



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



THESE

Présentée par **Pierre HUGUIER**

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)

Préparée au sein de l'unité Essais et Expertise en écotoxicologie (EXES)

INERIS, Verneuil-en-Halatte

avec la collaboration du Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements

Continentaux

(UMR 7360 LIEC CNRS-Université de Lorraine)

**Intérêt des organismes de la microfaune du sol pour la
détermination de l'écotoxicité des matières fertilisantes et
déchets valorisés en agriculture : le nématode *Caenorhabditis
elegans* et l'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer*.**

Thèse soutenue, le 17/12/2014 devant le jury composé de :

Annette DE VAUFLEURY, Rapporteur

Jérôme CORTET, Rapporteur

Carole LEGUILLE, Examineur

Mickael HEDDE, Examineur

Pascale BAUDA, Directrice de thèse

Pascal PANDARD, Co-Directeur de thèse

Véronique POULSEN, Invitée

Nicolas MANIER, Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Annette DE VAUFLEURY et Jérôme CORTET pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Carole LEGUILLE et Mickael HEDDE pour avoir jugé ce travail en tant qu'examinateur, et à Véronique POULSEN et à Nicolas MANIER pour avoir accepté de participer à ce jury.

Merci également à Christian MOUGIN, responsable de l'unité Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés (PESSAC) au sein de l'INRA (Versailles), ainsi que Véronique POULSEN, responsable de l'unité Evaluation en Ecotoxicologie et Environnement des Intrants du Végétal au sein de l'ANSES pour leur présence et leurs conseils lors du comité de pilotage de thèse.

Je tenais à remercier sincèrement Pascale BAUDA, ma directrice de thèse, pour m'avoir suivi durant ces quatre années, malgré la distance, et pour ses conseils, plus particulièrement lors de la rédaction du manuscrit. Travailler avec vous aura été très enrichissant durant la thèse ainsi que pendant les années de licence et de master. Merci pour votre enthousiasme et votre disponibilité. Egalement merci pour m'avoir motivé pendant les moments difficiles.

Je voudrais remercier Eric THYBAUD, responsable du pôle « Dangers et impacts sur le vivant », ainsi que Pascal PANDARD, responsable de l'unité « Essais et expertise en écotoxicologie » (EXES) et co-directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux dans de bonnes conditions au sein de l'unité EXES à l'INERIS.

Je remercie Nicolas MANIER et Pascal PANDARD pour leur encadrement, leur enthousiasme et l'énergie consacrée jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Nos nombreuses discussions ainsi que vos conseils scientifiques et pratiques m'ont permis de mener à bien ce projet.

Egalement un grand merci au Caenorhabditis Genetic Center (Université du Minnesota, USA) et au laboratoire ECT Oekotoxikologie (Allemagne) pour nous avoir fourni les souches d'organismes modèles ainsi que leurs nourritures respectives.

Je remercie particulièrement Jörg ROMBKE (ECT Oekotoxikologie, Allemagne) et Olugbenga John OWOJORI (université Obafemi Awolowo, Nigeria) pour leur collaboration et leurs conseils avisés lors de la rédaction de la review concernant l'utilisation des acariens du sol en écotoxicologie.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'équipe EXES, Camille, Manon, Anne, Agnès, Jacky et Franck, qui sont les petites mains de l'équipe. Merci pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur quotidienne. Egalement un grand merci à Camille pour son aide lors des essais de reproduction avec le nématode, qui peuvent vite devenir fastidieux pour une seule personne.

Je tenais également à remercier Camille POLETZ et Samee AFTAB pour leurs travaux de stage de Master 2 réalisés dans le contexte de cette thèse, et encadrés en partie par moi-même. Ce fut une expérience personnelle très enrichissante, de la recherche d'un candidat à la préparation de la soutenance de fin de stage.

Je voudrais remercier l'équipe de l'atelier de l'INERIS, pour leurs conseils, leur rapidité et leur efficacité lors du montage de l'appareil Berlèse. Sans eux, aucun essai n'aurait pu être réalisé avec l'acarien prédateur, du fait de l'impossibilité d'extraire correctement les organismes du substrat.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes rencontrées à l'INERIS, thésards ou embauchés passés au laboratoire et dont la bonne humeur est contagieuse : Benoît, Julien, Etienne, Maxime, Damien, Raphaël, Mathieu, Nicolas C., Sandrine, Mélanie.

Pour terminer, j'adresse mes plus profonds remerciements à mes parents ainsi qu'à ma sœur, pour leur soutien sans faille. Merci aussi à ceux que j'aurais pu oublier !

Résumé

Les déchets organiques valorisés en agriculture, sous la dénomination de « matières fertilisantes » (MF) en France, sont largement utilisés en agriculture depuis de nombreuses années. Ces matériaux, de diverses origines, sont épandus en champ pour leurs caractéristiques fertilisantes ou afin d'améliorer les propriétés des sols. Ces MF peuvent être une source potentielle d'éléments contaminants, tels que des éléments tracemétalliques (ETM), des composés traces organiques (CTO) et certains polluants émergents (*e.g.* perturbateurs endocriniens, résidus médicamenteux ou nanoparticules). Le cadre réglementaire définissant l'homologation des MF indique qu'il est nécessaire de démontrer l'innocuité de ces matériaux vis-à-vis de l'environnement, avant leur épandage en champ. Afin de limiter l'accumulation d'éléments toxiques dans les sols agricoles, la réglementation définit des teneurs limites en ETM et CTO à respecter dans les matériaux produits, ainsi que dans les sols sur lesquels sont épandus les MF. Cependant, la caractérisation physico-chimique des MF ne permet pas de prédire à elle seule les dangers potentiels de ces matrices complexes.

Dans ce contexte, le travail de thèse avait pour objectifs :

- D'identifier les dangers pour l'environnement liés à l'épandage des MF ainsi que de réaliser un bilan de l'évaluation écotoxicologique *a priori* de ces dangers (analyse de la littérature concernant les aspects réglementaires liés aux MF et utilisation d'organismes modèles pour l'étude de ces matrices complexe) ;
- De déterminer l'applicabilité ainsi que les limitations des bio-essais utilisant les organismes modèles *C. elegans* et *H. aculeifer* en ce qui concerne l'étude des MF ;
- D'étudier la sensibilité du nématode et de l'acarien à des éléments contaminants potentiellement apportés au sol par l'utilisation de MF (*i.e.* éléments métalliques: Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) ;
- D'évaluer la toxicité de différentes MF sur le nématode *C. elegans* et sur l'acarien prédateur *H. aculeifer* ;
- De définir, *in fine*, l'intérêt de ces deux organismes modèles par rapport à ces matrices complexes, et de renseigner sur leur intérêt au sein d'une batterie de bio-essais (*i.e.* terrestres et aquatiques) utilisés plus classiquement.

Les résultats obtenus au cours des travaux de thèse traitent dans une première partie de l'applicabilité et des limitations des bio-essais à l'étude des MF (problématiques telles que l'hydratation des échantillons, l'apport de nourriture, l'extraction des organismes de matrices complexes,...). D'autre part, la réponse des critères d'effet étudiés pour chacun des deux organismes (*i.e.* mortalité, croissance, et reproduction pour *C. elegans* ainsi que mortalité et reproduction pour *H. aculeifer*) a été renseignée après exposition à différentes substances chimiques préconisées en tant que substances de référence. La deuxième partie présente la sensibilité des organismes étudiés par rapport à des éléments contaminant (*i.e.* ETM) pouvant potentiellement être apportés au sol lors de l'épandage de MF. La dernière partie des résultats concerne l'évaluation de différentes MF par approche directe et indirecte, en utilisant les critères d'effet définis pour les deux organismes modèles.

La discussion des travaux de thèse est axée en premier lieu sur la comparaison de la sensibilité des critères d'effet suivis chez les deux organismes modèles pour les différentes substances chimiques étudiées. Dans un second temps, la pertinence d'intégrer les organismes modèles *C. elegans* et *H. aculeifer* dans des batteries de bio-essais est discutée, cela afin de proposer, à terme, une stratégie expérimentale permettant une caractérisation *a priori* des dangers pour l'environnement liés à l'utilisation agricole des MF.

Abstract

Organic wastes recycled in agriculture, namely « fertilizing matters » (FM) in France, are used since many years. These materials, of several origins, are spread on land for their fertilizing properties or to improve soil characteristics. These FM can be a potential source of contaminants, like metallic trace elements (TME), organic compounds (OC), and some emerging pollutants (*e.g.* endocrine disruptors, drugs residues or nanoparticles). The regulatory framework defining the approval of MF indicates that it is necessary to demonstrate their safety towards the environment, before application in the field. To limit the accumulation of toxic elements in agricultural soils, regulation defines limits of TME and OC contents in respect to the materials produced, and in soils to which FM are applied. However, the physico-chemical characterization of FM does not alone predict the potential hazards of these complex matrices.

In this context, the objectives of the thesis were to:

- Identify environmental hazards associated with the application of FM and to achieve a statement of the *a priori* ecotoxicological assessment of these hazards (analysis of the literature on regulatory aspects and use of model organisms for the study of these complex matrices);
- Determine the applicability and limitations of bio-assays using *C. elegans* and *H. aculeifer* as model organisms, related to the study of FM;
- Study the sensitivity of the two organisms towards potential contaminants potentially brought to soils through the use of FM (*i.e.* metals: Cd, Cu, Ni, Pb and Zn);
- Assess the toxicity of various FM on the nematode *C. elegans* and the predatory mite *H. aculeifer*;
- Define, ultimately, the interest of these two organisms in relation to these complex matrices, and assess their potential role in biotest batteries (*i.e.* terrestrial and aquatic) used more conventionally.

The results obtained during this thesis concern, in the first part, the applicability and limitations of bio-assays to study FM (issues such as hydration of samples, food intake, extraction of organisms from complex matrices,...). On the other hand, the response of the endpoints studied for both organisms (*i.e.* mortality, growth, and reproduction for *C. elegans* as well as mortality and reproduction for *H. aculeifer*) has been defined after exposure to different chemicals used as reference substances. The second part shows the sensitivity of the studied organisms in relation to pollutants (*i.e.* ETM) which can be potentially applied to the soil during the use of FM. The last section of the results presents the assessment of FM with direct and indirect approaches, using the endpoints defined for the two model organisms.

The discussion of the thesis focuses primarily on the comparison of the sensitivity of the two model organisms in relation to different chemicals. In a second step, the relevance of integrating the model organisms *C. elegans* and *H. aculeifer* in batteries of bio-assays is discussed. It was used to propose, ultimately, an experimental strategy allowing an *a priori* characterization of the environmental hazards associated with agricultural use of FM.

Liste des communications et publications

Communication affichée :

- Huguier Pierre, Manier Nicolas, Chancerelle Laure, Pandard Pascal & Bauda Pascale. 2012. Selection of relevant ecotoxicity tests to assess the effects of agricultural, municipal & industrial (organic) materials used in agriculture. 6th SETAC World (<http://berlin.setac.eu/home>, ET12C-6 – Soil Ecotoxicology, 21/05/2012)

Communications orales :

- Huguier Pierre, Manier Nicolas, Meline Camille, Pandard Pascal & Bauda Pascale. 2012. Applicability of the *Caenorhabditis elegans* survival, growth & reproduction test to assess the effects of organic materials used in agriculture. 6th SETAC World (<http://berlin.setac.eu/home>, ET12C-6 – Soil Ecotoxicology, 21/05/2012)
- Huguier Pierre, Manier Nicolas, Chabot Laure, Pandard Pascal & Bauda Pascale. 2013. *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) as “new” ecotoxicological tool in test batteries for the assessment of organic materials used in agriculture. RAMIRAN 15th (<https://colloque4.inra.fr/ramiran2013/Conference-schedule>, S11-12-13: Integrated assessment and social factors, 03/06/2013)

Publications :

- Huguier Pierre, Manier Nicolas, Meline Camille, Bauda Pascale & Pandard Pascal. 2013. Improvement of the *Caenorhabditis elegans* growth & reproduction test to assess the ecotoxicity of soils & complex matrices. Environmental Toxicology and Chemistry 32, 2100-2108
- Huguier Pierre, Manier Nicolas, Owojori Olugbenga John, Bauda Pascale, Pandard Pascal & Römbke Jörg. 2015. The use of soil mites in ecotoxicology: a review. Ecotoxicology 24, 1-18.
- Huguier Pierre, Manier Nicolas, Chabot Laure, Bauda Pascale & Pandard Pascal. 2015. Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: towards a proposal of a testing strategy. Ecotoxicology & Environmental Safety 113, 103-111.

Abréviations

ACP : analyse en composante principale

ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

ANOVA : analyse of variance

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BAC C-16 : chlorure de benzyldimethylhexadecylammonium

CEC : capacité d'échange cationique

CEx : concentration effective médiane entraînant x% d'effet

CGC : *Caenorhabditis* Genetic Center

CRE : capacité de rétention d'eau

CTO : composé trace organique

DEHP : di (2-éthyl) phtalate

ETM : élément trace métallique

FAU : formazine absorption unit

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

HSD : test statistique « High significant differences » de Tukey

ICPE : installation classée pour l'environnement

ISO : organisation internationale de normalisation

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IUSS : International Union of Soil Sciences

LB : luria broth

LUFA : landwirtschaftliche untersuchungs und forschungsanstalt speyer

MF : matière fertilisante

NGM : nematode growth medium

OCDE : organization de co-opération et de développement économique

OGM : organisme génétiquement modifié

PBDE : polybromodiphényléther

PCA : polychloroalcane

PCB : polychlorobiphényle

PCN : polychloronaphtalène

pH : potentiel hydrogène

STEP : station d'épuration

VADETOX : Evaluation des risques écotoxicologiques liés à la valorisation de déchets en agriculture

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Partie I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
Chapitre I. Réglementation et évaluation des MF	6
I.1. Dangers potentiels pour l'environnement liés à l'épandage de MF	6
I.1.1. Problématique.....	6
I.1.2. Polluants organiques prioritaires	7
I.2. Contexte réglementaire Européen	9
I.2.1. Directive 86/278/CEE : l'utilisation de boues d'épuration en agriculture	9
I.2.2. Directive 2008/98/CE : les boues d'épuration en tant que déchets	11
I.2.3. Evaluation de l'écotoxicité des matériaux utilisés en agriculture : un besoin réglementaire européen	12
I.3. Cadre législatif en France	12
I.3.1. Généralités sur les réglementations	12
I.3.2. La normalisation des MF	13
I.3.3. L'homologation des MF	14
I.3.4. Le plan d'épandage des MF	17
I.4. Origine, typologie et composition des MF en France	18
Chapitre II. Méthodes intégratrices pour la caractérisation des dangers liés aux MF ..	20
II.1. Généralités sur les batteries de bio-essais.....	20
II.2. Batteries de bio-essais proposées pour l'évaluation des MF en Europe....	20
Chapitre III. Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> et l'acarien prédateur <i>Hypoaspis aculeifer</i> en tant qu'organismes modèles.....	25
III.1. Place des deux organismes au sein de la microfaune du sol	25

III.2. Utilisation de <i>C. elegans</i> en écotoxicologie	28
III.3. Utilisation de <i>H. aculeifer</i> en écotoxicologie – Article « The use of soil mites in ecotoxicology : a review »	35
Partie II. MATERIELS ET METHODES.....	55
Chapitre I. Matériels utilisés.....	56
I.1. Matériel biologique.....	56
I.1.1. Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	56
I.1.1.1. Habitat et morphologie	56
I.1.1.2. Origine des souches de nématode et de bactérie utilisées	57
I.1.1.3. Cycle de vie et maintien des élevages de nématode au laboratoire... ..	57
I.1.1.4. Maintien de la souche de bactérie <i>E. coli</i> OP50 au laboratoire.....	60
I.1.2. L'acarien prédateur <i>Hypoaspis aculeifer</i>	60
I.1.2.1. Habitat et morphologie	60
I.1.2.2. Origine des souches d'acariens prédateurs et d'acariens du fromage	62
I.1.2.3. Cycle de vie et maintien des acariens prédateurs au laboratoire ...	62
I.1.2.4. Choix et maintien des organismes utilisés en tant que proies	64
I.2. Matrices utilisées	66
I.2.1. Les sols	66
I.2.1.1. Présentation des sols artificiels et naturels	66
I.2.1.2. Caractérisation des sols	67
I.2.1.3. Utilisation des sols.....	67
I.2.2. Matières fertilisantes	70
I.2.2.1. Description des matières fertilisantes étudiées.....	70
I.2.2.2. Caractérisation des matières fertilisantes	71

I.3. Méthodes analytiques	75
Chapitre II. Méthodes et protocoles utilisés.....	76
II.1. Protocoles d'essai	76
II.1.1. Essai d'inhibition de la croissance, de la fertilité et de la reproduction du nématode <i>C. elegans</i>	76
II.1.1.1. Principe général de l'essai	76
II.1.1.2. Obtention des organismes pour les essais	76
II.1.1.3. Critères de validité.....	77
II.1.1.4. Essais en phase solide.....	77
II.1.1.5. Essais en milieu aqueux.....	79
II.1.2. Essai de mortalité et d'inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur <i>H. aculeifer</i>	81
II.1.2.1. Principe général de l'essai	81
II.1.2.2. Obtention des organismes pour les essais	81
II.1.2.3. Critères de validité.....	81
II.1.2.4. Protocole d'essai.....	82
II.2. Protocoles de préparation des échantillons.....	84
II.2.1. Etude de la sensibilité des organismes exposés aux ETM	84
II.2.1.1. Evaluation de la sensibilité des organismes <i>C. elegans</i> et <i>H.</i> <i>aculeifer</i> à différents métaux étudiés en substances seules	84
II.2.1.2. Approche mélange de métaux	85
II.2.2. Préparation des mélanges de sol et de MF	86
II.2.3. Protocole de lixiviation.....	88
II.3. Analyses statistiques et logiciels utilisés	89
II.3.1. Statistiques inférentielles.....	89
II.3.2. Détermination des concentrations effectives médianes.....	90
II.3.3. Statistiques descriptives.....	90

Partie III. RESULTATS	91
Chapitre I. Maîtrise et optimisation des protocoles d'essai	92
I.1. Optimisation du protocole d'essai en milieu terrestre pour <i>C. elegans</i> – Article « Improvement of the <i>Caenorhabditis elegans</i> growth and reproduction test to assess the ecotoxicity of soils and complex matrices (Environmental Toxicology and Chemistry) »	94
I.2. Adéquation des protocoles d'essai de <i>C. elegans</i> aux substrats artificiels et naturels témoins, ainsi qu'aux éluats issus de ces substrats.	105
I.2.1. Applicabilité des essais à différents substrats témoins.....	105
I.2.2. Applicabilité des essais aux éluats de différents substrats témoins....	108
I.3. Détermination des rendements d'extraction des organismes pour les protocoles d'essai mis en place au laboratoire	109
I.3.1. Adéquation du protocole d'extraction de <i>C. elegans</i> lors des essais en phase solide.....	109
I.3.2. Adéquation du protocole d'extraction mis en place pour <i>H. aculeifer</i>	112
I.4. Evaluation du caractère limitant de la nourriture lors des essais en milieu aqueux avec <i>C. elegans</i>	114
I.5. Evaluation de la sensibilité des deux organismes modèles à différentes substances de référence.....	116
I.5.1. Sensibilité de <i>C. elegans</i> au BAC C-16.....	117
I.5.2. Sensibilité de <i>H. aculeifer</i> à l'acide borique	118
Chapitre II. Evaluation de la sensibilité des organismes modèles aux éléments métalliques	119
II.1. Caractérisation de la toxicité des ETM vis-à-vis de <i>C. elegans</i>	119
II.1.1. Exposition de <i>C. elegans</i> aux ETM en milieu terrestre.....	119
II.1.2. Exposition de <i>C. elegans</i> à des mélanges d'ETM en milieu terrestre	125
II.1.1. Exposition de <i>C. elegans</i> aux éluats de sols artificiellement contaminés par des mélanges d'ETM	128

II.2.	Caractérisation de la toxicité d'ETM vis-à-vis de <i>H. aculeifer</i>	130
II.2.1.	Exposition de <i>H. aculeifer</i> aux ETM.....	130
II.2.2.	Exposition de <i>H. aculeifer</i> aux mélanges d'ETM	135
Chapitre III.	Caractérisation des dangers de différentes MF avec <i>C. elegans</i> et <i>H. aculeifer</i>	137
III.1.	Exposition de <i>C. elegans</i> aux mélanges de sol et de MF	137
III.1.1.	Exposition par approche directe	137
III.1.2.	Exposition de <i>C. elegans</i> aux éluats des mélanges sol/MF.....	140
III.2.	Exposition de <i>H. aculeifer</i> aux mélanges de sol et de MF	147
III.3.	Bilan de l'exposition des organismes aux MF.....	150
Partie IV. DISCUSSION		151
Chapitre I.	Intérêts et limitations des essais utilisant <i>C. elegans</i> et <i>H. aculeifer</i>	153
I.1.	Intérêt des essais	153
I.1.1.	Essais avec le nématode <i>C. elegans</i>	153
I.1.2.	Essais avec l'acarien prédateur <i>H. aculeifer</i>	154
I.2.	Questionnements relatifs aux essais avec <i>C. elegans</i>	154
I.2.1.	Influence de la quantité de nourriture.....	154
I.2.2.	Efficacité de l'extraction des juvéniles.....	155
I.2.3.	Dénombrement des juvéniles	156
I.2.4.	Applicabilité des essais aux matrices artificielles	156
I.3.	Questionnements relatifs aux essais avec <i>H. aculeifer</i>	157
I.3.1.	Apports de nourriture	157
I.3.2.	Efficacité de l'extraction des acariens juvéniles	157
Chapitre II.	Sensibilités de <i>C. elegans</i> et de <i>H. aculeifer</i> aux substances chimiques, comparées à d'autres organismes terrestres	158

II.1. Sensibilités comparées des critères d'effet mesurés chez <i>C. elegans</i> et <i>H. aculeifer</i>	158
II.1.1. Comparaison des critères d'effet de <i>C. elegans</i>	158
II.1.2. Comparaison des critères d'effet de <i>H. aculeifer</i>	160
II.1.3. Hypothèses d'explication des effets hormétiques observés chez les deux organismes	160
II.2. Sensibilité comparée des organismes terrestres exposés à l'acide borique	161
II.3. Sensibilité comparée des organismes terrestres exposés aux ETM.....	162
Chapitre III. Intérêt du nématode et de l'acarien prédateur dans l'évaluation écotoxicologique des MF.....	166
III.1. Sensibilité de <i>C. elegans</i> aux MF comparée aux organismes composant les batteries de bio-essais – Article « Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land : towards a proposal of a suitable test battery (Ecotoxicology and Environmental Safety) ».....	166
III.2. Réponse de <i>H. aculeifer</i> aux MF comparée aux organismes composant les batteries de bio-essais	177
Partie V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	179
Références	183
ANNEXES.....	197

Liste des tableaux

Tableau 1 : Famille, utilisation et exemples de polluants prioritaires dans l'évaluation des dangers des MF (d'après Eriksson <i>et al.</i> , 2008 et Clarke & Smith, 2011)	8
Tableau 2 : Récapitulatif des valeurs de concentrations seuils en ETM admises dans les sols et dans les boues (d'après la Directive 86/278/CEE)	10
Tableau 3 : Résumé des flux minimaux de référence pour le critère d'efficacité (Annexe VI du Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation de matières fertilisantes – supports de culture)	15
Tableau 4 : Résumé des flux maximaux annuels autorisés pour le critère d'innocuité (Annexe VII du Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation de matières fertilisantes – supports de culture)	15
Tableau 5 : Grandes classes de matières homologuées ou sous autorisation provisoire de vente (d'après le catalogue e-phy concernant les MF)	19
Tableau 6 : Exemples d'études européennes utilisant différentes batteries de bio-essais terrestres et aquatiques pour l'évaluation de l'écotoxicité des MF.....	22
Tableau 7 : Exemples de matières ainsi que de protocoles de préparation des échantillons utilisés pour l'évaluation des MF.....	23
Tableau 8 : Résumé des méthodes d'essai en milieu aqueux ou assimilé (<i>i.e.</i> agar) utilisant <i>C. elegans</i> en tant qu'organisme modèle (tiré de Sochova <i>et al.</i> , 2006)	29
Tableau 8 bis : Résumé des méthodes d'essai en milieu aqueux ou assimilé (<i>i.e.</i> agar) utilisant <i>C. elegans</i> en tant qu'organisme modèle (études après 2006).....	30
Tableau 9 : Résumé des méthodes d'essai appliquées pour les sols et les sédiments utilisant <i>C. elegans</i> en tant qu'organisme modèle (tiré de Sochova <i>et al.</i> , 2006).....	32
Tableau 9 bis : Résumé des méthodes d'essai appliquées pour les sols et les sédiments utilisant <i>C. elegans</i> en tant qu'organisme modèle (études après 2006).....	32
Tableau 10 : Sensibilité de <i>C. elegans</i> aux substances chimiques pour des expositions en phase solide (critère de mortalité).....	34

Tableau 11 : Récapitulatif des dosages de métaux dans les sols de référence et les sols naturels.....	68
Tableau 12 : Texture et caractéristiques physico-chimiques des sols naturels et artificiel....	69
Tableau 13 : Descriptif des traitements appliqués aux MF étudiées.....	70
Tableau 14 : Caractéristiques physico-chimiques des matières fertilisantes étudiées.	73
Tableau 15 : Résumé des méthodes analytiques suivies pour la caractérisation des matières fertilisantes.....	75
Tableau 16 : Concentrations nominales (mini-maxi) en ions métalliques introduites dans les sols pour les essais avec <i>C. elegans</i> et <i>H. aculeifer</i>	85
Tableau 17 : Résumé des concentrations (Directive 86/278/EEC) et des équivalences de dilution pour les mélanges de métaux.....	86
Tableau 18 : Comparaison de la croissance et de la reproduction de <i>C. elegans</i> , exposé au milieu M9, aux éluats de sol artificiel ISO ou naturel LUFA 2.2 (quatre réplicats par condition).	108
Tableau 19 : Rendements d'extraction de juvéniles <i>Hypoaspis aculeifer</i> obtenus pour des sols des différentes textures (trois réplicats par condition d'essai).....	113
Tableau 20 : Résumé des CE ₅₀ obtenues avec <i>C. elegans</i> pour la substance de référence BAC C-16.	117
Tableau 21 : Résumé des CL ₅₀ et CE ₅₀ obtenues avec <i>C. elegans</i> après exposition à du sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par différents sels métalliques.....	121
Tableau 22 : Résumé des NOEC obtenues avec <i>C. elegans</i> après exposition à du sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par différents sels métalliques.	121
Tableau 23 : Résumé des NOEC déterminées avec <i>H. aculeifer</i> pour le cadmium, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc.	134
Tableau 24 : Résumé de la sensibilité du critère de reproduction de différents invertébrés terrestres vis-à-vis de l'acide borique	162
Tableau 25 : Résumé de la sensibilité des paramètres de mortalité et de reproduction de différents invertébrés vis-à-vis du cadmium, du cuivre, du nickel, du plomb et du zinc	163

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du chevauchement des réglementations concernant les déchets organiques valorisés en agriculture.....	13
Figure 2 : Schéma récapitulatif de l'homologation des MF (issu de la Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des MFSC, 2013)	16
Figure 3 : Exemple de chaîne trophique entre différents groupes d'invertébrés au sein d'un sol agricole (modifié de Laskowski <i>et al.</i> , 1998).....	27
Figure 4 : Morphologie d'un nématode (<i>C. elegans</i>) adulte hermaphrodite.	57
Figure 5 : Cycle de vie du nématode <i>C. elegans</i>	58
Figure 6 : Illustration de l'élevage de <i>C. elegans</i> au laboratoire.	60
Figure 7 : Morphologie d'une femelle adulte <i>H. aculeifer</i>	61
Figure 8 : Cycle de vie de l'acarien prédateur <i>H. aculeifer</i>	63
Figure 9 : Illustration de l'élevage de l'acarien prédateur <i>Hypoaspis aculeifer</i> au laboratoire.	63
Figure 10 : Illustration de l'élevage de l'acarien <i>T. putrescentiae</i> au laboratoire.	65
Figure 11 : Triangle des textures français (Richer de Forges, 2010).	68
Figure 12 : Illustration des matières fertilisantes étudiées.	72
Figure 13 : Schéma récapitulatif de la réalisation des essais d'inhibition de la croissance, de la fertilité et de la reproduction de <i>C. elegans</i> en phase solide et liquide.....	80
Figure 14 : Illustration du système de type Berlèse-Tullgren développé pour l'extraction des acariens <i>H. aculeifer</i>	83
Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'essai de mortalité et d'inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur <i>H. aculeifer</i>	83
Figure 16 : Schéma récapitulatif de l'évaluation des MF	87
Figure 17 : Schéma récapitulatif des éluats réalisés et du protocole de lixiviation.....	88
Figure 18 : Schéma décisionnel concernant les statistiques inférentielles	89

Figure 19 : Survie (A), croissance (B) et reproduction (C) de <i>C. elegans</i> exposé aux sols artificiels (<i>i.e.</i> 5%, à 10% de tourbe) ainsi qu'au sol naturel LUFA 2.2, préparés en utilisant les protocoles normatif et optimisé.	107
Figure 20 : Cumul des pourcentages d'extraction moyens des nématodes adultes (A) et juvéniles (B).....	111
Figure 21 : Influence de la concentration en bactéries <i>E. coli</i> sur la croissance (A) et la reproduction (B) du nématode <i>C. elegans</i> en milieu aqueux.....	115
Figure 22 : Survie des nématodes adultes exposés au sol LUFA 2.2, artificiellement contaminé par différents sels métalliques.....	122
Figure 23 : Croissance des nématodes adultes exposés au sol LUFA 2.2, artificiellement contaminé par différents sels métalliques.....	123
Figure 24 : Reproduction des nématodes adultes exposés au sol LUFA 2.2, artificiellement contaminé par différents sels métalliques.....	124
Figure 25 : Survie (A), croissance (B) et reproduction (C) de <i>C. elegans</i> exposé à du sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par des mélanges d'ETM.....	127
Figure 26 : Survie (A), croissance (B) et reproduction (C) de <i>C. elegans</i> exposé aux éluats de sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par différents mélanges d'ETM.....	130
Figure 27 : Reproduction de l'acarien <i>H. aculeifer</i> exposé au sol artificiel ISO, contaminé par différents sels métalliques (Série 1).....	131
Figure 28 : Reproduction de l'acarien <i>H. aculeifer</i> exposé au sol naturel LUFA 2.2 contaminé par différents sels métalliques (Série 1).....	132
Figure 29 : Reproduction de l'acarien <i>H. aculeifer</i> exposé au sol artificiel ISO contaminé par différents sels métalliques (Série 2).....	133
Figure 30 : Survie (A) et reproduction (B) de <i>H. aculeifer</i> exposé au sol artificiel ISO et naturel LUFA 2.2 contaminés avec des mélanges d'ETM.	136
Figure 32 : Reproduction de <i>C. elegans</i> exposé aux MF par approche directe.....	139
Figure 33 : Croissance de <i>C. elegans</i> exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2.	142
Figure 34 : Reproduction de <i>C. elegans</i> exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2.	143

Figure 35 : Croissance de <i>C. elegans</i> exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol artificiel ISO.	145
Figure 36 : Reproduction de <i>C. elegans</i> exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol artificiel ISO.	146
Figure 37 : Survie (A) et reproduction (B) de <i>H. aculeifer</i> exposé aux mélanges de MF et de sol artificiel ISO.	148
Figure 38 : Survie (A) et reproduction (B) de <i>H. aculeifer</i> exposé aux mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2.	149
Figure 39 : Récapitulatif des ratios croissance/reproduction de <i>C. elegans</i> obtenus pour les mélanges de sol LUFA 2.2 et de MF (A), pour les éluats de ces mélanges (B) ainsi que pour les éluats des mélanges réalisés avec du sol artificiel ISO (C).	159
Figure 40 : Comparatif de la toxicité de la seconde série de MF pour les organismes terrestres	178

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Dans le contexte de réduction de la production de déchets, les résidus organiques issus de procédés industriels, d'exploitations agricoles ou provenant du traitement des eaux usées, sont proposés sous la dénomination de matières fertilisantes (MF) pour assurer ou améliorer la nutrition des végétaux, ainsi que les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Ces matériaux sont aujourd'hui largement utilisés en agriculture et participent à la valorisation d'une partie des matières résiduelles, telles que les boues issues des stations d'épuration (STEP) ou certaines déjections animales. En dépit de leur pouvoir fertilisant, il s'agit de matières complexes et diverses (tant en ce qui concerne l'origine que la composition), pour lesquelles il est indispensable de tenir compte de la présence potentielle de contaminants organiques (*e.g.* HAPs, PCBs,...) et/ou inorganiques (*e.g.* ETM).

Certaines MF, plus particulièrement les matières composées de boues issues du retraitement des eaux usées, peuvent être le réceptacle de différents contaminants. Leur utilisation agricole a soulevé de nombreuses interrogations au sein de la communauté scientifique, en raison des risques potentiels pour l'homme et l'environnement causés par l'apport de polluants issus de MF sur des sols cultivés (Dean & Suess, 1985 ; Epstein, 2002). Par conséquent, l'utilisation agricole des MF a été règlementée, afin de limiter ces risques tout en favorisant leur valorisation agricole. Cependant, en Europe et plus particulièrement en France, il n'existe à ce jour aucune stratégie réglementaire d'évaluation écotoxicologique des dangers pour l'environnement liés à l'utilisation des MF. Ceci conduit à une hétérogénéité des données fournies par les demandeurs, et donc à une difficulté de jugement par les experts de l'ANSES en charge de l'homologation de ces matériaux. D'autre part, la composition des MF se diversifie de plus en plus, ce qui renforce le besoin de données écotoxicologiques sur ces matières.

Dans ce contexte, cette thèse définit l'intérêt et la faisabilité de l'utilisation de deux organismes de la micro/mesofaune du sol pour évaluer l'écotoxicité des MF : le nématode *Caenorhabditis elegans* (Maupas) et l'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini). L'abondance de ces organismes au sein du compartiment sol, leur ubiquité, et leur rôle primordial dans le fonctionnement des milieux terrestres, en font deux organismes d'intérêt en écotoxicologie et pertinents d'un point de vue écologique. De plus, leur cycle de vie court permet la prise en compte de paramètres de toxicité chronique pour des temps d'exposition restreints (*i.e.* 96 h pour le nématode, 14 jours pour l'acarien prédateur). Malgré ces atouts et l'existence de protocoles d'essais normalisés pour ces deux organismes modèles, ceux-ci restent aujourd'hui peu utilisés et n'ont jamais été intégrés dans les propositions de stratégies

INTRODUCTION

d'évaluation écotoxicologique des MF. Si certaines données sur matrices solides naturelles contaminées (*i.e.* sols et sédiments) sont disponibles pour *C. elegans*, en revanche *H. aculeifer* est utilisé pour l'essentiel dans le cadre de l'évaluation des dangers liés à l'utilisation des matières actives pesticides.

L'objectif principal des travaux de thèse vise donc à déterminer la pertinence d'intégrer les essais utilisant *C. elegans* et *H. aculeifer* dans une stratégie d'évaluation des MF. Pour ce faire, les travaux de thèse se sont déroulés en trois étapes interdépendantes :

Etape 1 : Développement, calibration et validation des essais utilisant les organismes modèles *C. elegans* et *H. aculeifer*. Les données expérimentales générées ont permis (i) de calibrer les élevages de ces organismes dans des conditions contrôlées et maîtrisées ; et (ii) de caractériser la sensibilité des critères d'effet suivis pour chaque espèce, ainsi que, dans une moindre mesure, la reproductibilité des essais.

Etape 2 : Application des deux bio-essais à l'évaluation des dangers liés aux MF. Cette seconde étape a permis (i) de définir et de tester les modalités d'exposition des organismes modèles les plus pertinentes au regard de l'utilisation agronomique des MF, (ii) de générer des données expérimentales concernant l'effet de facteurs contaminants (*i.e.* ETM) sur les deux organismes modèles, à des concentrations représentatives d'apports au sol par des MF, et (iii) d'identifier les effets de différentes MF sur le nématode et l'acarien prédateur, en utilisant un schéma d'épandage pertinent, combinant des approches directes (*i.e.* caractérisation de mélanges de sol et de MF) et indirectes (*i.e.* caractérisation d'extraits aqueux des mélanges de sol et de MF).

Etape 3 : Intégration et comparaison des résultats obtenus avec *C. elegans* et *H. aculeifer* avec ceux d'autres bio-essais classiquement utilisés dans les stratégies réglementaires d'évaluation des dangers en général (*i.e.* végétaux supérieurs, vers de terre, bactéries, algues, rotifères et crustacés). Dans le cadre de l'évaluation des dangers des MF, cette dernière étape a permis de faire ressortir, à l'aide d'outils de statistiques multivariées, l'intérêt des organismes modèles *C. elegans* et *H. aculeifer*. Ces travaux ont également permis d'apporter des recommandations pour l'élaboration d'une batterie de bio-essais optimale applicable dans le cadre de l'homologation des MF.

INTRODUCTION

Le manuscrit s'organise de la manière suivante :

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique. Tout d'abord, les aspects réglementaires européens et français concernant l'utilisation des MF ont été abordés, afin de prendre connaissance des législations en vigueur. Par la suite, un état des lieux a été mené relatif à l'utilisation de bio-essais pour l'évaluation écotoxicologique des MF. Ceci a permis de prendre connaissance des différentes stratégies d'évaluation des MF issues de la littérature scientifique. Le dernier chapitre de cette partie concerne l'utilisation du nématode *C. elegans* et de l'acarien prédateur *H. aculeifer* en écotoxicologie (sous la forme d'un article de revue).

La seconde partie présente les matériels et méthodes utilisés. Dans un premier chapitre, sont présentés les organismes ainsi que les matrices utilisées (*i.e.* sols et MF). Dans un second chapitre, sont définis les protocoles d'essai (l'optimisation du protocole d'essai en milieu terrestre pour *C. elegans* a fait l'objet d'un article), les protocoles de préparation des échantillons ainsi que les analyses statistiques associées à chaque expérimentation.

La troisième partie est consacrée aux résultats des expériences menées au cours des travaux de thèse. Ceux-ci ont permis de lever les différents verrous scientifiques que représentent l'applicabilité des essais à l'évaluation des dangers des MF, ainsi que la réponse aux MF apportée par les deux organismes modèles. Le premier chapitre présente les résultats de la maîtrise et de l'optimisation des protocoles d'essai. Le second est consacré à la sensibilité des deux organismes à des ETM, par une approche « substance seule » (*i.e.* toxicité intrinsèque des ETM) et par une approche « mélange » (*i.e.* concentrations représentatives d'apports au sol lors de l'utilisation de MF issues de la réglementation européenne). Le dernier chapitre présente les résultats des essais avec le nématode et l'acarien prédateur concernant l'exposition à différentes typologies de MF.

La quatrième partie traite de la place et l'intérêt de *C. elegans* et *H. aculeifer* pour la caractérisation des dangers des MF. Les avantages et les questionnements sur ces deux essais ont été discutés dans un premier temps, puis la sensibilité du nématode et de l'acarien exposés aux ETM a été comparée à celles d'autres organismes terrestres. Dans le cadre de la proposition d'une batterie de bio-essais pour l'évaluation des MF, les résultats de l'exposition aux MF ont été, par la suite, comparés à ceux obtenus pour d'autres bio-essais réalisés au laboratoire (sous forme d'un article accepté). Ceci a effectivement permis de proposer *in fine* une batterie de bio-essais optimale pour l'évaluation écotoxicologique des MF. Cette discussion débouche sur les conclusions et perspectives de l'ensemble des travaux réalisés.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I. SYNTHESE **BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre I. Réglementation et évaluation des MF

Ce chapitre a pour objectif d'établir un bilan des réglementations européennes et françaises dans le domaine de la valorisation des résidus organiques en agriculture. Les différentes sections définissent les dangers associés aux MF, les aspects réglementaires ainsi que les classes de MF utilisées, plus particulièrement au niveau national.

I.1. Dangers potentiels pour l'environnement liés à l'épandage de MF

I.1.1. Problématique

La réglementation et la législation sur les MF imposent aux producteurs de démontrer l'innocuité des matières vis-à-vis de l'environnement, dans le cadre de l'homologation. Pour cela, celles-ci doivent respecter certaines teneurs et/ou apports aux sols en éléments toxiques, sous forme de flux annuels. Parmi les éléments classiquement recherchés, on retrouve les ETM, essentiels (*i.e.* Cu et Zn) et non-essentiels (*i.e.* As, Cd, Hg, Ni, Pb et Se), ainsi que certains CTO (*i.e.* PCBs et HAPs) (Annexe VII du Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation de matières fertilisantes – supports de culture).

Cependant, les MF sont des matrices complexes composées d'un cocktail d'éléments fertilisants, de matières organiques et potentiellement de polluants pouvant affecter la faune du sol (Düring & Gäth, 2002). Ce cocktail peut être très variable d'une matière fertilisante à l'autre, étant donné la grande diversité de matières proposées, leur provenance, leur méthode de production ainsi que les matières premières utilisées. Pour ce type de matrices complexes, la caractérisation physico-chimique montre ses limites. En effet, bien plus de polluants que ceux recherchés peuvent se retrouver dans les MF (Eriksson *et al.*, 2008). De plus, certaines substances non couvertes par la réglementation, telles que des substances à caractère prioritaire (Section I.1.2) ou des nano-particules (Kim *et al.*, 2010 ; Lombi *et al.*, 2012), peuvent également être retrouvées.

D'autre part, les interactions au sein d'une matière fertilisante entre les différents éléments (*e.g.* fertilisants et contaminants) peuvent être complexes, compte tenu du grand nombre de molécules potentiellement présentes (Clarke & Smith, 2011). La difficulté d'évaluer la toxicité des MF est d'autant plus accrue que ces matières sont épandues sur des sols agricoles, dont la texture et la composition peuvent être très différentes d'une parcelle à l'autre.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.2. Polluants organiques prioritaires

Les boues issues du retraitement des eaux sont les matrices pouvant potentiellement contenir le plus de composés organiques différents (Clarke & Smith, 2011). En effet, les composés organiques d'origine industrielle, domestique et urbaine peuvent être retrouvés ultimement dans les boues résiduelles issues de retraitement des eaux usées (plus de 500 molécules xénobiotiques organiques ; Eriksson *et al.*, 2008). Parmi les molécules retrouvées, certaines ont des effets cancérogènes, mutagènes ; d'autres peuvent entraîner des dommages sur la reproduction ainsi que des perturbations endocriniennes (Eriksson *et al.*, 2008). Bien que les procédés de traitement des eaux usées et des boues permettent d'éliminer une quantité significative de composés organiques, certains ayant un caractère lipophile et non dégradable peuvent se retrouver en concentrations résiduelles dans ces matériaux (Clarke & Smith, 2011).

Les polluants organiques persistants contenus dans les boues issues du retraitement des eaux usées peuvent présenter un risque pour la santé humaine et l'environnement une fois appliqué en champ (Chaney *et al.*, 1996). Le caractère prioritaire de certains polluants peut être défini en fonction de la persistance de ces composés dans le sol, de leur risque potentiel pour la santé humaine *via* l'alimentation, de leur bioaccumulation dans le réseau trophique et de leur écotoxicité (Clarke & Smith, 2011).

Les groupes de polluants organiques potentiellement prioritaires ainsi que les composés associés sont présentés dans le Tableau 1. Ces molécules sont majoritairement issues de l'utilisation d'énergies fossiles, de procédés industriels, du traitement de différents types de matériaux (*e.g.* bois, plastique, textile), de produits d'hygiène, de retardateurs de flamme, de tensio-actifs, de surfactants, de pesticides, d'hormones ainsi que de résidus médicamenteux.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Famille, utilisation et exemples de polluants prioritaires dans l'évaluation des dangers des MF (d'après Eriksson *et al.*, 2008 et Clarke & Smith, 2011)

Famille/Catégorie	Provenance/Utilisation	Exemple de molécule
HAP	Combustion incomplète de charbon et de pétrole	Naphtalène, benzo[ghi]perylene, fluoranthène
Hydrocarbure aliphatique	Résidus de carburant	Nonane, octane, hexadecane
Benzothiazole	Traitement du caoutchouc	2-Mercaptobenzothiazole, 2-hydroxybenzothiazole
Phénols	Plastifiant	Bisphénol A
Alkylphénol	Tensioactif	Nonylphénol
Organo-étain	Fabrication du PVC, traitement du bois	Oxide de tributylétain
Phtalate	Fabrication de résines et de PVC	Di (2-ethylhexyl) phtalate
Polybromodiphényléther (PBDE)	Retardateur de flamme	PBDE 47, PBDE 99
Polychloroalcanes (PCA)	Plastifiant, retardateurs de flamme	PCA à longue, moyenne et courte chaîne
Polychloronaphtalène (PCN)	Traitement du bois, additif d'huile de moteur	PCN congénères présentant de 1 à 8 atomes de chlore par molécule de naphtalène
Siloxane	Traitement de textiles, produits d'hygiène, anti-mousse (utilisé en STEP)	Polydimethylsiloxane
Perfluoroalkylés	Traitement de produits contre la chaleur, la graisse, les tâches et l'eau	Perfluorooctane sulphonate
Dérivés d'ammonium quaternaire	Surfactant cationique	Ammonium quaternaires à chaîne alkyle et/ou aryle
Stéroïdes	Hormones humaines	17 α -ethinyloestradiol, 17 β -oestradiol, oestriol, oestrone
Muscs synthétiques	Produits d'hygiène	Tonalide, galaxolide
Dioxines	Processus industriels	Tertrachlorodibenzo-p-dioxine
Pesticides	Lutte contre les nuisibles	Triclosan
Produits pharmaceutiques	Médicaments	Ibuprofène
Divers	Surfactant anionique	Sulfonate d'alkyl benzène linéaire

I.2. Contexte réglementaire Européen

I.2.1. Directive 86/278/CEE : l'utilisation de boues d'épuration en agriculture

La Directive 86/278/CEE (modifiée par la Directive 91/692/CEE, puis par le Règlement 807/2003 et par le Règlement 219/2009), relative à la protection de l'environnement, et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture, régit l'utilisation agricole des MF. L'objectif de cette directive est d'encadrer l'utilisation des boues d'épuration de manière à éviter des effets nocifs sur les sols, la végétation, les animaux et l'homme, tout en encourageant leur épandage.

Cette directive répartit les boues en quatre catégories :

- les boues résiduelles issues de stations d'épuration traitant des eaux usées domestiques ou urbaines, ainsi que d'autres stations d'épuration traitant des eaux usées de composition similaire aux eaux usées domestiques et urbaines ;
- les boues résiduelles de fosses septiques et d'autres installations similaires pour le traitement des eaux usées ;
- les boues résiduelles issues de stations d'épuration autres que celles visées aux points précédents ;
- les boues traitées par voie biologique, chimique ou thermique, par stockage à long terme ou par tout autre procédé approprié de manière à réduire, de façon significative, leur pouvoir fermentescible, ainsi que les inconvénients sanitaires liés à leur utilisation.

En outre, cette directive européenne établit des considérations à prendre en compte lors de l'épandage de MF. Il est reconnu que les boues peuvent présenter des propriétés agronomiques utiles, ce qui justifie d'encourager leur valorisation en agriculture, tout en s'assurant que leur utilisation ne nuit pas à la qualité des sols ni à la production agricole.

Ce dernier point a été défini en se basant sur la présence d'ETM, potentiellement apportés au sol lors de l'épandage de boue. Dans un premier temps, la directive considère qu'il convient de fixer des valeurs limites pour ces éléments dans les sols (Tableau 2) en raison de leur potentielle toxicité pour les plantes et pour l'homme, de par leur présence potentielle dans les récoltes. Dans un second temps, il est acté qu'il convient d'éviter que ces valeurs limites ne soient dépassées suite à une utilisation des boues.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Pour limiter l'impact environnemental des MF, l'apport d'ETM dans les sols cultivés est défini :

- en fixant les quantités maximales annuelles des apports de MF, en veillant à ne pas dépasser les valeurs limites de concentration en ETM dans ces matrices ;
- en veillant à ne pas dépasser les limites applicables aux quantités d'ETM pouvant être apportées au sol, sur la base d'une moyenne de dix ans.

Lorsque les concentrations en métaux dans les sols dépassent les valeurs seuils fixées, il y a lieu d'interdire l'épandage.

D'autre part, les boues doivent être traitées (*e.g.* chaulage, épaissement, hygiénisation,...) avant d'être utilisées en agriculture, afin de diminuer leur teneur en eau et/ou limiter leur impact sanitaire.

Toutefois, les Etats membres peuvent autoriser l'utilisation de boues non traitées, si elles ne présentent pas de risque pour la santé humaine et animale, ainsi que si celles-ci sont injectées ou enfouies dans le sol. Un autre aspect de l'utilisation des boues est qu'un délai (*i.e.* minimum trois semaines) doit être respecté entre leur utilisation et certaines activités agricoles (*e.g.* mise en pâturage, récolte de cultures fourragères,...). D'autre part, leur épandage sur des cultures maraîchères et fruitières pendant la période de végétation est interdit, à l'exception des arbres fruitiers.

Tableau 2 : Récapitulatif des valeurs de concentrations seuils en ETM admises dans les sols et dans les boues (d'après la Directive 86/278/CEE)

ETM	Valeurs seuils dans les sols (mg/kg m.s.)		Valeurs seuils dans les boues (mg/kg m.s.)		Valeurs limites pour les quantités annuelles pouvant être introduites dans les sols cultivés, sur une base moyenne de 10 ans (kg/ha/an)
	Limite basse	Limite haute	Limite basse	Limite haute	
Cd	1	3	20	40	0,15
Cu	50	140	1000	1750	12
Ni	30	75	300	400	3
Pb	50	300	750	1200	15
Zn	150	300	2500	4000	30
Hg	1	1,5	16	25	0,1
Cr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

m.s. : matière sèche ; n.d. : non déterminé

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

De par leur origine et leur mode d'obtention, ces boues sont également couvertes par la réglementation relative aux déchets (Directive 2008/98/CE). Celle-ci s'applique si la matière en question contient des substances inscrites en tant que substance toxique ou dangereuse, à des concentrations susceptibles de présenter un risque pour la santé humaine ou l'environnement.

De plus, l'utilisation de boues doit être effectuée dans des conditions qui garantissent la protection du sol et celle des eaux superficielles et souterraines (Directive 2000/60/CE et ses modifications ultérieures).

I.2.2. Directive 2008/98/CE : les boues d'épuration en tant que déchets

La Directive Européenne 2008/98/CE, abrogeant les Directives 75/442/CEE et 2006/12/CE concernant les déchets ainsi que la Directive 91/689/CEE concernant les déchets dangereux, établit des mesures visant à protéger l'environnement et la santé humaine par la prévention ou la réduction des effets nocifs liés à la production et à la gestion des déchets.

La directive de 2008 classe les déchets, par catégories ou types génériques, en fonction de leur nature ou l'activité qui les a produits. Les déchets sont classés dangereux ou non selon qu'ils contiennent des substances dangereuses. Ceux-ci peuvent se présenter sous forme de liquide, de solide ou de boue (*e.g.* issues de lavage de gaz, des installations de purification d'eau ou encore les boues d'épuration non traitées et non utilisable en agriculture). Figurent également dans cette liste, les déchets issus de la collecte sélective auprès des ménages.

A *minima* quinze critères peuvent être utilisés pour classer la dangerosité des déchets. Parmi ceux-ci, le critère HP14, ou critère « Ecotoxique », caractérise les dangers immédiats ou différés pour une ou plusieurs composantes de l'environnement.

D'autre part, la Directive 2008/98/CE intègre la notion de « biodéchets », définis comme étant des déchets biodégradables de différentes provenances, tels que les déchets de jardin, les déchets alimentaires ou les déchets provenant d'usines de transformation de denrées alimentaires. La Directive de 2008 encourage les Etats membres à proposer une collecte séparée pour ce type de déchets, afin de les transformer par compostage et/ou digestion, tout en respectant un niveau élevé de protection de l'environnement. Cette directive incite donc à valoriser les matériaux issus de biodéchets sous forme de produits (*i.e.* fin du statut de déchet) par différentes opérations, dont l'épandage sur le sol au profit de l'agriculture ou de l'écologie.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.2.3. Evaluation de l'écotoxicité des matériaux utilisés en agriculture : un besoin réglementaire européen

La Directive 86/278/CEE souligne que l'utilisation de boues ou de déchets pouvant être utilisés en agriculture ne doit pas compromettre la qualité des sols et des eaux superficielles ainsi que souterraines. Toutefois, il n'y a aucune obligation réglementaire en termes d'évaluation écotoxicologique avant l'épandage de ces matériaux.

Par ailleurs, certaines substances considérées dangereuses pour l'environnement peuvent se retrouver dans les MF utilisées en agriculture, plus particulièrement dans les boues issues du traitement des eaux. Mais ces substances ne sont pas intégrées dans la Directive 86/278/CEE, qui fait toujours foi aujourd'hui pour l'utilisation de boues en Europe, et plus généralement de biodéchets. Cependant, le libre choix est laissé aux Etats membres de proposer une réglementation spécifique afin d'assurer la protection de l'environnement sur leur territoire.

I.3. Cadre législatif en France

I.3.1. Généralités sur les réglementations

En France, l'utilisation des déchets organiques en agriculture est réglementée par les articles L255-1 à L255-11 du Code Rural et de la Pêche maritime (Partie législative, Livre II, Titre V, Chapitre V), ainsi que par l'arrêté du 21 décembre 1998 concernant l'homologation des MF et supports de culture. Les déchets organiques sont regroupés sous la dénomination de « matières fertilisantes ». Celles-ci comprennent les engrais, les amendements et, d'une manière générale, tous les produits dont l'emploi est destiné à assurer ou à améliorer la nutrition des végétaux, ainsi que les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Dans le cadre de la valorisation agronomique, le Code Rural prévoit différents moyens pour un retour au sol des MF : la normalisation, l'homologation ou le plan d'épandage (Figure 1).

Les deux premières voies de valorisation (*i.e.* la normalisation et l'homologation) permettent la mise sur le marché des MF (*i.e.* logique de produit), alors que le dernier (*i.e.* l'épandage réglementé) permet uniquement de céder celles-ci à titre gracieux. Cependant, la règle prioritaire de mise sur le marché est l'homologation.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

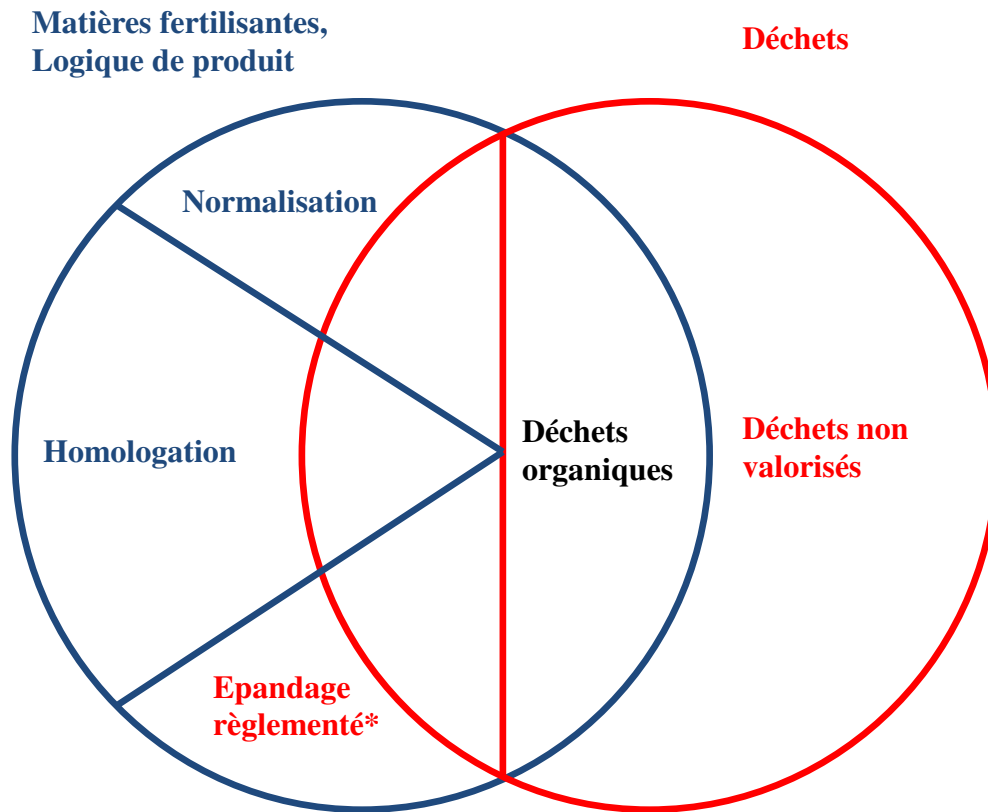


Figure 1 : Représentation schématique du chevauchement des réglementations concernant les déchets organiques valorisés en agriculture

* : conservation du statut de déchet.

I.3.2. La normalisation des MF

En France, les MF peuvent être approuvées à la commercialisation sans autorisation préalable, si leur composition est conforme au Règlement Européen n°2003/2003 relatif aux engrais (*i.e.* nomenclature « Engrais CE ») et/ou à des normes rendues d'application obligatoire par arrêté ministériel en France (*i.e.* normes NF-U).

On distingue donc:

- les engrais, destinés à apporter des éléments directement utiles à la nutrition des plantes. Cette dénomination est attribuée aux matières qui répondent à la norme NF U 42-001 (*i.e.* engrais) ;
- les amendements organiques, destinés à l'entretien ou à la reconstitution du stock de matière organique du sol. Cette dénomination est attribuée aux matières qui répondent aux normes NF U 44-051 (*i.e.* amendements organiques avec et sans engrais) ou NF U

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

44-095 (*i.e.* amendements organiques contenant des matières d'intérêt agronomique issues du traitement des eaux) ;

- les amendements calciques ou magnésiens, destinés principalement à maintenir ou élever le pH du sol et à en améliorer les propriétés. Cette dénomination est attribuée aux matières qui répondent aux normes NF U 44-001 (*i.e.* amendements calciques/magnésiens) ou NF U 44-203 (*i.e.* amendements calciques/ magnésiens avec engrais).

I.3.3. L'homologation des MF

Avant de pouvoir être mises sur le marché (arrêté du 21 décembre 1998 relatif à l'homologation des MF et des supports de culture), les MF doivent être évaluées par l'ANSES, qui rend un avis au Ministère chargé de l'Agriculture en ce qui concerne les modalités de l'autorisation provisoire de vente, d'importation ou de distribution pour expérimentation (schéma de l'évaluation en Figure 2). Cet avis, rendu par un comité d'experts spécialisés, s'appuie sur le dossier de demande d'homologation fourni par le producteur de MF. Afin de pouvoir commercialiser ce type de matières, celles-ci doivent répondre à des critères définis dans le Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation des matières fertilisantes et supports de culture.

Ceux-ci sont les suivants :

- critère de constance de composition : il doit être démontré que la composition du produit est homogène, invariable et constante au cours du temps, par l'intermédiaire d'un suivi de la composition. L'auto-contrôle et la surveillance des produits jusqu'à leur mise sur le marché font partie des obligations que doivent respecter les producteurs ;
- critère d'efficacité : il doit être démontré, de façon quantifiable, que l'utilisation du produit a entraîné soit une amélioration de la production végétale, soit une amélioration de la qualité du sol. Les flux minimaux de référence pour ce critère sont résumés dans le Tableau 3 ;
- critère d'innocuité : il doit être démontré que l'utilisation du produit ne doit pas entraîner de risques pour la santé humaine et pour l'environnement. Les flux maximaux annuels en éléments traces sont résumés dans le Tableau 4. De plus, certains critères microbiologiques (*i.e.* dénombrement de pathogènes pour l'homme et de micro-

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

organismes pouvant présenter un risque pour les cultures) doivent être effectués pour les MF contenant des matières d'origine animale ou végétale.

Tableau 3 : Résumé des flux minimaux de référence pour le critère d'efficacité (Annexe VI du Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation de matières fertilisantes – supports de culture)

Eléments fertilisants majeurs (kg/ha)		Oligo-éléments (kg/ha)	
N total	30	B	0,4
P ₂ O ₅	30	Co	0,05
K ₂ O	30	Cu	0,4
MgO	30	Fe	50
CaO	300	Mn	10
		Mo	0,05
		Zn	1

Tableau 4 : Résumé des flux maximaux annuels autorisés pour le critère d'innocuité (Annexe VII du Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation de matières fertilisantes – supports de culture)

Eléments traces métalliques (g/ha)		Eléments traces organiques (g/ha)	
As	90	Σ 7 PCB	1,2
Cd	15	Fluoranthène	6
Cr	600	Benzo(b)fluoranthène	4
Cu	1000	Benzo(a)pyrène	2
Hg	10		
Ni	300		
Pb	900		
Se	60		
Zn	3000		

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

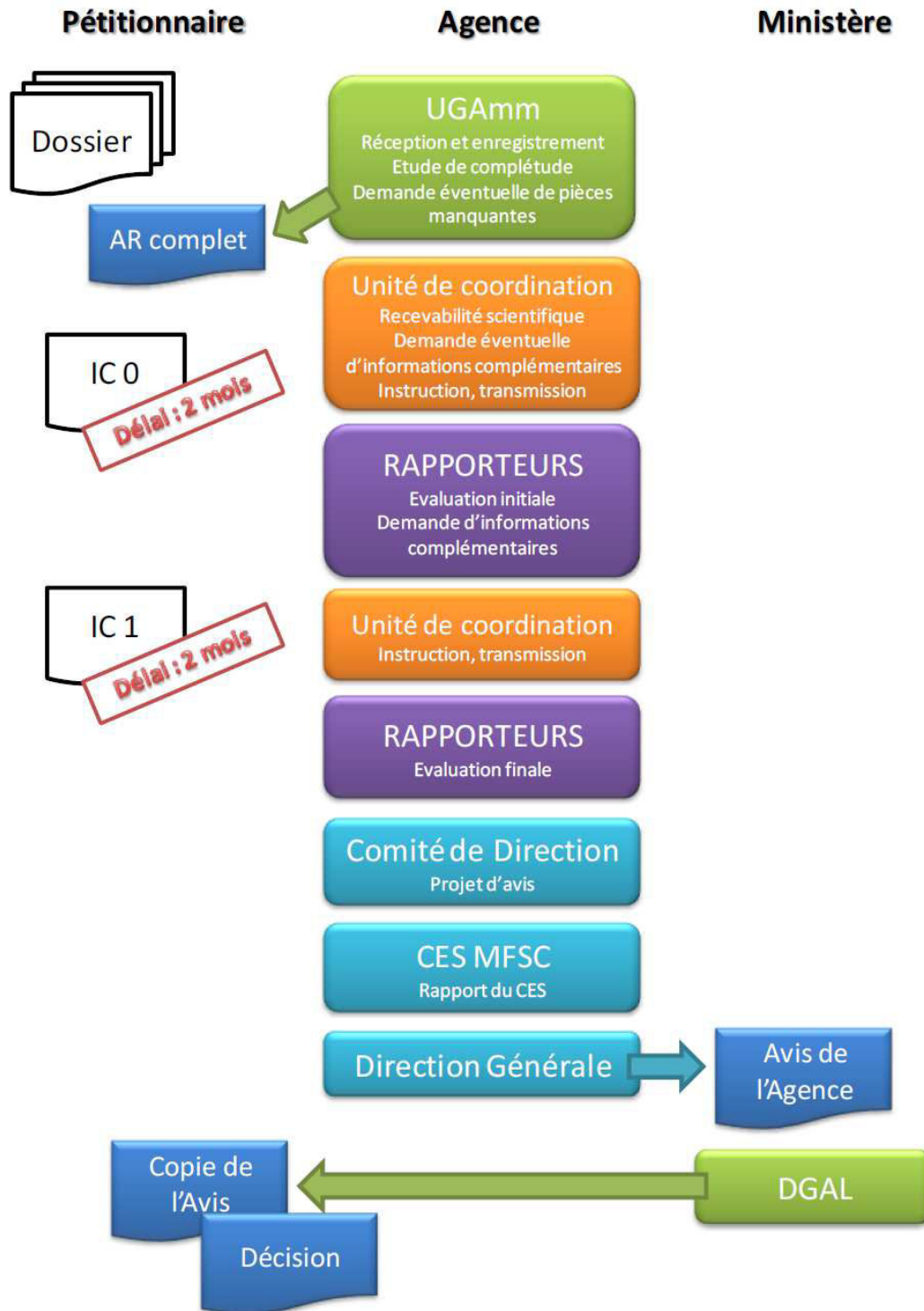


Figure 2 : Schéma récapitulatif de l'homologation des MF (issu de la Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des MFSC, 2013)

UGAmm : Unité de Gestion des Autorisations de Mise sur le Marché ; AR : accusé de réception ; IC : informations complémentaires ; CES : Comité d'experts spécialisés ; MFSC : matières fertilisantes et supports de cultures ; DGAL : Direction Générale de l'Alimentation.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.3.4. Le plan d'épandage des MF

Le plan d'épandage est un document de synthèse qui définit les parcelles qui pourront faire l'objet d'épandage, ainsi que les modalités de celui-ci (arrêté du 16 septembre 2005 modifiant l'arrêté du 7 mars 2002 relatif au projet d'amélioration des pratiques agronomiques). Ce plan concerne les matières issues des Installations Classées Pour l'Environnement (ICPE) qui, contrairement aux matières citées précédemment, gardent le statut de déchet et ne sont donc pas mises sur le marché. Comme ces déchets ne rentrent pas dans la logique de produit, ceux-ci sont soumis à une réglementation spécifique concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates, à partir de sources agricoles (Directive 91/676/CEE et Code de l'Environnement en France, Partie Réglementaire, Livre II, Titre Ier, Chapitre Ier, Section 2).

Les motifs d'exclusion du plan d'épandage sont liés à la protection du voisinage et à celui de la ressource en eau. Pour la protection du voisinage, il s'agit d'interdiction d'épandage à moins de 100 m des habitations ou des zones urbaines. Cette distance pouvant être réduite à 50 m, 15 m ou 10 m dans certains cas précis. Pour la protection de la ressource en eau, il s'agit d'interdire l'épandage à moins de 35 m des cours d'eau et 50 m des points de prélèvement d'eau destinée à l'alimentation humaine. D'autres lieux ou installations sont protégées par cette réglementation, comme les lieux de baignades ou les piscicultures. L'épandage sur les terrains en forte pente est également interdit, interdiction appliquée au cas par cas.

Le plan d'épandage comporte au minimum les éléments suivants :

- l'identité et l'adresse de l'exploitant et des éventuels prêteurs de terres;
- l'identification des parcelles regroupées par îlot cultural et par exploitant;
- une représentation cartographique établie avec une précision au moins égale à une échelle au 1/12 500 des îlots culturaux concernés, des surfaces exclues de l'épandage et du motif des exclusions en tenant compte de la réglementation (*i.e.* notamment distance vis-à-vis des cours d'eau et tiers, pentes) et des autres contraintes d'épandage (*i.e.* notamment localisation des parcelles, nature du sol);
- les surfaces totale et épandable de chaque parcelle;
- les systèmes de culture (*i.e.* cultures en place et principales successions végétales);
- la nature, la teneur en azote avec indication du mode d'évaluation de cette teneur (*i.e.* analyses ou références) et la quantité des matériaux qui seront épandus;

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- les doses maximales admissibles par type de matière, de sol et de cultures en utilisant des références locales;
- un calendrier prévisionnel d'épandage rappelant, en zone vulnérable, les périodes d'épandage interdit et, en dehors de ces zones, les périodes d'épandage inappropriées;
- le cas échéant, le solde de la balance globale en phosphore de l'exploitation, exprimé en kilogrammes de phosphore par hectare (*i.e.* surface agricole utile).

I.4. Origine, typologie et composition des MF en France

Il existe aujourd'hui une variété grandissante de MF au sens général du terme, ce qui renforce le besoin de disposer d'une méthodologie de caractérisation *a priori* des dangers pour l'environnement.

L'ANSES, en charge de l'homologation des MF en France, rend public la liste des produits homologués ou ayant une autorisation provisoire de vente (catalogue e-phy, e-phy.agriculture.gouv.fr). A partir de cette liste, qui regroupe plus d'une centaine de produits, il est possible d'établir une typologie selon la provenance, la catégorie ainsi que selon les composants des MF. Un récapitulatif de ce listing est présenté dans le Tableau 5.

Parmi les matières homologuées ou sous autorisation provisoire de vente, on retrouve des matières fertilisantes, des engrais, des produits mixtes (*i.e.* engrais et pesticides), des amendements, des conditionneurs de sol, des rétenteurs d'eau de synthèse, des stimulateurs de croissance racinaire ainsi que des préparations microbiennes. Les composants de ces matières ont des actions spécifiques pouvant être combinées, comme par exemple améliorer les caractéristiques des sols (*e.g.* substances humiques, amendements basiques, agents mouillants, tensio-actifs et rétenteurs d'eau), nourrir les végétaux (*e.g.* acides aminés, engrais pour pulvérisation foliaire, engrais pour plantes d'aquarium, engrais à base d'effluents, engrais à base d'excréments d'animaux traités, engrais à base de boues de station d'épuration), protéger les cultures des insectes nuisibles et des mauvaises herbes (*e.g.* mélanges d'engrais et d'insecticide/herbicide), favoriser la croissance des plantes (*e.g.* stimulateur de croissance et stimulateur de croissance racinaire) ainsi que l'absorption des nutriments, par l'intermédiaire de symbiose avec des micro-organismes (*e.g.* préparations bactériennes et mycorhiziennes).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 5 : Grandes classes de matières homologuées ou sous autorisation provisoire de vente (d'après le catalogue e-phy concernant les MF)

Dénomination de classe	Dénomination de type	Exemples de constituants présents dans la composition
Matières fertilisantes	Substances humiques	Acides humiques et fulviques
	Stimulateurs de croissance	Acide glutamique et acétique; lignosulfonate
	Acides aminés	Acides aminés
	Agents nutritionnels par pulvérisation foliaire	N/P/K
	Engrais pour plantes d'aquarium	N/P/K
	Préparation microbiennes	Préparations de bactéries; préparations de champignons mycorhiziens
Engrais	Produits non classés	Basalte micronisé; terre de diatomée
	Engrais à base d'effluents	Effluents industriels et issus de l'agriculture
	Engrais à base d'excréments animaux traités	Excréments d'animaux d'élevage traités (fientes et lisier)
	Engrais à base de boues de station d'épuration traitées	Boues de station d'épuration
Produits mixtes	Engrais et pesticide	Mélange N/P/K et herbicide
		Mélange N/P/K et insecticide
Amendements	Organo-minéral basique	Ordures ménagères chaulées
	Organo-basique	Boue déshydratée issue d'une station d'épuration d'une usine de traitement du tabac
	Basique	Coquilles d'œufs cuites et déshydratée; oxydes de calcium
	Minéral basique	Carbonate de calcium
Conditionneurs de sol	Agents mouillants non ioniques	Polyéthylène glycol; copolymère d'oxyde d'éthylène et de propylène
	Tensio-actifs	Mélange d'acide carbonique sulfoné, d'alcools gras et d'anti-mousse
Rétenteurs d'eau de synthèse	Copolymère d'acrylate d'acrylamide de potassium réticulé	Copolymère d'acrylate d'acrylamide de potassium réticulé
Stimulateurs de croissance racinaire	Lignosulfonate	Lignosulfonate
Préparations bactériennes	Inoculum bactérien	Enrobage de semences de soja avec <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	Inoculum d'endomycorhizes	Préparation de <i>Glomus intraradices</i>

Chapitre II. Méthodes intégratrices pour la caractérisation des dangers liés aux MF

Ce chapitre a pour objectif de récapituler les différentes méthodes d'évaluation écotoxicologique (*i.e.* batteries de bio-essais) proposées dans la littérature scientifique pour étudier les matrices complexes, et plus particulièrement les MF.

II.1. Généralités sur les batteries de bio-essais

Les analyses physico-chimiques sont généralement insuffisantes afin de prendre en compte les dangers potentiels pour l'environnement d'échantillons multi-contaminés. En effet, ce type d'analyse n'intègre pas les effets combinés des mélanges de polluants potentiellement présents, ni leur biodisponibilité. Il est donc recommandé d'utiliser plusieurs bio-essais en batterie, complémentaires en terme de représentativité écologique et de critère d'effet évalué (*i.e.* aigu, chronique et comportemental), permettant ainsi de prendre en compte les potentiels effets adverses pour l'environnement (van Gestel *et al.*, 2001)..

En fonction du compartiment étudié (*i.e.* sol, eau ou sédiment) et de la problématique abordée (*e.g.* évaluation d'échantillons environnementaux ou de résidus d'activités humaines), différentes stratégies d'évaluation utilisant des batteries de bio-essais normalisés ont été proposées. Concernant l'évaluation de matrices solides comme les sols (Bierkens *et al.*, 1998 ; Achazi, 2002 ; Eisentraeger *et al.*, 2004) ou les déchets (Pandard *et al.*, 2006 ; Wilke *et al.*, 2008 ; Pablos *et al.*, 2009 ; Stierstroem *et al.*, 2009 ; Pandard & Römbke, 2013), les bio-essais généralement considérés utilisent des bactéries, des collemboles, des vers de terre et des végétaux supérieurs en tant qu'organismes modèles. Les bio-essais généralement considérés pour l'évaluation de matrices liquides telles que des effluents ou des éluats issus de matrices solides utilisent des bactéries, des algues, des végétaux et des crustacés (Tigini *et al.*, 2004 ; Hernando *et al.*, 2005 ; Mendoça *et al.*, 2009).

II.2. Batteries de bio-essais proposées pour l'évaluation des MF en Europe

La réglementation européenne préconise de déterminer l'innocuité des MF avant leur utilisation en agriculture. Cependant, la décision sur l'utilisation de ces matières est déterminée par chaque Etat Membre. Cela a entraîné différentes études scientifiques nationales, visant à évaluer l'écotoxicité de différentes catégories de MF (Tableau 6). Parmi

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

ces matières, on retrouve fréquemment des boues issues du retraitement des eaux urbaines et/ou industrielles.

En ce qui concerne les batteries de bio-essais proposées par exposition directe aux matrices solides, celles-ci se composent généralement d'essais normalisés de germination et de croissance sur végétaux supérieurs (*Lepidium sativum* (Linné), *Hordeum vulgare* (Linné), *Avena sativa* (Linné), *Brassica rapa/campestris* (Linné) et *Lactuca sativa* (Linné)), d'essais normalisés d'évitement et de reproduction sur collemboles (*Folsomia candida* (Willem)) ainsi que sur vers de terre (*Eisenia fetida* (Savigny)/*andrei* (Bouché)). Certaines études se sont intéressées à des critères d'effet plus spécifiques. C'est le cas, par exemple, des marqueurs du stress oxydatif chez les végétaux supérieurs (Ferrari *et al.*, 1999). Pour les essais par approche indirecte (*i.e.* exposition aux éluats et/ou aux lixiviats des MF), les batteries se composent fréquemment d'essais normalisés d'inhibition de la luminescence de bactéries (*Vibrio fischeri* (Beijerinck)), d'essais de croissance d'algues (*Chlorella vulgaris* (Beijerinck) et *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov)) ainsi que de tests de mobilité sur microcrustacés (*Daphnia magna* (Straus)). Certains auteurs ont intégré d'autres organismes dans les batteries d'essais aquatiques proposées. C'est le cas de l'utilisation du cladocère *Ceriodaphnia dubia* (Richard) (Ferrari *et al.*, 1999), du protozoaire *Tetrahymena thermophila* (Furgason) ou encore du rotifère *Brachionus calyciflorus* (Pallas) (Malara & Oleszczuk, 2013). Aucune étude n'a, à notre connaissance, intégré le nématode *C. elegans* ni l'acarien prédateur *H. aculeifer* dans des batteries d'essais concernant l'évaluation des MF.

Différentes stratégies ont été par ailleurs utilisées afin d'évaluer les dangers des MF (Tableau 7). Certaines études évaluent ces dangers par approche directe seule (*i.e.* essais sur organismes terrestres), par approche indirecte seule (*i.e.* essais sur organismes aquatiques) ou bien en combinant ces deux approches. Les protocoles de préparation des échantillons diffèrent également d'une étude à l'autre. Pour les études utilisant une approche directe, les MF ont été testées en évaluant différents pourcentages de MF incorporée à du sol artificiel ISO, en évaluant différentes doses d'utilisation agronomique, ou bien en utilisant différentes concentrations prédéfinies. Pour les études par approche indirecte, les échantillons évalués sont obtenus en réalisant une lixiviation à l'eau ou à différents solvants des préparations de sol et de MF.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 6 : Exemples d'études utilisant différentes batteries de bio-essais terrestres et aquatiques pour évaluer l'écotoxicité des MF

Bio-essais terrestres	Bio-essais aquatiques	Pays	Référence
Croissance de végétaux (<i>Lepidium sativum</i> et <i>Hordeum vulgare</i>), mortalité de vers de terre (<i>Eisenia fetida</i>)	Luminescence de bactéries (<i>Vibrio fischeri</i>), germination de végétaux (<i>Lepidium sativum</i> et <i>Hordeum vulgare</i>), immobilisation de crustacés (<i>Daphnia magna</i>)	Portugal, Italie	Alvarenga <i>et al.</i> , 2007
/	Croissance d'algues (<i>Chlorella vulgaris</i>), immobilisation de crustacés (<i>Daphnia magna</i>)	Espagne	Delgado <i>et al.</i> , 2013
Reproduction de collemboles (<i>Folsomia candida</i>)	Immobilisation de crustacés (<i>Daphnia magna</i>)	Espagne	Domene <i>et al.</i> , 2008
Germination, croissance et stress oxydatif de végétaux (<i>Avena sativa</i> , <i>Brassica campestris</i> , <i>Lactuca sativa</i>)	Luminescence de bactéries (<i>Vibrio fischeri</i>), croissance d'algues (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>), immobilisation et reproduction de crustacés (<i>Daphnia magna</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i>)	France	Ferrari <i>et al.</i> , 1999
/	Luminescence de bactéries (<i>Vibrio fischeri</i>), immobilisation de crustacés (<i>Daphnia magna</i>)	Portugal	Lapa <i>et al.</i> , 2007
/	Luminescence de bactéries (<i>Vibrio fischeri</i>), essai microbien pour l'évaluation des risques (MARA), toxkits (<i>Tetrahymena thermophila</i> , <i>Brachionus calyciflorus</i> , <i>Daphnia magna</i>)	Pologne	Malara & Oleszczuk, 2013
Evitement et reproduction de collemboles (<i>Folsomia candida</i>), évitement et reproduction de vers de terre (<i>Eisenia &rei</i>), germination et croissance de végétaux (<i>Avena sativa</i> , <i>Brassica rapa</i>)	/	Portugal	Moreira <i>et al.</i> , 2008
Evitement et reproduction de collemboles (<i>Folsomia candida</i>), évitement et reproduction de vers de terre (<i>Eisenia &rei</i>), croissance de végétaux (<i>Avena sativa</i> , <i>Brassica rapa</i>)	/	Portugal	Natal-da-Luz <i>et al.</i> , 2009

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 7 : Exemples de matières ainsi que de protocoles de préparation des échantillons utilisés pour l'évaluation écotoxicologique des MF

Matières	Préparation des échantillons solides	Préparation des échantillons liquides	Références
Boue de STEP, compost de déchets municipaux, compost de jardin	Gamme de dilution de la matière dans du sol artificiel, de 25% à 100% de matière	Lixiviation à l'eau	Alvarenga <i>et al.</i> , 2007
Fientes de volailles	Dilution de la matière dans des microcosmes	Lixiviation de microcosmes à l'eau (percolation)	Delgado <i>et al.</i> , 2013
Boues de STEP après gigestion aérobie et anaérobie, lisier	Gamme de dilution de la matière dans du sol artificiel, de 1g/kg à 1000g/kg	Lixiviation à l'eau et extraction au méthanol et au dichlorométhane	Domene <i>et al.</i> , 2008
Cendres de déchets municipaux	Gamme de dilution de la matière dans du sol artificiel, de 3% à 100% de matière	Lixiviation à l'eau	Ferrari <i>et al.</i> , 1999
Cendres de boues de STEP	Matières brutes	Lixiviation à l'eau	Lapa <i>et al.</i> , 2007
Boues de STEP	Matières brutes et mélangées à des sols agricoles (étude de terrain)	Lixiviation à l'eau	Malara & Oleszczuk, 2013
Boues de STEP, compost de boues de STEP	Gamme de dilution dans du sol artificiel, à 6T/ha et 12T/ha	/	Moreira <i>et al.</i> , 2008
Boues de STEP	Gamme de dilution dans du sol artificiel, de 4g/kg à 30g/kg	/	Natal-da-Luz <i>et al.</i> , 2009

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Au regard de ces différents travaux, il n'est pas possible de déterminer une batterie d'essai optimale pour l'évaluation écotoxicologique des MF. En effet, la diversité de matières étudiées (*e.g.* boues, cendres, lisier, fientes de volaille,...), la diversité de protocoles de préparation des échantillons pour les essais en milieu terrestre comme aquatique ainsi que la diversité de bio-essais utilisés entraînent une hétérogénéité des données exploitables. Ce constat a mené en partie à l'élaboration du programme de recherche français « Evaluation des risques écotoxicologiques liés à la valorisation de déchets en agriculture » (VADETOX).

De 1996 à 2004, l'ADEME a mené un projet de recherche (VADETOX), dont le but principal était d'évaluer *in situ* les risques de transfert des polluants issus des déchets vers le sol, les eaux, les végétaux et la chaîne alimentaire. Pour cela, le devenir des polluants (*i.e.* mobilité, biodisponibilité et transfert) ainsi que leurs effets sur le système sol-eau-plante ont été évalués. De plus, des tests de toxicité sur organismes aquatiques (*i.e.* bactéries, algues et crustacés) avaient également été utilisés pour évaluer la toxicité des déchets bruts ainsi qu'une fois ceux-ci épandus en champ.

A la suite du programme VADETOX, l'ADEME, en lien avec l'ANSES, ont exprimé le besoin de disposer d'une batterie d'essais écotoxicologiques sur organismes terrestres et aquatiques pertinents et sensibles afin d'améliorer l'évaluation des risques des MF (convention n° 09-75-C0061), ainsi que de contribuer à la révision du Guide concernant la constitution des dossiers de demande d'homologation des MF (n°50644#01). Les objectifs de ce second programme étaient d'optimiser le protocole d'évaluation des MF, ainsi que de valider une batterie de bio-essais optimale, permettant une évaluation par approche directe et indirecte.

Il est important de mentionner que les travaux de thèse présentés ont été réalisés en parallèle de ce programme de recherche. Une partie des résultats de ce programme (*i.e.* essais réalisés à l'INERIS) a été utilisée afin de discuter et de conclure quant à la proposition d'une stratégie d'évaluation des dangers *a priori* des MF.

Chapitre III. Le nématode *Caenorhabditis elegans* et l'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer* en tant qu'organismes modèles

III.1. Place des deux organismes au sein de la microfaune du sol

Malgré la diversité importante d'espèces d'invertébrés au sein du système sol, l'évaluation de la toxicité des substances chimiques ou des matrices polluées ne peut raisonnablement se baser que sur un nombre restreint d'organismes. Il est donc important et nécessaire de choisir correctement les espèces d'intérêt. Celles-ci doivent être représentatives en termes de fonctions écosystémiques, de taxonomie, de niveau trophique, de stratégie de développement et de voie d'exposition aux toxiques (Laskowski *et al.*, 1998). La Figure 3 représente un exemple de réseau trophique de micro-invertébrés au sein d'un écosystème du sol (terre agricole), intégrant *C. elegans* et *H. aculeifer*.

A ce jour, les invertébrés majoritairement utilisés pour mener des essais en écotoxicologie sont les vers de terre (*e.g.* le plus souvent *Eisenia fetida*) et les collemboles (le plus souvent *Folsomia candida/fimetaria*). Les vers de terre sont des représentants des décomposeurs. Ils incorporent la litière dans leurs excréments et ont un impact majeur sur la fragmentation de celle-ci. Les turricules sont riches en nutriments et jouent un rôle fondamental dans la structuration du sol. Les lombricidés, dont *E. fetida* ne fait pas partie, jouent également un rôle d'ingénierie, par le fait de mélanger verticalement les fractions organiques et inorganiques des sols (Edwards, 2004). Les collemboles sont les invertébrés les plus abondants dans la plupart des écosystèmes terrestres (jusqu'à 50000 individus/m²). Ceux-ci se nourrissent d'hyphes de champignons et de bactéries. Leur rôle dans la structuration du sol est encore mal connu, mais ils peuvent avoir un impact significatif dans le cas où les vers de terre et autres décomposeurs sont peu présents (Hopkin, 1997).

Les nématodes sont à la base du réseau trophique. Ce sont également des métazoaires abondants et riches en espèces dans les sédiments et les sols (Yeats, 1981 ; Traunspurger *et al.*, 2002). Les espèces non parasites jouent un rôle fondamental dans la production primaire, la décomposition de la litière et dans le cycle de la matière organique en général (Sohlenius, 1980 ; Freckmann *et al.*, 1990), au même titre que les vers de terre et les collemboles. Parmi les nématodes bactérivores, *C. elegans* est l'espèce la plus étudiée. L'utilisation de ce nématode en écotoxicologie remonte aux années 1980 (Popham & Webster, 1979 ; van Kessel *et al.*, 1989), et s'appuie sur les avancées concernant son utilisation en génétique (Brenner, 1974). En effet, le développement cellulaire de *C. elegans* est connu, de l'œuf fertilisé à

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

l'individu adulte composé de 810 cellules (Sulston & Hodgkin, 1988). Ce fut également l'un des premiers organismes totalement séquencé (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Depuis lors, son utilisation en tant qu'organisme modèle en écotoxicologie s'est élargie afin d'évaluer des matrices de plus en plus complexes, en passant par des tests sur de l'agar (Williams & Dusenbery, 1988), des essais en milieu aqueux (Williams & Dusenbery, 1990), des essais en milieu terrestre (Donkin & Dusenbery, 1993) ainsi que sur sédiments (Traunspurger *et al.*, 1997).

Les acariens de la famille des Laelapidae (Gamasina), dont *H. aculeifer* fait partie, peuvent se retrouver en grande densité dans les sols naturels ou agricoles (jusqu'à 10⁴ individus/m² ; Krogh, 1991 ; Koehler, 1992 ; Krogh & Bruus Pedersen, 1997). Ce sont des prédateurs polyphages (Sardar & Murphy, 1987; