

Etude de la biodégradation accélérée du lindane dans le sol

M. Bennaceur*, J. Bastide** & C.M. Coste**

Keywords: Lindane - Treatments - Rapid Degradation - Soil - Microorganism.

Résumé

Une biodégradation rapide du lindane a été observée dans les sols traités plusieurs fois avec l'insecticide. Le taux de disparition du lindane augmente avec la fréquence des applications. Il s'est constitué probablement une microflore progressivement adaptée qui est à l'origine de ce phénomène.

Une bactérie Bacillus sp., responsable de la biodégradation rapide du produit a été isolée.

Summary

Rapid Biodegradation of Lindane Soil

The rapid degradation of lindane in soils after multiple treatments was studied under laboratory conditions. The rate of lindane disappearance increased with the increase in the frequency of application. After the fourth application of lindane, more than 85% of the applied chemical was lost within 8 weeks (70% in control soil). The rapid loss of lindane in the field for the long term experiment itself suggested that some lindane decomposing microorganisms had accumulated.

A bacteria (Bacillus sp) was isolated as lindane decomposing microorganism.

Introduction

Certains pesticides sont considérés comme les composés chimiques persistants, relativement moins tolérés dans la biocénose et pouvant présenter des risques d'accumulation dans l'environnement. Des travaux récents cependant, ont montré que cette persistance était réduite dans les pays tropicaux et chauds où les conditions climatiques sont différentes et l'activité microbienne des sols beaucoup plus complexe (6,10). Une dissipation rapide du produit peut également s'opérer dans les sols possédant un historique de traitement, pouvant donner lieu par ailleurs à un phénomène d'adaptation et à une perte d'efficacité du traitement.

Cela était le cas par exemple pour le diazinon qui présentait une cinétique de dégradation plus rapide lors des traitements successifs des sols (1), du méthyl parathion dans les sols des rizières (8) ainsi que du carbofuran sur des sols sablo-argileux (2).

Les données sur le phénomène de la biodégradation accélérée et des bactéries dégradant les insecticides organochlorés sont assez mal connues et la persistance du phénomène d'adaptation des sols a fait l'objet d'un nombre réduit d'études malgré l'importance agronomique croissante de ce problème.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier ce phénomène sur des sols provenant d'une parcelle algérienne traitée pendant trois années consécutives avec le lindane et d'une parcelle sénégalaise traitée par le même produit mais de manière irrégulière.

Matériel et méthodes

Pesticide

Le lindane (isomère gamma, 1,2,3,4,5,6 hexachlorocyclohexane), poudre mouillable 5% est fourni par Asmidal (Algérie). Le lindane standard 2 ppm provient de l'AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique). Une gamme d'étalons établie à partir du standard est préparée à partir de la solution mère.

Sols

Les sols proviennent de deux régions pédoclimatiques différentes. Le premier sol provient de la station expérimentale de l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) à Alger. Le second sol provient d'une parcelle agricole près de la capitale sénégalaise Dakar. Des sols non traités issus des mêmes parcelles ont servi de témoins. Les sols sont prélevés et tamisés à 2 mm puis stockés à 4°C jusqu'à analyse. Un mélange de 20% de sol traité (T) et de 80% de sol non traité (NT) est effectué pour les sols des deux régions.

Méthode

20 g de sol contenant 12 µg de lindane pur dilué dans l'eau distillée sont introduits dans chaque flacon de 125 ml (4 flacons par analyse). Les sols préalablement tamisés sont bien mélangés de manière à bien homogénéiser le produit et l'humidité de chaque sol est ramenée à 22%. Les flacons sont fermés à l'aide de parafilm et placés dans un incubateur à 30°C. Une procédure similaire est effectuée pour le sol non traité et le mélange des deux sols (T et NT). Une opération

* Division agrochimie, CDTN, 2 Bd Frantz Fanon, Alger, Algérie.

** Centre de phytopharmacie, Université de Perpignan, France.

Reçu le 20.08.97 et accepté pour publication le 22.04.98.

identique est répétée pour le sol sénégalais. Les analyses sont effectuées le 1^{er} jour et la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, 6^{ème} et 8^{ème} semaine après application du produit. L'effet de la stérilisation par autoclavage des sols à 120°C pendant 20 mn sur la dégradation du lindane a également été effectuée.

Extraction

L'extraction est effectuée par agitation magnétique pendant une heure utilisant un mélange acetone-hexane (V-V,1-1). Le mélange est centrifugé à 15000 tr/min pendant 10 mn, filtré et évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans 20 ml d'hexane pur et analysé par chromatographie phase gaz (GC Girdel muni d'un ECD). Les conditions opératoires sont les suivantes: température de colonne: 200°C, température d'injection: 240°C, température de détection: 300°C, colonne capillaire chromapack, pression 1 bar, gaz: azote pur.

Le rendement d'extraction des sols contaminés volontairement par une concentration connue de lindane est estimé à 89% de moyenne.

Sélection des microorganismes dégradants le lindane.

Le milieu de culture (table 1) saturé en lindane (5 ppm) après agitation magnétique à 70°C et aseptiquement filtré, sur membrane millipore 0.22 µm est utilisé comme milieu pour l'enrichissement des bactéries dégradants le lindane et l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie.

Tableau 1
Composition du milieu de culture

K ₂ HPO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	1g
NH ₄ NO ₃	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	5mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	5mg
Eau distillée	1000 ml
pH	7

Chaque fraction de 10 ml du milieu est placée dans un tube à essai auquel est inoculé 0,01 g de sol adapté.

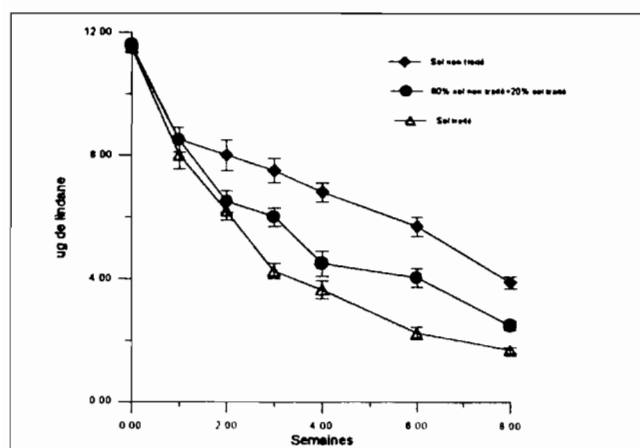


Figure 1. - Biodégradation du lindane sur le sol de l'ITGC (Alger)

Les tubes à essai sont incubés à 30°C en agitation continue et la détermination du produit est effectuée par GC toutes les 24 h après extraction à l'hexane. Dès que 80-90% de l'insecticide est dégradé, un volume de 0,1 ml de la solution du milieu est prélevé puisensemencé dans un nouveau milieu de culture et placé dans un agitateur comme précédemment. Cette procédure est répétée une dizaine de fois jusqu'à enrichissement du milieu en bactéries dégradantes (7).

L'agar purifié, est dissous dans le milieu de culture (1,5%) pour la préparation des boîtes de Pétri. Préalablement, la solution du milieu est stérilisée par autoclavage à 120°C pendant 20 mn. Les boîtes sont inoculées avec une portion du milieu de culture enrichi et la surface des boîtes est recouverte par une pulvérisation de lindane à l'aide d'une solution d'ether saturée en lindane à 10% selon la méthode de Kiyokama (4). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant plusieurs jours. Les colonies de bactéries avec une zone claire sont échantillonnées puis transférées dans un nouveau milieu de culture sur des boîtes de Pétri, recouvertes du produit et incubées comme précédemment. Cette procédure est répétée de manière à purifier les bactéries décomposant le lindane.

Le nombre de bactéries dégradant le lindane peut être compté, selon la méthode MPN (5) utilisant le même milieu de culture saturé de lindane.

Des échantillons de sol, collectés des deux sous-parcelles ITGC (T et NT) puis tamisés à 2 mm sont utilisés. 1 g de sol est mélangé à 10 ml du milieu de culture par agitation magnétique pendant 10 mn. Les dilutions suivantes sont effectuées: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ à partir de la solution initiale (5 tubes par dilution). Les tubes sont incubés à 30°C pendant 4 semaines en agitation continue. Après incubation, les résidus de lindane sont déterminés par chromatographie gazeuse.

Inoculation des sols non adaptés.

Des échantillons de sols n'ayant jamais fait l'objet de traitements préalables au lindane sont utilisés pour l'inoculation. Les sols sont tamisés puis inoculés par une portion du milieu de culture enrichi, préalablement centrifugé. Le résidu est repris dans de l'eau distillée. Les flacons contenant 20 g de sol et 12 µg de lindane

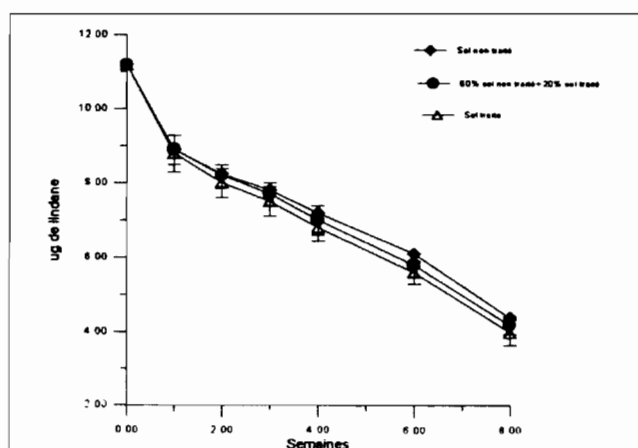


Figure 2. - Biodégradation du lindane sur le sol de Dakar

sont incubés à 30°C. L'extraction et l'analyse sont effectuées selon la méthode décrite précédemment. Le test de student t à été utilisé pour le calcul statistique.

Résultats et discussion

Les figures 1 et 2 représentent respectivement les cinétiques de dégradation du lindane dans les sols algérien et sénégalais. Le premier sol présente une biodégradation significativement plus rapide pour le sol adapté à partir de la 2ème semaine ($p < 0.005$). La disparition du produit est également élevée après l'inoculation de 20% du sol adapté. Cette étude concorde avec celle de Wada (9) où une biodégradation accélérée du produit a été constatée par l'inoculation de 10% de sol adapté. Cette observation n'a pas été cependant confirmée dans le cas du sol sénégalais où la différence entre la dégradation des deux sols (T et NT) n'était pas significative ($p > 0.1$), probablement en raison des traitements ultérieurs irréguliers et d'une microflore non progressivement adaptée.

La biodégradation accélérée peut être fonction de l'importance de la priorité adaptative que constitue pour les bactéries leur possibilité à décomposer ce produit (microflore progressivement adaptée) et cette priorité peut prendre la forme d'une capacité d'utilisation du produit comme source de carbone, ce qui semblerait être le cas pour le premier sol où les traitements ont été appliqués régulièrement et successivement pendant 3 années. La croissance de la population bactérienne ne semble pas être modifiée par la présence du lindane lorsque la biodégradation ne donne aucun avantage adaptatif aux bactéries. A ce moment, la vitesse de réaction serait constante en fonction du temps en raison probablement de l'absence d'une microflore du sol adapté comme cela pouvait être le cas pour le second sol. Le phénomène de biodégradation de ces insecticides par une microflore progressivement adaptée pose le problème de la persistance de cette priorité adaptative dans les sols traités, particulièrement dans la perspective d'applications ultérieures de ces produits. En effet, si l'adaptation se maintient partiellement, en l'absence du substrat jusqu'à une nouvelle application du produit, la biodégradation de ce dernier

ne connaîtra plus une phase de latence aussi longue que lors du premier traitement (3), pouvant entraîner ainsi un échec du traitement par manque de couverture de la période de risque. La figure 3 illustre bien le rôle des microorganismes dans la dissipation du produit.

La dégradation est interrompue suite à l'absence des microorganismes éliminés par la chaleur. La dégradation du lindane s'opérerait de plus en plus rapidement et proportionnellement en fonction du nombre d'ensemencement sur le milieu de culture utilisé. Cette procédure a permis au bout du 10ème ensemencement d'obtenir une dégradation de plus de 95% du produit en moins de 4 jours (contre plusieurs semaines pour le milieu non enrichi). Le tableau 2 représente le pourcentage de dégradation du lindane dans les tubes contenant le milieu de culture saturé en gamma HCH selon différentes dilutions. Le pourcentage de dégradation du sol adapté est de 89,1% pour une dilution de 10^{-1} alors qu'il ne représente que 60,2% pour le même sol non adapté (tableau 2).

Tableau 2
Pourcentage de dégradation du lindane dans les tubes contenant le milieu de culture saturé en lindane

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Sol possédant un historique de traitement (1)	89,1	80,3	67,5	20,1	0
Sol de possédant pas un historique de traitement (1)	60,2	55,7	21,5	0	0

Chaque valeur représente la moyenne ($\pm$ écart type) de plusieurs tubes. Le nombre de colonies par gramme de sol est déterminé par la méthode MPN.

(1): Sol ITGC (Alger). L'extraction est effectuée à l'hexane et l'analyse des résidus est déterminée par CPG.

Après enrichissement du milieu de culture (7920 bactéries par gramme de sol pour le sol adapté contre 10 pour le sol non adapté), les bactéries dégradantes sont encore présentes à la dilution de 10^{-4} , ce qui représente un pourcentage de dégradation de 20,1% pour le sol possédant un historique de traitement alors qu'il est nul pour le sol non adapté.

L'inoculation du milieu de culture enrichi (figures 4 et 5) a permis de constater une dégradation très rapide du produit, due probablement à la présence d'une microflore dégradante importante qui s'est développée lors de l'enrichissement du milieu.

Une bactérie (*Bacillus* sp.) responsable de la biodégradation accélérée dans le sol de l'ITGC a été isolée et identifiée.

D'autres facteurs liés aux conditions environnementales peuvent également intervenir dans ce phénomène et bien souvent les conditions qui favorisent une dégradation accélérée du lindane sont celles qui sont les plus favorables à une activité ou à une croissance microbienne. Il en est ainsi d'une élévation de température et d'humidité ou encore d'un apport de carbone.

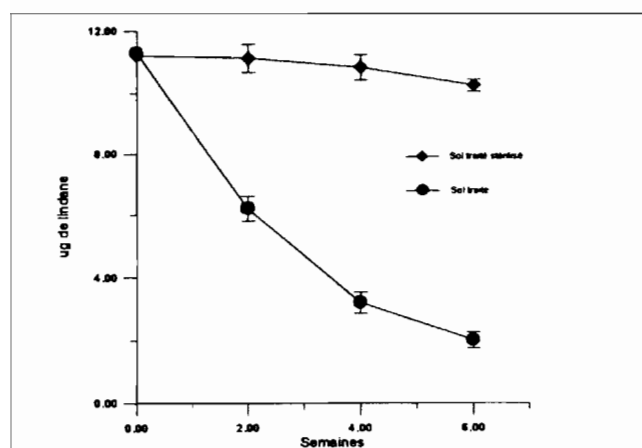


Figure 3. Effet de la stérilisation sur la dégradation du lindane sur le sol de l'ITGC.

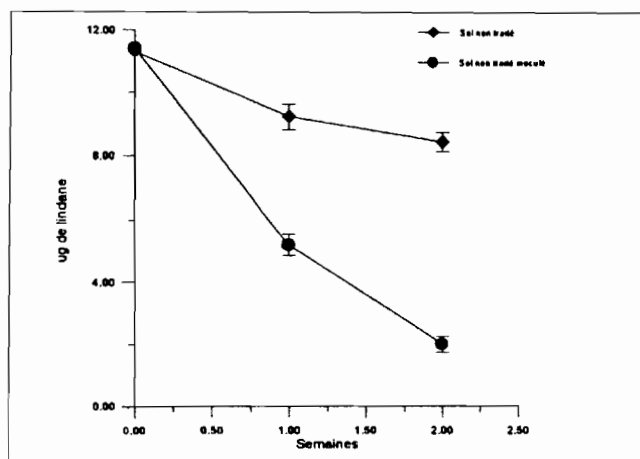


Figure 4. Biodégradation du lindane dans le sol ITGC inoculé par le milieu de culture enrichi.

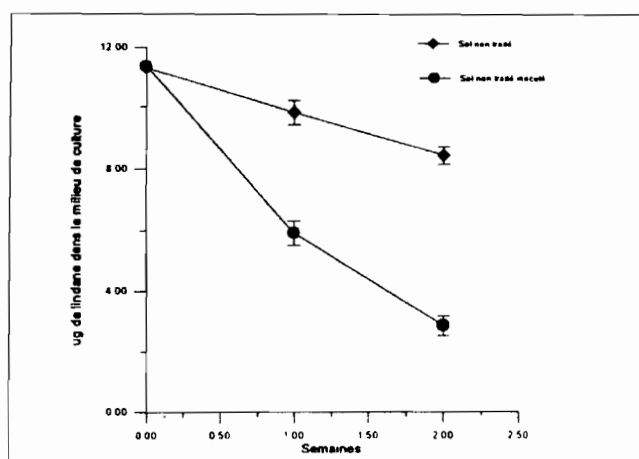


Figure 5. Biodégradation du lindane dans le sol de Dakar inoculé par le milieu de culture enrichi.

Références bibliographiques

1. Forrest M., Lord K.A. & Walker N., 1981. Environ. Pollut., A24, 93.
2. Harris C.R., Chapman R.A., Harris C. & Tu C.M., 1984. J. Env. Sci. Health, B19 (1), 1-11.
3. Kaufman D.D. & Edwards D.F., 1983, in: IUPAC pesticide chemistry: Human Welfare and the environment. 1. Miyamoto et al.(eds) NV: Pergamon Press, 177-182.
4. Kiyokara H., Nagao K. & Yiono K., 1982, "Appli.Env.Microbiol.", 43, 454.
5. Manual of method for general bacteriology, 1981, American Society for microbiol. Ed. Philip Gerhardt. Washington DC 2006.
6. Mercedes M. De Andréa & Flores-Ruegg E., 1988, in "Isotope technique for studying the fate of persistent pesticides in the tropics". IAEA-TECDOC 476 - Vienna, 53-59.
7. Senoo K. & Wada H., 1989, Soil Sci.Plant Nutr. **35**(1), 79-87.
8. Sethunathan N., 1973. J. Agric. Food Chem. 21, 602.
9. Wada H., Senoo K. & Takai Y., 1989, Soil Sci. Plant Nutr., **35**(1), 71-77.
10. Wandiga S.O. & Mghenyi J.M., 1988, in "Isotope techniques for studying the fate of persistent pesticides in the tropics". IAEA-TECDOC 476 - Vienna, 77-84.

M. Bennaceur: Algérien. Docteur en nutrition, Ingénieur agronome, Chargé de recherche, Chef de la division Agrochimie du CDNT, Alger.

J. Bastide: Français. Docteur en chimie organique. Directeur de recherche au Centre de phytopharmacie. Directeur du Groupe d'Etudes et de Recherches appliquées pluridisciplinaires à l'Université de Perpignan.

C.M. Coste: Français. Docteur, Professeur à l'Université de Perpignan, Directeur du Centre de phytopharmacie de l'Université de Perpignan.

ERRATA

Volume 16-17,3, page 2 de couverture, au sommaire, ainsi que page 4 de couverture dans le contents, lire O.D. Koudandé en place de O.D. Koukandé.

Une omission a également été faite, Monsieur G. Dossou-Gbété co-auteur de l'article n'a pas été cité en page 127, ni repris en page 129.