

Les tests d'écotoxicité terrestre

Eric Thybaud

▶ **To cite this version:**

Eric Thybaud. Les tests d'écotoxicité terrestre. Séminaire National sur l'Ecotoxicologie des sols et des déchets, Dec 1998, Paris, France. pp.46-56. ineris-00972157

HAL Id: ineris-00972157
https://ineris.hal.science/ineris-00972157

Submitted on 3 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LES TESTS D'ECOTOXICITE TERRESTRE

Eric THYBAUD

INERIS
Laboratoire d'Ecotoxicologie
Parc Technologique Alata - BP 2
605550 Verneuil en Halatte
Tél: 03 44 55 66 77 Fax: 03 44 55 67 67
E-mail: Eric.Thybaud@ineris.fr

1. Introduction

Les composés toxiques présents dans les sols ou les déchets, peuvent affecter les différentes espèces présentes dans les sols.

En toute rigueur, compte tenu de la différence de sensibilité entre les différentes espèces voir dans certains cas les différents génotypes d'une même espèce, il serait nécessaire en vue de caractériser l'écotoxicité d'un sol ou d'un déchet de tester la toxicité de celui-ci vis-à-vis de différentes espèces présentes dans les écosystèmes terrestres. Ce schéma idéal mais économiquement non viable peut être simplifié en ayant recours à une batterie de bioessais réalisés avec différentes espèces représentatives des divers milieux, niveaux trophiques et groupes taxonomiques.

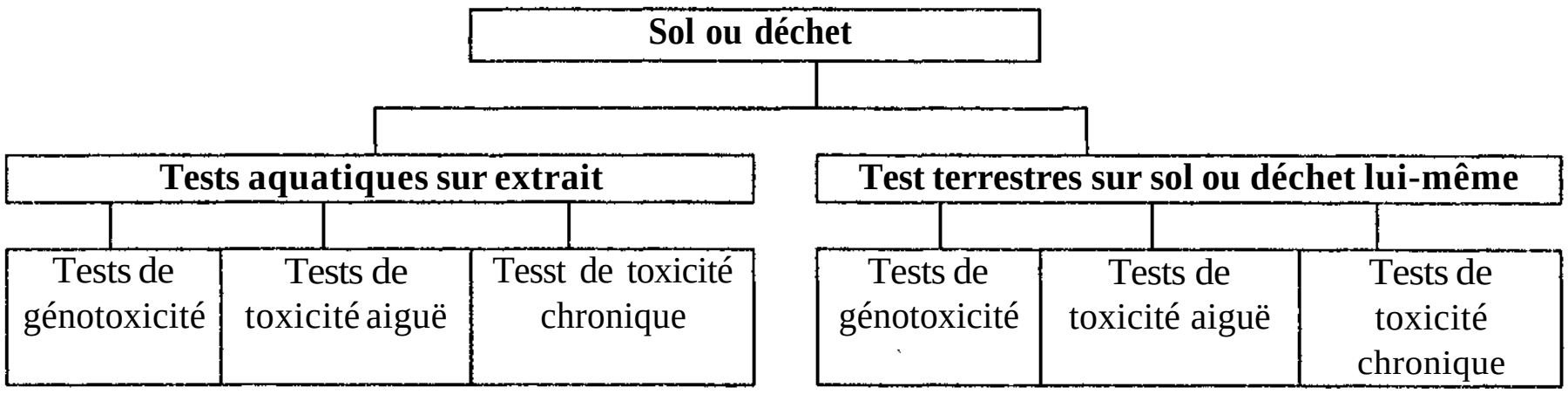


Figure 10 : Différentes approches possibles pour l'évaluation de l'écotoxicité des sols et des déchets au laboratoire.

Dans cet exposé ne seront abordés que les essais terrestres réalisés sur le sol ou le déchet lui-même ; les essais d'écotoxicité aquatiques sur extrait faisant l'objet d'une autre présentation.

L'intérêt majeur des bioessais sur le déchet ou le sol lui-même réside dans la prise en compte de la biodisponibilité des substances contaminantes présentes dans les échantillons vis-à-vis des organismes vivants et dans celle des interactions entre substances chimiques que celles-ci correspondent à des synergies ou des antagonismes.

