

L'ÉVALUATION ÉCOTOXICOLOGIQUE DE LA QUALITÉ DES SOLS

DES BIOESSAIS D'ÉCOTOXICITÉ POUR L'ÉVALUATION PAR EXPOSITION DIRECTE DE LA QUALITÉ DU SOL

DESCRIPTION THÉORIQUE DU PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

Les bioessais d'écotoxicité permettent l'étude des effets **toxiques** des substances, naturelles ou d'origine anthropique, et des matrices environnementales (comme un sol) sur des organismes vivants (microorganismes, végétaux, animaux).

L'évaluation écotoxicologique des sols repose le plus souvent sur des **essais réalisés en laboratoire avec des organismes modèles** dont la biologie et la sensibilité aux polluants sont généralement connues. Il existe deux approches complémentaires : l'**approche par exposition directe** à la matrice sol qui étudie les impacts de la matrice et/ou des polluants qu'elle contient sur des organismes et l'**approche indirecte** qui étudie les effets des polluants mobilisables par l'eau (via un éluât de ce sol) sur des organismes aquatiques. Dans cette fiche, seuls les effets par exposition directe à ce sol sont étudiés.

L'objectif de ces essais est de déterminer la toxicité d'un sol pour une espèce en caractérisant l'effet toxique sur un groupe d'individus de cette espèce. Les critères d'effets qui sont suivis sont variables : on distingue d'une part les effets dits létaux, qui entraînent la mort des organismes et qui surviennent souvent dans un court laps de temps après l'exposition au sol (**exposition aiguë**) et d'autre part les effets sublétaux, tels que l'inhibition de la reproduction ou de la croissance, qui apparaissent généralement après une exposition plus longue

(**exposition chronique**). Le résultat d'un essai d'écotoxicité s'exprime en pourcentage d'effet observé sur un critère par rapport à un groupe d'individu non exposé au sol à tester. Selon les critères d'effets suivis, les bioessais peuvent renseigner sur la présence de substances ayant un mécanisme d'action spécifique (génotoxique, mutagène, perturbateur du système endocrinien) ou leurs effets.

De très nombreux types d'essais existent pour évaluer les effets sur les organismes d'une ou plusieurs substances présentes dans le sol et leurs protocoles sont pour la plupart normalisés. Ils sont bien documentés dans la littérature scientifique et de nouveaux essais voient le jour chaque année. Une approche par **batteries de bioessais** est généralement préconisée pour caractériser le danger d'une matrice environnementale. Les bioessais qui constituent la batterie mettent en œuvre des organismes de niveaux trophiques et de groupes taxonomiques différents, pertinents pour évaluer les effets de la matrice sur la qualité du sol. Ils permettent également de couvrir les différentes typologies d'effets et sensibilités aux polluants. Le nombre d'essais dans la batterie est rationalisé pour sacrifier le moins d'organismes possible. Les données acquises donnent ainsi une information sur l'écotoxicité du sol testé pour les organismes modèles par rapport à un sol de référence.

Organismes concernés		Bioessais	Norme associée	Essai aigu	Essai chronique	Essai de génotoxicité
"Microfaune Mésofaune"	Nématodes	Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de <i>Caenorhabditis elegans</i>	NF ISO 10872		X	
	Acarie	Inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur (<i>Hypoaspis aculeifer</i>) par des contaminants du sol	NF EN ISO 21285		X	
	Collembolés	Essai d'évitement pour contrôler la qualité des sols et les effets des produits chimiques sur le comportement : essai avec des collembolés (<i>Falsomia candida</i>)	NF EN ISO 17512-2	X		
		Inhibition de la reproduction de <i>Collembola</i> (<i>Falsomia candida</i>) par des contaminants du sol	NF EN ISO 11267		X	
	Enchytrées	Effets de contaminants sur les Enchytraeidae (<i>Enchytraeus</i> sp.) - Détermination des effets sur la survie et la reproduction	NF EN ISO 16387		X	
Macrofaune	Lombrics	Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>	NF EN ISO 11268-1	X		
		Détermination des effets sur la reproduction de <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>	NF EN ISO 11268-2		X	
		Essai d'évitement pour contrôler la qualité des sols et les effets des produits chimiques sur le comportement - essai avec des vers de terre (<i>Eisenia fetida</i> et <i>Eisenia andrei</i>)	NF EN ISO 17512-1	X		
	Gastéropodes	Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (<i>Helicidae</i>) - Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol	NF EN ISO 15952		X	
	Scarabées	Effets des polluants vis-à-vis des larves d'insectes (<i>Oxythreya funesta</i>) - Détermination de la toxicité aiguë	NF EN ISO 20963	X		
Végétaux supérieurs		Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines	NF EN ISO 11269-1	X		
		Essai de détection de l'émergence des plantules de laitue (<i>Lactuca Sativa</i> L.)	NF ISO 17126	X		
		Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs	NF EN ISO 11269-2	X		
		Toxicité chronique sur les plantes supérieures	NF EN ISO 22030		X	
		Evaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs - Essai des micronoyaux sur <i>Vicia faba</i>	NF EN ISO 29200			X

