

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



## SEEERAPLUS-216

### *Ecofun-Microbiodiv*

ECOFUN-MICROBIODIV : un programme européen pour développer et évaluer des outils pour mesurer l'impact de pesticides sur les microorganismes des sols

**Coordonnateur : F Martin-Laurent**

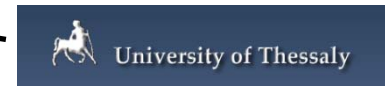
[http://www4.inra.fr/ecofun\\_microbiodiv/](http://www4.inra.fr/ecofun_microbiodiv/)

**ECOTOX**

Colloque Ecotox, Saint-Lager,  
7-9 Novembre 2011

# Partenaires

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



**Institut Rudger Boskovic, Zagreb, Croatie**

**Faculté d'Agriculture de Novi Sad, Serbie**

**Faculté de Sciences Biologiques, Université de Thessalie, Grèce**

**Faculté des Sciences du Sol, Université d'Hohenheim, Allemagne**

**INRA, Laboratoire de Microbiologie du Sol, France**

**Ass Res Ines PETRIC**

**Ass Pr Simonida DJURIC**

**Pr Dimitrios KARPOUZAS**

**Pr Ellen KANDELER**

**Fabrice MARTIN-LAURENT**

**ECOTOX**

**Colloque Ecotox, Saint-Lager,  
7-9 Novembre 2011**

# Contexte: diversité microbienne et services écosystémiques des sols

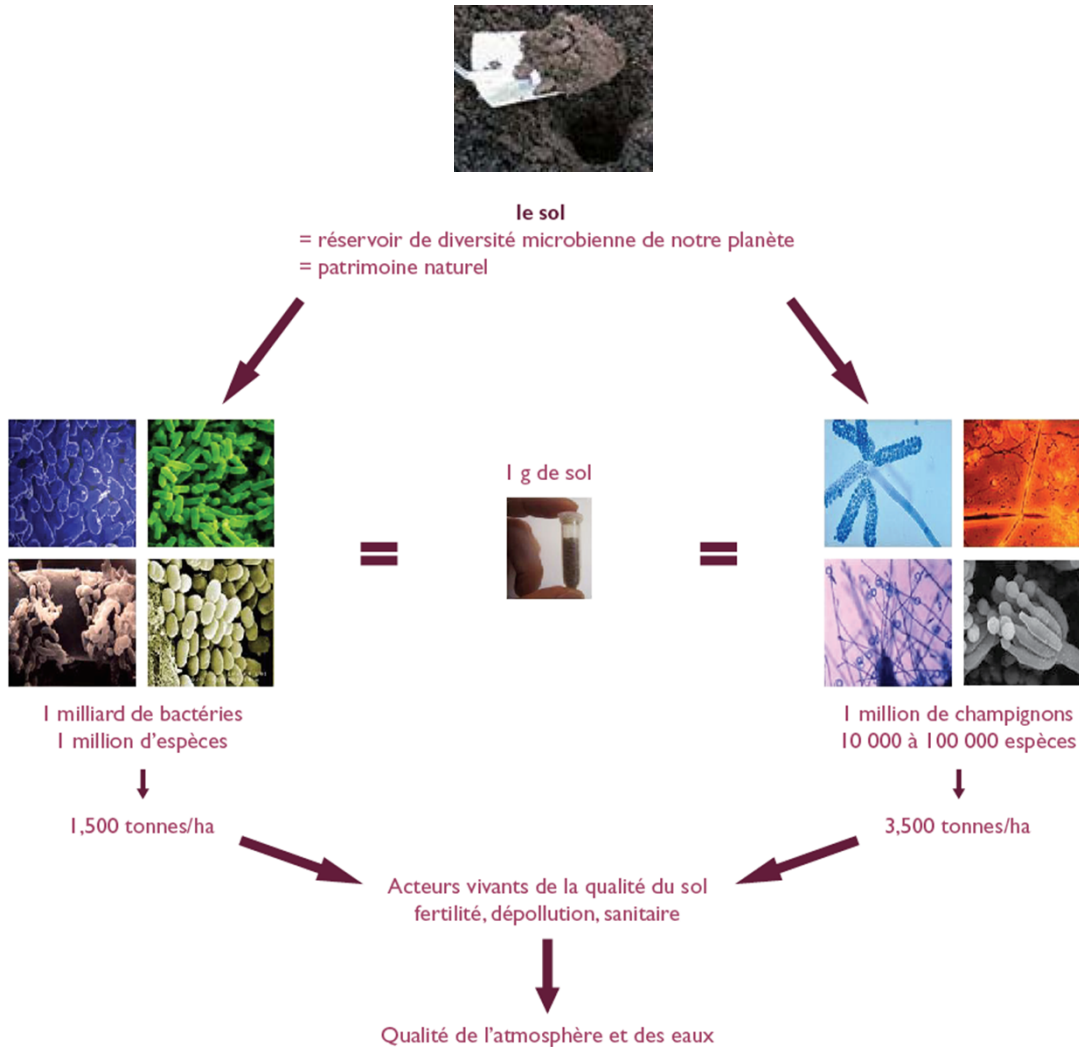
LA DIVERSITÉ MICROBIENNE DANS LES SOLS

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



## The value of the world's ecosystem services and natural capital

Robert Costanza<sup>1</sup>, Ralph d'Arge<sup>2</sup>, Rudolf de Groot<sup>3</sup>, Stephen Farber<sup>4</sup>, Monica Grasso<sup>5</sup>, Bruce Hannon<sup>6</sup>, Karin Limburg<sup>7</sup>, Shahid Naeem<sup>8</sup>, Robert V. O'Neill<sup>9</sup>, Jose Paruelo<sup>10</sup>, Robert G. Raskin<sup>11</sup>, Paul Sutton<sup>12</sup> & Marjan van den Belt<sup>13</sup>



Service*	Fonctions	Valeur**
Régulation du climat	Cycles C & N	684
Cycle des nutriments	Cycle nutriments	17 075
Traitement des déchets	Epuration	2 277
Contrôle érosion	Préservation des sols	576
Formation des sols	Pédogénèse	53
Sous-Total		20 665
17 Services recensés	Total	32 268

\* Inclus la production primaire \*\* US\$ par an x 10<sup>9</sup>

Recensement des services et fonctions écosystémiques dépendant de la biodiversité microbienne des sols (Costanza et al. 1997, Nature, vol 387).



MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT

ECOTOX

Colloque Ecotox, Saint-Lager,  
7-9 Novembre 2011

# Contexte : Evaluation de l'impact des pesticides sur la composante biologique des sols

## Réhabilitation et protection des sols

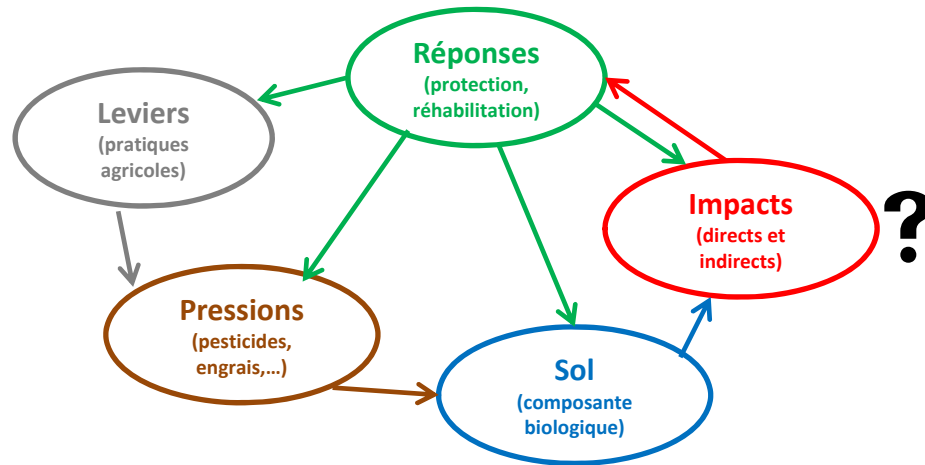


Schéma modifié de 'Contamination and land management' vol IV, écrit pour établir la stratégie Européenne de protection des sols

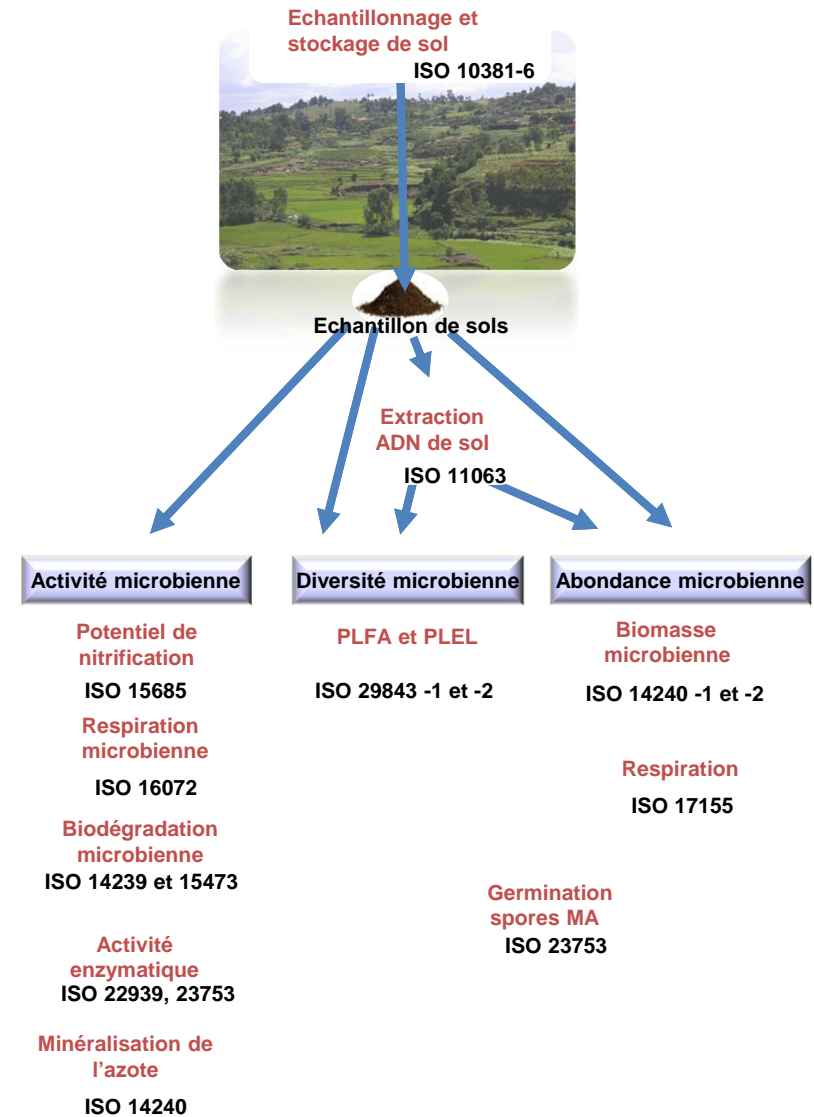
### Pré-homologation Estimation de l'impact des pesticides sur la microflore du sol

(selon la directive cadre 91/414/CEE du 15 Juillet 1991).

- Test de Sturm modifié : estimation de la biodégradation des pesticides et de substrats de référence (acetate de sodium ou benzoate)
- Minéralisation du carbone,
- Minéralisation de l'azote.

Tests globaux pouvant rendre compte de l'impact des pesticides sur la microflore du sol mais pas sur les fonctions écosystémiques du sol

### Post-homologation : Estimation de l'impact sur la composante microbienne Travaux ISO TC190/SC4



Determination of soil microbial diversity- Part 1 Method by phospholipid acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids – Part 2 Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the “simple PLFA extraction method” (ISO TS 29843)

Method to directly extract DNA from soil samples (ISO/DIS 11063) [derived from Martin-Laurent et al. 2001 Appl. Env. Microbiol 67 : 2354-2359]

J Soils Sediments  
DOI 10.1007/s11368-010-0265-8

---

ANNOUNCEMENT

## **Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction**

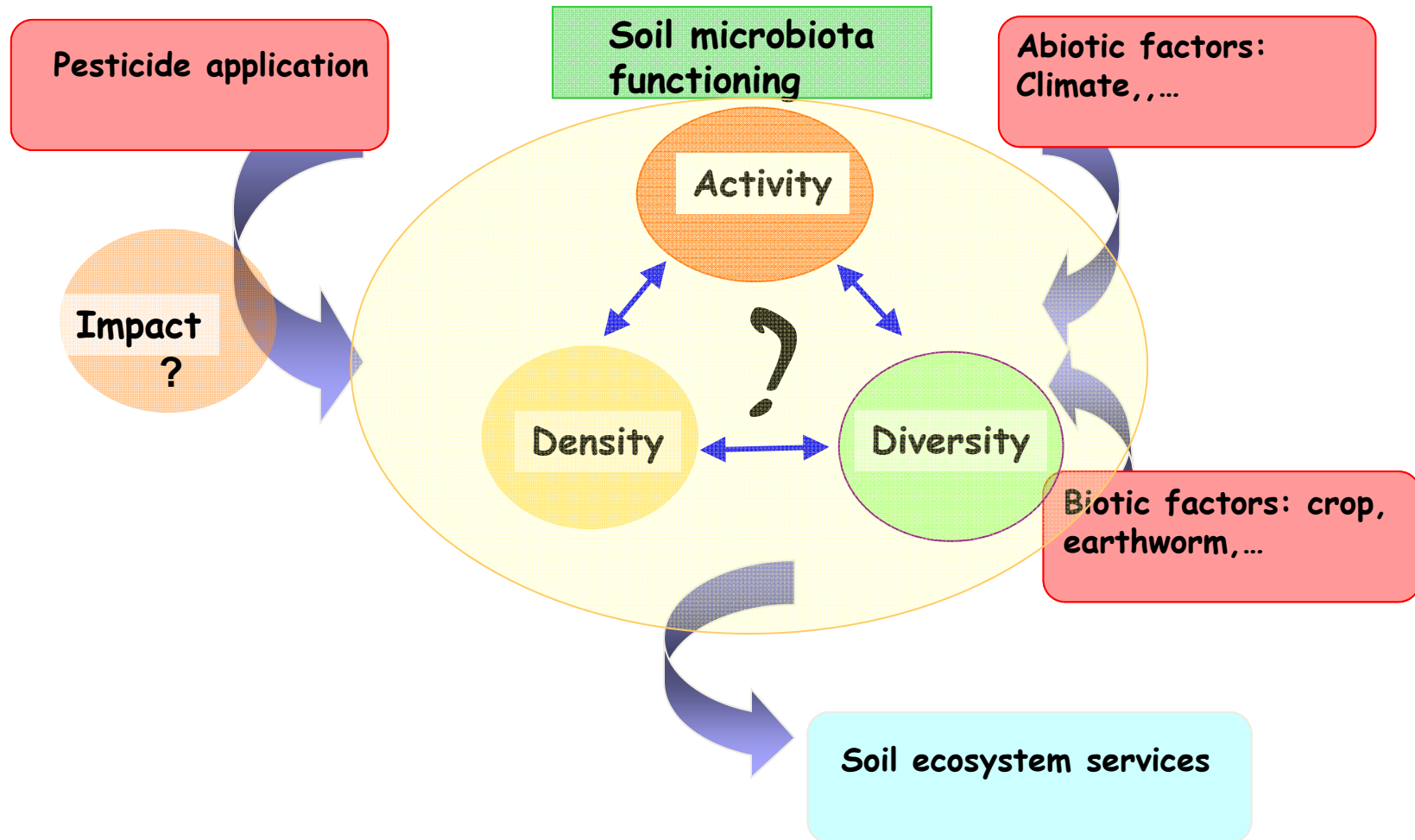
Laurent Philippot • Cristina Abbate • Antonio Bispo • Thierry Chesnot • Sara Hallin •  
Philippe Lemanceau • Kristina Lindström • Pascal Pandard • Esperanza Romero •  
Michael Schloter • Pascal Simonet • Kornelia Smalla • Berndt-Michael Wilke •  
Fabrice Martin-Laurent

Received: 16 June 2010 / Accepted: 16 June 2010  
© Springer-Verlag 2010

PROOF

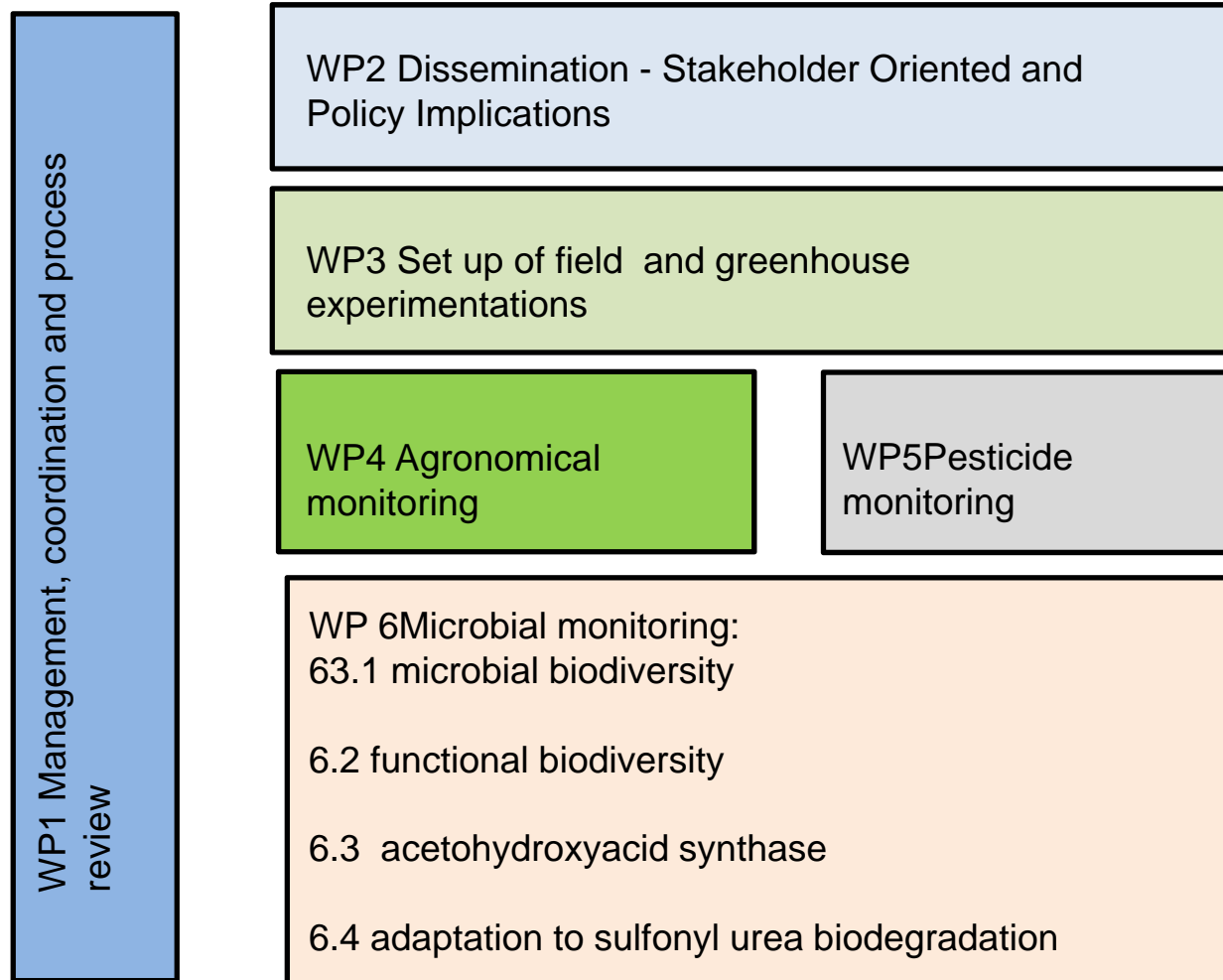


# Impact d'herbicides faiblement dosés sur les services écosystémiques des sols

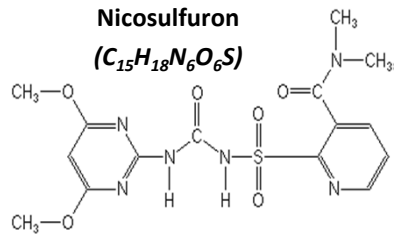


## SEEERAPLUS-216 - *Ecofun-Microbiodiv*

Development and evaluation of innovative tools to estimate the ecotoxicological impact of low dose pesticide application in agriculture on soil functional microbial biodiversity .



## Dispositifs expérimentaux : plein champs (Serbie)



**Plante : ZEA MAIS Variété: NS 640**

**Date de semis : 28.04.2011**

**Date d'émergence : 05. – 07.05.2011**



### Essai bloc randomisé

**Bloc: 6 x 4 m Repts: 4**

**Tillage Type: conventional**

**Traitement herbicide DuPont™ Accent® Herbicide**

Traitement 0, 1x, 2x et 5x dose agronomique



Post-Emergence 04.06.2011





## Dispositifs expérimentaux : plein champs (Serbie)

Echantillonnage du sol:

04.06.2011. – avant le traitement  
06.06.2011. - 2 jours après le traitement  
11.06.2011. - 7 jours  
18.06.2011. - 14 jours after treatment  
02.07.2011. - 28 jours  
30.07.2011. – 56 jours  
05.10.2011. – fin de la culture



Envoi aux différents partenaires des échantillons:

Dosage du nicosulfuron

Analyse biochimique: activité microbienne, PLFA, respirométrie, biomasse microbienne

Analyse microbienne: adaptation à la biodégradation, population résistante

Analyse moléculaire : extraction d'ADN, A-RISA (structure), qPCR 16S rRNA

Développement d'un marqueur d'exposition: AHAS



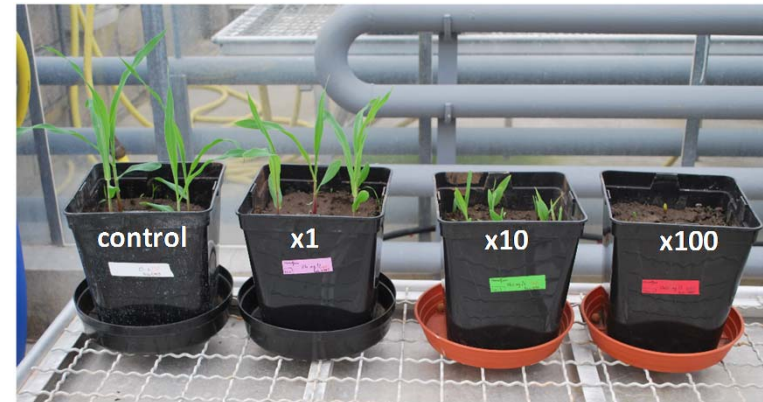
## Dispositifs expérimentaux : serre (France)

### Culture répétée de maïs

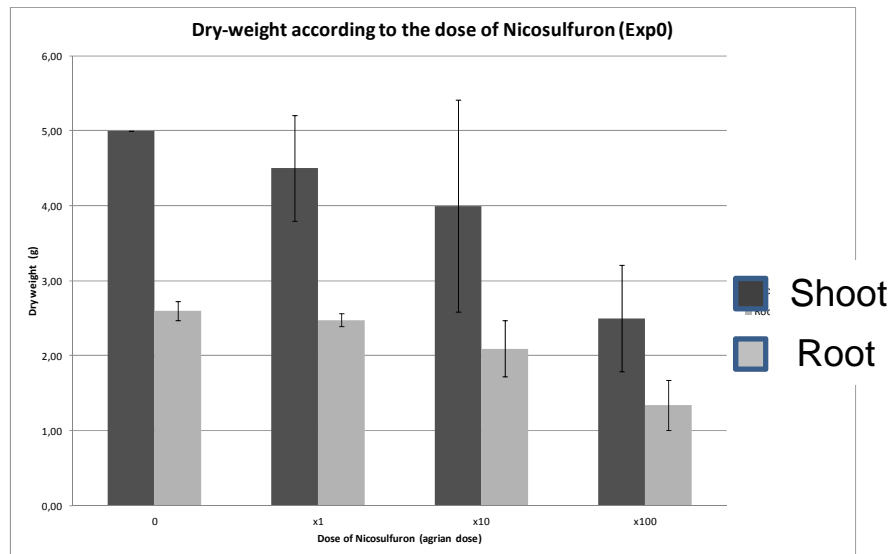
5 cycles de culture (20°C nuit, 25°C jour, 60 à 70 humidité)

Traitement post-émergence

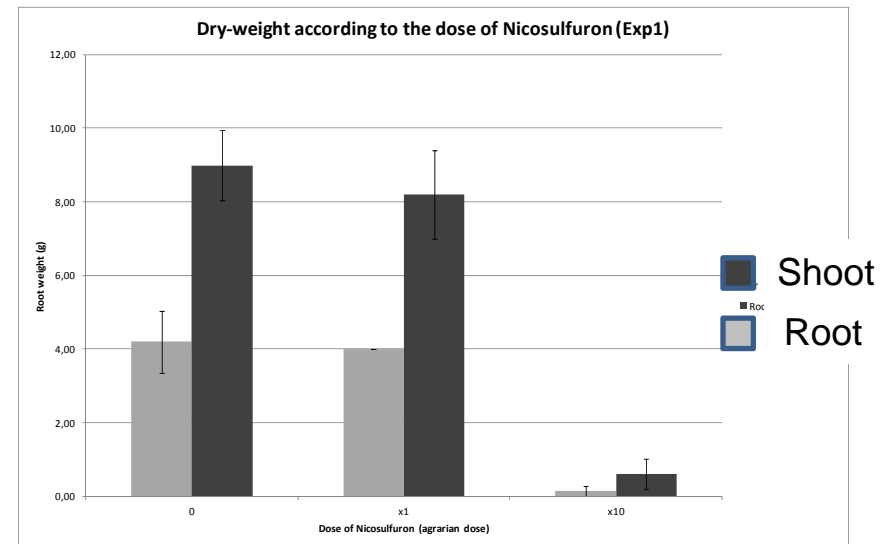
4 doses: 0, 1x, 10x et 100x dose agronomique



2<sup>ème</sup> cycle de culture



Premier cycle de culture



Deuxième cycle de culture

## Dosage du nicosulfuron

10 g of soil from the Novi Sad field (moist soil cca 20 %)  
- contaminated with nicosulfuron (Fluka, Nicosulfuron PESTANAL<sup>®</sup>, analytical standard)



Repeated extraction (3x) with 10 ml of extraction solvent methanol:phosphate buffer pH 7 (2:1, v/v)  
→ agitation on vortex mixer 1 min  
→ sonication 5 min  
→ centrifugation (4000 rpm, 10 min) → supernatant collected



Methanol is removed by evaporation (under steam of N<sub>2</sub>)  
Aqueous extract was acidified with glacial acetic acid to pH 2,5 (to protonate herbicide molecule)



Cleaniup and concentration of the sample  
(SOLID PHASE EXTRACTION under vaccum)

Complex sample matrix and trace quantities of herbicide -  
pretreatment of sample i.e. enrichment of targeted analytes  
**REQUIRED**



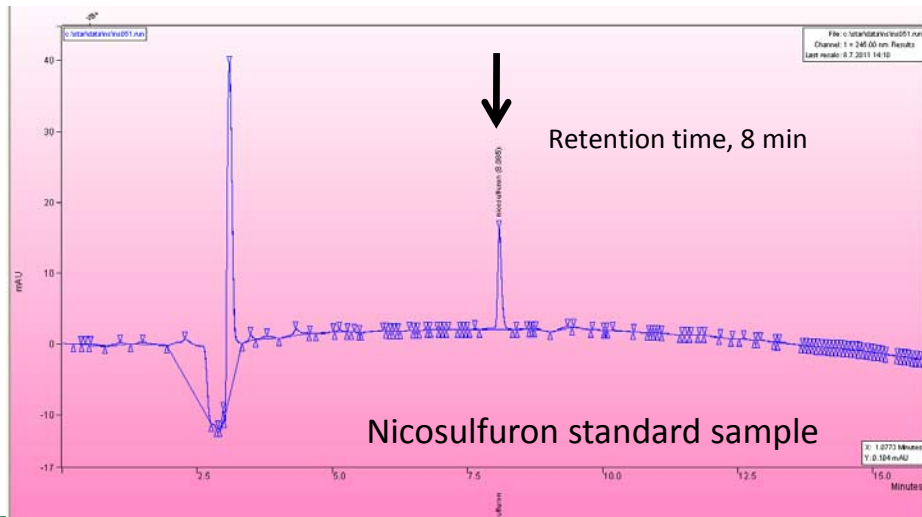
# Dosage du nicosulfuron

## HPLC-UV

- High performance liquid chromatography (Varian ProStar, Agilent Technologies) equipped with ultraviolet diode array detector set at 245 nm
- Analytical reverse phase column Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 mm x 250 mm, packed with 5 $\mu$  particles

Gradient elution program:

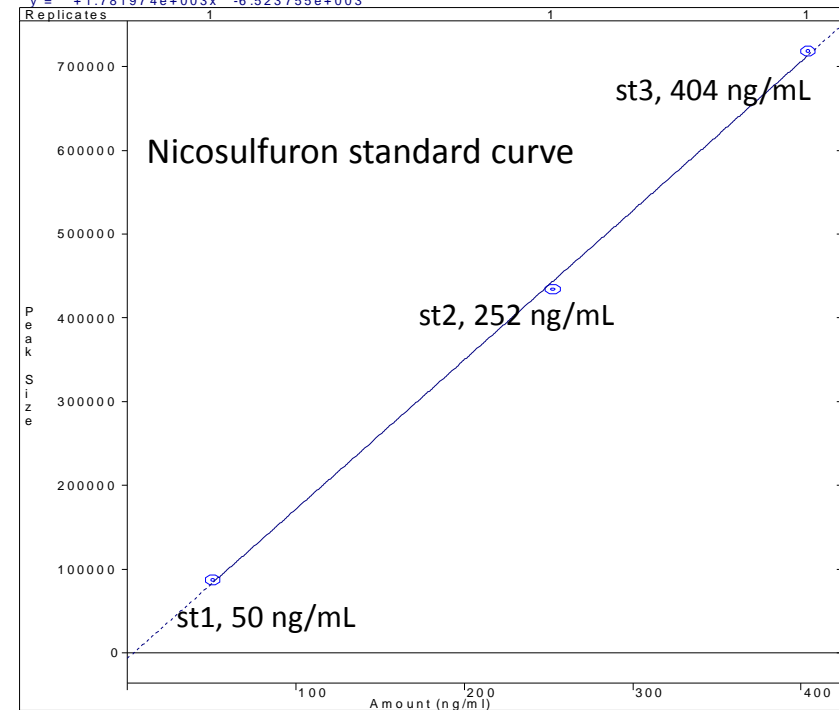
Time (min)	0,2 % Acetic acid in H <sub>2</sub> O v/ %	Acetonitrile v/ %
0	80	20
14	10	90
16	4	96



Calibration Curve Report  
File: c:\star\metode\ms\_16 min.mth  
Detector: ProStar 335 PDA Detector, Address: 44, Channel ID: 1

External Standard Analysis  
Curve Type: Linear  
Origin: Ignore  
y = +1.781974e+003x -6.523755e+003

nicosulfuron  
Resp. Fact. RSD: 1.797%  
Coeff. Det.(r<sup>2</sup>): 0.999390



## Identification des plantes adventices

### WEED SPECIES

*Sorghum halepense*

- johnson grass-

*Chenopodium album*

- goosefoot -

*Amaranthus retroflexus*

- redroot pigweed -

*Convolvulus arvensis*

- field bindweed -

*Datura stramonium*

- devil's trumpet -

*Solanum nigrum*

- black nightshade -

*Hibiscus trionium*

- flower on-an-hour -

*Ambrosia artemisiifolia*

- ragweed -



Objectif: recherche de plantes adventices résistantes



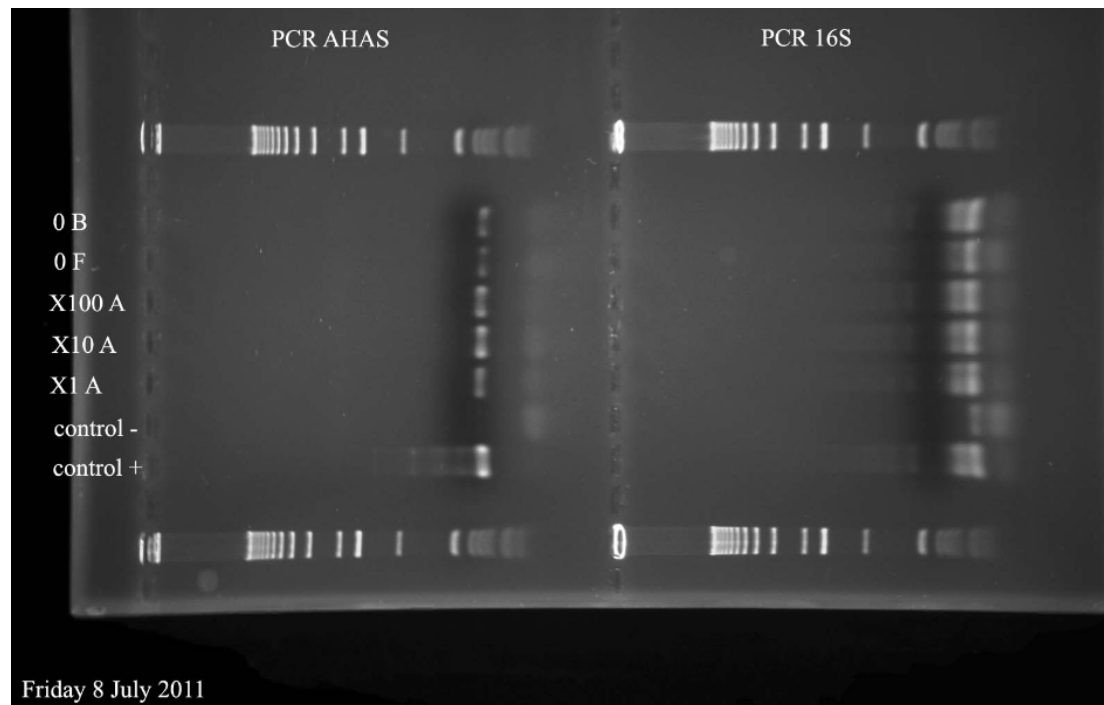
# Développement du marqueur d'exposition AHAS

Antonie van Leeuwenhoek (2008) 93:123–132  
DOI 10.1007/s10482-007-9186-y

ORIGINAL PAPER

## The distribution of acetohydroxyacid synthase in soil bacteria

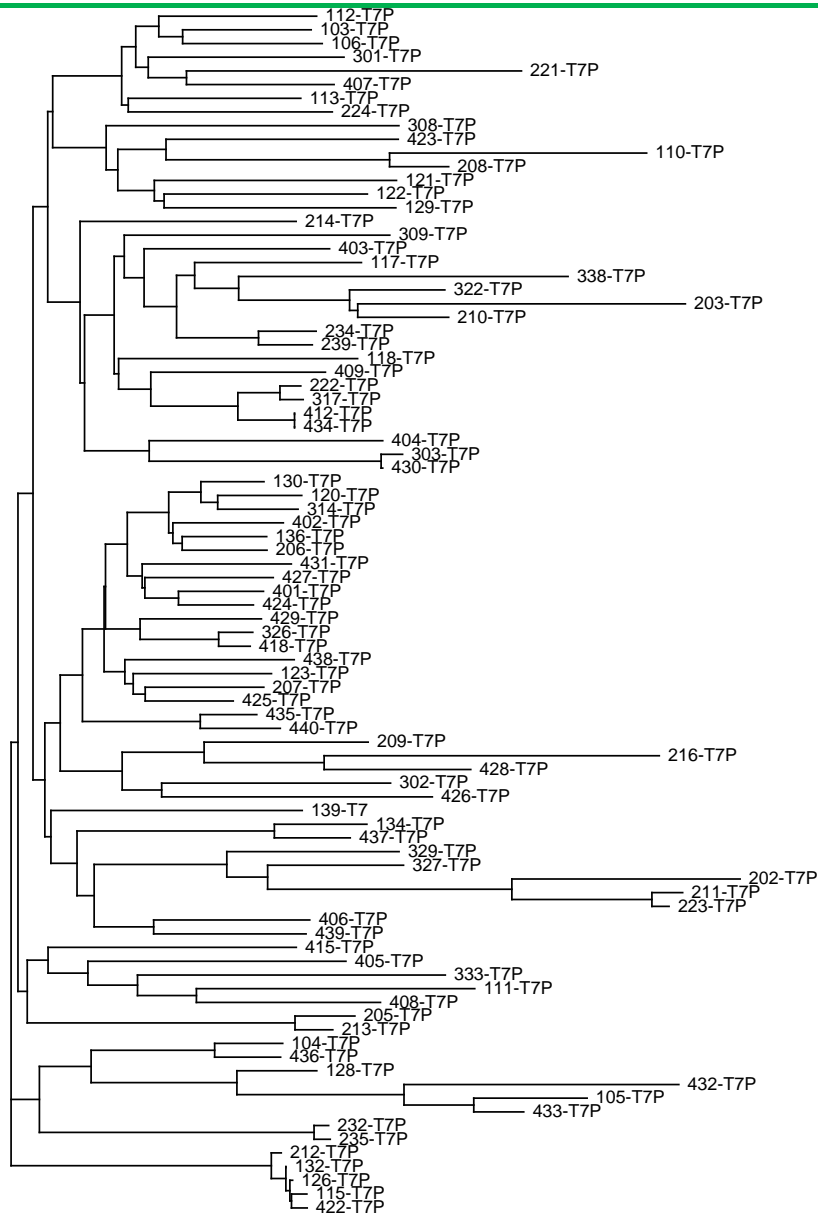
Darryl R. Nelson · Trevor Duxbury



Forward primer, upilvB (873–890),  
5'-CGCCCG(G/T/C)TT(C/T)GA(C/T)GACCG-3'  
Reverse, loilvB (1207–1227),  
5'-CGC(G/T)G(A/C/T)CCACAT(C/T)TG(A/G)TGCTG-3'

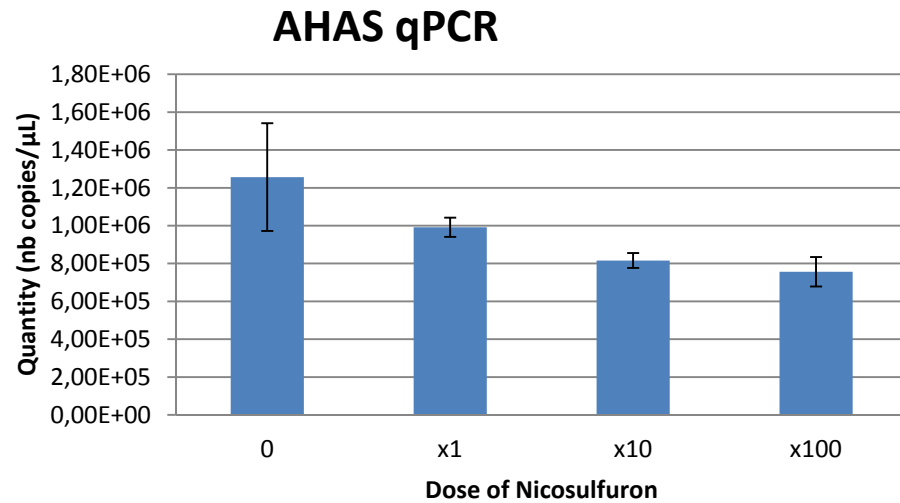
PCR program  
of 94°C (5 min),  
25 cycles of  
94°C (30 s), 63°C (30 s), 72°C (1 min),  
final extension of 7 min (72°C).

# Diversité des séquences AHAS



**Sur 96 clones:  
-80 séquences similaire AHAS  
-similarité comprise entre 45 et  
95 % d'identité**

# Quantification des séquences AHAS



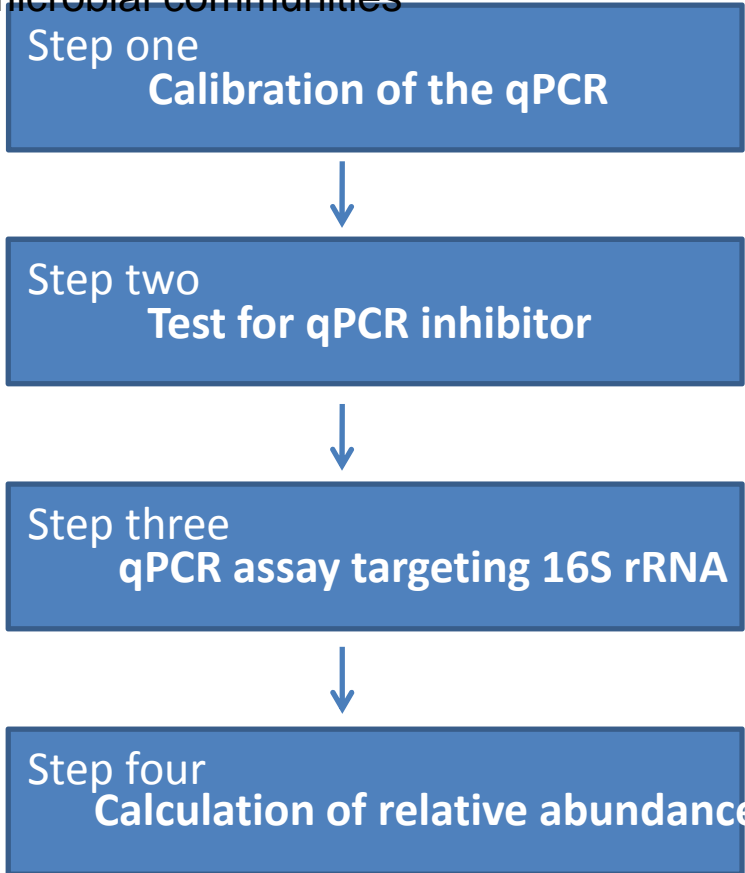
## Premiers résultats:

-impact du nicosulfuron sur l'abondance de la communauté AHAS

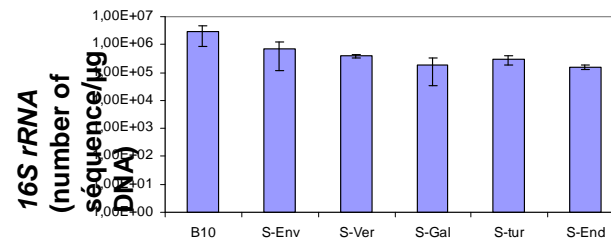
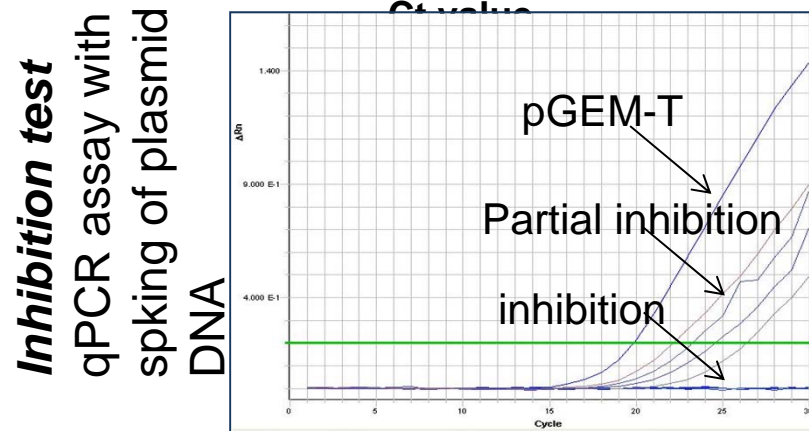
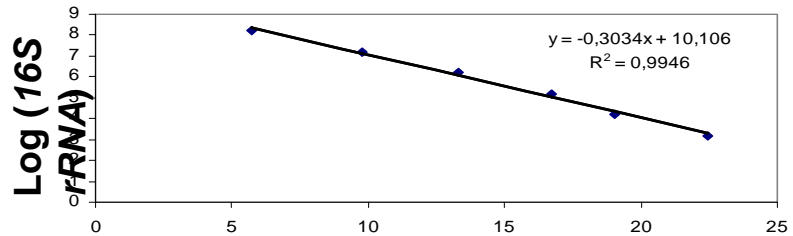


# Discussion avec les instances de normalisation

**New work item:** quantification of the abundance of soil microbial communities



Calibration curve



Présentation Meeting ISO 2011 (Australie: adoption d'un NWI)

**Merci pour votre attention**

*ECOTOX*



Colloque Ecotox, Saint-Lager,  
7-9 Novembre 2011