En revanche, cette approche se heurte à un certain nombre de difficultés techniques telles que la nécessité de l'utilisation d'une matrice de dilution dont la nature peut influer sur la réponse des bioessais ou l'étude de divers types d'échantillons tels que ceux contenant des substances volatiles ou riches en argile ou en graviers.

2. Les bioessais d'écotoxicité terrestre

L'évaluation de l'écotoxicité des sols et des déchets fait appel à l'utilisation de divers bioessais dont certains font l'objet d'une normalisation au niveau national ou international. D'autres, en revanche, sont en cours de développement et en sont pour le moment utilisés que par un nombre limité de laboratoires.

2. 1 Les bioessais normalisés

Parmi ceux-ci, certains correspondent à des essais de toxicité aiguë court terme, d'autre en revanche peuvent être considérés comme des bioessais d'écotoxicité chronique.
En ce qui concerne les producteurs primaires, maillons indispensables des écosystèmes terrestres, deux grandes approches ont fait l'objet d'une standardisation.

La première consiste à étudier l'inhibition de la germination des semences et à déterminer la concentration inhibant la germination de 50% des graines mises en expérimentation. Dans ce but, des graines de diverses espèces végétales sont introduites dans un substrat contenant différentes proportions de l'échantillon à étudier. Après un temps correspondant à la durée normale de germination de l'espèce considérée (de la norme AFNOR NF X 31-201.

Tableau 7), le nombre de graines ayant réellement germées pour chacune des concentrations étudiées est noté et la concentration inhibitrice 50% est déterminée. Ce protocole fait l'objet de la norme AFNOR NF X 31-201.

Tableau 7 : Liste des espèces préconisées pour l'étude de l'inhibition de la germination et délai de germination (AFNOR X 31-201)

Espèce	Délai de germination (en jours)
Avoine	7
Carotte	15
Concombre	7
Cresson alénois	6 à 7
Laitue	7
Lentille	7
Maïs	7
Orge	7
Radis	7
Ray grass	14
Tomate	18à21

La seconde approche concernant quant à elle correspond à des bioessais d'inhibition de la croissance des végétaux et peuvent dont être considérés comme des essais de toxicité chronique.

Deux protocoles font actuellement l'objet d'une standardisation au niveau international.

Le premier (ISO 11269-1) est un essai d'inhibition de la croissance des parties racinaires. Il consiste à déterminer la plus forte concentration n'entraînant pas d'effet statistiquement significatif sur la croissance du système racinaire de deux végétaux (No Observed Effect Concentration, NOEC, ou Concentration Sans Effet Observé, CSEO).

Pour cet essai, des graines prégermées d'orge (*Hordeumvulgare)* sont introduites dans un substrat contenant différentes proportions de l'échantillon à étudier. Après un temps variable en fonction de l'espèce considérée, les plantules sont extraites du substrat contaminé et la longueur de la racine principale est mesurée. La NOEC (ou CSEO) est ensuite déterminée. Cet essai, du fait du recours à des graines prégermées exclu l'étude des effets potentiels des contaminants sur les premiers stades de développement des végétaux.

Le second bioessai (ISO 11269-2), en revanche intègre la phase de germination dans l'essai d'inhibition de la croissance. Celui-ci correspond à une méthode de détermination de la plus forte concentration sans effet observé sur l'émergence et la production de biomasse des parties aériennes de deux espèces végétales, l'une correspondant à une monocotylédone, l'autre à une dicotylédone (Tableau 5). Pour cet essai, 20 graines sont introduites dans un substrat contenant différentes proportions de l'échantillon à tester. Après avoir évalué l'émergence dans chaque pot, seules 5 plantules sont conservées et les effets sur la biomasse sont mesurés après 14 à 21 jours après que 50% des semis témoins aient émergé.