Principaux bioessais d'écotoxicité normalisés applicables sur des sols pollués.

L'ÉVALUATION ÉCOTOXICOLOGIQUE DE LA QUALITÉ DES SOLS

CONTEXTE D'UTILISATION

La conduite de bioessais peut être pertinente dans le cadre de la gestion des sites et sols pollués, en complément des analyses physico-chimiques classiquement réalisées, car ils intègrent les effets liés à la présence conjointe de divers polluants ainsi que certains paramètres complexes comme la spéciation et la biodisponibilité des polluants.

Ils sont mis en œuvre **sur tous types de sols** capables de supporter la vie. Au besoin, le sol testé est enrichi en nutriments (amendé) pour différencier les effets néfastes liés à la pollution de ceux liés à de faibles concentrations en nutriments. Un sol témoin non pollué et amendé est alors nécessaire pour pouvoir dissocier l'effet lié au polluant de celui lié aux paramètres agro-pédologiques du sol.

Les essais d'écotoxicité sont réalisés avec du sol **prélevé en surface** : la méthode est donc indiquée pour des sols pollués par des dépôts de déchets, des dépôts atmosphériques, des fuites accidentelles, des résidus miniers... ou par remontée d'une pollution souterraine. Les bioessais peuvent également être appliqués dans le cas de la valorisation de **terres excavées** afin de s'assurer de la qualité des terres à évacuer, éventuellement déjà excavées et entreposées.

À quelle étape ?

Les essais d'écotoxicité apportent une information exploitable à n'importe quelle étape dans la gestion d'un site pollué ; néanmoins, certains essais sont plus pertinents lors

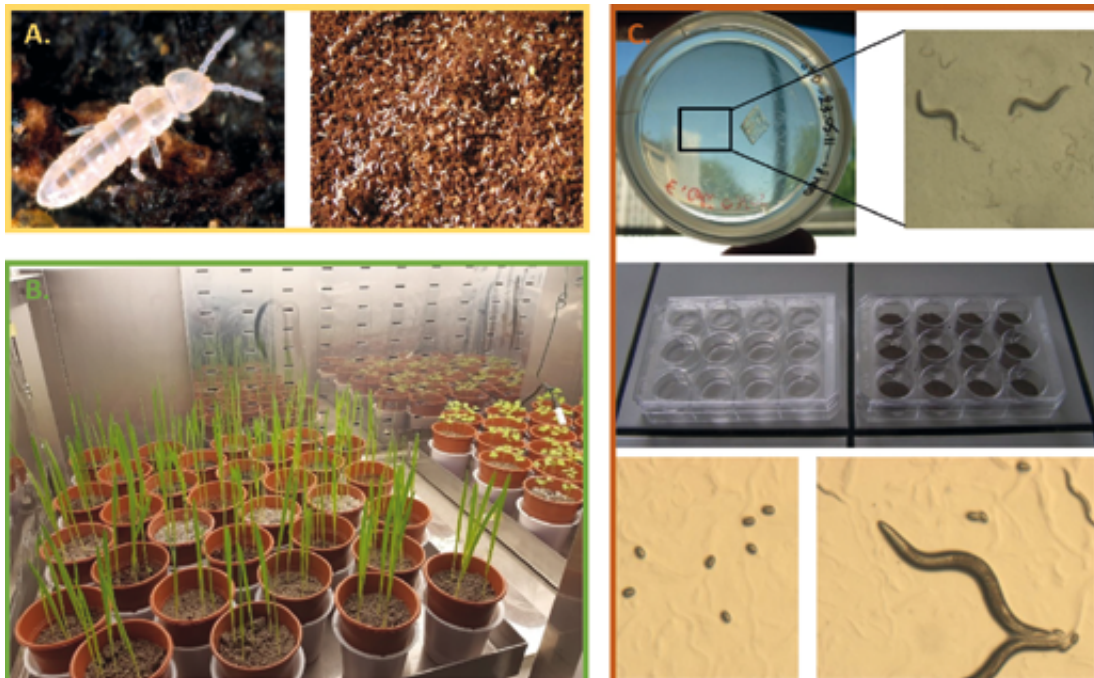
de certaines phases. La batterie de tests choisie dépend des questions associées aux polluants présents.

Lors du **diagnostic**, les bioessais permettent d'appréhender l'évaluation des risques pour les écosystèmes, car ils prennent en compte de nombreux paramètres :

- le danger lié aux substances dans le sol vis-à-vis des organismes,
- l'effet cocktail du mélange des substances présentes,
- les processus liés à la mobilité voire à la biodisponibilité des substances,
- les voies de transfert et d'exposition vers les cibles environnementales.

Lors de la mise en place des mesures de gestion, les bioessais permettent de **s'assurer de la compatibilité** entre le niveau de pollution sur le site ou l'état des terres excavées avec l'usage du site. Lors du **plan de gestion**, les essais aident au choix des techniques à mettre en œuvre et pendant le **plan de conception des travaux (PCT)**, ils permettent d'évaluer l'efficacité du traitement, de manière complémentaire à des résultats d'analyses chimiques. Ils peuvent également être utilisés en phase travaux dans le cadre du **suivi d'une opération de dépollution**.

Enfin, les bioessais peuvent être des outils à intégrer aux plans de **surveillance environnementale**, car ils sont adaptés pour mesurer l'évolution dans le temps des effets sur les organismes liés aux polluants, avant ou après dépollution.



Exemple de bioessais : A. Essai d'inhibition de la reproduction des collemboles par des polluants du sol ; B. Détermination des effets des polluants vis-à-vis des végétaux supérieurs (inhibition de l'émergence et de la croissance) ; C. Détermination des effets des polluants vis-à-vis de la croissance, la fertilité et la reproduction des nématodes.

POLLUANTS CONCERNÉS

Les méthodes sont intégratives et traduisent les effets toxiques de **l'ensemble des substances chimiques** présentes sur les organismes testés, de leur spéciation mais aussi des effets synergiques ou antagonistes qui peuvent avoir lieu lorsque l'on est en présence d'un mélange de substances.

L'effet de certains polluants est plus visible sur certains organismes ; la sélection des essais peut être optimisée en ce sens afin de pouvoir prendre en compte les espèces plus sensibles mais **l'inventaire des polluants dans le sol n'est pas nécessaire** pour garantir l'efficacité de la méthode.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE

Le matériel déployé dépend des bioessais envisagés. Ces bioessais sont, sauf exception, réalisés au laboratoire et nécessitent généralement un matériel courant tel que de la verrerie de laboratoire (bécher, cristalliseur...) et du matériel de culture (bain-marie, incubateurs...). L'environnement dédié à la prise en charge, la préparation et le stockage des sols doit être sécurisé s'ils présentent un danger pour le manipulateur (EPI, hottes aspirantes, congélateurs...).

Un environnement contrôlé en température, hygrométrie et éclairage est nécessaire à la fois pour maintenir en élevage les organismes modèles (nématodes, lombrics...) mais aussi

lors des phases d'exposition aux sols à tester. Pour cela, il est utile de disposer de pièces régulées ou de chambres climatiques dédiées.

Enfin, certains matériels optiques ou analytiques peuvent être nécessaires. Il s'agit le plus souvent de microscopes ou loupes binoculaires pour la détermination des critères d'effets ou encore de lecteur de microplaques pour les méthodes nécessitant de la colorimétrie ou de la fluorimétrie. Dans des cas plus spécifiques, du matériel de biologie moléculaire de base peut également être nécessaire pour mesurer certains effets subcellulaires.

MÉTHODOLOGIE

Les investigations sont réalisées suivant trois phases distinctes.

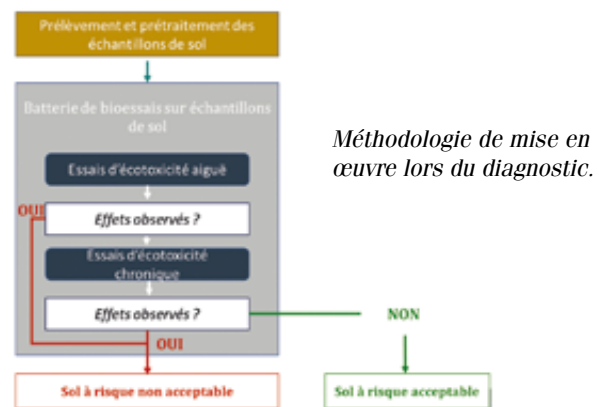
La **collecte des échantillons** se traduit par le prélèvement sur le terrain, à l'aide d'une pelle ou d'une tarière, d'une quantité de sol en un point donné du site ou en plusieurs points sur une zone du site (échantillon composite). Le sol est **prélevé en surface**, généralement dans les 20 premiers cm de profondeur, idéalement moins (5 à 10 cm). Cette profondeur correspond à la zone qui accueille la plus grande densité d'organismes et à la longueur racinaire de nombreux végétaux. Le plan d'échantillonnage (nombre et localisation des échantillons) est à adapter en fonction du site à étudier (superficie, hétérogénéité...). Il est important que les échantillons soient prélevés dans de bonnes conditions et soient représentatifs du sol à tester et de la zone étudiée ; le suivi des préconisations de la norme ISO 18400-203 permet de s'en assurer. Lors du prélèvement, le sol est généralement grossièrement tamisé sur site pour enlever les éventuels cailloux et/ou débris de végétaux. La quantité de sols nécessaire dépend du type de bioessai ou de la batterie de bioessais : de 1 kg de sol pour la réalisation ponctuelle de certains bioessais (essais sur nématode ou sur bactéries) à plus de 30 kg pour les batteries de tests les plus complètes.

Le sol prélevé peut, au besoin, être conservé dans une enceinte réfrigérée ou congelée, dans une durée aussi courte que possible et adaptée aux essais envisagés (selon la norme NF ISO 18400-206), pendant des conditions limitant l'activité microbienne et respectant autant que possible les conditions redox.

La **mise en œuvre des essais** est réalisée en laboratoire. L'échantillon est tamisé à 4 mm ou 2 mm, homogénéisé et caractérisé. A minima le pH, le taux d'humidité et la capacité de rétention d'eau doivent être déterminés. Pour certains tests, une étape de congélation est nécessaire afin de débarrasser l'échantillon de la faune indigène. En fonction de l'objectif à atteindre, le **choix des essais d'écotoxicité** par un spécialiste du domaine et leur mise en œuvre sont différents :

- Lors du **diagnostic**, la réalisation d'une **batterie de bioessais complète** (plus de trois essais) est nécessaire pour caractériser le risque que représente la présence de polluants dans le sol. La sélection de la batterie de tests prend en considération les différents effets mesurés (toxicité aiguë, toxicité chronique, génotoxicité) et les différents niveaux trophiques des organismes testés (végétaux, consommateurs primaires, secondaires, décomposeurs...) pour déterminer quels sont les points les plus préoccupants sur une zone polluée. Dans un premier temps, des essais simples et peu coûteux sont réalisés (essais aigus ou court

terme). Ils permettent d'identifier les zones très polluées qui ont des impacts observables rapidement sur les organismes (mortalité ou germination par exemple). Dans un second temps, des essais plus complexes sont réalisés sur les échantillons pour lesquels aucun effet significatif n'a été démontré lors de la réalisation des essais à court terme. L'objectif est de renseigner les effets à long terme (impact sur la croissance des plantes, succès de la reproduction des invertébrés...) liés à une exposition chronique aux substances polluantes présentes dans le sol.



© Ineris

- Pendant le **plan de conception des travaux et le suivi de dépollution**, les bioessais sélectionnés doivent permettre de choisir entre des techniques de traitement à mettre en œuvre mais aussi de renseigner sur l'efficacité du traitement.
- Lors de la **surveillance environnementale**, les bioessais choisis, rapides et peu coûteux, peuvent être utilisés pour surveiller l'évolution des impacts du sol sur les organismes vivants après vérification de leur pertinence vis-à-vis des concentrations résiduelles à surveiller.

Le **traitement des données et l'interprétation des résultats** font intervenir les compétences d'un spécialiste du domaine. Le résultat des observations réalisées sur les organismes exposés au sol pollué à évaluer sont comparés à ceux obtenus sur un ou plusieurs sols «témoin». Le résultat s'exprime en pourcentage d'effet observé sur un critère (concentration qui provoque x % d'effet) par rapport à une situation de référence (essai témoin). Pour mettre en évidence un impact sur les organismes testés, le résultat obtenu sur un sol pollué doit être statistiquement différent de celui obtenu sur un sol témoin et doit présenter un effet significatif sur le fonctionnement ou la structure des écosystèmes.

