹)	Mineral N (mg N kg ⁻¹)	Microbial biomass (mg C kg ⁻¹)	¹⁴ C-CO ₂ (% of initial ¹⁴ C-atrazine)
<u>Adapted soil</u>				
Added N	16 ^{***}	1403 ^{***}	25 ^{***}	1169 ^{***}
Glucose	8341 ^{***}	95 ^{***}	227 ^{***}	2781 ^{***}
Added N * glucose	5 ^{**}	84 ^{***}	15 ^{***}	499 ^{***}
<u>Non adapted soil</u>				
Added N N	24 ^{***}	2330 ^{***}	8 ^{***}	259 ^{***}
Glucose	13512 ^{***}	149 ^{***}	51 ^{***}	54 ^{***}
Added N * glucose	2 ns	116.4 ^{***}	1 ns	22 ^{***}

** p < 0.05 ; *** p < 0.001 ; ns : not significant (p > 0,1)

Table 7.3 : Distribution of the initial radioactivity from ¹⁴C-atrazine into the mineralized, extractable (water plus methanol extracts) and bound residues fractions at the end of the incubations in the soil from the adapted soil, added of the different doses of glucose and mineral N. Characterization of the extracted radioactivity; results of water and methanol extractions were cumulated and expressed in percent of initial ¹⁴C-atrazine. Atrazine and four metabolites were detected: hydroxyatrazine (HYA), deethylatrazine (DEA), deisopropylatrazine (DIA) and deethyldeisopropylatrazine (DEIA).

	Mineralized CO ₂	Bound residues	Extractable residues	Extracted ¹⁴ C-compounds					
				Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA	(% of initial ¹⁴ C-atrazine)
<i>Without glucose (G₀)</i>									
Soil + N ₀	90.2 ± 1.0 a*	6.6 ± 0.1	4.0 ± 0.8 ab	2.5	0.1	0.5	0.2	0.7	
Soil + N ₁	88.6 ± 1.2 ab	7.9 ± 0.1 a	3.8 ± 0.4 a	2.2	0.0	0.9	0.2	0.7	
Soil + N ₂	72.5 ± 1.3 c	12.4 ± 0.0	16.4 ± 1.6 c	3.2	6.0	2.2	0.8	3.7	
<i>With G₁</i>									
Soil + N ₀	89.6 ± 0.7 a	6.8 ± 0.0	4.1 ± 0.6 ad	2.1	0.0	0.9	0.3	0.8	
Soil + N ₁	89.1 ± 0.9 a	7.9 ± 0.0 a	3.7 ± 0.2 a	2.0	0.1	0.6	0.2	0.7	
Soil + N ₂	75.9 ± 0.1 d	11.6 ± 0.1	13.6 ± 1.0 c	2.8	4.9	1.9	0.7	3.0	
<i>With G₂</i>									
Soil + N ₀	88.4 ± 1.3 ae	7.7 ± 0.1 a	3.9 ± 0.2 a	2.1	0.1	0.8	0.2	0.7	
Soil + N ₁	85.6 ± 1.2 be	9.8 ± 0.0	5.2 ± 0.5 bde	2.7	0.1	1.1	0.4	0.9	
Soil + N ₂	72.2 ± 2.0 cd	13.5 ± 0.0	15.8 ± 1.7 c	3.4	4.6	2.9	1.0	3.6	
<i>With G₃</i>									
Soil + N ₀	79.4 ± 2.3 d	9.4 ± 0.1	7.3 ± 1.0 e	3.1	0.3	1.7	0.5	0.9	
Soil + N ₁	3.4 ± 0.1	35.1 ± 0.3	64.9 ± 3.0 f	30.8	3.6	18.5	4.9	7.1	
Soil + N ₂	2.6 ± 0.3	32.9 ± 0.1	69.6 ± 1.1 f	21.9	3.5	30.7	5.1	7.9	

* Means within a column followed by the same letter do not differ significantly (P = 0.05) according to Student test.

Table 7.4 : Distribution of the initial radioactivity from ¹⁴C-atrazine into the mineralized, extractable (water plus methanol extracts) and bound residues fractions at the end of the incubations in the soil from the non adapted soil, added of the different doses of glucose and mineral N. Characterization of the extracted radioactivity; results of water and methanol extractions were cumulated and expressed in percent of initial ¹⁴C-atrazine. Atrazine and four metabolites were detected: hydroxyatrazine (HYA), deethylatrazine (DEA), deisopropylatrazine (DIA) and deethyldeisopropylatrazine (DEIA).

	Mineralized CO ₂	Bound residues	Extractable residues	Extracted ¹⁴ C-compounds				
				Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
(% of initial ¹⁴ C-atrazine)								
<i>Without glucose (G₀)</i>								
Soil + N ₀	8.9 ± 0.3 a*	62.5 ± 5.8 ab	34.0 ± 0.5 abd	41.5	5.8	9.7	2.6	2.7
Soil + N ₁	11.3 ± 0.4 bc	62.0 ± 4.1 bc	33.1 ± 1.0 acd	44.1	7.8	5.8	2.0	1.9
Soil + N ₂	1.6 ± 0.3 de	72.0 ± 6.4 b	34.9 ± 0.3 bcdf	58.4	7.1	1.9	1.0	1.4
<i>With G₁</i>								
Soil + N ₀	9.9 ± 0.8 ac	63.2 ± 4.9 bd	33.7 ± 0.4 a	42.1	5.4	10.1	2.6	2.8
Soil + N ₁	10.8 ± 0.6 bc	62.4 ± 4.1 bd	33.3 ± 0.3 a	45.1	7.1	6.1	2.0	1.9
Soil + N ₂	2.1 ± 0.2 d	71.5 ± 14.2 abd	35.4 ± 0.5 be	58.0	7.2	3.0	0.9	1.2
<i>With G₂</i>								
Soil + N ₀	7.2 ± 0.3	66.0 ± 4.7 bd	35.0 ± 0.4 dce	41.8	5.4	11.7	3.8	3.0
Soil + N ₁	3.4 ± 0.1	68.1 ± 4.2 b	36.0 ± 0.7 efg	45.6	8.9	8.2	2.3	2.7
Soil + N ₂	1.1 ± 0.1 e	71.2 ± 5.2 b	36.6 ± 0.1 g	49.8	6.5	6.7	5.1	2.1
<i>With G₃</i>								
Soil + N ₀	8.5 ± 0.1 a	50.6 ± 3.2 a	42.6 ± 0.3 h	14.4	0.4	16.9	10.0	7.8
Soil + N ₁	2.9 ± 0.2	57.6 ± 3.2 acd	42.8 ± 0.1 h	28.7	2.5	14.2	0.8	3.9
Soil + N ₂	0.1 ± 0.0	65.2 ± 3.1 bd	40.7 ± 0.3	24.7	4.4	22.2	8.4	4.8

* Means within a column followed by the same letter do not differ significantly (P = 0.05) according to Student test.

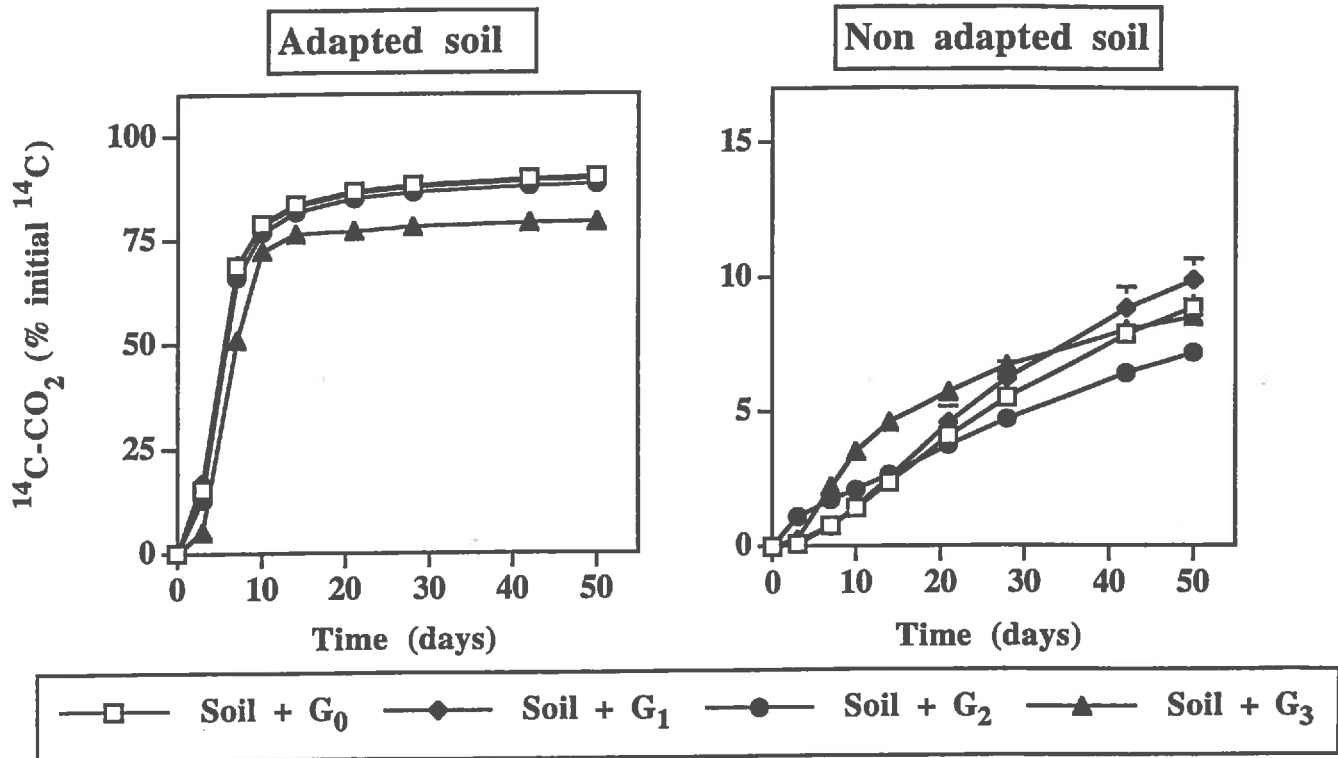
in the extracted fraction and represented 41.5% of the initial radioactivity. The extracted radioactivity also included 20.8% of metabolites (Table 7.4). The dealkylated metabolites were again the most abundant but more radioactivity was present as hydroxyatrazine (5.8% of the initial radioactivity, Table 7.4) than in the adapted soil where it represented 0.1% of the initial radioactivity (Table 7.3).

Dealkylation of the amino-groups used to be presented as the major mechanism involved in atrazine microbial degradation and has been associated with low rates of triazine ring degradation (Kaufman and Kearney 1970). More recently, dehalogenation has been shown to possibly be the first step of atrazine rapid mineralization (Mandelbaum et al. 1993b; Assaf and Turco 1994; Mandelbaum et al. 1995; Radosevich et al. 1995). However, dealkylation could also be the first step of a rapid atrazine degradation and both dealkylation and dehalogenation can occur simultaneously (Yanze-Kontchou and Gschwind 1994; Shao et al. 1995; Stucki et al. 1995). Low concentrations of metabolites were detected in the extractable radioactivity at the end of the incubation of ^{14}C -atrazine in the adapted soil, either because a consortium of microorganisms was efficient enough to entirely mineralize atrazine in this soil or because the whole degradation occurred intracellularly in atrazine-metabolizing bacteria (De Souza et al. 1998). Both hydroxyatrazine and dealkylated metabolites were detected in the extracts after incubation in the adapted soil and both degradation pathways, via hydroxylation or via dealkylation, could occur simultaneously in this soil. However, microorganisms responsible for triazine ring mineralization were present only in the adapted soil, but not in the non adapted one, which could explain the relative accumulation of hydroxyatrazine in this soil. On the other hand, the bound residues reached 34.0% of the initial radioactivity in the non adapted soil and constituted an alternative pathway of atrazine dissipation in this soil (Barriuso and Houot 1996).

Effect of increasing C availability on atrazine behaviour in soils

In the adapted soil, the addition of only glucose few modified atrazine mineralization which was only decreased significantly when the largest concentration of glucose was added (treatment G_3-N_0 in Fig. 7.4). Simultaneously, both the extractable fraction and the bound residues increased significantly (Table 7.3). On the other hand, increasing the amount of added glucose few modified the metabolite concentrations in the extracts. The amount of untransformed atrazine extracted remained rather constant with the different amounts of glucose added (G_0 to G_3-N_0) and represented 2.1 to 3.1% of the initial radioactivity at the end of the incubations (Table 7.3).

Figure 7.4 : Effect of increasing glucose addition (G_0 to G_3) on mineralization of ^{14}C -atrazine during incubation in soil from the adapted (maize plot) or non adapted (wheat plot) soils. Results are expressed as per cent of the initial radioactivity. Standard deviation are indicated where larger than symbols.

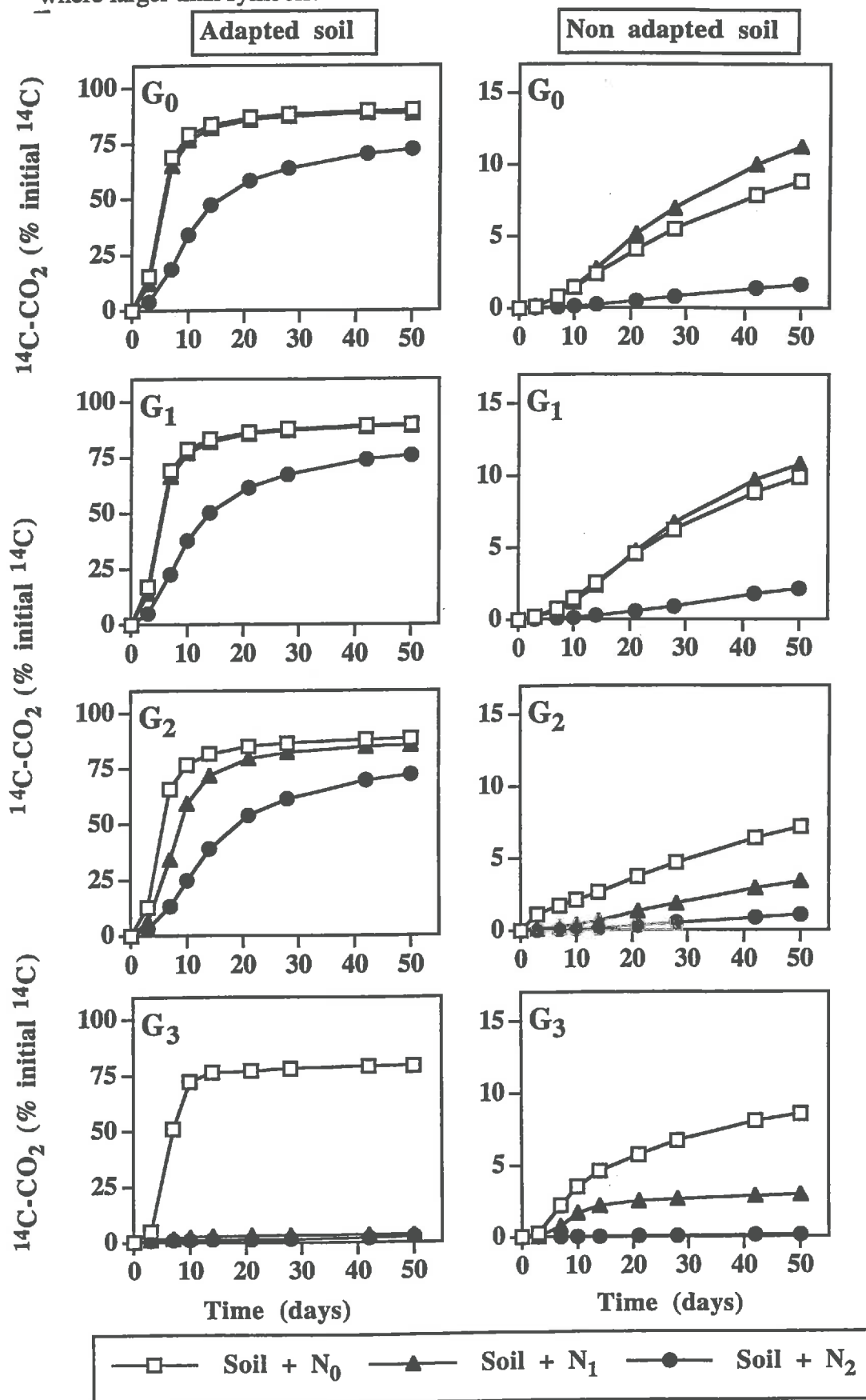


In the non adapted soil, although the addition of increasing amount of glucose did not influence atrazine mineralization (Fig. 7.4), the distribution of the residual radioactivity was modified (Table 7.4). Significant larger proportion of bound residues was formed when the largest amount of glucose was added (G_3-N_0). Simultaneously the extracted radioactivity decreased significantly. At the end of the incubation, 42.6% of the initially added radioactivity formed bound residues and 50.6% remained extractable (Table 7.4). The increase of bound residue proportion could originate from the atrazine retention onto the growing microbial biomass after glucose addition. Retention is the first step of bound residue formation and cell walls and membranes of microorganisms are reactive and constitute an available surface for pesticide retention (Benoit and Barriuso 1997). The addition of increasing amount of glucose also modified the distribution of the metabolites in the extracts. The proportion of extracted atrazine decreased from 41.5% of the initially added radioactivity at the end of the incubation of soil alone (G_0-N_0) to 14.4% when the largest concentration of glucose was added (treatment G_3-N_0 in Table 7.4). Simultaneously, HYA proportion decreased from 5.8 to 0.4%, but the proportion of dealkylated metabolites increased : DEA from 9.7 to 16.9%, DIA from 2.6 to 10.0% and DEIA from 2.7 to 7.8%. Entry and Emmingham (1995) and Topp et al. (1996) found that the addition of organic amendment could stimulate microbial atrazine degradation. The addition of easily degradable organic substrate stimulated the total soil microflora (Fig. 7.3) including the microorganisms degrading atrazine. However, atrazine degradation stopped after dealkylation.

Effect of increasing N availability on atrazine behaviour in soils

In both soils, the addition of mineral N modified atrazine mineralization more than glucose addition (Fig. 7.5). The smallest amount of mineral N added (treatment G_0-N_1) did not modify atrazine mineralization neither the distribution of the residual radioactivity between extractable and bound residues (Tables 7.3 and 7.4). But when the largest amount of mineral N was added (G_0-N_2), atrazine mineralization decreased significantly from 90.2 to 72.5% and from 8.9 to 1.6% of the initial ^{14}C -atrazine in the adapted and non adapted soil, respectively (Fig. 7.5). Simultaneously, the proportion of extractable radioactivity increased more than this of bound residues in both soils although significantly only in the adapted soil (Tables 7.3 and 7.4). At the end of the incubation without glucose but with the largest dose of mineral N (treatment G_0-N_2), 16.4 and 72.0% of the initially added radioactivity remained extractable in the adapted and non adapted soil, respectively and 12.4 and 34.9% formed bound residues, respectively.

Figure 7.5 : Effect of increasing mineral N addition (N_0 to N_2) on mineralization of ^{14}C -atrazine for each level of glucose addition (G_0 to G_3) during incubation in soil from the adapted (maize plot) or non adapted (wheat plot) soils. Results are expressed as per cent of the initial radioactivity. Standard deviation are indicated where larger than symbols.



The addition of mineral N tended to increase atrazine concentration in the extracted radioactivity at the end of the incubation in the non adapted soil; simultaneously the proportion of extracted DEA decreased from 9.7 to 1.9% of the initially added radioactivity (Table 7.4). The characterization of the extracted radioactivity was more modified by mineral N addition than by glucose addition in the adapted soil. The extracted atrazine increased from 2.5 to 3.2% of the initially added radioactivity (Table 7.3). Simultaneously the proportion of HYA increased from 0.1 to 6.0%.

Previous works have shown that large concentration of mineral N greatly decreased atrazine mineralization in soil when added alone or with organic amendments (Entry et al. 1993; Alvey and Crowley 1995). The use of mineral N as N source rather than atrazine N could contribute to the inhibition of atrazine mineralization after mineral N addition (Alvey and Crowley 1995). The inhibition of enzymatic systems responsible for triazine ring degradation has been proposed also to explain the effect of mineral N on atrazine mineralization (Entry et al. 1993) which could explain the accumulation of metabolites at the end of the incubation in the adapted soil. On the other hand, the accumulation of HYA at the end of the incubation could mean that atrazine degradation occurred via hydroxylation in this soil and that further degradation was inhibited by large concentration of mineral N.

Synergistic effect of C and N addition on atrazine behaviour in soils

The simultaneous addition of glucose and mineral N affected more the kinetics of ^{14}C -atrazine mineralization than separately added glucose or mineral N (Fig. 7.5). Similar results were obtained with G_0 and G_1 , in both soils. The addition of the smallest dose of glucose (treatments G_1-N_0 to N_2) did not modify atrazine behaviour significantly as compared to the correspondent treatments without glucose (treatments G_0-N_0 to N_2 , Fig. 7.5 and Tables 7.3 and 7.4). With G_2 , a decrease in ^{14}C -atrazine rate of mineralization was observed during the first days of incubation with the two concentrations of added mineral N (N_1 and N_2) in the adapted soil. In the non adapted soil, with the same dose of glucose G_2 , the decrease in atrazine mineralization was more pronounced when the intermediate amount of mineral N (treatment G_2-N_1) was added, as compared to the equivalent treatments with G_0 and G_1 (G_0-N_1 and G_1-N_1). However, in both soils for each level of mineral N added, the proportions of extractable radioactivity and of bound residues at the end of the G_2 incubations were not significantly modified as compared to the two smallest doses of glucose G_0 and G_1 (Tables 7.3 and 7.4). The composition of

the extractable fraction was also few modified. The only effect of G_2 on the extract composition was observed at the end of the incubations with the largest amount of mineral N added in the non adapted soil where atrazine concentration decreased but dealkylated metabolites increased (treatment G_2-N_2 compared to G_0-N_2 and G_1-N_2 in Table 7.4).

In the adapted soil with the largest dose of glucose added G_3 , atrazine mineralization decreased to 3% of the initially added amount when mineral N was present (Fig. 7.5). Simultaneously, both the extractable fraction and the bound residues increased (Table 7.3). Atrazine concentration increased to 30.8% of the initial radioactivity with the smallest amount of mineral N added (treatment G_3-N_1) but decreased to 21.9% of the initial radioactivity in the treatment G_3-N_2 (Table 7.3). Simultaneously, the proportion of HYA, DEA, DIA and DEIA increased with the amount of mineral N added, the largest increased being observed for DEA: 1.7% of the initial ^{14}C added in the treatment G_3-N_0 to 30.7% in the treatment G_3-N_2 (Table 7.3). Dealkylation increased with the total heterotrophic microbial activity stimulated by glucose and mineral N addition (Fig. 7.1 and 7.3). On the contrary, triazine ring mineralization related to a specific microflora was inhibited when large concentrations of glucose and mineral N were added.

In the non adapted soil, the addition of the largest amount of glucose (G_3) did not significantly modify atrazine mineralization as compared to the incubations with G_2 (Table 7.4 and Fig. 7.5). However, the extractable fraction decreased while the bound residue proportion increased (Table 7.4), possibly in relation with the increased microbial biomass as discussed previously. The proportion of extracted atrazine, HYA and DEA increased when mineral N was added together with G_3 (treatments G_3-N_1 and N_2) while DEIA proportion decreased (Table 7.4).

The analysis of variance revealed a significant effect of both glucose and mineral N concentration on the percentage of atrazine mineralization at the end of the incubations (Table 7.2). In the adapted soil, the effect of glucose concentration was more important than this of mineral N concentration ($F=2781$ and 1169 for glucose and mineral N, respectively, both with $p<0.001$). In this soil, the interaction of glucose and mineral N had also a significant effect on atrazine mineralization ($F=499$, $p<0.001$). In the non adapted soil, the effect of mineral N was larger than this of glucose ($F=259$ and 55 , for mineral N and glucose, respectively, both with $p<0.001$). All the factors less influenced atrazine mineralization in the non adapted soil than in the adapted one.

In the adapted soil, atrazine mineralization decreased with the amount of mineral N added. Similar negative effects of mineral N on atrazine mineralization in soil have been observed when large amounts of mineral N were added alone or with organic amendments (Entry et al. 1993; Alvey and Crowley 1995). However, the negative effect of mineral N addition could not be attributed only to the presence of large concentration of mineral N. As a matter of fact, atrazine mineralization was inhibited during the G_3-N_1 incubation (Fig. 7.5) although no mineral N was present during the incubations (Fig. 7.2). Important increase in total microbial biomass occurred when the largest concentrations of glucose and mineral N were added simultaneously (Fig. 7.3). The competition for space and nutrients between atrazine degrading microorganisms and total heterotrophic microflora could partly contribute to the decrease in atrazine mineralization observed in these conditions (Alvey and Crowley 1995). Simultaneously, the increase in bound residue proportion confirmed the important role of a growing microbial biomass in atrazine retention and stabilisation (Benoit and Barriuso, 1997).

In summary, as previously observed, atrazine mineralization was directly related to the frequency of field treatments with a rapid triazine ring mineralization in soil yearly treated with atrazine in field conditions and a slow triazine ring mineralization in soil never treated with atrazine in field conditions. Such soils have been qualified of "adapted" and "non adapted" to atrazine mineralization, respectively. In both soils, atrazine behaviour was highly influenced by glucose and mineral N when large amounts were added. Glucose alone did not modify the kinetics of triazine ring mineralization in the adapted and the non adapted soils but increased atrazine degradation and mainly dealkylation in the non adapted soil. The addition of only mineral N decreased more atrazine mineralization than glucose. In the adapted soil, metabolite proportions increased which suggested that large mineral N concentration inhibited the enzymatic systems responsible for triazine ring mineralization. However, in the non adapted soil, large mineral N concentrations also inhibited atrazine hydroxylation and dealkylation. Assuming that mineral N is applied on soil surface during fertilization, the largest amount of added mineral N (2.5 g kg^{-1} of soil) corresponded to 500 kg N ha^{-1} . Although larger than usually applied, this amount of mineral N was comparable to N fertilization. Since atrazine and mineral N are usually brought together on maize, mineral N fertilization could actually inhibit atrazine degradation in field condition. The addition of large amounts of glucose and mineral N simultaneously increased the total microbial biomass and stopped atrazine mineralization in both soils probably because of the competition for space and nutrients between atrazine degrading microorganisms and total heterotrophic

microflora. The increased proportion of bound residues confirmed the important role of microbial activity in the stabilisation of pesticide residues in soils.

Acknowledgements This work was financially supported by the INRA program "AIP - Etude et Gestion de l'Ecosystème Sol". The authors thank J.N. Rampon and V. Bergheaud for their technical assistance.

Conclusion de la troisième partie

L'effet de la disponibilité en carbone croisée à celle en azote sur la dégradation de l'atrazine varie dans les deux sols étudiés selon l'activité des microorganismes responsables de la dégradation de cet herbicide. Dans le sol où la microflore est adaptée à la dégradation de l'atrazine à la suite d'applications répétées de cet herbicide au champ, les apports des différentes matières organiques en absence d'azote ont peu d'effet sur la minéralisation de l'atrazine. En revanche dans le sol non adapté qui n'a jamais reçu d'atrazine au champ, l'addition de matières organiques stimule la minéralisation de l'atrazine mais elle reste toujours plus faible que dans le sol adapté. Dans tous les cas, l'addition des différentes matières organiques stimule la déalkylation de l'atrazine.

Dans les deux sols, l'azote minéral diminue la minéralisation de l'atrazine. Cependant, la dégradation de l'atrazine est fortement influencée par la forme d'azote apporté. L'effet augmente avec la disponibilité de l'azote. Ainsi les formes organiques azotées facilement minéralisables inhibent la minéralisation de l'atrazine. Le biuret semble faire exception. Bien que peu minéralisable, il inhibe fortement la minéralisation de l'atrazine sans doute car c'est un des derniers intermédiaires de la dégradation de l'herbicide. L'effet de l'azote pourrait être dû à l'inhibition des enzymes intervenant dans la dégradation de l'atrazine. Contrairement aux apports carbonés qui stimulaient la dégradation partielle de l'atrazine, les apports azotés ralentissent également cette dernière.

L'addition de quantités importantes de glucose et d'azote minéral sont nécessaires pour inhiber la minéralisation de l'atrazine dans les deux sols. Cela peut être dû à une compétition entre les microorganismes dégradants et la microflore totale stimulée par l'addition de glucose et d'azote. Toutefois, l'addition de l'azote minéral seul ralentit plus la minéralisation de l'atrazine que le glucose.

Dans tous les cas, l'augmentation de la formation des résidus liés s'observe en cas de stimulation de la microflore totale des sols. Cela confirme le rôle important de l'activité microbienne dans la stabilisation des résidus de pesticides dans les sols.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

La dégradation microbienne est la principale voie de dissipation de l'atrazine dans les sols. La dégradation accélérée de l'atrazine allant jusqu'à la minéralisation du cycle triazinique a été mise en évidence dans les sols après plusieurs applications de l'herbicide au champ (Barriuso et Houot, 1996). Des microorganismes capables de réaliser la minéralisation complète de la molécule ont été isolés par plusieurs auteurs (Mandelbaum et al., 1993a). L'utilisation de l'azote de l'atrazine par la microflore dégradante est alors le plus souvent citée (Mandelbaum et al., 1993b ; Radosevich et al., 1995). L'hydroxylation et la déalkylation sont les deux principales voies de la dégradation de l'atrazine avant le clivage du cycle triazinique (Yanze Kontchou et Gschwind, 1995). Toutefois, le clivage du cycle triazinique se produit seulement après l'hydroxylation (Kaufman et Kearney, 1970 ; Goswami et Green, 1971). Des travaux récents ont montré la participation de l'activité biologique dans l'hydroxylation (Mandelbaum et al., 1993b ; Bouquard et al., 1997), alors que ce processus a longtemps été considéré comme une voie de dégradation physico-chimique (Armstrong et al., 1967 ; Skipper et Volk, 1972).

Au cours d'un travail préliminaire (Abdelhafid, 1994), nous avons montré que dans un sol où existe une microflore spécifique responsable de la minéralisation rapide de l'atrazine, sa vitesse de dégradation augmente en cas de stress azoté et en présence de carbone facilement métabolisable, en revanche, elle ralentit en présence d'azote minéral disponible. Alvey et Crowley (1995) ont montré que l'effet d'apport de matières organiques sur la minéralisation de l'atrazine dépend de la nature de la matière organique et surtout dépend de la présence simultanée de carbone et d'azote. Le premier effet des amendements organiques est d'augmenter la rétention des pesticides, ce qui a pour conséquence la réduction de leur dégradation en raison de la diminution de la proportion de pesticide en solution disponible pour les microorganismes, ce qui se traduit par une stabilisation des pesticides et de leurs produits de dégradation qui forment progressivement des résidus de moins en moins disponibles avec le temps (Barriuso et al., 1992).

Les trois objectifs principaux de ce travail étaient les suivants :

- Caractériser la mise en place de la minéralisation accélérée de l'atrazine dans le sol limono-argileux de Grignon et la voie métabolique de dégradation de l'herbicide dans ce sol.

- Etudier l'influence de la disponibilité en carbone et en azote sur le devenir de l'atrazine dans des sols adaptés ou non adaptés à la minéralisation accélérée de l'atrazine. L'effet de la disponibilité en carbone et en azote endogène des sols est comparé à celui d'apports exogènes.
- Tester la capacité d'un sol adapté à dégrader d'autres pesticides azotés.

Nous avons montré que dans le sol limono-argileux de Grignon, la microflore peut s'adapter rapidement à la dégradation complète de l'atrazine allant jusqu'à la minéralisation du cycle triazinique. La fréquence d'application semble plus importante que la dose d'application. Dans ce type de sol, la dégradation de l'atrazine semble pouvoir se faire via la déalkylation initiale (Kaufman et Blake, 1970 ; Behki et Khan, 1994) ou l'hydroxylation initiale (Mandelbaum et al. 1993b ; Assaf et Turco, 1994). La détection de l'hydroxyatrazine est fugace quand le sol est adapté, celle-ci s'accumule quand le sol n'est pas adapté à la dégradation de l'atrazine.

La fréquence d'application de l'atrazine au champ est le facteur prépondérant dans la mise en place de la minéralisation accélérée de l'atrazine dans le sol limono-argileux de Grignon. Dans le sol adapté, l'addition de substrats organiques carbonés modifie peu le devenir de l'atrazine. En revanche, ceux-ci stimulent la minéralisation du cycle dans le sol non adapté confirmant la dégradation par co-métabolisme dans ce sol. Dans les deux sols, la présence d'azote minéral inhibe la minéralisation de l'atrazine confirmant les résultats d'Alvey et Crowley (1995). L'effet des formes organiques d'azote dépend de la vitesse de minéralisation de cet azote, donc de sa disponibilité vis à vis des microorganismes. Le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine augmente avec l'intensité de la minéralisation de l'azote organique. L'effet de l'azote pourrait être dû à l'inhibition de la synthèse ou de l'activité des enzymes intervenant dans la dégradation de l'atrazine (Entry et al., 1993). Le biuret semble faire exception. Bien que peu minéralisable, il inhibe fortement la minéralisation de l'atrazine. C'est un des derniers intermédiaires de la dégradation de cet herbicide, et une concentration importante de ce produit pourrait réprimer les enzymes actives dans la dégradation de l'atrazine. Enfin, si les apports carbonés stimulaient la dégradation partielle de l'atrazine et la formation de métabolites, en revanche, les apports azotés inhibent également leur formation.

Les différences de disponibilité de l'azote de la matière organique du sol dues à la différenciation de leur statut organique issue de pratiques de fertilisation différentes ne sont pas suffisantes pour modifier la cinétique de minéralisation de l'atrazine. Dans les deux sols,

un apport de 2.5 g kg^{-1} sol en azote minéral est nécessaire au ralentissement de la minéralisation de l'atrazine. Si on estime que la fertilisation se fait à la surface du sol, cela correspondrait à un apport de $500 \text{ kg d'N ha}^{-1}$. Bien que supérieur aux pratiques de fertilisation azotée sur maïs, cela reste du même ordre de grandeur. En culture de maïs, la fertilisation azotée et les traitements herbicides se font à des dates proches et l'apport d'azote pourrait donc ralentir la minéralisation de l'atrazine au champ. Un apport simultané d'azote minéral et de glucose inhibe totalement la minéralisation de l'atrazine. Là encore un apport important de glucose est nécessaire, équivalent au carbone organique total du sol. Dans ce cas, la compétition entre les microorganismes dégradants et les autres microorganismes du sol pour l'espace, les nutriments et l'oxygène pourrait contribuer au ralentissement de la minéralisation de l'atrazine. Dans les deux sols, l'augmentation de la formation de résidus inextractibles d'atrazine ou résidus liés est associée à la stimulation de la microflore totale à la suite d'apports organiques facilement minéralisables. Cela confirmerait le rôle important de l'activité microbienne dans la formation de ces résidus liés (Benoit, 1994).

Enfin, la capacité à dégrader rapidement d'autres pesticides azotés ne s'étend qu'à d'autres chloro-triazines, molécules de la même famille chimique confirmant le phénomène d'adaptation croisée déjà observé dans le même sol par Barriuso et Houot (1996). Pour l'atrazine et la simazine, les temps de demi-vie observés au laboratoire sont beaucoup plus courts (5 à 7 jours) que classiquement rencontrés de 70 à 110 jours (Dabène et al., 1995). Pour les autres molécules, les temps de demi-vie sont du même ordre de grandeur que ceux classiquement rencontrés dans la littérature.

Ce travail se poursuit actuellement dans deux directions :

- L'isolement de microorganismes capables de la dégradation complète de l'atrazine est en cours. La caractérisation des microorganismes isolés se fait en collaboration avec le Pest Management Research Centre au Canada (London, Ontario).
- L'étude de la capacité d'autres types de sols à s'adapter à la minéralisation de l'atrazine après plusieurs applications permettra de la relier aux caractéristiques physico-chimiques des sols.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelhafid R. (1994) *Caractérisation microbiologique des différences de biodégradation de l'atrazine observées dans un environnement pédoclimatique apparemment homogène*. Mémoire de DEA. Institut National Agronomique, 34 p.
- Abdelhafid R., Hout S. Et Barriuso E. (1998) Dependence of atrazine degradation rate on C and N availability in soils : variation with the responsible microflora. Soumis à *Soil Biology & Biochemistry*.
- Adams C.D. et Thurman E.M. (1991) Formation and transport of deethylatrazine in the soil and Vadose zone. *J. Environ. Qual.*, 20, 540-547.
- Alexander M. (1977) *Introduction to Soil Microbiology*, 2nd edn. John Wiley & Sons, New-York, USA. 457 p.
- Alexander M., et Scow K. (1989) Kinetics of biodegradation in soil. In : *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Shawney B.L. et Broxton K. Eds., SSSA special publication n° 22, Madison, Wisconsin, 243-267.
- Alva A.K., Singh M. et Anderson C.A. (1990) Differential sorption of herbicides as related to soil topography and organic matter. *J. Environ. Sci. Health*, B25, 627-642.
- Alvey S. et Crowley D.E. (1995) Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen source. *J. Environ. Qual.*, 24, 1156-1162.
- Alvey S. et Crowley, D.E. (1996) Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. *Environ. Sci. and Technol.*, 30, 1596-1603.
- Ambrosoli R., Nègre M. et Gennari M. (1996) Indications of the occurrence of enhanced biodegradation of carbofuran in some Italian soils. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 1749-1752.
- Armstrong D.E., Chesters G. et Harris R.F. (1967) Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 31, 61-66.
- Arthur E.L., Anhalt J.C., Anderson T.A. et Coats J.R. (1997) Enhanced degradation of deethylatrazine in an atrazine-history soil of Iowa. *J. Environ. Sci. Health*, B32, 599-620.
- Assaf N.A. et Turco R.F. (1994) Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. *Biodegradation*, 5, 29-35.
- Audus L.J. (1951) The biological detoxification of hormone herbicides in soil. *Plant Soil*, 3, 170-192.
- Bailey A.M. et Coffey M.D. (1986) Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Can. J. Microbiol.*, 32, 562-569.
- Barriuso E., Andreux F., Schiavon M. et Portal J.M. (1991) Intérêts et limitations des méthodes de séparation des micropolluants organiques des sols. *Science du Sol*, 29, 301-320.
- Barriuso E., Koskinen W. et Sorenson B. (1992) Modification of atrazine desorption during field incubation experiments. *Sci. Total Environ.*, 123/124, 333-344.
- Barriuso E., Gaillardon P. et Schiavon M. (1994) Biodisponibilité des pesticides dans le sol. XXIV Congrès du Groupe Français des Pesticides, Bordeaux, 1-11.

- Barriuso E. et Houot S. (1996) Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 1341-1348.
- Barriuso E., Calvet R., Schiavon M. et Soulas G. (1996) Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Étude et Gestion des Sols*, 3, 4, 279-296.
- Barriuso E., Houot S. et Serra-Wittling C. (1997) Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pest. Sci.*, 49, 65-75.
- Behki R.M. et Khan S.U. (1986) Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 746-749.
- Behki R.M. et Khan S.U. (1994) Degradation of atrazine, propazine and simazine by *Rhodococcus Strain B-30*. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1237-1241.
- Behki R., Topp E., Dick W. et Germon P. (1993) Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1955-1959.
- Beigel C. (1997) *Analyse et modélisation du transport et de la dissipation dans les sols des molécules phytosanitaires appliquées en traitement de semences, cas de triticonazole*. Thèse Doct., INA, Paris-Grignon, 114p.
- Beigel C., Charnay M.P. et Barriuso E. (1998) Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil : effect of application rate. *Soil Biol. Chem.*, sous presse.
- Benoit P. (1994) *Rôle de la nature des matières organiques dans la stabilisation des résidus de polluants organiques dans les sols*. Thèse Doct., INA, Paris-Grignon, 194p.
- Benoit P., Barriuso E., Houot S. et Calvet R. (1996) Influence of the nature of soil organic matter on the sorption-desorption of 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Europ. J. Soil Sci.*, 47, 567-578.
- Benoit P. et Barriuso E. (1997) Fate of ¹⁴C-ring-labeled 2,4-D, 2,4-dichlorophenol and 4-chlorophenol during straw composting. *Biol. Fertil. Soils*, 25, 53-59.
- Bertin G. et Schiavon M. (1989) Les résidus non extractibles de produits phytosanitaires dans les sols. *Agronomie*, 9, 117-124.
- Best J.A. et Weber J.B. (1974) Disappearance of s-triazines as affected by soil pH using a balance-sheets approach. *Weed Sci.*, 22, 364-373.
- Bollag J.M. et Liu S.Y. (1990) Biological transformation processes of pesticides. In : *Pesticides in the soil environment : processes, impacts and modeling*. SSSA Book series : 2, 169-211. SSSA. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Boundy-Mills K.L., De Souza M.L., Mandelbaum R.T., Wackett L.P. et Sadowsky M.J. (1997) The atzB gene of *Pseudomonas* sp. Strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 916-923.
- Bouquard C., Ouazzani J., Promé J.C., Michel-Briand Y. et Plésiat P. (1997) Dechlorination of atrazine by *Rhizobium* sp. isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 862-866.

- Boyd S.A., Mikesell M.D. et Lee J.F. (1989) Chlorophenols in soils. In : *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Shawney B.L. and Broxton K. Eds., SSSA special publication n° 22, Madison, Wisconsin, 209-228.
- Burkhard N. et Guth J.A. (1981) Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption. *Pest. Sci.*, 12, 45-52.
- Cadot L. (1993) *Impact de facteurs pédoclimatiques sur la biodégradation de boues résiduaires de station de dépuración dans deux sols. Modélisation et simulation*. Thèse Doct. INA, Paris-Grignon, 175p.
- Calderbank A. (1989) The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 108, 71-103.
- Calvet R. (1988) Evaluation des coefficients d'adsorption et prédiction de la mobilité des pesticides dans les sols. In : *Methodological aspects of the study of pesticide behaviour in soil*. Jamet P. Ed., INRA, Paris, 119-126.
- Calvet R. (1989) Adsorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*, 83, 145-177.
- Charnay M.P. (1993) *La dégradation accélérée du carbofuran dans les sols : aspects microbiologiques et possibilités de contrôle du phénomène*. Thèse Doct. de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 132 p.
- Charnay M.P., Tarabelli L., Beigel C. et Barriuso E. (1998) Soil microbial activity and triticonazole degradation modified by formulation additives. Soumis à *Soil Biol. Biochem.*
- Chaussod R., Nicolardot B. et Catroux G. (1986) Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol*, 2, 201-211.
- Chung G.Y., Maccoy B.J. et Scow K.M. (1993) Criteria to assess when biodegradation is kinetically limited by intraparticle diffusion and sorption. *Biotechnol. Bioengineering*, 41, 625-632.
- Cook A.M. (1987) Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 93-116.
- Cook A.M. et Hütter R. (1981) S-triazines as nitrogen sources for bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1135-1143.
- Cook A.M., Beilstein P., Grossenbacher H. et Hütter R. (1985) Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *The Biochemical Journal*, 231, 25-30.
- Couch R.W., Gramlich J.V., Davis D.E. et Funderburk H.H. (1965) The metabolism of atrazine and simazine by soil fungi. Southern Weed Control Conference Proceedings, 18, 623-631.
- Dabène E., Marié F. et Smith C. (1995) *Caractéristiques utiles pour l'évaluation du comportement de quelques substances actives dans l'environnement*. Ministère de l'Agriculture de la Pêche et de l'Alimentation, Paris-France.

- Dao T.H., Lavy T.L. et Sorensen R.C. (1979) Atrazine degradation and residue distribution in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, 1129-1134.
- De Souza M.L., Wackett L.P., Boundy-Mills K.L., Mandelbaum R.T. et Sadowsky M.J. (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.
- De Souza M.L., Sadowski M.J. et Wackett L.P. (1996) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *J. Bacteriology*, 178, 4894-4900.
- Dec J., Shuttleworth K.L. et Bollag J.M. (1990) Microbial release of 2,4-dichlorophenol bound to synthetic humic acid. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 52, 1366-1371.
- Demon M. (1994) *Influence des facteurs climatiques et des constituants du sol sur la dynamique de l'atrazine*. Thèse INPL, Nancy, 111p.
- Dousset S. (1994) *Evaluation des potentialités de lessivage de la terbuthylazine et de l'atrazine dans trois sols de la région centre*. Thèse Doct., ENSAIA-INPL, 161p.
- Doyle R.C., Kaufman D.D. et Burt G.W. (1978) Effect of dairy manure and sewage sludge on ¹⁴C-pesticide degradation in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 987-989.
- Entry J.A., Mattson K.G. et Emmingham W.H. (1993) The influence of nitrogen on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in grassland soils. *Biol. Fertil. Soils*, 16, 179-182.
- Entry J.A. et Emmingham W.H. (1995) The influence of dairy manure on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in pasture soils. *Can. J. Soil Sci.*, 75, 379-383.
- Esser H.O., Dupuis G., Ebert E., Marco G.J. et Vogel C. (1975) s-Triazines In : *Herbicides, Chemistry, Degradation and Mode of Action*, eds P.C. Kearney and D.J. Kaufman, Vol 1, pp. 129-208, Marcel Dekker, New-York.
- Fournier J.C. (1989) *Aspects du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol*. Thèse Doct., Univ. Perpignan, 501 p.
- Gaillardon P., Gaudry J.C. et Calvet R. (1983) Effet des matières organiques ajoutées au sol sur l'adsorption des herbicides. Influence de la composition des matières organiques. *Weed Res.*, 23, 333-338.
- Gan J., Becker R.L., Koskinen W.C. et Buhler D.D. (1996) Degradation of atrazine in two soils as a function of concentration. *J. Environ. Qual.*, 25, 1064-1072.
- Geller A. (1980) Studies on the degradation of atrazine by bacterial communities enriched from various biotopes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 289-305.
- Giardina M.C., Giardi M.T. et Filacchoni G. (1980) 4-Amino-2-chloro-1,3,5-triazine : a new metabolite of atrazine by a soil bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2067-2072.

- Giardina M.C., Giardi M.T. et Filacchoni G. (1982) Atrazine metabolism by *Nocardia* : elucidation of initial pathway and synthesis of potential metabolites. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1439-1445.
- Girard H. Et Rougieux R. (1967) *Techniques de microbiologie agricole*. Ed. Dunod, 215 p.
- Goswami K.P. et Green R.E. (1971) Microbial degradation of the herbicide atrazine and its 2-hydroxy analog in submerged soils. *Environ. Sci. Technol.*, 5, 426-429.
- Green R.E., Schneider R.C. et Gavenda R.T. (1993) *Utility of sorption and degradation parameters from literature for site-specific pesticide impact assessment*. SSSA Special Publications, 32, Madison, Winsconsin, USA, 209-225.
- Hamaker J.W. et Thompson J.M. (1972) Adsorption In : *Organic chemicals in the soil environment, Vol. 1, Goring C.A. et Hamaker J.W. Eds.*, Marcel Dekker, New York, 49-143.
- Hance R.J. (1973) The effect of nutrients on the decomposition of the herbicides atrazine and linuron incubated with soil. *Pest. Sci.*, 4, 817-822.
- Hance R.J. (1974) Soil organic matter and the adsorption and decomposition of the herbicides atrazine and linuron. *Soil Biol. Biochem.*, 6, 39-42.
- Hart M.R. et Brookes P.C. (1996) Soil microbial biomass and mineralisation of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 1641-1649.
- Hickey W.J., Fuster D.J. et Lamar R.T. (1994) Transformation of atrazine in soil by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 1665-1671.
- Hornsby A.G., Wauchope R.D. et Herner A.E. (1996) *Pesticides properties in the environment*. Springer-Verlag New York, Inc., 227 p.
- Houot S. et Chaussod R. (1995) Impact of agricultural practices on the size and activity of the microbial biomass in a long-term field experiment. *Biol. Fertil. Soils*, 19, 309-316.
- Houot S. et Barriuso E. (1998) Influence de paramètres physico-chimiques des sols sur la dégradation accélérée de l'atrazine. XXVIII Congrès du Groupe Français des Pesticides, Alès.
- Houot S., Molina J.A.E., Chaussod R. et Clapp C.E. (1989) Simulation by NCSOIL of net mineralization in soils from the Deherain and 36 parcelles fields at Grignon. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 53, 451-455.
- Houot S., Barriuso E. et Bergheaud V. (1998) Modification of atrazine behaviour in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biol. Biochem.*, Soil Biol. Biochem., sous presse.
- Hsu T.S. et Bartha R. (1976) Hydrolysable and non hydrolysable 3,4-dichloroaniline-humus complexes and their respective rates of bidegradation. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 118-122.

- Jenkinson D.S. et Ladd J.N. (1981) Microbial biomass in soils : measurement and turnover. In : *Soil Biochemistry Vol.5 Paul E.A. et Ladd J.N. Eds.*, Marcel Dekker, New York, 415-471.
- Kaal E.E.J., Field J.A. et Joyce T.W. (1995) Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technology*, 53, 133-139.
- Kauffmann C.G. et Mandelbaum R.T. (1996) Entrapment of atrazine-degrading enzymes in sol-gel glass. *J. Biotechnology*, 51, 219-225.
- Kaufman D.D. (1987) Accelerated biodegradation of pesticides in soil and its effect on pesticide efficacy. Proc. Br. Crop Prot. Conf. Weeds, 2, 515-522.
- Kaufman D.D. et Blake J. (1970) Degradation of atrazine by soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* 2, 73-80.
- Kaufman D.D. et Kearney P.C. (1970) Microbial degradation of s-triazine herbicides. *Residue Reviews*, 32, 235-265.
- Keeney D.R. et Nelson D.W. (1982) Nitrogen-inorganic forms. In : Page A.L. Miller R.H. et Keeney D.R., Eds. *Methods of soil analysis*, Part 2, 2nd edn. Agronomy 9, Am. Soc. Agron., Madison, Wis, 643-693.
- Khan S.U. (1978) Kinetics of hydrolysis of atrazine in aqueous fulvic acid solution. *Pest. Sci.*, 9, 39-43.
- Khan S.U. (1980) Determining the role of humic substances in the fate of pesticides in the environment. *J. Environ. Sci. Health*, B15, 1071-1090.
- Khan S.U. (1982) Bound pesticide residues in soils and plants. *Residues Rev.*, 84, 1-25.
- Khan S.U. et Saidak W.J. (1981) Residues of atrazine and its metabolites after prolonged usage. *Weed Res.*, 21, 9-12.
- Khan S.U. et Ivarson K.C. (1982) Release of soil bound (non extractable) residues by various physiological groups of microorganisms. *J. Environ. Sci. Health*, B17, 737-749.
- Korpraditskul R., Katayama A. et Kuwatsuka S. (1993) Degradation of atrazine by soil bacteria in the stationary phase. *Pest. Sci.*, 18, 293-298.
- Krom D.K. (1980) Spectrophotometric determination of ammonia : A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The analyst*, 105, 305-316.
- Kruger E.L., Somasundaram L., Kanwar R.S. et Coats J.R. (1993) Persistence and degradation of [¹⁴C]atrazine as affected by soil depth and moisture conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1959-1967.
- Levanon D. (1993) Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 1097-1105.
- Li D., Alic M. et Gold M.H. (1994) Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3447-3449.

- Lichtenstein E.P., Katan J. Et Anderegg B.N. (1977) Binding of "persistent and no persistent" ^{14}C -labeled insecticides in an agricultural soil. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 43-47.
- Mandelbaum R.T., Wackett L.P. et Allan D.L. (1993a) Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1695-1701.
- Mandelbaum R.T., Wackett L.P. et Allan D.L. (1993b) Rapid hydrolysis of atrazine to hydroxyatrazine by soil bacteria. *Environ. Science Technol.*, 27, 1943-1946.
- Mandelbaum R.T., Allan D.A. et Wackett L.P. (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1451-1457.
- Martinez-Inigo M.J. et Almendros G. (1992) Pesticide sorption on soils treated with evergreen oak biomass at different humification stages. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 23, 1717-1729.
- Masaphy S., Levanon D. et Henis Y. (1996) Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus Pulmonarius* during solid-state fermentation. *Bioresource Technol.*, 56, 207-214.
- Mc Cormick L.L. et Hiltbord A.E. (1966) Microbiological decomposition of atrazine and diuron in soil. *Weeds*, 14, 77-82.
- Menasseri S. (1994) *Mise en évidence expérimentale de compartiments dynamiqués de la matière organique du sol. Apport de la modélisation et application au champ.* Thèse Doct., INA, Paris-Grignon, 166p.
- Metzger L., Levanon D. et Mingelgrin U. (1987) The effect of sewage sludge on soil structural stability : microbiological aspects. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, 346-351.
- Montavon C. (1984) *Influence d'apport de substrats carbonés sur la dégradation du 2,4-D et de l'atrazine dans le sol, action de différentes doses d'atrazine sur la microflore du sol.* Mémoire de DEA, Université de Dijon, 36 p.
- Morel R., Lasnier T. et Bourgeois S. (1984) *Les essais de fertilisation de longue durée de la station agronomique de Grignon.* INRA publications, Paris, 335p.
- Morel-Chevillet C., Parekh N.R., Pautrel D. et Fournier J.C. (1996) Cross-enhancement of carbofuran biodegradation in soil samples previously treated with carbamate pesticides. *Soil. Biol. Biochem.*, 28, 1767-1776.
- Mougin C., Laugero C., Asther M. et Chaplain V. (1997) Biotransformation of s-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Pest. Sci.*, 49, 169-177.
- Mougin C., Laugero C., Asther M., Dubroca J., Frasse P. et Asther M. (1994) Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 705-708.
- Mueller T.C., Skipper H.D., Lawrence E.G. et Kline E.L. (1989) Bacterial stimulation by carbamothioate herbicides. *Weed Sci.*, 37, 424-427.

- Obrador A., Lechon Y. et Tadeo J.L. (1993) Simulation of atrazine persistence in Spanish soils. *Pest.Sci.*, 37, 301-308.
- Patil S.G., Nicholls P.H., Chamberlain K., Briggs G.G. et Bromilow R.H. (1988) Degradation rates in soil of 1-Benzyltriazoles and two triazole fungicides. *Pest. Sci.*, 22, 333-342.
- Paya-Perez A.B., Cortes A., Sala M.N. et Larsen B. (1992) Organic matter fractions controlling the sorption of atrazine in sandy soils. *Chemosphere*, 25, 887-898.
- Perkovich B.S., Anderson T.A., Kruger E.L. et Coats J.R. (1996) Enhanced mineralization of [¹⁴C]atrazine in *Kochia scoparia* rhizospheric soil from a pesticide-contaminated site. *Pestic. Sci.*, 46, 391-396.
- Piccolo A., Celano G. et De Simone C. (1992) Interactions of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolysed products. *Sci. Total Environ.*, 117/118, 403-412.
- Pons N. (1994) *Effet de l'apport de matières organiques exogènes sur le devenir de l'atrazine dans un sol : rôle des différentes populations microbiennes*. DEA de Toxicologie de l'environnement, Univ. de Metz, 66p.
- Pussemier L., Goux S., Vanderheyden V., Debongnie P., Trésine I. et Foucart G. (1997) Rapid dissipation of atrazine in soils taken from various maize fields. *Weed Res.*, 37, 171-179.
- Radosevitch M., Traina S.J., Hao Y.L. et Tuovinen O.H. (1995) Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 297-302.
- Rahman A., Atkinson G.C., Douglas J.A. et Sinclair D.P. (1979) Eradicane causes problems. *New Zealand J. Agric.*, 139, 47-49.
- Roeth F.W. (1986) Enhanced herbicide degradation in soil with repeat application. *Rev. Weed Sci.*, 2, 45-167.
- Runddyanski W.J., Fawcett R.S. et Allister R.S. (1987) Effect of prior use on thiocarbamate herbicide persistence and Giant Foxtail (*Setaria Faberi*) control. *Weed Sci.*, 35, 68-74.
- Scheunert I. (1992) Transformation and degradation of pesticides in soil. In : *Chemistry of Plant Protection Vol. 8, Terrestrial Behaviour of Pesticides Ebing W. Ed.*, Springer-Verlag, Berlin, 23-75.
- Schiavon M. (1980) *Contribution à l'étude du mouvement et de la dégradation de l'atrazine dans deux sols agricoles drainés*. Thèse Doct. Etat, Univ. Nancy-INPL, 193p.
- Schiavon M. (1988) Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxyatrazine in soil using ¹⁴C ring-labelled compounds under outdoor conditions. *Ecotox. Environ. Safety*, 15, 55-61.
- Schiavon M. et Soulas G. (1983) Etude de la contamination des eaux de drainage et de la matière organique du sol par l'atrazine et ses dérivés de dégradation. Ministère de l'Environnement, Convention n° 81398.

- Schiavon M., Jacquin F. et Goussault C. (1977) Blocage des molécules s-triaziniques par la matière organique. *Soil Organic Matter Studies, I.A.E.A., II*, 327-332.
- Scow K.M. et Huston J. (1992) Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : theoretical consideration. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 56, 119-127.
- Serra-Wittling C., Houot S. et Barriuso E. (1996) Modification of soil water retention and biological properties by municipal solid waste compost. *Compost Science and Utilization*, 4, 44-52.
- Shao Z.Q., Seffens W., Mulbry W. et Bekki R.M. (1995) Cloning and expression of the s-triazine hydrolase gene (trzA) from *Rhodococcus corallinus* and development of *Rhodococcus* recombinant strains capable of dealkylating and dechlorinating the herbicide atrazine. *J. Bact.*, 177, 5748-5755.
- Shea P.J. (1989) Role of humified organic matter in herbicide adsorption. *Weed Technol.*, 3, 190-197.
- Skipper H.D. et Volk V.V. (1972) Biological and chemical degradation of atrazine in three Oregon soils. *Weed Sci.*, 20, 344-347.
- Skipper H.D., Gilmour C.M. et Furtick W.R. (1967) Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 31, 653-656.
- Skipper H.D., Murdock E.C., Gooden D.T., Zublena J.P. et Amakari M.A. (1986) Enhanced herbicide biodegradation in South Carolina soils previously treated with butylate. *Weed Sci.*, 34, 558-563.
- Smelt J.H., Van de Peppel-Groen A.E., Van Der Pas L.J.T. et Dijksterhuis A. (1996) Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils. *Soil. Biol. Biochem.*, 28, 1757-1765.
- Sorensen L.H. (1983) Size and persistence of the microbial biomass formed during the humification of glucose, hemicellulose, cellulose, and straw in soils containing different amount of clay. *Plant and Soil*, 75, 121-130.
- Soulas G. (1985) La dégradation des pesticides dans le sol. Aspects microbiens et cinétiques. *Science du Sol*, 2, 43-57.
- Stucki G., Yu C.H., Baumgartner T. et Gonzalez-Valero J.F. (1995) Microbial atrazine mineralization under carbon limited and denitrifying conditions. *Water Research*, 29, 291-296.
- Suett D.L., Fournier J.C., Papadopoulou-Mourkidou E., Pussemier L. et Smelt J. (1996) Accelerated degradation : the european dimension. *Soil. Biol. Biochem.*, 28, 1741-1748.
- Tal A., Rubin B., Katan J. et Aharonson N. (1990) Involvement of microorganisms in accelerated degradation of EPTC in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1100-1105.
- Tarabelli L. (1995) *Effets des adjuvants de formulation sur la dégradation du triticonazole dans les sols*. DEA de fonctionnement physique, chimique et biologique de la biosphère continentale, Univ. Pierre et Marie Curie (Paris VI), 30p.

- Topp E., Gutzman D.W., Bourgoïn B., Millette J. et Gamble D.S. (1995) Rapid mineralization of the herbicide atrazine in alluvial sediments and enrichment cultures. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 743-747.
- Topp E., Tessier L. et Gregorich E.G. (1996) Dairy manure incorporation stimulates rapid atrazine mineralization in an agricultural soil. *Can. J. Soil Sci.*, 76, 403-409.
- Van Zwieten L. et Kennedy I.R. (1995) Rapid degradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. NI86/21 and by an atrazine-perfused soil. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1377-1382.
- Vance E.D., Brookes P.C. et Jenkinson D.S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 703-707.
- Vanderheyden V., Debongnie P. et Pussemier L. (1997) Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. *Pest. Sci.*, 49, 237-242.
- Verhagen C., Lebbink G. et Bloem J. (1996) Enhanced biodegradation of the nematicides 1,3-dichloropropen and methyl isothiocyanate in a variety of soils. *Soil. Biol. Biochem.*, 28, 1753-1756.
- Yanze-Kontchou C. et Gschwind N. (1993) Rapid biodegradation of the herbicide atrazine in soil inoculated with a pure bacterial culture. IX Symposium Pesticide Chemistry, Mobility and Degradation of Xenobiotics, Piacenza, 533-536.
- Yanze-Kontchou C. et Gschwind N. (1994) Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4297-4302.
- Yanze-Kontchou C. et Gschwind N. (1995) Mineralization of the herbicide atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas* strain. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2291-2294.
- Wagner G.H. et Chahal K.S. (1966) Decomposition of carbon-14 labeled atrazine in soil samples from Samborn field. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 30, 752-754.
- Wagner G.H. et Broder M.W. (1993) Microbial progression in the decomposition of corn stalk residue in soil. *Soil Sci.*, 155, 48-52.
- Walker A. (1978) Simulation of the persistence of eight soil-applied herbicides. *Weed Res.*, 18, 305-313.
- Walker A. (1987) Evaluation of a simulation model for prediction of herbicide movement and persistence in soil. *Weed Res.*, 27, 143-152.
- Walker A et Welch S. (1991) Enhanced degradation of some soil-applied herbicides. *Weed Res.*, 31, 49-57.
- Walker A et Welch S. (1992) Further studies of the enhanced biodegradation of some soil-applied herbicides. *Weed Res.*, 32, 19-27.
- Walker A et Roberts S.J. (1993) Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. IX Symposium Pesticide Chemistry, Mobility and Degradation of Xenobiotics, Piacenza, 357-370.

- Walker A., Cotteril E.G. et Welch S.J. (1989) Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyle in soils from different depths. *Weed Res.*, 29, 281-287.
- Walker A., Hance R.J., Allen J.G., Briggs G.G., Chen Y.L., Gaynor J.D., Hougue E.J., Malquori A., Moody K., Moyer J.R., Pestemer W., Rahman A., Smith A.E., Streibig J.C., Torstensson N.T.L., Widyanto L.S. et Zandvoort R. (1983) EWRS Herbicide-Soil Working Group : Collaborative experiment on simazine persistence in soil. *Weed Res.*, 23, 373-383.
- Weed D.A.J., Kanwar R.S., Stoltenberg D.E. et Pfeiffer R.L. (1995) Dissipation and distribution of herbicides in the soil profile. *J. Environ. Qual.*, 24, 68-79.
- Wilson R.G. (1984) Accelerated degradation of thiocarbamate herbicides in soil with prior thiocarbamate herbicide exposure. *Weed Sci.*, 32, 264-268.
- Winkelmann D.A. et Klaine S.J. (1991) Atrazine metabolite behavior in soil-core microcosms. In : *Pesticide Transformation Products. Fate and significance in the environment*, Somasundaram L. et Coats J.R., Eds, Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 75-92.
- Wolf D.C. et Martin J.P. (1975) Microbial decomposition of ring ^{14}C atrazine, cyanuric acid, and 2-chloro-4,6-diamino-s-triazine. *J. Environ. Qual.*, 4, 134-139.
- Wu J., Joergensen R.G., Pommerening B., Chaussod R. et Brookes P.C. (1990) Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction, an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 1167-1169.
- Zagal E. (1993) Measurement of microbial biomass in rewetted air-dried soil by fumigation-incubation and fumigation-extraction techniques. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 553-559.
- Zagal E. et Persson J. (1994) Immobilization and remineralization of nitrate during glucose decomposition at four rates of nitrogen addition. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 1313-1321.

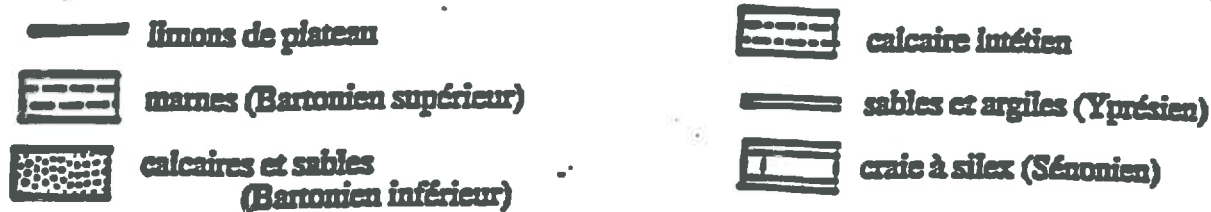
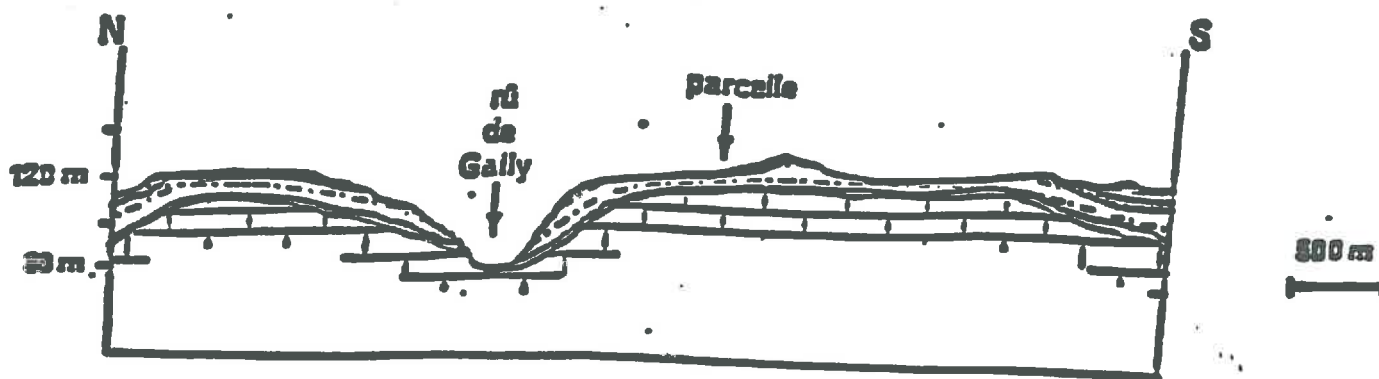
ANNEXES

Annexe 1 : Principales caractéristiques des pesticides azotés utilisés.

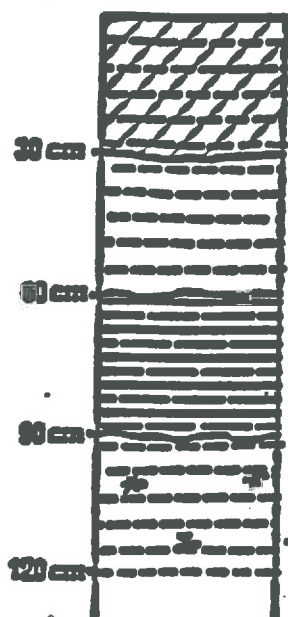
Molécules	Nature de pesticide	Utilisation	Mode d'action
<u>Pesticides heterocycliques azotés</u>			
<u>Triazines</u>			
Atrazine	herbicide	maïs, sorgho, zones non cultivées	absorbé par les racines et en partie par les feuilles
Simazine	herbicide	maïs, zones non cultivées	Absorbé exclusivement par les racines
Terbutryne	herbicide	blé d'hiver, maïs, pomme de terre, pois	absorbé par les racines
<u>Triazinones</u>			
Métribuzine	herbicide	pomme de terre, tomate, asperge	absorbé par les racines et les feuilles
<u>Uraciles</u>			
Terbacile	herbicide	luzerne implantée	absorbé par les racines
<u>Triazoles</u>			
Triticonazole	fongicide	céréales	appliqué sur la semence, absorbé par les racines
<u>Dérivés Oxadiazoles</u>			
Dimefuron	herbicide	colza	absorbé par les racines
<u>Pesticides azotés non heterocycliques</u>			
<u>Urées substituées</u>			
Diuron	herbicide	vigne, légumineuses, zones non cultivées	pénètre par les racines
Isoproturon	herbicide	céréales d'hiver et de printemps	absorbé par les racines
<u>Dinitroanilines</u>			
Pendiméthaline	herbicide	pois, céréales d'hiver, maïs, légumes	inhibe la division et l'élongation cellulaire (tiges et racines)
Trifluraline	herbicide	colza, tournesol, céréales, soja	inhibe la germination
<u>Carbamates</u>			
Carbétamide	herbicide	légumineuses fouragères, colza, arbres fruitiers	agit par absorption radiculaire

Annexe 2

Annexe 2.1. Environnement géomorphologique (d'après la carte géologique 1/50 000) et caractéristiques pédologiques du site.



Localisation : Grignon
 Type de sol : sol brun lessivé.
 Roche mère : loess limono-argileux sur calcaire lutétien.
 Altitude : 130 m.

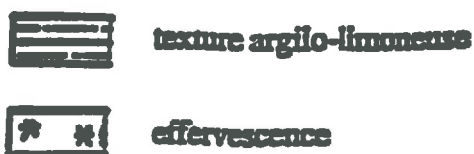
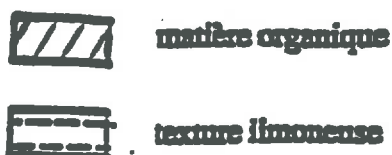


Ap (0-30 cm) : limono-argileux très pauvre en sable, brun gris, structure polyédrique subanguleuse, racines fines et moyennes peu nombreuses, correspond à l'horizon de labour.

A/B (30-60 cm) : limono-argileux, brun clair, structure prismatique.

B (60-90 cm) : argilo-limoneux, brun clair, structure prismatique.

C (>90 cm) : loess limoneux argileux, de couleur plus jaune, structure continue, peu poreux, front de recarbonatation éventuel.



Annexe 2.2. Distribution de la radioactivité initiale de ^{14}C -atrazine, entre les fractions minéralisées, extractibles et non extractibles (résidus liés) au cours des incubations de sols du dispositif plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Dans la figure 2.6, la fraction non extractible à 28 jours correspond à la mesure faite à 7 jours.

Sols	Jours	0	7	28	42	56	90
<u>Parcelle M80</u>							
Minéralisée		0	82.3 ± 1.4	91.9 ± 1.5	92.9 ± 1.5	93.6 ± 1.5	94.4 ± 1.5
Extractible au CaCl_2		83.6 ± 0.2	nd*	1.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0
Extractible au méthanol		26.7 ± 3.5	8.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2
Résidus liés		1.7 ± 0.2	8.0 ± 0.6	nd	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.1	4.5 ± 0.2
<u>Parcelle M-B73</u>							
Minéralisée		0	70.2 ± 0.5	89.0 ± 0.8	90.8 ± 0.8	91.8 ± 0.8	93.2 ± 0.8
Extractible au CaCl_2		63.5 ± 2.8	nd	1.6 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0
Extractible au méthanol		51.6 ± 2.8	16.5 ± 0.4	3.8 ± 0.4	2.8 ± 0.2	2.3 ± 0.3	1.7 ± 0.3
Résidus liés		2.4 ± 0.1	10.8 ± 0.1	nd	7.4 ± 0.1	8.0 ± 1.1	6.6 ± 0.1
<u>Parcelle B65</u>							
Minéralisée		0	0.6 ± 0.0	4.7 ± 0.4	7.1 ± 0.4	10.3 ± 0.9	17.1 ± 1.1
Extractible au CaCl_2		69.3 ± 1.2	nd	26.4 ± 2.1	24.8 ± 0.7	19.4 ± 1.9	15.0 ± 0.9
Extractible au méthanol		44.9 ± 3.5	84.3 ± 0.8	42.4 ± 1.6	36.7 ± 2.8	36.6 ± 1.3	25.1 ± 2.9
Résidus liés		3.0 ± 0.2	16.3 ± 0.4	nd	33.0 ± 0.9	35.8 ± 0.4	43.4 ± 0.7
<u>Parcelle D4</u>							
Minéralisée		0	72.0 ± 6.1	88.1 ± 6.2	89.9 ± 6.2	90.7 ± 6.2	91.9 ± 6.2
Extractible au CaCl_2		88.8 ± 2.9	nd	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Extractible au méthanol		23.1 ± 0.8	7.9 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Résidus liés		1.8 ± 0.1	11.1 ± 0.4	nd	6.2 ± 0.2	5.6 ± 0.0	5.1 ± 0.0
<u>Parcelle D10</u>							
Minéralisée		0	76.4 ± 1.2	92.8 ± 1.2	94.3 ± 1.2	95.1 ± 1.2	96.2 ± 1.2
Extractible au CaCl_2		86.6 ± 1.6	nd	1.2 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Extractible au méthanol		27.2 ± 1.5	7.8 ± 0.8	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Résidus liés		1.7 ± 0.0	11.5 ± 0.6	nd	6.4 ± 0.5	5.5 ± 0.2	5.0 ± 0.3

* non disponible

Annexe 2.3. Distribution de la radioactivité initiale de ^{14}C -simazine, entre les fractions minéralisées, extractibles et non extractibles (résidus liés) au cours des incubations de sols du dispositif plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehéran (D4, D10). Dans la figure 2.8, la fraction non extractible à 28 jours correspond à la mesure faite à 7 jours.

Sols	Jours					
	0	7	28	42	56	90
<u>Parcelle M80</u>						
Minéralisée	0	51.8 ± 2.8	65.4 ± 2.8	67.5 ± 2.8	68.8 ± 2.8	70.5 ± 2.8
Extractible au CaCl_2	62.0 ± 0.3	nd*	3.6 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.2
Extractible au méthanol	19.0 ± 0.7	20.5 ± 2.0	5.3 ± 0.5	4.5 ± 0.4	3.6 ± 0.2	3.1 ± 0.2
Résidus liés	6.0 ± 0.4	13.6 ± 0.6	nd	13.6 ± 1.4	11.7 ± 0.8	11.1 ± 0.4
<u>Parcelle M-B73</u>						
Minéralisée	0	38.5 ± 0.8	60.2 ± 1.0	63.3 ± 1.0	65.3 ± 1.1	68.0 ± 1.1
Extractible au CaCl_2	51.5 ± 4.9	nd	3.0 ± 0.3	2.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Extractible au méthanol	26.8 ± 0.5	36.1 ± 1.3	10.0 ± 0.6	7.7 ± 0.1	6.8 ± 0.3	5.4 ± 0.2
Résidus liés	6.9 ± 0.1	18.4 ± 0.4	nd	15.8 ± 1.1	15.4 ± 1.0	14.1 ± 0.2
<u>Parcelle B65</u>						
Minéralisée	0	12.4 ± 0.1	16.3 ± 0.2	18.1 ± 0.2	19.9 ± 0.2	23.4 ± 0.4
Extractible au CaCl_2	47.0 ± 1.5	nd	11.2 ± 1.5	12.0 ± 0.1	7.7 ± 0.4	5.2 ± 0.8
Extractible au méthanol	30.5 ± 0.3	68.1 ± 6.4	34.0 ± 1.6	30.7 ± 1.2	27.6 ± 3.1	23.7 ± 1.5
Résidus liés	6.8 ± 0.2	23.1 ± 0.5	nd	32.1 ± 0.3	33.8 ± 1.3	35.5 ± 1.5
<u>Parcelle D4</u>						
Minéralisée	0	49.3 ± 2.3	64.2 ± 2.4	66.5 ± 2.4	68.3 ± 2.4	69.8 ± 2.6
Extractible au CaCl_2	61.0 ± 0.8	nd	3.5 ± 0.3	2.8 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.3
Extractible au méthanol	16.2 ± 0.5	15.6 ± 0.6	5.1 ± 0.4	4.3 ± 0.2	3.3 ± 0.5	2.4 ± 0.4
Résidus liés	5.7 ± 0.2	16.1 ± 0.3	nd	12.4 ± 0.4	12.5 ± 0.1	11.9 ± 0.4
<u>Parcelle D10</u>						
Minéralisée	0	49.7 ± 1.1	66.2 ± 1.2	68.7 ± 1.2	70.4 ± 1.2	72.5 ± 1.2
Extractible au CaCl_2	58.9 ± 0.3	nd	3.6 ± 0.1	2.8 ± 0.0	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Extractible au méthanol	18.3 ± 0.8	21.3 ± 1.1	5.0 ± 0.4	4.3 ± 0.2	3.5 ± 0.5	2.5 ± 0.3
Résidus liés	5.5 ± 0.2	15.9 ± 0.2	nd	12.0 ± 0.5	12.0 ± 0.4	13.1 ± 0.1

* non disponible

Annexe 2.4. Distribution de la radioactivité initiale de ^{14}C -trifliconazole, entre les fractions minéralisées, extractibles et non extractibles (résidus liés) au cours des incubations de sols du dispositif plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehéraïn (M4, M10). Dans la figure 2.10, la fraction non extractible à 28 jours correspond à la mesure faite à 7 jours.

Sols	Jours					
	0	7	28	42	56	90
<u>Parcelle M80</u>						
Minéralisée	0	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	5.7 ± 0.1
Extractible au CaCl_2	33.0 ± 0.3	nd*	18.6 ± 1.8	17.5 ± 1.0	16.1 ± 1.0	13.4 ± 2.3
Extractible au méthanol	43.9 ± 1.3	70.4 ± 3.9	47.7 ± 0.7	42.9 ± 1.5	45.0 ± 1.0	41.8 ± 1.0
Résidus liés	2.7 ± 0.1	10.8 ± 0.2	nd	17.2 ± 0.6	18.6 ± 1.3	21.2 ± 1.4
<u>Parcelle M-B73</u>						
Minéralisée	0	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Extractible au CaCl_2	24.5 ± 0.2	nd	15.7 ± 1.5	17.1 ± 5.1	13.0 ± 0.9	12.3 ± 2.0
Extractible au méthanol	51.7 ± 0.5	76.7 ± 0.2	51.8 ± 0.6	44.2 ± 5.3	48.6 ± 2.6	43.2 ± 0.9
Résidus liés	3.5 ± 0.1	13.0 ± 0.3	nd	21.0 ± 0.9	19.5 ± 0.7	24.5 ± 0.1
<u>Parcelle B65</u>						
Minéralisée	0	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0	2.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Extractible au CaCl_2	26.1 ± 1.1	nd	14.5 ± 1.5	13.1 ± 0.0	13.6 ± 0.8	12.5 ± 0.6
Extractible au méthanol	60.5 ± 1.9	79.0 ± 1.7	56.6 ± 2.6	47.1 ± 0.6	49.3 ± 1.2	40.2 ± 2.3
Résidus liés	4.3 ± 0.1	14.6 ± 0.4	nd	26.4 ± 0.5	25.9 ± 0.9	30.0 ± 1.0
<u>Parcelle D4</u>						
Minéralisée	0	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Extractible au CaCl_2	40.7 ± 1.2	nd	23.2 ± 0.5	16.5 ± 3.2	20.4 ± 1.4	18.9 ± 0.3
Extractible au méthanol	42.9 ± 2.5	68.2 ± 2.3	44.7 ± 2.1	45.2 ± 5.8	42.2 ± 1.1	36.4 ± 0.9
Résidus liés	2.7 ± 0.1	14.9 ± 0.3	nd	19.4 ± 0.4	21.7 ± 0.8	24.8 ± 2.4
<u>Parcelle D10</u>						
Minéralisée	0	0.6 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1
Extractible au CaCl_2	36.4 ± 0.8	nd	21.9 ± 1.6	18.2 ± 0.5	20.0 ± 0.4	18.5 ± 0.6
Extractible au méthanol	46.6 ± 0.4	70.4 ± 0.7	47.1 ± 2.2	40.7 ± 2.3	44.0 ± 2.7	42.4 ± 0.8
Résidus liés	2.9 ± 0.2	14.6 ± 0.8	nd	19.5 ± 0.6	20.7 ± 0.7	28.1 ± 1.4

* non disponible

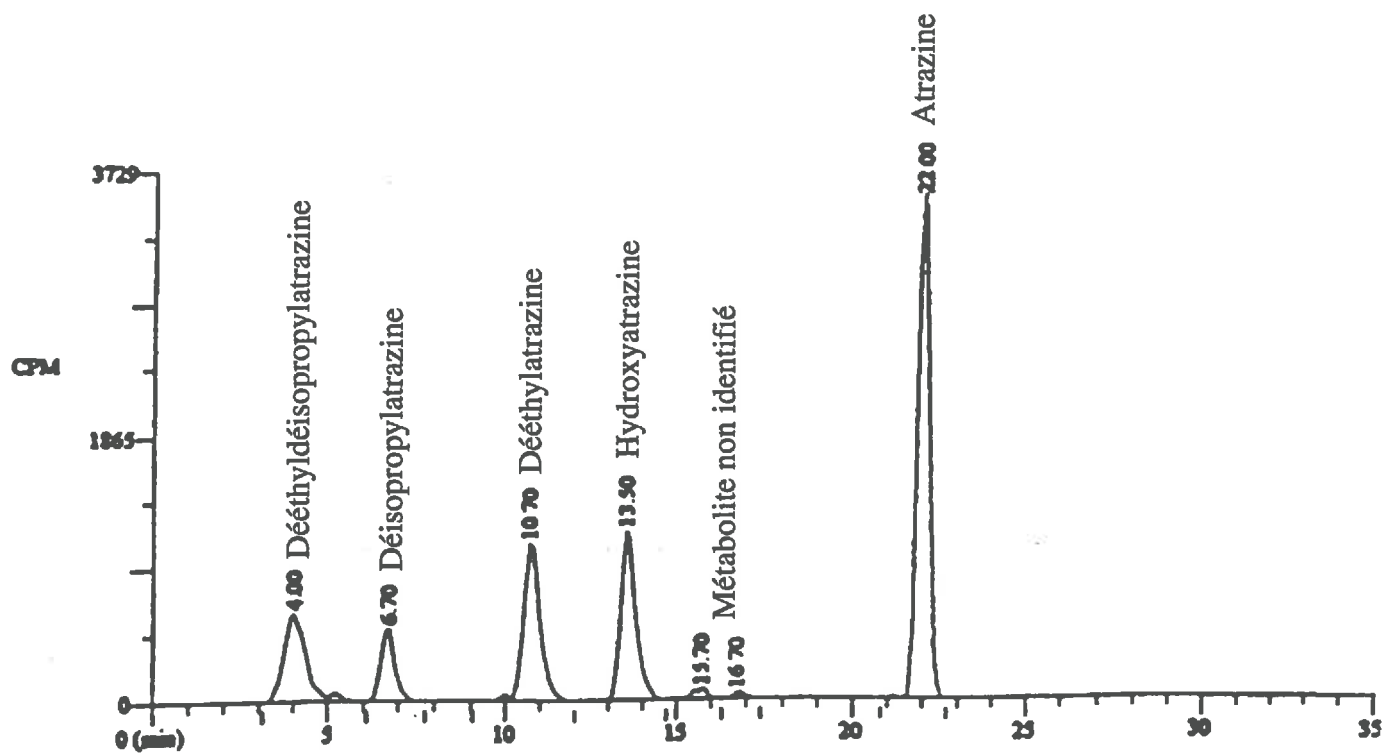
Annexe 2.5. Caractérisation de la radioactivité extractible au CaCl_2 au cours des incubations de ^{14}C -atrazine dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Parcelles et temps d'incubation	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
<i>Parcelle M80</i>					
0 j	95.2	1.4	2.6	0.8	0
28 j	0	0	0	0	100
56 j	0	0	0	0	100
90 j	0	0	0	0	100
<i>Parcelle M-B73</i>					
0 j	95.9	0.9	3.3	0	0
28 j	73.0	0	23.0	0	0
56 j	0	0	0	0	100
90 j	16.6	0	0	0	83.4
<i>Parcelle B65</i>					
0 j	96.0	2.2	0.7	0.7	0.4
28 j	58.1	5.1	25.3	4.6	6.9
56 j	41.1	6.6	34.7	0	17.6
90 j	30.9	8.8	28.6	8.5	23.3
<i>Parcelle D4</i>					
0 j	94.9	2.0	2.1	0.6	0
28 j	51.6	0	48.4	0	0
56 j	0	0	0	0	100
90 j	0	0	0	0	100
<i>Parcelle D10</i>					
0 j	95.1	1.4	1.0	0.7	0.5
28 j	81.6	0	13.2	0	5.2
56 j	31.3	0	0	0	68.7
90 j	0	0	0	0	100

Annexe 2.6. Caractérisation de la radioactivité extractible au **méthanol** au cours des incubations de ^{14}C -**atrazine** dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Parcelles et temps d'incubation	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
<u>Parcelle M80</u>					
0 j	94.6	1.7	2.1	0.9	0
28 j	76.7	0	0	2.3	21.0
56 j	41.1	0	0	0	58.6
90 j	28.6	0	0	0	71.4
<u>Parcelle M-B73</u>					
0 j	95.9	1.6	1.7	0	0.4
28 j	34.7	0	1.8	3.8	59.6
56 j	53.8	0	2.1	1.6	42.5
90 j	60.6	0	0	3.2	36.2
<u>Parcelle B65</u>					
0 j	95.5	2.3	1.3	0	0.4
28 j	75.2	1.1	15.2	5.4	3.2
56 j	63.6	1.8	19.7	6.4	8.5
90 j	51.4	8.7	22.8	6.8	10.3
<u>Parcelle D4</u>					
0 j	95.7	2.1	1.1	0.6	0.6
28 j	45.6	0	3.5	10.4	40.6
56 j	29.9	0	0	0	70.1
90 j	52.6	0	0	0	47.5
<u>Parcelle D10</u>					
0 j	97.4	1.0	1.2	0	0.5
28 j	69.5	0	0	6.1	24.5
56 j	70.2	0	0	0	29.8
90 j	49.5	0	0	0	50.5

Annexe 2.7. Chromatogramme présentant les temps de rétention de l'atrazine et ses métabolites, selon la méthode utilisée dans ce travail.



Annexe 2.8. Caractérisation de la radioactivité extractible au CaCl_2 au cours des incubations de ^{14}C -simazine dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Parcelles et temps d'incubation	Simazine	Métabolites		
		M1	M2	M3
<i>Parcelle M80</i>				
0 j	73.5	1.4	16.9	8.3
28 j	0	0	2.0	98.0
56 j	0	0	0	100
90 j	0	0	0	100
<i>Parcelle M-B73</i>				
0 j	76.8	0	16.8	6.4
28 j	0	0	8.2	91.8
56 j	0	0	0	100
90 j	0	0	0	100
<i>Parcelle B65</i>				
0 j	73.5	1.4	16.9	8.3
28 j	33.3	0	6.5	60.3
56 j	14.7	0	15.9	69.4
90 j	6.4	0	14.2	79.4
<i>Parcelle D4</i>				
0 j	71.3	4.2	15.8	8.7
28 j	33.3	0	6.5	60.3
56 j	0	0	5.2	94.8
90 j	0	0	0	100
<i>Parcelle D10</i>				
0 j	73.2	0	18.7	8.1
28 j	0	0	3.7	96.3
56 j	0	0	0	100
90 j	0	0	0	100

Annexe 2.9. Caractérisation de la radioactivité extractible au **méthanol** au cours des incubations de ^{14}C -**simazine** dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Parcelles et temps d'incubation	Simazine	Métabolites		
		M1	M2	M3
<i>Parcelle M80</i>				
0 j	63.1	1.3	12.9	13.2
28 j	17.9	0	33.1	49.0
56 j	20.9	0	32.4	46.7
90 j	21.4	0	21.6	57.0
<i>Parcelle M-B73</i>				
0 j	69.1	0	15.9	14.3
28 j	34.3	0	15.2	50.5
56 j	32.6	0	33.2	34.2
90 j	30.6	0	24.1	45.4
<i>Parcelle B65</i>				
0 j	63.1	1.3	12.9	13.2
28 j	61.1	0	28.6	10.3
56 j	49.9	0	33.4	16.7
90 j	48.2	0	36.1	15.7
<i>Parcelle D4</i>				
0 j	68.7	0.7	8.1	22.5
28 j	0	0	0	100
56 j	16.1	6.9	26.6	33.3
90 j	0	0	0	100
<i>Parcelle D10</i>				
0 j	74.1	0	15.1	10.7
28 j	0	0	0	100
56 j	19.9	0	24.4	55.7
90 j	0	0	40.1	59.9

Annexe 2.10. Caractérisation de la radioactivité extractible au CaCl_2 au cours des incubations de ^{14}C -triticonazole dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Parcelles et temps d'incubation	Triticonazole	Métabolites	
		M1	M2
<u>Parcelle M80</u>			
0 j	91.2	4.4	4.4
28 j	77.8	18.1	4.1
56 j	89.0	6.4	4.6
90 j	74.2	17.4	7.1
<u>Parcelle M-B73</u>			
0 j	91.0	4.1	4.9
28 j	82.1	17.9	0
56 j	69.5	28.7	1.6
90 j	80.9	19.1	0
<u>Parcelle B65</u>			
0 j	87.8	9.0	3.2
28 j	82.2	17.8	0
56 j	78.4	18.9	2.7
90 j	50.6	35.7	13.7
<u>Parcelle D4</u>			
0 j	90.6	3.3	4.1
28 j	82.7	14.4	2.9
56 j	65.7	29.5	4.8
90 j	73.3	22.0	4.7
<u>Parcelle D10</u>			
0 j	89.3	3.2	5.5
28 j	90.5	7.4	1.8
56 j	75.2	21.5	3.3
90 j	69.1	27.1	3.5

Annexe 2.11. Caractérisation de la radioactivité extractible au **méthanol** au cours des incubations de ^{14}C -triticonazole dans les sols du plateau (M80, M-B73, B65) et du dispositif Dehérain (D4, D10). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité extractible.

Parcelles et temps d'incubation	Triticonazole	Métabolites	
		M1	M2
<i>Parcelle M80</i>			
0 j	100	0	0
28 j	81.6	10.9	6.4
56 j	65.1	20.7	14.2
90 j	69.2	19.1	11.6
<i>Parcelle M-B73</i>			
0 j	89.9	4.4	3.5
28 j	81.6	13.7	6.0
56 j	67.5	18.1	14.5
90 j	59.4	21.6	19.1
<i>Parcelle B65</i>			
0 j	91.8	3.9	2.1
28 j	73.4	13.2	11.6
56 j	61.7	17.9	19.3
90 j	50.7	20.2	29.1
<i>Parcelle D4</i>			
0 j	95.8	1.8	2.5
28 j	77.8	12.0	9.3
56 j	71.5	14.4	14.1
90 j	66.5	16.6	14.6
<i>Parcelle D10</i>			
0 j	93.7	2.7	1.3
28 j	87.8	5.5	6.7
56 j	71.1	14.1	12.9
90 j	70.2	16.3	12.0

Annexe 3

Annexe 3.1. Cinétiques de minéralisation de l'atrazine mesurées au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) en présence de différentes doses d'atrazine. Les résultats sont exprimés en $^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial supposé appliqué).

Jours	$^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial)				
	Monoculture de maïs		Monoculture de blé		
	D0.5	D25	D0.5	D5	D25
3	21.1 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1
7	58.0 ± 0.9	11.6 ± 1.2	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3
14	67.0 ± 1.0	37.5 ± 2.4	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.4	0.8 ± 0.3
21	69.2 ± 1.0	43.5 ± 2.6	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.5	1.3 ± 0.4
28	70.4 ± 1.0	45.2 ± 2.6	4.1 ± 0.2	4.6 ± 0.6	1.9 ± 0.4
31	70.8 ± 1.0	45.6 ± 2.6	4.8 ± 0.2	6.1 ± 0.6	2.5 ± 0.6
35	71.2 ± 1.0	45.0 ± 2.6	6.8 ± 0.4	13.2 ± 0.8	5.5 ± 2.0
42	71.8 ± 1.0	46.4 ± 2.6	11.2 ± 0.7	27.5 ± 1.3	19.4 ± 2.0
49	72.2 ± 1.0	46.6 ± 2.6	15.0 ± 0.8	34.2 ± 1.5	29.0 ± 2.1
56	72.5 ± 1.0	46.8 ± 2.6	17.9 ± 0.9	37.7 ± 1.6	33.6 ± 2.1
60	72.6 ± 1.0	46.9 ± 2.6	19.5 ± 0.9	40.4 ± 1.8	36.1 ± 2.2
64	72.7 ± 1.0	47.0 ± 2.6	21.2 ± 0.9	43.4 ± 1.9	38.8 ± 2.4
71	72.9 ± 1.0	47.1 ± 2.6	23.8 ± 0.9	46.3 ± 2.2	41.4 ± 2.4
78	73.1 ± 1.0	47.2 ± 2.6	25.7 ± 0.9	47.9 ± 2.2	42.8 ± 2.4
85	73.2 ± 1.0	47.3 ± 2.6	27.0 ± 0.9	48.9 ± 2.2	44.7 ± 2.4
92	73.3 ± 1.0	47.3 ± 2.6	28.3 ± 0.9	49.9 ± 2.2	44.7 ± 2.4
99	73.5 ± 1.0	47.4 ± 2.6	29.9 ± 0.9	51.1 ± 2.2	45.8 ± 2.4
106	73.6 ± 1.0	47.5 ± 2.6	30.7 ± 0.9	51.6 ± 2.2	46.2 ± 2.4
140	74.1 ± 1.0	47.8 ± 2.6	34.3 ± 0.9	53.9 ± 2.2	47.7 ± 2.4

Dans la figure 3.1, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 3.2. Vitesses de minéralisation de l'atrazine mesurées au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65) en présence de différentes doses d'atrazine. Les résultats sont exprimés en % ^{14}C initial supposé appliqué jour⁻¹.

Jours	% ^{14}C initial jour ⁻¹				
	Monoculture de maïs		Monoculture de blé		
	D0.5	D25	D0.5	D5	D25
3	7.04	0.21	0.07	0.05	0.04
7	9.23	2.75	0.12	0.11	0.03
14	1.29	3.7	0.16	0.17	0.08
21	0.31	0.85	0.17	0.20	0.07
28	0.17	0.24	0.15	0.20	0.09
31	0.14	0.14	0.25	0.49	0.19
35	0.11	0.09	0.48	1.78	0.75
42	0.08	0.05	0.63	2.04	2.00
49	0.06	0.04	0.55	0.96	1.37
56	0.04	0.03	0.41	0.50	0.65
60	0.03	0.02	0.39	0.67	0.62
64	0.03	0.02	0.44	0.76	0.67
71	0.03	0.02	0.37	0.42	0.38
78	0.02	0.01	0.27	0.23	0.20
85	0.02	0.01	0.19	0.15	0.14
92	0.02	0.01	0.18	0.14	0.13
99	0.03	0.02	0.24	0.17	0.15
106	0.01	0.01	0.10	0.07	0.05
140	0.02	0.01	0.11	0.07	0.05

Dans la figure 3.2, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 3.3. Distribution de la radioactivité initiale provenant de la ^{14}C -atrazine, entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol et la fraction non extractible (résidus liés) en fin d'incubation de longue durée dans les sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65), en présence de différentes doses d'atrazine (D0.5, D5, D25). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale supposée appliquée.

	Minéralisée	Extractible au CaCl_2	Extractible au méthanol	Résidus liés
<u>Monoculture de maïs</u>				
D0.5	74.1 ± 1.0	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	5.9 ± 0.2
D25	47.8 ± 2.6	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0
<u>Monoculture de blé</u>				
D0.5	34.3 ± 1.0	5.1 ± 0.7	11.1 ± 1.5	34.1 ± 0.2
D5	53.9 ± 2.2	1.5 ± 0.1	4.2 ± 0.4	23.0 ± 0.3
D25	47.7 ± 2.4	1.1 ± 0.2	2.1 ± 0.3	16.3 ± 0.5

Dans le tableau 3.3, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 3.4. Cinétiques et vitesses de minéralisation de l'atrazine mesurées au cours des incubations de sols provenant de la monoculture de maïs (M62)
 Les résultats sont exprimés en $^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial) supposé appliqué pour les cinétiques de minéralisation et en % ^{14}C initial jour $^{-1}$ pour les vitesses de minéralisation.

	$^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial)						% ^{14}C initial jour $^{-1}$					
	Jours	3	7	14	21	28	3	7	14	21	28	
<u>Première application</u>												
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)		18.8 ± 1.9	58.3 ± 2.0	68.7 ± 2.1	71.5 ± 2.1	72.8 ± 2.1	6.26	9.87	1.49	0.40	0.18	
25 mg kg $^{-1}$ (D25)		0.8 ± 0.1	13.5 ± 0.6	41.4 ± 2.2	49.6 ± 2.7	52.6 ± 2.9	0.26	3.17	4.00	1.16	0.43	
<u>Deuxième application</u>												
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)		58.1 ± 2.0	72.3 ± 2.2	75.9 ± 2.2	77.0 ± 2.2	77.8 ± 2.2	19.37	3.55	0.51	0.16	0.11	
25 mg kg $^{-1}$ (D25)		26.8 ± 0.9	49.1 ± 1.6	54.9 ± 2.0	56.6 ± 2.0	57.8 ± 2.1	8.94	5.58	0.82	0.24	0.17	
<u>Troisième application</u>												
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)		60.1 ± 4.4	74.2 ± 4.9	77.9 ± 4.9	79.1 ± 4.9	79.8 ± 4.9	20.03	3.52	0.54	0.16	0.11	
25 mg kg $^{-1}$ (D25)		29.6 ± 2.9	50.2 ± 3.1	57.6 ± 3.1	59.1 ± 3.1	60.0 ± 3.1	9.87	5.14	1.06	0.21	0.13	
<u>Quatrième application</u>												
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)		46.8 ± 4.9	60.8 ± 5.0	65.8 ± 5.1	67.1 ± 5.1	67.6 ± 5.1	15.61	3.50	0.72	0.17	0.08	
25 mg kg $^{-1}$ (D25)		32.2 ± 1.6	48.4 ± 2.2	55.2 ± 2.3	56.3 ± 2.3	56.8 ± 2.3	10.74	4.03	0.98	0.16	0.06	
<u>Cinquième application</u>												
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)		54.0 ± 8.4	72.3 ± 10.2	76.3 ± 10.3	77.5 ± 10.3	78.2 ± 10.3	17.99	4.58	0.57	0.18	0.09	
25 mg kg $^{-1}$ (D25)		25.2 ± 2.3	38.2 ± 3.2	43.9 ± 3.6	45.1 ± 3.7	45.7 ± 3.7	8.41	3.26	0.81	0.18	0.08	

Dans les figures 3.3 et 3.4, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 3.5 : Distribution de la radioactivité provenant de la ¹⁴C-atrazine, entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl₂ et au méthanol et la fraction non extractible (résidus liés) en fin d'incubation dans les sols de la monoculture de maïs (M62), en présence de différentes doses d'atrazine (D0.5, D5, D25) après cinq applications successives. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale supposée apportée.

Traitements	Minéralisée					Bilan	
	Extractible au CaCl ₂	Extractible au méthanol	Résidus liés	% ¹⁴ C-atrazine initiale			
<u>Première application</u>							
D0.5	72.8 ± 2.1	1.3 ± 0.2	nd*	nd	-	-	
D25	52.6 ± 2.9	2.4 ± 1.0	nd	nd	-	-	
<u>Deuxième application</u>							
D0.5	77.8 ± 2.2	0.7 ± 0.1	nd	nd	-	-	
D25	57.8 ± 2.1	1.1 ± 0.3	nd	nd	-	-	
<u>Troisième application</u>							
D0.5	79.8 ± 4.9	0.6 ± 0.1	nd	nd	-	-	
D25	60.0 ± 3.1	0.4 ± 0.1	nd	nd	-	-	
<u>Quatrième application</u>							
D0.5	67.6 ± 5.1	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	4.1 ± 0.0	74.7		
D25	56.8 ± 2.3	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.0 ± 0.0	60.2		
<u>Cinquième application</u>							
D0.5	78.2 ± 10.3	1.0 ± 0.1	2.6 ± 0.2	4.9 ± 0.1	86.7		
D25	45.7 ± 3.7	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.8 ± 1.0	50.2		

* non déterminé ; dans le tableau 3.6, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 3.6. Cinétiques et vitesses de minéralisation de l'atrazine mesurées au cours des incubations de sols provenant de la monoculture de blé (B65) Résultats exprimés en $^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial) supposé appliqué pour les cinétiques de minéralisation et en % ^{14}C initial jour $^{-1}$ pour les vitesses de minéralisation.

	$^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial)							% ^{14}C initial jour $^{-1}$						
	Jours	3	7	14	21	28	3	7	14	21	28			
Première application														
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1	3.7 ± 0.2	5.0 ± 0.2	0.08	0.16	0.21	0.19	0.17				
5 mg kg $^{-1}$ (D5)	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.4 ± 0.2	4.2 ± 0.3	5.9 ± 0.3	0.06	0.15	0.23	0.25	0.24				
25 mg kg $^{-1}$ (D25)	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.5 ± 0.2	0.03	0.03	0.08	0.11	0.13				
Deuxième application														
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)	1.2 ± 0.2	3.1 ± 0.8	6.1 ± 1.5	8.7 ± 1.8	11.5 ± 2.0	0.39	0.48	0.43	0.36	0.40				
5 mg kg $^{-1}$ (D5)	1.3 ± 0.2	4.3 ± 1.4	11.3 ± 3.5	17.0 ± 3.8	23.3 ± 3.9	0.43	0.74	1.00	0.82	0.90				
25 mg kg $^{-1}$ (D25)	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.0 ± 0.4	4.9 ± 0.6	7.6 ± 0.8	0.14	0.19	0.25	0.28	0.39				
Troisième application														
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)	12.9 ± 4.8	35.6 ± 5.2	53.5 ± 5.5	55.4 ± 5.5	59.6 ± 5.6	4.28	5.70	2.56	0.27	0.60				
5 mg kg $^{-1}$ (D5)	15.7 ± 7.0	47.3 ± 8.3	64.2 ± 9.7	65.8 ± 9.7	68.1 ± 9.7	5.22	7.91	2.41	0.23	0.33				
25 mg kg $^{-1}$ (D25)	18.6 ± 8.9	45.1 ± 9.2	58.7 ± 10.3	60.1 ± 10.3	62.4 ± 10.3	6.19	6.63	1.95	0.20	0.33				
Quatrième application														
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)	57.5 ± 5.7	73.8 ± 6.7	80.1 ± 6.7	82.3 ± 6.8	83.4 ± 6.8	19.16	4.07	0.91	0.30	0.03				
5 mg kg $^{-1}$ (D5)	51.2 ± 1.7	66.4 ± 2.6	70.0 ± 2.7	70.9 ± 2.7	71.4 ± 2.7	17.08	3.80	0.51	0.13	0.07				
25 mg kg $^{-1}$ (D25)	39.9 ± 1.2	56.7 ± 1.7	62.9 ± 2.2	64.5 ± 2.3	64.6 ± 2.3	13.30	4.19	0.89	0.23	0.06				
Cinquième application														
0.5 mg kg $^{-1}$ (D0.5)	60.5 ± 3.2	76.7 ± 3.9	81.7 ± 3.9	83.5 ± 3.9	84.5 ± 3.9	20.18	4.03	0.72	0.27	0.14				
5 mg kg $^{-1}$ (D5)	42.5 ± 3.1	60.6 ± 3.4	66.0 ± 3.4	67.4 ± 3.4	68.0 ± 3.4	14.16	4.52	0.78	0.20	0.08				
25 mg kg $^{-1}$ (D25)	29.3 ± 0.2	45.3 ± 1.5	51.3 ± 2.1	53.2 ± 2.2	54.2 ± 2.2	9.78	4.00	0.85	0.28	0.14				

Dans les figures 3.3 et 3.4, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 3.7. Distribution de la radioactivité provenant de la ^{14}C -atrazine, entre la fraction minéralisée, les fractions extractibles au CaCl_2 et au méthanol et la fraction non extractible (résidus liés) en fin d'incubation dans les sols de la monoculture de blé (B65), en présence de différentes doses d'atrazine (D0.5, D5, D25) après cinq applications successives. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale supposée apportée.

Traitements	Minéralisée	Extractible au CaCl_2	Extractible au méthanol	Bilan	
				Résidus liés	Bilan
	()	
	%			% ^{14}C -atrazine initiale	
<u>Première application</u>					
D0.5	5.0 ± 0.2	6.8 ± 1.1	nd*	nd	-
D5	5.9 ± 0.3	25.4 ± 4.6	nd	nd	-
D25	2.5 ± 0.2	34.2 ± 2.3	nd	nd	-
<u>Deuxième application</u>					
D0.5	11.5 ± 2.0	25.2 ± 1.0	nd	nd	-
D5	23.3 ± 3.9	21.0 ± 7.8	nd	nd	-
D25	7.6 ± 0.82	40.2 ± 1.6	nd	nd	-
<u>Troisième application</u>					
D0.5	59.6 ± 5.5	4.7 ± 0.5	nd	nd	-
D5	68.1 ± 9.7	1.4 ± 0.7	nd	nd	-
D25	62.4 ± 10.3	0.9 ± 0.2	nd	nd	-
<u>Quatrième application</u>					
D0.5	83.4 ± 6.8	2.8 ± 0.6	5.2 ± 0.8	7.4 ± 0.1	98.8
D5	71.4 ± 2.7	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2	77.1
D25	64.9 ± 2.3	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1	69.3
<u>Cinquième application</u>					
D0.5	84.5 ± 3.9	1.6 ± 0.3	5.5 ± 0.1	6.3 ± 0.0	97.9
D5	68.0 ± 3.4	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1	74.0
D25	54.2 ± 2.2	0.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1	58.7

* non déterminé ; dans le tableau 3.9, les résultats sont corrigés en fonction de la radioactivité totale récupérée en fin d'incubation.

Annexe 4

Annexe 4.1 : Cinétiques de minéralisation de la ^{14}C -atrazine, au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale apportée.

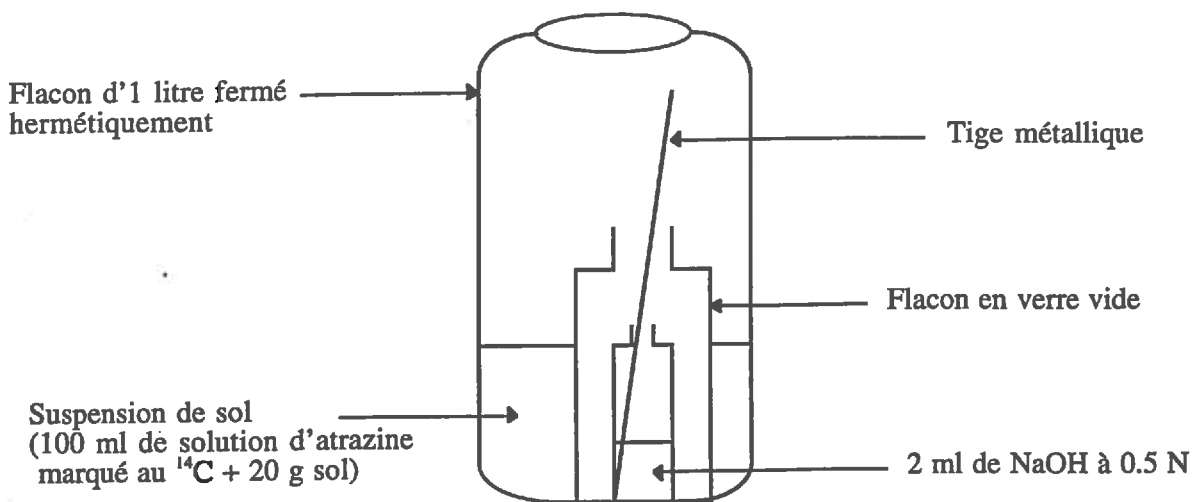
Temps (jours)	Monoculture de maïs	Monoculture de blé
	(————— $^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial) —————)	
0	0	0
0.2	0.1 ± 0.0	0.03 ± 0.01
1	1.0 ± 0.1	0.09 ± 0.01
2	4.0 ± 0.3	0.12 ± 0.01
3	14.6 ± 0.8	0.15 ± 0.01
4	34.0 ± 1.1	0.17 ± 0.01
5	49.6 ± 1.2	0.19 ± 0.01
6	57.8 ± 1.3	0.22 ± 0.01
7	62.3 ± 1.3	0.25 ± 0.01
10	68.4 ± 1.3	0.34 ± 0.01
14	71.3 ± 1.3	0.47 ± 0.02
20	73.2 ± 1.3	0.69 ± 0.03

Annexe 4.2 : Comparaison de la dégradation de l'atrazine en milieu liquide et solide

Protocole d'incubation en milieu liquide

Des incubations en milieu liquide sont réalisées avec 20 g de sol sec des deux mêmes parcelles de Grignon utilisées au chapitre 4 : la parcelle M62 sous monoculture de maïs et la parcelle B65 sous monoculture de blé, dans 100 ml ^{14}C -atrazine à 0.1 mg l^{-1} et 0.40 MBq l^{-1} , dans des flacons d'un litre fermés hermétiquement. Un pilulier en verre est introduit dans le flacon avec un autre petit pilulier contenant 2 ml de NaOH à 0.5 N (annexe 4.2.1). Les flacons sont incubés à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, en agitation sur une table d'agitation (AS 850, LSL Biolafitte SA) à 80 trs min^{-1} . Un témoin sans sol est incubé seulement avec 100 ml de la solution d'atrazine. Trois répétitions sont réalisées. Le $^{14}\text{C-CO}_2$ est mesuré dans les 2 ml de NaOH après 5h d'incubation et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 20 jours d'incubation.

Annexe 4.2.1 : Schéma du dispositif d'incubation du ^{14}C -atrazine en milieu liquide



Comparaison de cinétiques de minéralisation de l'atrazine en milieu solide et liquide

Les cinétiques de minéralisation de l'atrazine ont la même allure au cours des incubations en milieu solide et liquide. La minéralisation est toujours rapide et plus importante dans le sol

provenant de la monoculture de maïs (annexe 4.2.2., annexe 4.2.3). Dans ce sol, les taux de minéralisation de l'atrazine sont de 73% et 69% de la radioactivité initiale, respectivement en milieu solide et liquide après 20 jours d'incubation. Néanmoins, cette minéralisation démarre un peu plus lentement en milieu liquide et la vitesse de minéralisation n'est maximale qu'au 6^{ème} et 7^{ème} jours d'incubation, alors qu'en milieu solide elle atteint sa vitesse maximale au 4^{ème} jour d'incubation (annexe 4.2.4). En revanche dans la monoculture de blé, la minéralisation de l'atrazine est très faible pendant toute la durée de l'incubation dans les deux milieux, elle atteint en moyenne seulement 0.65 % de la radioactivité apportée initialement. Dans le milieu liquide non ensemencé la minéralisation de l'atrazine est nulle.

L'analyse des métabolites de l'atrazine formés au cours des incubations en milieu liquide est suivie dans les deux sols (annexes 4.2.5 et 4.2.6). Dans le sol de la monoculture de maïs, l'atrazine reste le principal composé présent dans le milieu pendant les cinq premiers jours d'incubation, avec une diminution de sa proportion. Après 10 jours d'incubation, l'atrazine n'est plus détectée dans le milieu. L'hydroxyatrazine et la déisopropylatrazine sont absentes tout le long de la durée de l'incubation. Les proportions de la dééthylatrazine et de la dééthyl-déisopropylatrazine augmentent au cours de l'incubation. En revanche dans la monoculture de blé, l'atrazine reste le principal composé présent dans le milieu pendant toute la durée de l'incubation, avec l'apparition de faibles quantités d'hydroxyatrazine, et de déisopropylatrazine. La dééthylatrazine s'accumule en proportion plus élevée dans le milieu. La dééthyl-déisopropylatrazine apparaît en fin d'incubation. Les concentrations en métabolites sont différentes par rapport à celles observées lors des incubations en milieu solide. Il semble que la dégradation de l'atrazine soit ralentie en milieu liquide.

Annexe 4.2.3 : Comparaison entre les cinétiques de minéralisation de la ^{14}C -atrazine, au cours des incubations de sols provenant des monocultures de maïs (M62) et de blé (B65), en milieu solide et liquide. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale apportée.

Temps (jours)	Monoculture de maïs		Monoculture de blé	
	Milieu solide	Milieu liquide	Milieu solide	Milieu liquide
	($\text{---}^{14}\text{C-CO}_2$ (% ^{14}C initial ---))			
0	0	0	0	0
0.2	0.1 ± 0.0	0	0.03 ± 0.01	0
1	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.0
2	4.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01
3	14.6 ± 0.8	3.9 ± 0.6	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01
4	34.0 ± 1.1	9.6 ± 0.6	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01
5	49.6 ± 1.2	18.4 ± 1.8	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01
6	57.8 ± 1.3	30.7 ± 2.8	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01
7	62.3 ± 1.3	43.3 ± 3.0	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.01
10	68.4 ± 1.3	59.9 ± 3.2	0.34 ± 0.01	0.25 ± 0.02
14	71.3 ± 1.3	66.2 ± 3.3	0.47 ± 0.02	0.31 ± 0.03
20	73.2 ± 1.3	68.9 ± 3.3	0.69 ± 0.03	0.64 ± 0.24

Annexe 4.2.5 : Evolution de la répartition de la radioactivité initiale de la ^{14}C -atrazine entre l'atrazine et ses métabolites, au cours de l'incubation en milieu liquide du sol provenant de la monoculture de maïs (M62) en milieu liquide. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale apportée. Les métabolites analysés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyldeisopropylatrazine (DEIA).

Temps (jours)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(----- en % du ^{14}C initial -----)				
0	100	0	0	0	0
0.2	100	0	0	0	0
1	97.5	0	0	0	0
3	85.1	0	1.9	0	9.7
5	69.3	0	0	0	20.2
7	7.5	0	0.5	0	6.6
10	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0

Annexe 4.2.6 : Evolution de la répartition de la radioactivité initiale de la ^{14}C -atrazine entre l'atrazine et ses métabolites, au cours de l'incubation en milieu liquide du sol provenant de la monoculture de blé (B65) en milieu liquide. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité initiale apportée. Les métabolites analysés sont : l'hydroxyatrazine (HYA), la dééthylatrazine (DEA), la déisopropylatrazine (DIA) et la dééthyldeisopropylatrazine (DEIA).

Temps (jours)	Atrazine	HYA	DEA	DIA	DEIA
	(----- en % du ^{14}C initial -----)				
0	100	0	0	0	0
0.2	100	0	0	0	0
1	97.5	0	0	0	0
3	93.4	1.1	3.6	0	0
5	92.7	0	3.6	0	0
7	91.2	0	5.2	1.4	0
10	88.2	1.0	6.6	1.0	0
14	84.1	21.8	8.7	1.1	0
20	79.4	1.2	9.9	1.6	1.2

Annexe 4.3 : Méthode d'isolement de souches bactériennes dégradant l'atrazine

Méthode A

Le sol utilisé pour cette expérience provient de la parcelle du dispositif expérimental "Dehérain" étudié dans les chapitres 1 et 2 : la monoculture de maïs (D4). Le milieu utilisé est le même milieu déjà cité dans le chapitre 2 mais sans citrate de sodium et sans saccharose, avec une concentration en atrazine de 25 mg l^{-1} . Ce milieu sera cité par la suite comme MSA. Une suspension-dilution à 10^{-2} est préparée à partir d'une suspension-dilution du sol à 10^{-1} (10 g de sol frais + 90 ml de NaCl). Dans des petits flacons en pyrex stériles de 50 ml, 18 ml du MSA additionnés de 2 ml de la suspension-dilution du sol à 10^{-2} sont incubés à 28°C sans agitation à raison de 5 répétitions. Des flacons témoins sont incubés seulement avec 20 ml du MSA. Une fois que l'atrazine est dégradée dans le milieu, 20 ml du MSA frais sont inoculés avec 0.5 ml de la suspension dégradante et mis à incuber dans les mêmes conditions.

Un autre enrichissement est réalisé avec 0.5 ml de la suspension dégradante du MSA dans 20 ml d'un autre milieu utilisé par Mandelbaum (communication personnelle), avec une concentration plus élevée en atrazine à 100 mg l^{-1} , ce milieu contient par litre : K_2HPO_4 , 1.6 g ; KH_2PO_4 , 0.4 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g ; NaCl, 0.1 g ; CaCl_2 , 0.025 g ; citrate de sodium, 2g. Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min. A ce milieu 20 ml d'une solution de sels / vitamines sont ajoutés. Cette solution de sels / vitamines contient : 10 g d'acide nitriloacétique dissous dans 700 ml d'eau puis neutralisé avec KOH, 14.45 g de MgSO_4 , 9.25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg d'acide nicotinique, 0.5mg de biotine, 25 mg thiamine-HCl et 44 ml d'une solution contenant (par litre) : EDTA, 2.5 g ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.0 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 g ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.54 g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.75 g ; $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g ; quelques gouttes de H_2SO_4 concentré pour éviter la précipitation des sels. La solution de sels / vitamines est stérilisée par filtration à 0.22μ et stockée à 4°C jusqu'à son utilisation. Le pH du milieu est ajustée à 6.6-6.8. 500 mg d'atrazine technique sont dissous dans 25 ml de méthanol à l'ultrason (Branson 2200). Les 20 ml de la solution de sels / vitamines et 5 ml de la solution d'atrazine préparée dans le méthanol sont apportés dans le milieu autoclavé le jour de leur utilisation. Par la suite ce milieu sera cité par MCA.

L'étape d'enrichissement est effectuée 3 fois de suite pour les deux milieux. La concentration de l'atrazine est suivie par analyse en CLHP avec la même méthode utilisée dans le chapitre 2 (sans le détecteur de la radioactivité) après un prélèvement de 1 ml de la suspension incubée et filtration à 0.22μ . Le volume d'injection est de $50 \mu\text{l}$. Après ces étapes d'enrichissement en

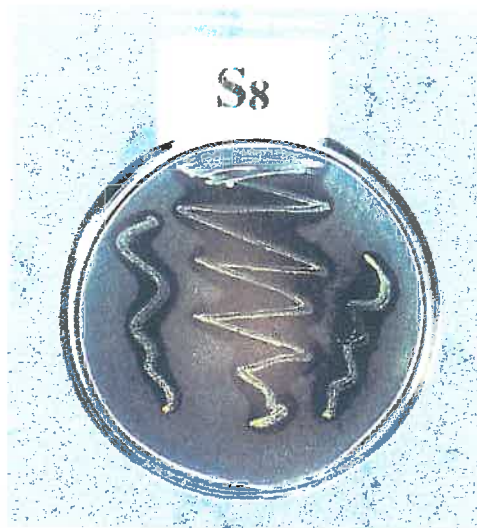
milieu liquide, les suspensions finales d'enrichissement sont étalées sur milieu gélosé, afin d'obtenir des colonies de microorganismes isolées. Pour cela les mêmes milieux (MSA et MCA) sont utilisés avec l'addition de 15 g l⁻¹ d'Agar technique (Difco, USA). Quand la température du MCA est au dessous de 70°C après l'autoclavage, les sels / vitamines et l'atrazine sont apportés, bien homogénéisés puis MCA est réparti sur des boîtes de Pétri. Une fois que le milieu est solidifié, les boîtes de Pétri sont ensemencées à l'aide d'une anse en stries à partir du dernier enrichissement en milieu liquide. Egalement, un autre repiquage est fait sur des boîtes du MCA à partir des boîtes du MSA (passage de 25 mg l⁻¹ à 100 mg l⁻¹ en atrazine). D'autres boîtes de Pétri sont préparées avec du MCA mais avec une concentration en atrazine de 500 mg l⁻¹ apportés dans 10 ml de méthanol. Ces boîtes à 500 mg l⁻¹ d'atrazine sont ensemencées à partir du dernier repiquage sur boîtes à 100 mg l⁻¹. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 25°C jusqu'à la croissance de la microflore microbienne. La sélection des souches est effectuée au vue des halos de dissolution (voir photos ci-jointes).

Méthode B

Une deuxième méthode d'enrichissement décrite par Goux (communication personnelle) est utilisée. Le milieu d'enrichissement est un milieu minéral amendé avec de l'atrazine à 20 mg l⁻¹, tamponné à pH 6.8 et stérilisé par autoclavage à 120°C. Ce milieu contient les sels suivants (par litre) : MoNa₂O₄.2H₂O, 969 µg ; MnSO₄.H₂O, 423 µg ; FeSO₄.7H₂O, 278 µg ; CaCl₂.6H₂O, 119 µg ; ZnSO₄.7H₂O, 114 µg ; Fe₂(SO₄)₃, 200 µg ; Al₂(SO₄)₃, 333 µg ; NiSO₄, 76 µg ; CuSO₄, 80 µg ; H₃BO₃, 31 µg ; MgSO₄.7H₂O, 0.1 g ; KH₂PO₄, 1.7 g ; CaSO₄.2H₂O, 0.031 g. Ce milieu sera cité par la suite comme MBA.

Dans des erlenmeyers stériles de 250 ml, 20 g de sol frais provenant de la parcelle de la monoculture de maïs (M62) du dispositif "plateau" (utilisé dans le chapitre 3), sont dilués dans 40 ml d'eau stérile. Six répétitions sont réalisées. Ces erlenmeyers sont fermés par du coton cardé et soumis à agitation pendant 60 min (60 trs min⁻¹) sur une table d'agitation à 25°C. Après 40 ml de MBA sont ajoutés à cette suspension et elle est remise à incuber toujours sous agitation à la même température. Lorsque l'atrazine est dégradée, 9 ml du MBA frais sont inoculés avec 1 ml de la suspension dégradante, dans des tubes à vis en verre de 15 ml, et la nouvelle suspension est incubée dans les mêmes conditions que précédemment. Cette étape est effectuée trois fois pour enrichir le milieu par la microflore dégradante, après vérification de la dégradation complète de l'atrazine dans le milieu. Par la suite, des suspensions-dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶ sont préparées à partir du dernier enrichissement (0.5 ml de la suspension dégradante dans 4.5 ml de NaCl à 8.5 g l⁻¹) afin d'inoculer du MBA frais avec une série de suspension-dilution allant de 10⁻¹ à 10⁻⁷ (1 ml dans 9 ml du MBA frais). La suspension-dilution 10⁻¹ est inoculée directement à partir de la dernière suspension enrichie dégradante. Après un temps d'incubation dans les mêmes conditions de ces suspensions-dilutions, la suspension-dilution

Les souches isolées à partir d'un sol provenant d'une parcelle de monoculture de maïs à Grignon avec l'observation des halos de dissolution.



dégradante la plus diluée est reprise pour poursuivre l'enrichissement en la réinoculant dans du MBA frais (rapport 1 : 10), et incubée à nouveau toujours dans les mêmes conditions d'incubation. La concentration de l'atrazine est suivie par analyse en CLHP comme précédemment (méthode A).

Après cette étape d'enrichissement en milieu liquide, la suspension finale de cet enrichissement est étalée sur milieu gélosé, pour obtenir des colonies de microorganismes isolées. Pour cela des boîtes de Pétri sont préparées avec le milieu MCA à 100 mg l⁻¹ et d'autres avec le milieu B de King (Merck) qui est composé de (par litre) : peptone de caséine, 10.0 g ; peptone de viande, 10.0 g ; glycérine, 10.0 g ; MgSO₄.7H₂O, 1.5 g ; K₂HPO₄, 1.5 g ; Agar, 12.0 g. Trois repiquages sont faits sur boîtes avec MCA à 100 mg l⁻¹ d'atrazine. Après comme précédemment, des boîtes avec MCA à 500 mg l⁻¹ d'atrazine sont ensemencées à partir du dernier repiquage sur boîtes à 100 mg l⁻¹, et laissées incuber à 25°C.