Tableau 8: Liste des espèces préconisées pour l'étude de l'émergence et de la croissance des végétaux supérieurs (ISO 11269-2)

Catégorie	Espèce d'essai
Seigle	*Secale céréale* L.
Ivraie vivace	*Lolium perenne* L.
Riz	*Oryza sativa* L.
Avoine (commune ou d'hiver)	*Avena sativa* L.
Blé tendre	*Triticum aestivum* L.
Orge (de printemps ou d'hiver)	*Hordeum vulgare* L.
Sorgho commun (ou shattercane, ou gros mil, blanc ou millet, gros)	*Sorghum bicolor* (L.) *Moench*
Maïs doux	*Zea Mays* L.
Moutarde blanche	*Sinapis alba* L.
Colza (ou colza d'été, ou colza d'hiver)	*Brassica napus* (L.) ssp. *Napus*
Radis sauvage	*Raphanus sativus* L.
Navet sauvage	*Brassica rapa* ssp. (DC.) Metzg
Chou chinois	*Brassica campestris* L. var. *chinensis*
Fenugrec patte d'oie	*Trifolium ornithopodioides* L.
Laitue	*Lactuca sativa* L.
Cresson de jardin	*Lepidium sativum* L.
Tomate	*Lycopersicon esculentum* Miller Hon
Haricot	*Phaseolus aureus* Roxb.

L'étude de l'écotoxicité des matrices solides vis-à-vis des organismes animaux fait actuellement l'objet de deux protocoles normalisés.

Dans les deux cas, l'organisme test est l'annélide oligochète *Eisenia fetida*.

Le premier essai, relatif à un protocole d'étude de la toxicité aiguë court terme consiste à déterminer la concentration entraînant la mort après 14 jours d'exposition de 50% des vers mis en expérimentation (ISO 11268-1).

Pour ce faire, des vers adultes, âgés de 2 mois minimum et présentant un clitellum bien visible sont introduits dans un substrat contenant différentes proportions de l'échantillon à tester. Après 14 jours, les pourcentages de mortalité "induits pour chacune des concentrations expérimentées sont déterminés permettant de calculer la CL50%.

Le second protocole quant à lui correspond à une essai de toxicité chronique. Il s'agit dans celui-ci de déterminer la plus forte concentration n'ayant pas d'effet sur la reproduction de jeune vers adultes placés pendant un mois dans le substrat contenant diverses proportions de l'échantillons à tester (ISO 11268-2).

Dans ce cas, les effets sur la reproduction sont appréhendés par l'intermédiaire du nombre de jeunes produits.

L'essai consiste donc, après une phase de contamination de 1 mois, à extraire les vers adultes du milieu d'essai et à laisser se développer les cocons produits par ceux-ci pendant un mois supplémentaire dans le milieu d'essai.

Les derniers essais normalisés concernent quant à eux l'étude des microorganismes du sol.

Deux bioessais permettent d'étudier les impacts de la contamination des sols sur la biomasse microbienne de ceux-ci.

Dans le premier (ISO 14240-1), la biomasse est estimée par l'intermédiaire de la respiration induite. Pour ce faire, le substrat d'essai est amendé par une série de concentrations croissantes de glucose jusqu'à atteindre une vitesse de respiration maximale. Il s'agit de la vitesse de respiration maximale initiale. La biomasse microbienne active peut être ensuite estimée à partir de cette respiration maximale initiale.

Dans le second (ISO 14240-2), la biomasse microbienne est estimée à partir du carbone organique libérée par fumigation du sol. En effet, par fumigation, les cellules microbiennes intactes sont lysées et la matière organique microbienne libérée. La matière organique non vivante du sol n'est pas sérieusement affectée par une telle fumigation. Les échantillons de sol sont fumigés au chloroforme pendant 24 heures. Le carbone organique extrait par le sulfate de potassium est déterminée dans des échantillons fumigés et non fumigés, et l'augmentation du carbone organique extrait est utilisée pour déterminer le carbone de la biomasse microbienne.

Enfin, le dernier essai normalisé correspond à l'étude de l'influence de la contamination des sols sur le processus de nitrification et de minéralisation de l'azote dans les sols (ISO 14238).

2.2 Les essais en cours de **normalisation** ou de **développement**

De très nombreuses méthodes permettant d'évaluer l'écotoxicité des matrices solides sont actuellement en cours de développement ou de normalisation.

Ne seront présentés ici que les essais ayant fait l'objet de campagne d'essais interlaboratoires ou en développement dans le cadre des programmes de recherche développés sous l'égide de l'ADEME.

En ce qui concerne les organismes animaux, deux essais sont en phase finale de normalisation au niveau international.

Le premier, en développement à l'ISO, concerne un protocole d'étude de l'inhibition de la reproduction d'un insecte, le collembole parthénogénétique, *Folsomia Candida.*
L'effet sur la reproduction est appréhendé par l'intermédiaire du nombre de jeunes produits après un mois d'exposition.
L'essai consiste donc à introduire de jeunes collemboles dans un milieu d'essai contenant différentes proportions de l'échantillon à tester et à déterminer la plus forte concentration n'ayant pas d'effet significatif sur le nombre de jeunes produits par rapport au témoin (ISO DIS 11267).

Le second essai quant à lui concerne l'étude de l'inhibition de la reproduction des *Enchytraedes* (Annelides oligochètes). Cet essai dont le principe est très proche de celui relatif à l'essai d'inhibition de la reproduction d'*Eiseniafetida* mais dont la durée totale est de six semaines a fait récemment l'objet d'un essai interlaboratoire organisé par l'union européenne.

Ces deux essais, d'inhibition de la reproduction, l'un sur insectes de la litière, l'autre sur enchytraedaes correspondent à des protocoles d'étude de la toxicité chronique pour ces deux espèces.

Au niveau national, un protocole d'étude de la toxicité létale de matrices solides vis-à-vis d'une larve souterraine d'insecte a fait l'objet d'un essai interlaboratoire.

Les arthropodes souterrains, tant par leur position dans la chaîne trophique que par l'importance de la biomasse qu'ils représentent, interviennent pour une part importante dans les phénomènes biologiques dans les sols. Les larves de Scarabïdae ont en particulier un rôle fondamental de consommateur primaire et servent de proie à de nombreux prédateurs tant vertébrés qu'invertébrés. Il a donc été jugé particulièrement intéressant de pouvoir disposé d'un protocole d'étude de la toxicité vis-à-vis de ce type d'organismes.

Du fait de sa large répartition géographique et de sa tolérance élevée à différentes natures de substrat c'est la larve d'*Oxythyrea funesta* qui a été choisie comme organisme test.

L'essai ayant fait l'objet de l'essai circulaire organisée par l'AFNOR et faisant maintenant l'objet d'une proposition à l'ISO consiste à déterminer la concentration létale 50% des larves *iïOxyihyrea funesta.*

Pour ce faire, les larves sont introduites pendant 10 jours dans un substrat contenant différentes proportions de l'échantillon à tester.

Enfin chez les animaux, un essai d'inhibition de la croissance des escargots *(Hélix aspersa aspersa* et *Hélix aspersa maxima*) est en phase finale de mise au point.

Au cours de cet essai, les organismes sont mis en présence des contaminants par l'intermédiaire de la nourriture.

En ce qui concerne les végétaux, un biotest permettant de mettre en évidence des situations de phytoxicité sublétale ou aiguë chez des végétaux modèles est en cours de développement.

Cet essai consiste dans un premier temps à mesurer des paramètres morphologiques (biomasse des parties aériennes et racinaire, surface foliaire des feuilles primaires. L'expression de biomarqueurs du métabolisme cellulaire (enzyme malique, glucose 6 - phosphate deshydrogénase, glutamate deshydrogénase, isocitrate deshydrogénase et peroxydases) est étudié dans un second temps.

L'acquisition des paramètres morphologiques et des biomarqueurs du métabolisme permet ensuite de classer l'écotoxicité des substrats en classe de toxicité.

Enfin le dernier protocole en cours de développement concerne l'étude de l'impact des contaminants sur le matériel génétique des plantes.

Cet essai, développé sur cellules méristématiques de racine et de pousses d'orge (*Hordeumvulgare*) permet d'évaluer la présence dans le sol , ou le déchet, de contaminants biodisponibles présentant une action clastogène (altération de la structure des chromosomes) ou anaploïdogène (altération du nombre de chromosomes).

Celle-ci est évaluée par l'intermédiaire du taux d'induction de micronoyaux correspondant à des fragments de chromosomes ou chromosomes entiers présents dans le cytoplasme cellulaire.
Ce protocole a fait l'objet d'une proposition de normalisation à l'ISO au cours des mois précédents.

3. La matrice de dilution

La réalisation des bioessais sur des échantillons solides nécessite, dès lors qu'une relation effet/dose est recherchée en vue de la détermination d'une concentration efficace 50% ou d'une NOEC, l'utilisation d'une matrice de dilution.

Diverses alternatives peuvent être envisagées. Certaines d'entre elles ont fait l'objet par le passé d'une normalisation lors du développement des tests biologiques.

La première catégorie de matrice de dilution envisageable correspond à l'utilisation de substrat inerte ne réagissant que faiblement avec les divers constituants de l'échantillon soumis à essai.

Deux types de substrat ont ainsi pu être utilisés :

- *Un substrat artificiel inerte constitué de silice amorphe (gel de silice en poudre impalpable) et de billes de verre de 1,5 à 2 cm de diamètre.*

  Cette matrice appelée « Artisol » correspond au substrat d'essai de la norme française X 31-250 d'octobre 1984 relative à la détermination de la toxicité d'une substance chimique vis-à-vis des lombriciens.

- *Un substrat inerte de type sable.*

  Celui-ci est en particulier préconisé dans la norme française X 31-2201 d'octobre 1982 relative à l'essai d'inhibition de germination des semences par une substance.

  Dans ce cas, le sable utilisé correspond à du sable de Fontainebleau, ayant une granulométrie comprise entre 0,5 et 0,8 mm, lavé aux acides et rincé à l'eau.

La seconde catégorie de matrice de dilution utilisable correspond à l'inverse à des substrats artificiels ou naturels pouvant interagir avec les constituants de l'échantillon testé.

- *Un substrat artificielappelé « substrat artificiel ISO ».*

  Celui-ci doit son nom au fait qu'il correspond au substrat d'essai préconisé par l'ISO pour la réalisation des essais de létalité ou d'inhibition de la reproduction des vers de terre (ISO 11268-1 et 2) et d'inhibition de la reproduction des collemboles (ISO DIS 11267).

  Ce substrat est constitué d'un mélange de :

  - ♦ Sphaigne finement moulue exempte de tous résidus de plante visible. (Tourbe de sphaigne blonde, broyée à 2 mm). 10%
  - ♦ Argile kaolinique contenant plus de 30% de kaolinite 20%
  - 4 Sable de quartz industriel (sable fin dominant dont plus de 50% des grains présentent une granulométrie de 0,05 mm à 0,2 mm) par exemple sable de Fontainebleau 70%
  - ♦ Carbonate de calcium ($CaCO_3$) pulvérisé de qualité analytique reconnue en quantité suffisante pour amener le pH du substrat humidifié à 6,0 ± 0,5. Le substrat doit être humidifié avec de l'eau déionisée ou distillée jusqu'à 40 à 60% de la capacité de rétention en eau.

- *Un sol naturel* tel que préconisée dans la norme AFNOR X 31-202 de septembre 1986 relative à l'inhibition de la croissance dès végétaux par une substance, et ayant les caractéristiques suivantes :

- Teneur en argile (particules inférieures à 2 µm) 15 à 20%
- Teneur en carbone organique 2,5 à 3,5%
- pH compris entre 6 et 7
- Rapport carbone / azote compris entre 6 et 10
- Capacité d'échange cationique en millimole pour 100 g de sol compris entre 7 et 10
- Carbonate de calcium = traces

Les principales propriétés de ces différentes matrices de dilution en terme de comportement et de mode de préparation sont présentées dans le ,

Tableau 9 : Principales propriétés des différentes matrices de dilution utilisables pour les bioessais d'écotoxicité

	Substrat inerte	Substrat artificiel (ISO)	Sol naturel
Standardisation	+++	++	-
Représentativité par rapport au sol naturel	-	+(+)	+++
Reproductibilité	+++	++	-
Interaction avec les constituants de l'échantillon	-	+++	+++
Information sur la qualité du substrat	+++	++	-

L'utilisation de l'un ou l'autre de ces substrats comme matrice de dilution dans les bioessais d'écotoxicité du fait des caractéristiques propres à chacun de ceux-ci peut donc conduire à des évaluations différentes de l'écotoxicité d'un même échantillon.

De plus, certaines matrices de dilution peuvent influer directement sur le développement des organismes test.

Dans le cas des végétaux par exemple, l'utilisation de sable comme substrat conduit à une carence nutritive se traduisant par une réduction de la biomasse végétale produite avec apparition éventuelle de phénomènes phytotoxiques (Tableau 10).

Tableau 10 : Influence de la nature du substrat sur la croissance de la laitue (*Lactucasativa*)

Nature du substrat	Poids sec moyen d'une pousse (en mg)
Sable	2,52
Substrat artificiel « ISO »	5,13

L'introduction d'une solution nutritive dans l'eau de réhydratation du substrat peut annuler cette carence nutritive et par là même son impact sur la croissance végétale (Tableau 11).

Tableau 11 : Influence de l'addition de solution nutritive dans l'eau de réhydratation sur la croissance de la laitue dans le sable -

Teneur en solution nutritive dans l'eau de réhydratation	Poids sec moyen d'une pousse (en mg)	Variation de croissance par rapport au témoin
0% (sable seul)	2,52	-
25%	5,43	+ 115%
50%	5,82	+ 130%
100%	7,53	+ 198%

L'addition de 25% de solution nutritive (milieu de Hoagland) dans l'eau de réhydratation du substrat permet donc une croissance comparable des pousses de laitue à celle observée dans le substrat artificiel ISO. Mais ces substances nutritives peuvent interagir avec les contaminants présents.

Des matrices de type substrat artificiel ou sol naturel, soit des matrices plus complexes vont influer sur la biodisponibilité des contaminants présents dans les échantillons.

Ainsi par exemple, lors d'un essai d'évaluation de l'inhibition de luminescence de *Vibrio fisheri* en phase solide, la toxicité de l'échantillon de sol contaminé par du cadmium, du chrome, du plomb et du zinc est fortement diminué lorsque le sol est « dilué » avec de la tourbe par rapport à ce même sol dilué avec du sable (Cf Figure 2, dilution 1/2).

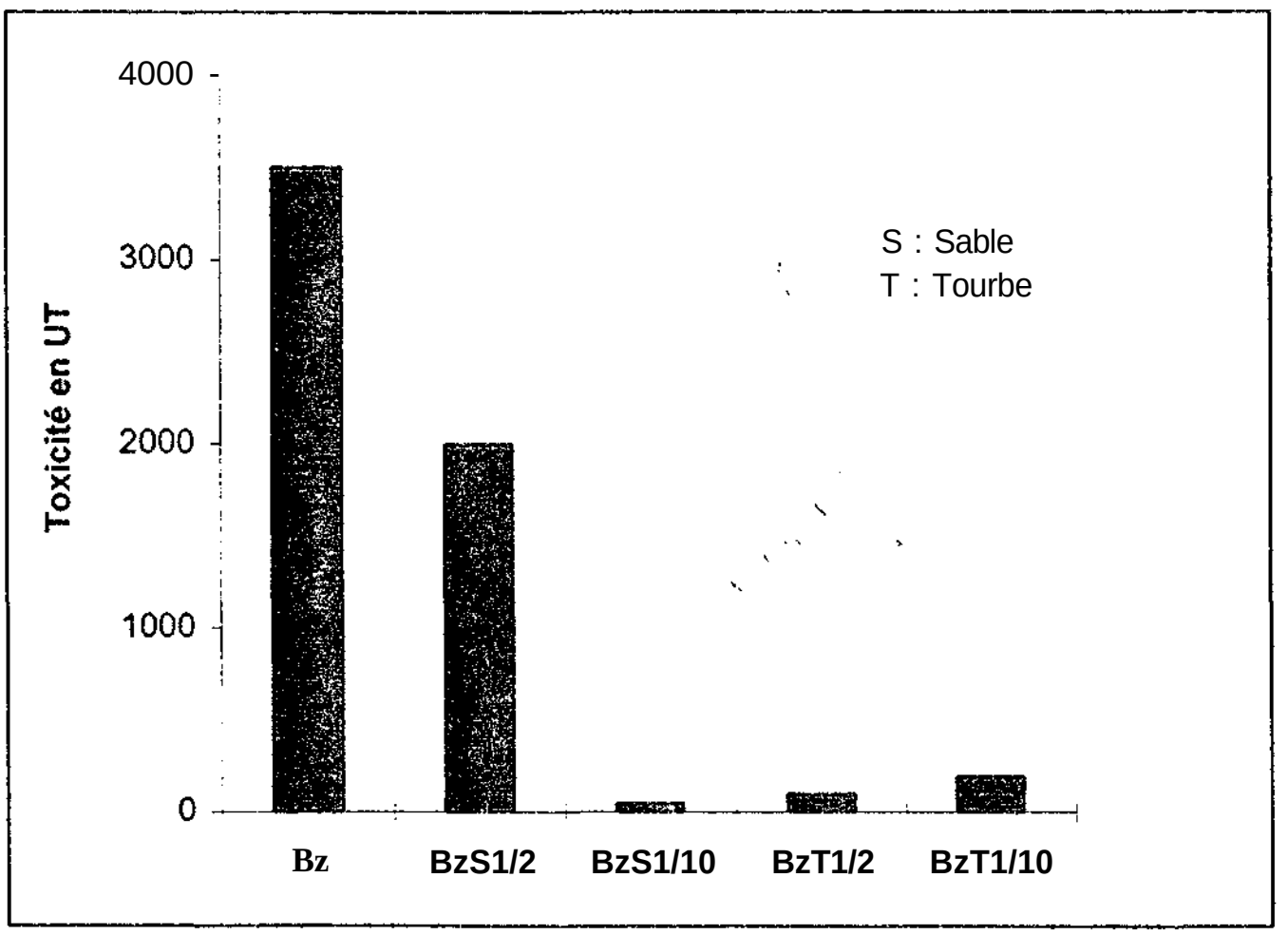


Figure 11 : Evolution de la toxicité par MICROTOX solide en fonction du type de diluant

Dans le cas des essais d'inhibition de la germination des semences, la toxicité du chlorure mercurique est fortement influencée par la nature du substrat d'essai utilisé (Tableau 12).

Tableau 12 : Influence du pH et de la nature du substrat sur la réponse des tests biologiques

		Sable de Fontainebleau	Substrat artificiel pH4	Substrat artificiel pH6	Terreau
Orge	CSEO	63 mg/kg	968 mg/kg	1453 mg/kg	> 5000 mg/kg*
	CI 50	105 mg/kg (90-123 mg/kg)	1121 mg/kg (1077-1164 mg/kg)	2152 mg/kg (2031-2329 mg/kg)	> 5000 mg/kg*
Laitue	CSEO	83 mg/kg	726 mg/kg	627 mg/kg	< 1000 mg/kg*
	CI 50	129 mg/kg (124-135 mg/kg)	1010 mg/kg (814-1252 mg/kg)	1353 mg/kg (989-1851 mg/kg)	< 1000 mg/kg*

* : résultats d'essai préliminaires

Ainsi pour l'orge, la CI50 du mercure passe d'une valeur de 105 mg/kg pour le sable à une valeur supérieure à 5000 mg/kg pour le terreau. La toxicité constatée apparaît donc corrélée à la teneur en matières organiques du substrat. Elle est d'autant plus élevée, que cette teneur en M.O. est faible (sable : 0%, sol artificiel : 6,5%, terreau : 15%).

Une évolution de pH pour un même substrat, influe également sur la réponse de cet essai de germination ; la CI50 du mercure pour l'orge est ainsi multipliée par 2 pour le sol artificiel entre un pH de 4 et 6 (Tableau 12).

En ce qui concerne la laitue, des variations de réponse ont également été constatée ; mais celles-ci sont apparues inférieures à celles enregistrées lors des essais sur l'orge.

Une observation identique a pu être réalisée lors d'un essai d'inhibition de la croissance de la lentille.

Ainsi la CE50 du sol étudié (sol contaminé par des métaux et des PCB) est de 38% lors d'une dilution avec du substrat artificiel ISO et de 6,9% lors d'une dilution avec du Sable de Fontainebleau.

La biodisponibilité des xénobiotiques dans les deux cas n'apparaît donc pas identique, l'introduction de substrat artificiel ISO entraînant vraisemblablement une complexation d'un certain nombre de métaux.

A l'évidence, il n'existe pas de matrice universelle satisfaisante dans tous les cas de figure envisagés.

Le choix de la matrice de dilution doit donc être adapté en fonction de l'objectif de l'étude :

- Evaluation de la toxicité intrinsèque d'un échantillon,
- Evaluation des risques,
- Epandage de boues par exemple.

Dans le premier cas, il pourra être fait appel, dans la mesure du possible, à l'utilisation d'une matrice de dilution inerte ne réagissant que faiblement avec les contenants présents dans l'échantillon.

Dans les 2 derniers cas en revanche, où une représentativité par rapport aux conditions environnementales est recherchée, l'utilisation d'un sol artificiel ou d'un sol directement prélevé aux abords du site peut s'avérer le choix le plus judicieux.