AVANTAGES – INCONVÉNIENTS – MATURITÉ DE LA TECHNIQUE

AVANTAGES

Échantillonnage

- Simple à mettre en œuvre,
- Pratique commune avec l'échantillonnage pour analyses chimiques classiques.

Polluants

- Utilisable quels que soient les polluants,
- Connaissance des polluants présents non nécessaire mais recommandée pour la sécurité des manipulateurs.

Laboratoires, matériel d'analyse

- Pas de matériel d'analyse coûteux.

Résultats d'interprétation

- Expression du résultat en pourcentage d'effets par rapport à un témoin simple à communiquer,
- Approche intégratrice : prends en compte l'interaction des substances entre elles, les autres paramètres physicochimiques du milieu, et les organismes (biodisponibilité).

INCONVÉNIENTS

Échantillonnage

- Utilisation jusqu'à 30 kg de sol.

Laboratoires, matériel d'analyse

- Nécessité de maintenir un élevage d'organismes ou de les commander.

Influence sur les résultats et incertitudes

- Certains paramètres du sol (structure, composition) peuvent être un facteur confondant avec l'effet des polluants,
- Influence de l'hétérogénéité spatiale et temporelle des échantillons sur les résultats.

Résultats d'interprétation

- Interprétation des résultats par un spécialiste du bioessai testé,
- Nécessité de connaître la robustesse des tests pour l'interprétation des résultats obtenus.

MATURITÉ DE LA TECHNIQUE



R&D aboutie, indicateurs développés, technique utilisée sur le terrain

DÉLAIS DE MISE EN ŒUVRE

La phase d'échantillonnage sur site est rapide : il faut compter 2 heures pour le prélèvement et le tamisage de 3 points. Le temps de réalisation des bioessais est variable selon le bioessai ou la batterie de bioessais : de 24 à 48 h pour les essais les plus courts à plusieurs semaines/mois pour des

essais chroniques avec des organismes ayant un cycle de vie plus long. Le faible nombre de laboratoires privés réalisant les analyses peut également ajouter une contrainte temporelle. Il faut ensuite compter quelques jours pour le traitement des données, la mise en forme et l'interprétation des résultats.

PHASE	DIAGNOSTIC	DÉPOLLUTION (PG, PCT, SUIVI)	SUIVI ENVIRONNEMENTAL
Délai associé	⌘ ⌘ ⌘	⌘ ⌘ ⌘ > ⌘ ⌘ ⌘	⌘ ⌘ ⌘

⌘ : jour / ⌘⌘ : semaine / ⌘⌘⌘ : mois

ÉLÉMENTS DE COÛTS

Les coûts de l'échantillonnage sont faibles et correspondent au coût d'un ou deux opérateurs sur site (les grandes quantités de sols à tamiser sont plus simples à gérer en binôme). Dans l'idéal, les essais sont réalisés en une fois pour un nombre d'échantillons qui dépend des dimensions du laboratoire (5 à 8 échantillons en moyenne). Le coût d'un essai court

terme est compris entre 100 et 300 € alors que celui d'un essai long terme est compris entre 1000 et 2000 €. Le coût d'une batterie d'essai complète (court terme + long terme) est estimé entre 2000 et 5000 € pour 1 à 3 échantillons. A ces coûts s'ajoute le prix de traitement des résultats obtenus par un spécialiste.

PHASE	DIAGNOSTIC	DÉPOLLUTION (PG, PCT, SUIVI)	SUIVI ENVIRONNEMENTAL
Coût associé	€€€ > €€€	€€€ > €€€	€€€

€ < 100 € / €€ < 1000 € / €€€ > 1000 €

POUR EN SAVOIR PLUS – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Pandard, P. (2006). "Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes." *Science of the Total Environment*
- [2] Thomas, J. M. (1986). "Characterization of Chemical Waste Site Contamination and Determination of Its Extent Using Bioassays." - *Environmental Toxicology and Chemistry*
- [3] Thèse M. Louzon - Développement d'indicateurs chimiques et biologiques pour l'évaluation des risques environnementaux des sites et sols contaminés – octobre 2020
- [4] Norme NF ISO 18400-206 – Qualité du sol – échantillonnage : collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire