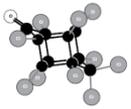


SESSION 5: Milieux impactés

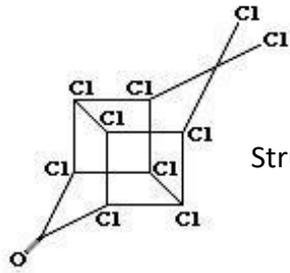
Biodechlord : à la recherche de traces de dégradation microbienne du chlordécone dans les sols contaminés des Antilles

F Martin-Laurent, C Merlin, S Vuilleumier, G Imfeld, T Vogel, S Cecillon, W Achouak, P Benoit, L Mamy, C Mougin, D Patureau, JM Chovelon, S Pesce, E Ugarte and D Le Paslier





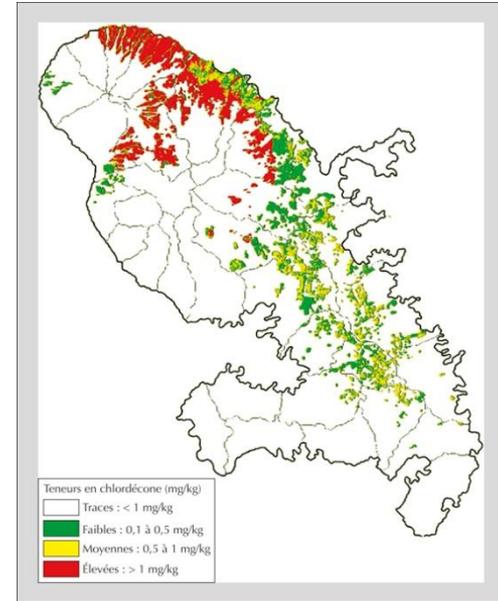
Origine de la contamination des sols des Antilles avec le chlordécone



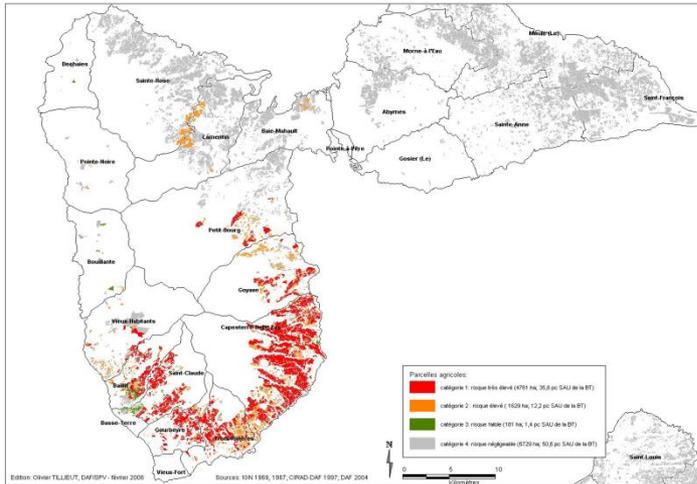
Structure chimique de la CLD
 $C_{10}Cl_{10}O$

Charançon du bananier
Cosmopolites sorditus

Carte de Martinique

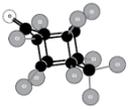


Carte de Guadeloupe



Epandage en **Guadeloupe et Martinique** entre 1972 et 1993 : **300 tonnes** épandues, **20 000 hectares** pollués soit **25%** de la surface agricole des Antilles

Nb: en Europe application sur les cultures de pomme de terre (Allemagne, Pologne, Ukraine)



Le chlordécone: persistance, transfert, bioaccumulation et toxicité

Persistance dans les sols

Dallaire et al. 2012 (impact CLD sur développement moteur et cognitif)

Multigner et al. 2010 (corrélation entre exposition à la CLD et risque de cancer de la prostate)

IARC, 1979, classé comme **cancérogène possible pour l'homme**

Toxicité pour l'environnement et la santé humaine

Polluant Organique Persistant (POP)
(2009 - Convention de Stockholm - Annexe A « Elimination »)

Cabidoche et al. 2009 (modèle de lessivage des sols basé sur cinétiques de désorption : persistance pour des centaines d'années)

Fernandes et al. 2010 (affinité pour les argiles)

Transfert dans les différents compartiments de l'environnement

Rapport Snégaroff 1977 (0.2 µg/L eau de rivières Guadeloupe)

Rapport IFEN 2006 (0.4 µg/L eaux superficielles et 0.15 µg/L eaux souterraines)

Etude IFREMER-CIRAD-CEMAGREF, aval de la Mansarde, novembre 2009 (0.5µg/L eau et 0.4mg/Kg MES)

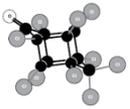
Lesueur-Jannoyer et al. 2012 (légumes-racines)

Bioaccumulation et biomagnification

Rapport Kermarrec 1979-1980, Mirex (poissons, crabes, crevettes dont ouassous)



Ouassous
(*Macrobrachium carcinus*)



PNAC 1 2008-2010

PNAC 2 2011-2013

PNAC 3 en préparation

} ⇒ AIP INRA Demichlord (2008-2013)
RENFORCER LA CONNAISSANCE



MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DE
L'ÉNERGIE, DU DÉVELOPPEMENT
DURABLE ET DE L'AMÉNAGEMENT
DU TERRITOIRE

MINISTÈRE DE L'INTÉRIEUR,
DE L'OUTRE-MER ET DES
COLLECTIVITÉS
TERRITORIALES

MINISTÈRE DE
L'ÉCONOMIE, DE
L'INDUSTRIE ET DE
L'EMPLOI

MINISTÈRE DE
L'AGRICULTURE ET DE LA
PÊCHE

MINISTÈRE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE
LA JEUNESSE, DES SPORTS ET
DE LA VIE ASSOCIATIVE

SECRETARIAT D'ÉTAT
À L'ÉCOLOGIE

SECRETARIAT D'ÉTAT
À L'OUTRE-MER

PREFECTURE DE LA
RÉGION GUADELOUPE

PREFECTURE DE LA
RÉGION MARTINIQUE

<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index>

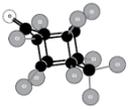
AIP Demichlord

1-ABACHLOR « Analyse, Bactéries anaérobies, Chlordécone », coordinateur: **C Mouvet (BRGM Orléans)** [BRGM, UPMC, IRD, CNRS, Charles Sturt University, University of Newcastle]

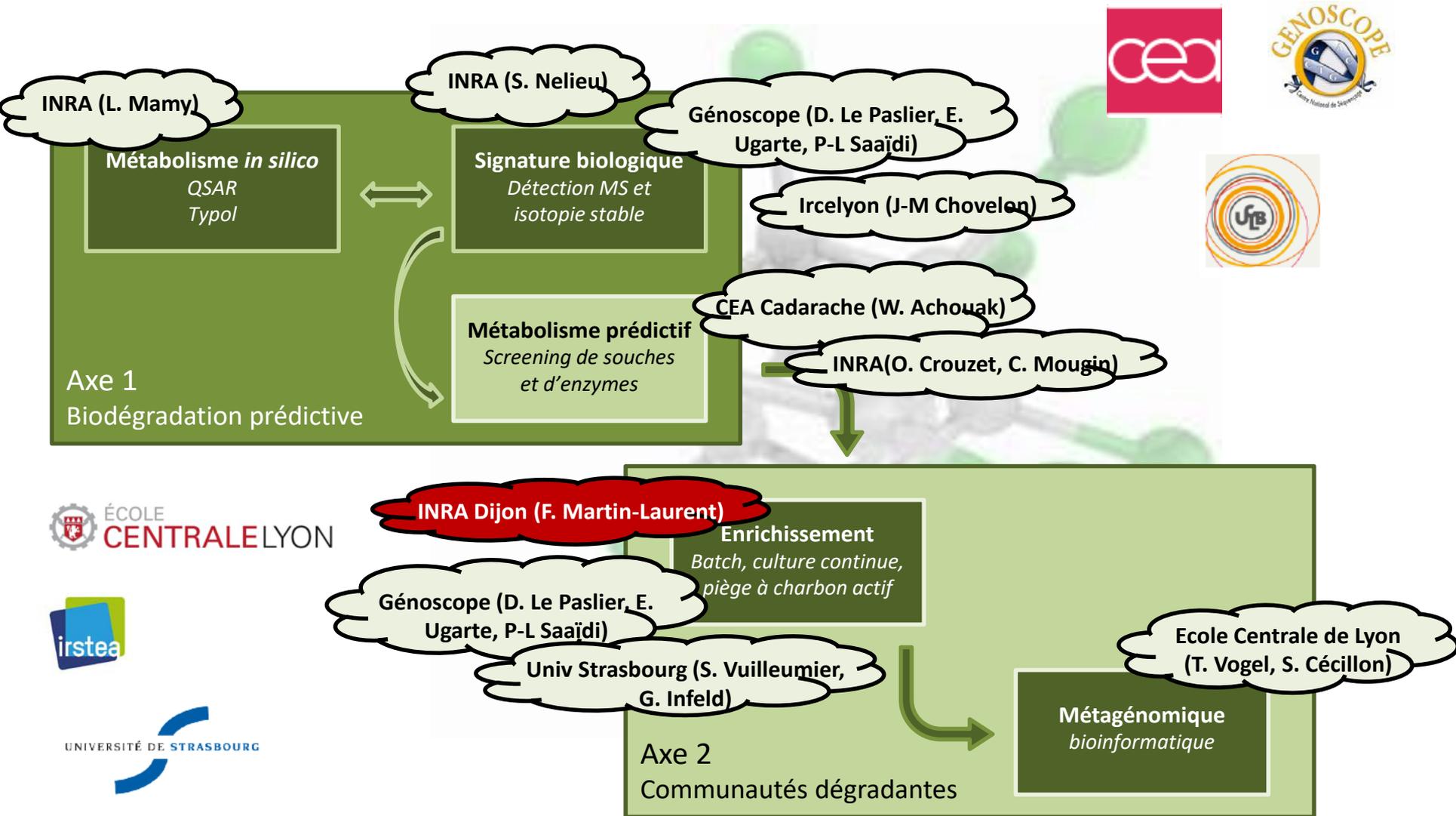
2- CHLORDEG « Recherche d'une voie de dégradation biologique de la chlordécone », coordinateur: **Pr Sara Gaspard (Université Antilles Guyane)** [UAG, Ecole de Chimie de Rennes, ETH Zürich]

3- BIODECHLORD « Recherche de la signature biologique de la dégradation du chlordécone dans les sols des antilles », coordinateur: **F Martin-Laurent (INRA Dijon)** [INRA (Dijon, Versailles, Grignon, Narbonne), Université de Bourgogne, CEA, Genoscope, IRSTEA, Ecole Centrale de Lyon, Université de Strasbourg, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1]

⇒ **Journées de restitution de l'AIP Demichlord**: 11 et 12 décembre 2014, INRA, 147 rue de l'Université, Paris



Recherche de la signature biologique de la dégradation du chlordécone dans les sols des Antilles



Sols contaminés utilisés dans BIODECHLORD (Guadeloupe)



Vue de la parcelle Andosol



Carte de la Guadeloupe

Type de sol	ANDOSOL AND/HFN	NITISOL NIT/MRP	FLUVISOL ALF/FD VAL1	FLUVISOL ALF/FD VAL2
Horizon (cm)	0-20	0-20	0-20	30-50
Granulométrie				
Argile (<2µm)	362*	710	364	328
Limons fins (2/20µm)	535	115	325	329
Limons grossiers (20/50µm)	32	29	146	166
Sables fins (50/100µm)	25	32	139	158
Sables grossiers (200/2000µm)	42	112	24	18
Caractéristiques chimiques				
C org (g/kg)	87,3	23	17,5	12,5
N total (g/kg)	6,52	1,98	1,5	1,08
C/N	13,4	11,6	11,7	11,6
Matière organique (g/kg)	151*	39,8	30,3	21,6
pH eau	5,06	5,31	7,17	7,65
pH KCl	4,62	4,77	6,28	6,62
CaCO3 total (g/kg)	3,4	1,7	1,7	1,4
P2O5 (g/kg)	0,044	0,015	0,044	0,022
2005, CLD (mg/kg)	33,6	nd	nd	nd
2009, CLD (mg/kg)	33	1,61	nd	nd
2011, CLD (mg/kg)	35,4	1,31	0,104	0,183
2012, CLD (mg/kg)	17,9	6,52	0,592	0,352
011, monhydroCLD (mg/kg)	0,65	0,009	nd	nd
12, monhydroCLD (mg/kg)	0,29	nd	nd	nd

Allophanes => piège pour la CLD (Fernandes *et al.* 2010)

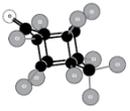
Koc = 2500 L.Kg⁻¹ (Cabidoche *et al.* 2009)

Coordonnées géoréférencées				
Latitude	61°37'15"W	61°34'20.3"W	61°33'51"W	61°33'51"W
Longitude	16°03'57"N	16°05'29.5"N	16°07'54"N	16°07'54"N

* selon la méthode décrite par Martin-Laurent *et al.*, 2013
 ⇒ Différents niveaux de contaminations de contamination au CLD:
 AND/HFN (35 mg.kg⁻¹) > NIT/MRP (1.5 mg.kg⁻¹) > ALF/FD VAL1 (0.5 mg.kg⁻¹)

Environ Sci Pollut Res
 DOI 10.1007/s11356-013-1839-y
 CROP PROTECTION : NEW STRATEGIES FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT
 Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using the ¹³C₁₀-chlordecone stable isotope as a tracer
 Fabrice Martin-Laurent · Mehdi M. Sabouni · Chloé Merlin · Guy Vollmer · Markus Lübke
 doi:10.1007/s11356-013-1839-y





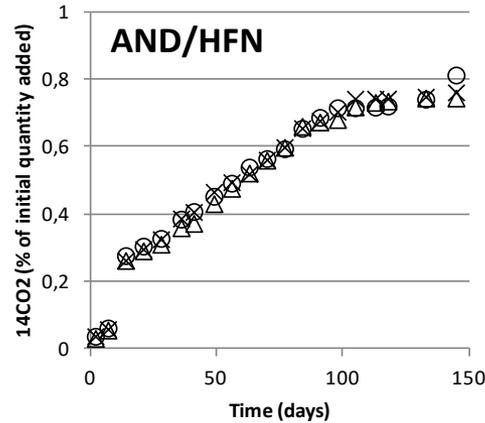
Capacité des sols à minéraliser ¹⁴C-chlordécone

Radiorespirométrie

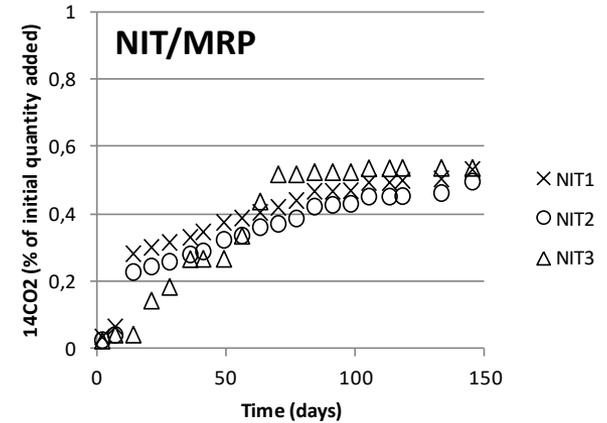


Sol+ ¹⁴C-CLD

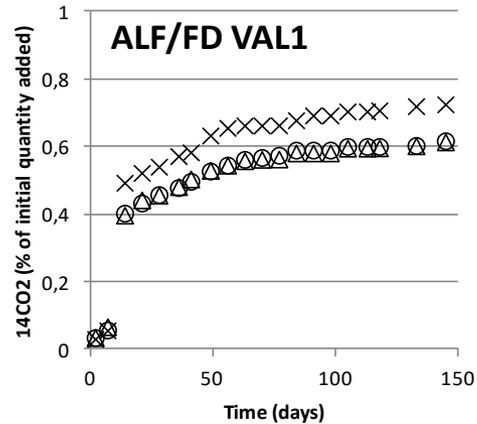
NaOH trap



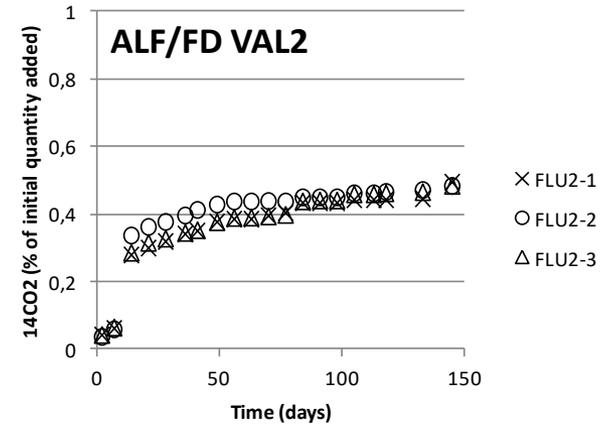
A-



B-

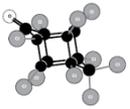


C-

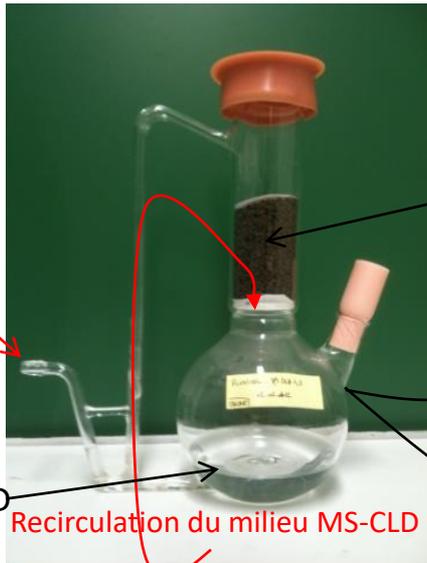


D-

⇒ **niveau de minéralisation** très faible (< 1 % en 120 jours), contrairement aux observations de Fernandez-Bayo et al. 2013 rapportant 5% de minéralisation en 200 jours sur l'andosol.



Culture par enrichissement pour rechercher des microorganismes tolérants le CLD



Pompe

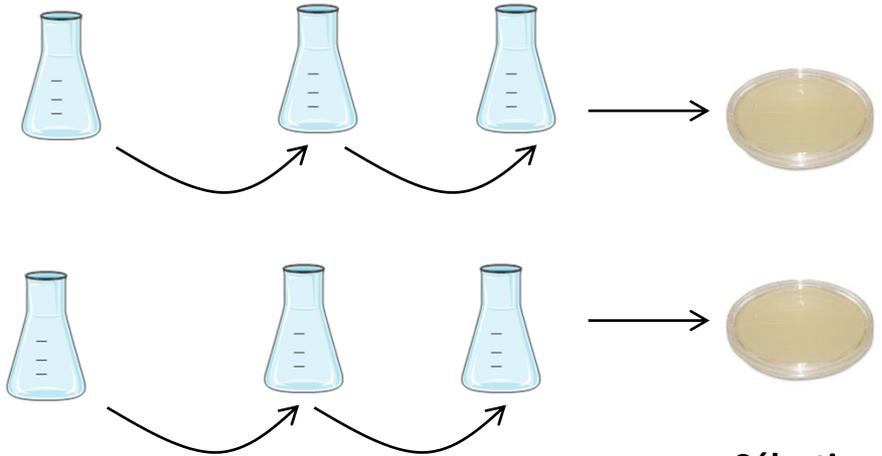
MS-CLD

Recirculation du milieu MS-CLD

Sol contaminé + 0,5%
charbon actif

Andosol

Charbon



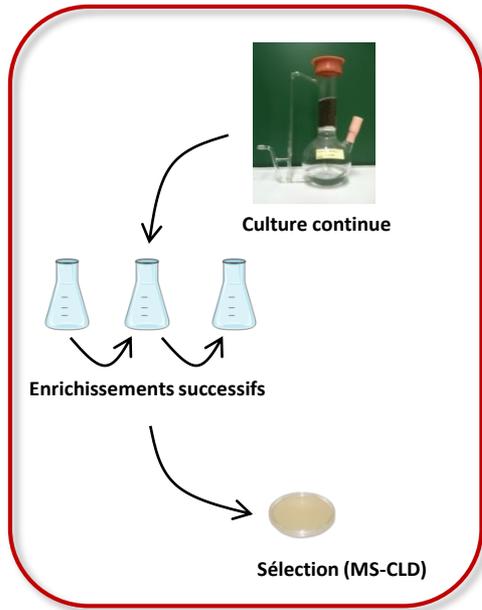
Système de culture continue (10 mois)

Takagi et al. 2009, *Appl. Env. Microbiol.* 7: 4452-4458

Cultures d'enrichissement successif
(4 cycles de 1 mois)

Sélection sur
MS-CLD gélosé

Isolement et caractérisation des microorganismes tolérants le CLD



Enrichissement et sélection

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-013-1971-8

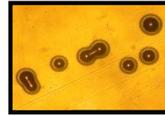
CROP PROTECTION: NEW STRATEGIES FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT

Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies

Chloé Merlin · Marion Devers · Olivier Cruzet ·
Cécile Heraud · Christian Steinberg · Christian Mougín ·
Fabrice Martin-Laurent

doi:10.1007/s11356-013-1971-8

Isolats bactériens



Isolats fongiques

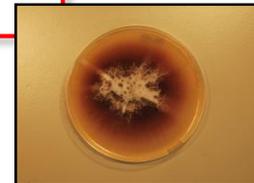


- ✓ **Caractérisation morphologique**
(identification macroscopique)
- ✓ **Analyse phylogénétique**
(extraction/purification ADN, séquençage ITS)
- ✓ **Criblage par test de croissance sur MS-CLD**
(Bioscreen)

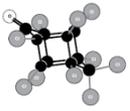
Isolément
MS-CLD

Isolément
PDA-CLD

Mise en évidence souche d'intérêt :
***Fusarium oxysporum* MIAE01197**



- ✓ **Caractérisation tolérance**
Tests de tolérance sur Bioscreen
EC₅₀ (O. Cruzet et C. Mougín, INRA Pessac)
- ✓ **Evaluation capacité de dissipation**



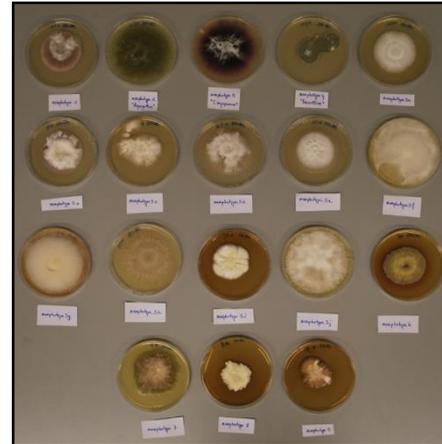
Isolement de souches fongiques tolérantes au CLD

- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

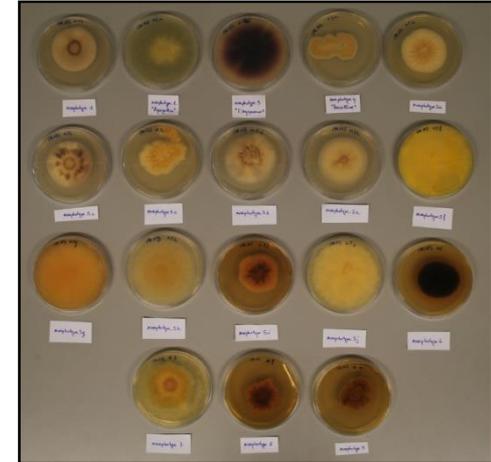
Identification macroscopique

=> Classification des morphotypes sur PDA-CLD

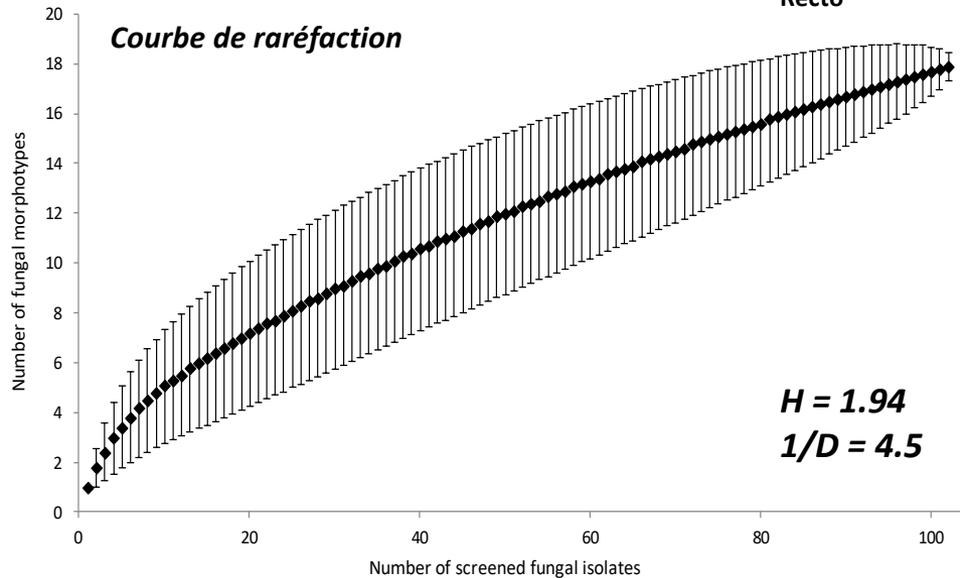
103 isolats
18 morphotypes

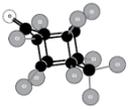


Recto



Verso

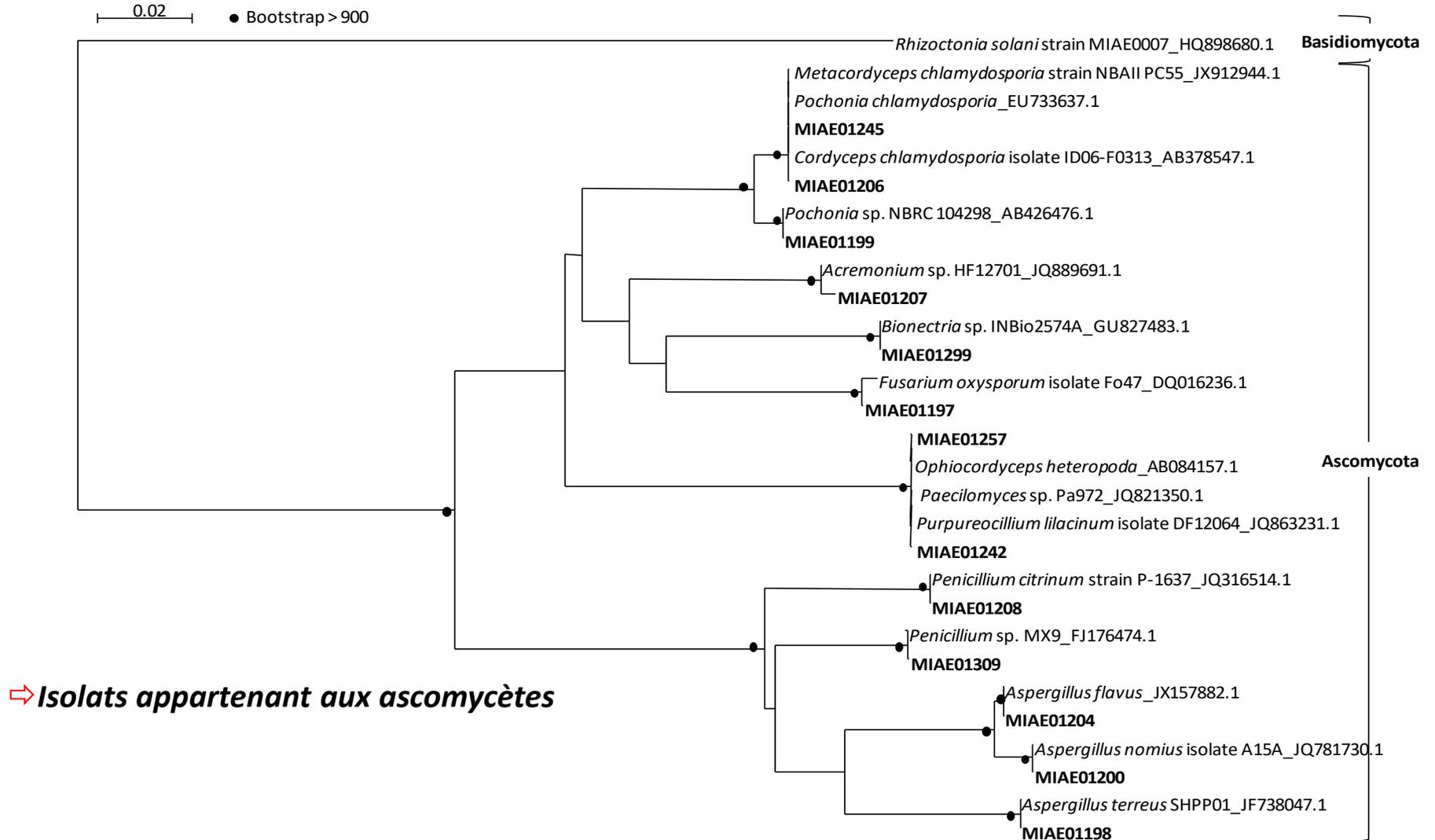


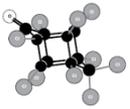


Taxonomie des souches fongiques tolérantes au CLD

- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

Identification taxonomique sur la base de la séquence ITS
(région intergénique 18S et 28S de l'opéron ribosomique ~700pb) (BLAST et NCBI)

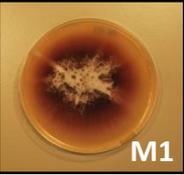
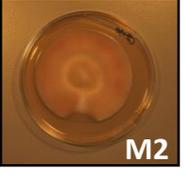
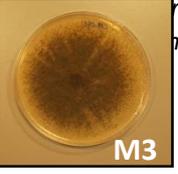




Taxonomie des souches fongiques tolérantes au CLD

- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

Description des 103 souches isolées de l'Andosol

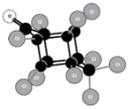
Species	Morphotypes																		Total effective per species
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
 M1 <i>Fusarium oxysporum</i>	33																		33
<i>Paecilomyces sp. / Ophiocordyceps heteropoda / Purpureocillium lilacinum</i>		13		1		1	1												16
<i>Aspergillus flavus</i>			11								1								12
<i>Aspergillus nomius</i>			3							1								1	5
<i>Aspergillus terreus</i>			1									1	1				1		4
 M2 <i>Metacordyceps sp. / Cordyceps chlamydosporia / Cordyceps chlamydosporia</i>		1		2		1			1										5
<i>Penicillium sp.</i>					2														2
<i>Penicillium sp.</i>					1														1
 M3 <i>Bionectria sp.</i>												1							1
<i>Acremonium sp.</i>															1				1
<i>Pochonia sp.</i>																1			1
n.d.	2	9	7			1	1	2											22
Total effective per morphotype	35	23	22	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	103

⇒ Co-dominance de trois morphotypes:

M1 *F. oxysporum* (33/103)

M2 *Paecilomyces sp.* et *Metacordyceps sp.* (21/103)

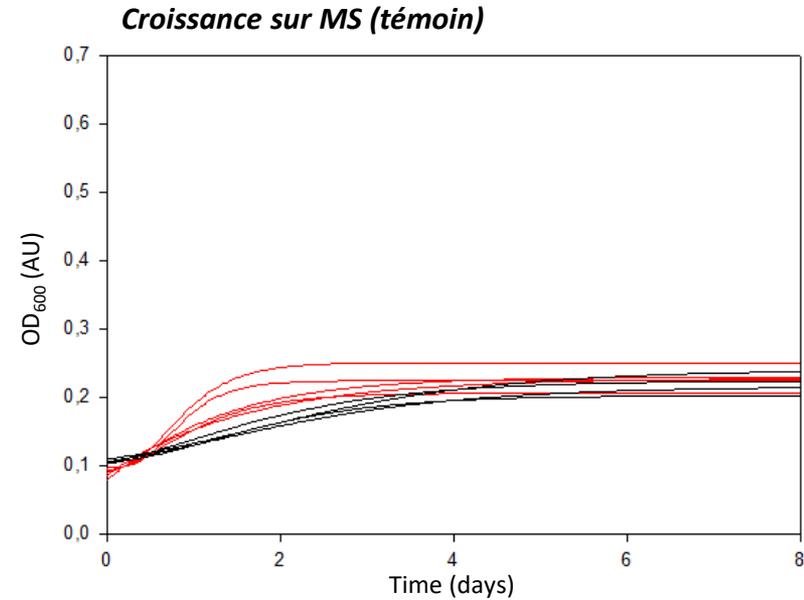
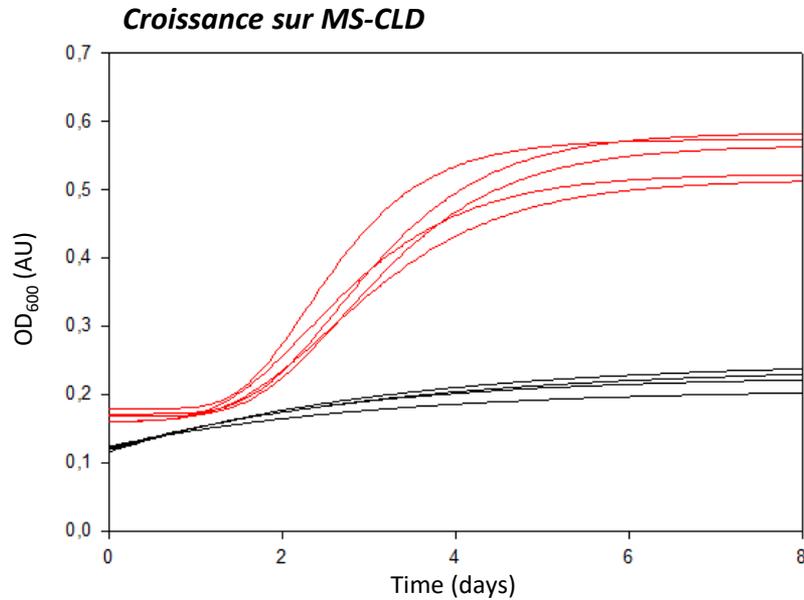
M3 *Aspergillus sp.* (21/103)



Criblage des souches fongiques tolérantes au CLD

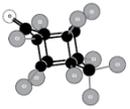
- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

Criblage : croissance sur MS-CLD



- *F. oxy* MIAE01197 (isolée de l'Andosol)
- *F. oxy* MIAE00047 (référence)

➤ ***Fusarium oxysporum* MIAE01197** est capable de se développer sur MS-CLD (contrôle *F. oxy* MIAE00047 non exposé au CLD)

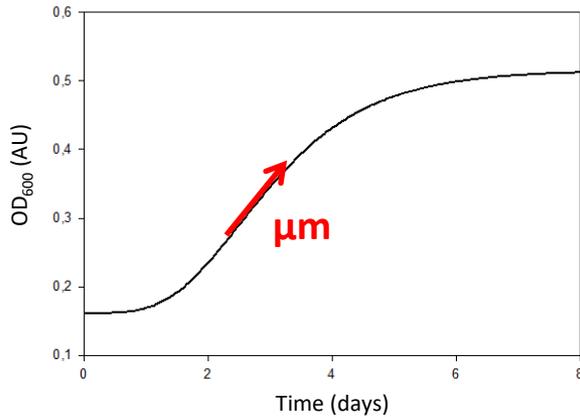


Evaluation de la tolérance au CLD de MIAE 01197

- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

Tolérance : croissance en Bioscreen (μ plaque) sur MS-glucose +/- CLD (0, 0.1, 1 et 10 mg.L^{-1})

Comparaison de vitesse max de croissance (μm) avec et sans CLD

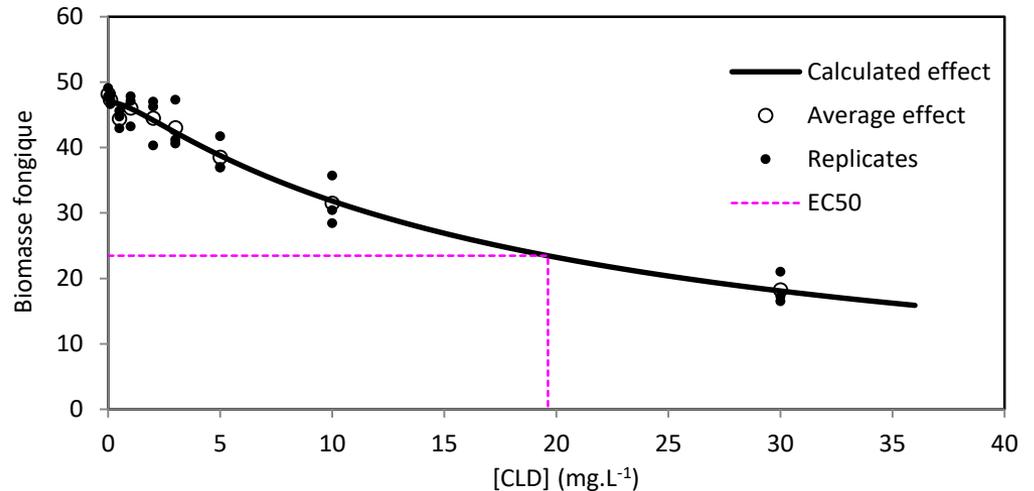


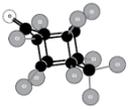
$$\frac{\mu\text{m} [\text{CLD}]_x}{\mu\text{m} [\text{CLD}]_0}$$

$$\frac{\mu\text{m} [\text{CLD}]_0}{\mu\text{m} [\text{CLD}]_0} = 1 \quad \text{Ref}$$

- $\frac{\mu\text{m} [\text{CLD}]_x}{\mu\text{m} [\text{CLD}]_0} < 1$ **ralentie**
- $\frac{\mu\text{m} [\text{CLD}]_x}{\mu\text{m} [\text{CLD}]_0} = 1$ **non affectée**
- $\frac{\mu\text{m} [\text{CLD}]_x}{\mu\text{m} [\text{CLD}]_0} > 1$ **augmentée**

Tolérance : EC₅₀ (O. Crouzet et C. Mougin, INRA Pessac)



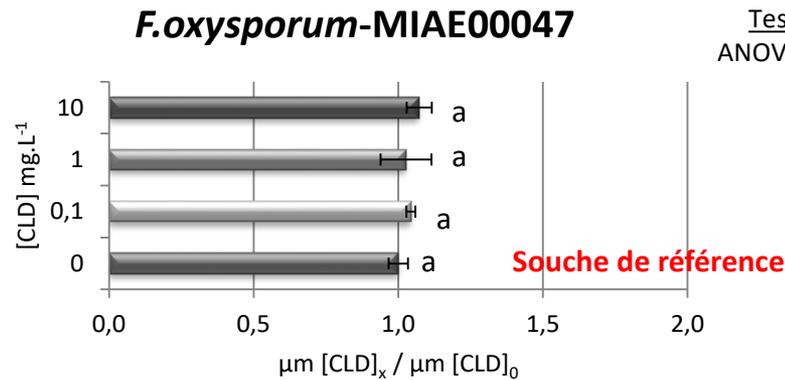


Evaluation de la tolérance au CLD de MIAE01197

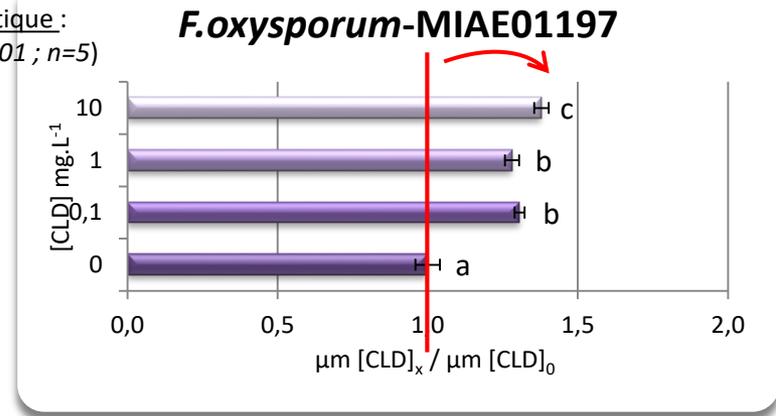
- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

Tolérance : croissance en Bioscreen (μ plaque) sur MS-glucose +/- CLD (0, 0.1, 1 et 10 mg.L^{-1})

Comparaison de vitesse max de croissance (μm) avec et sans CLD



Test statistique :
ANOVA ($p < 0.01$; $n = 5$)



Tolérance : EC_{50} (O. Crouzet et C. Mougin, INRA Pessac)

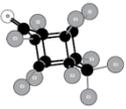
EC_{50} [MIAE00047] = 18,6 mg de CLD par litre

Souche de référence

EC_{50} [MIAE01197] = 29,2 mg de CLD par litre

($p < 0.01$)

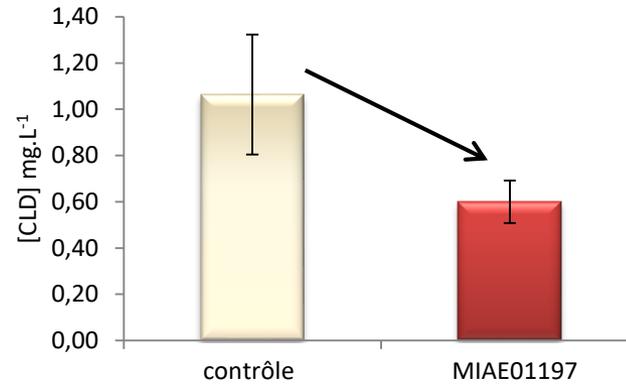
⇒ MIAE 01197 est plus tolérante au chlordécone que MIAE00047 (x 1,6)



- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

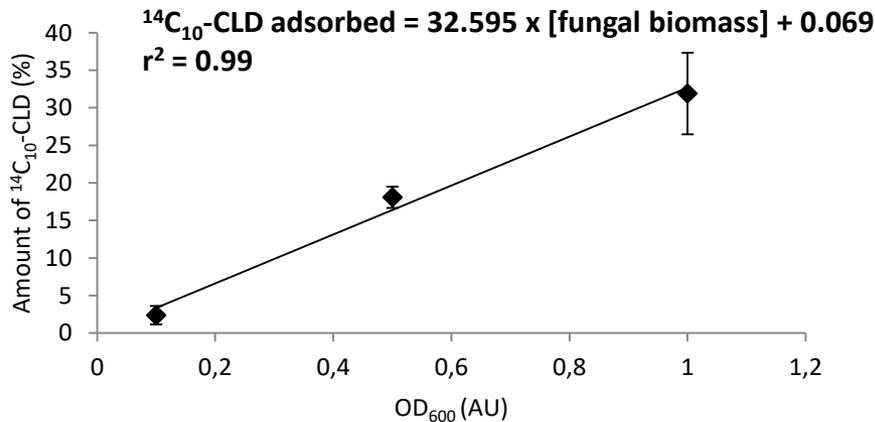
Capacité de dissipation : GC-MS

Culture *F. oxy* MIAE01197 sur MS-CLD
Analyse en point final

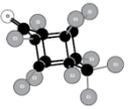


⇒ Abattement de 40% de la quantité initialement apporté mais pas de métabolites détectés

Capacité de dissipation : test d'adsorption



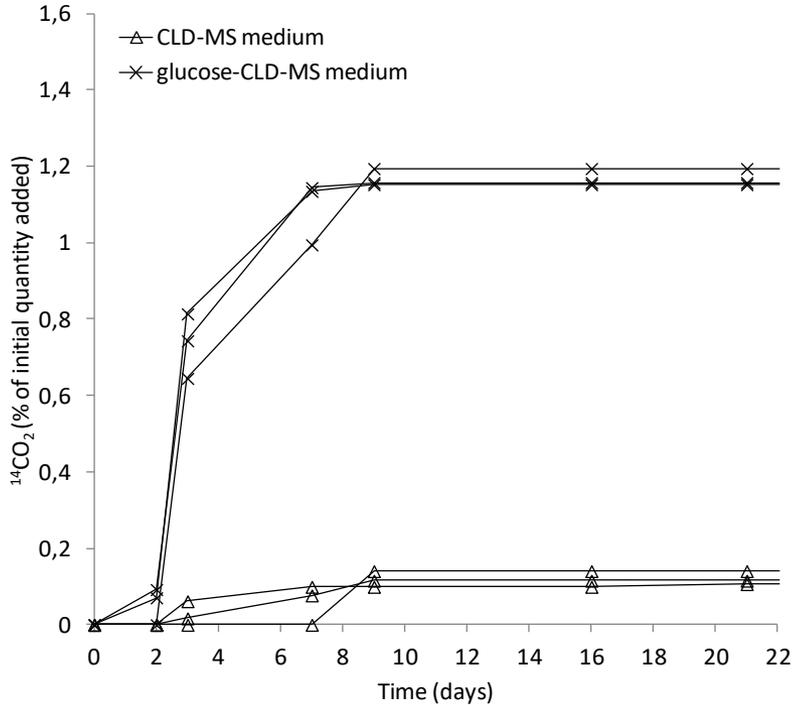
⇒ Adsorption de la ¹⁴C-chlordécone sur la biomasse fongique.



Evaluation de la capacité de dissipation du CLD de MIAE01197

- ✓ Diversité fongique
- ✓ Croissance sur CLD
- ✓ Tolérance
- ✓ Capacité de dissipation

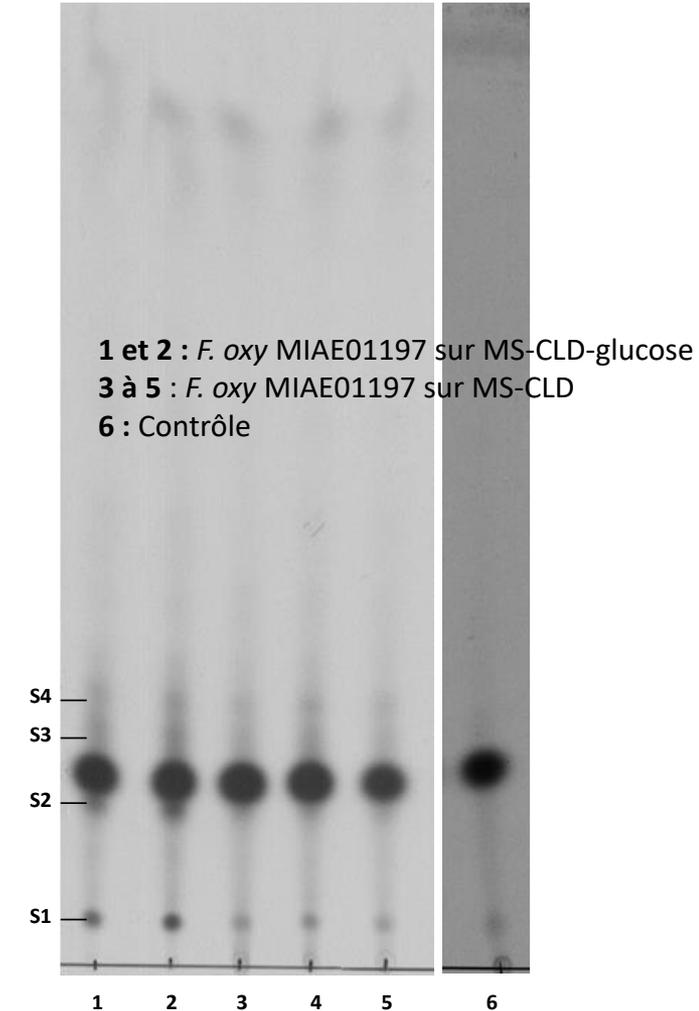
Capacité de minéralisation : Radiorespirométrie

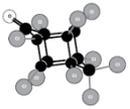


⇒ Faible capacité à minéraliser le chlordécone sur le milieu en présence de glucose (< 1,5 %).

⇒ Métabolites (S2) observés en faibles quantités sur glucose-MS-CLD (structures non identifiées)

Capacité de dégradation : CCM





Conclusions

- ⇒ La dégradation du chlordécone dans les sols testés est très faible
- ⇒ Isolement et caractérisation de 103 isolats fongiques tolérants au chlordécone : co-dominance de 3 morphotypes (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* sp. et *Paecilomyces* sp./*Metacordyceps* sp.)
- ⇒ Capacité de *F. oxysporum* MIAE 01197 de croître sur milieu MS-CLD
- ⇒ Tolérance accrue de MIAE 01197 au chlordécone par rapport à *F. oxysporum* MIAE00047 (x 1,6): adaptation de la souche en réponse à l'exposition au chlordécone? Quel toxicité du chlordécone ?
- ⇒ MIAE 01197 présente une capacité de dissipation du chlordécone (40% d'abattement); adsorption sur la biomasse fongique avérée; minéralisation très faible. Accumulation de métabolites en faibles quantités. Voie de dégradation? Toxicité des métabolites?

Remerciements

Financeurs: AIP Demichlord



Thèse Chloé Merlin



Je vous remercie pour votre attention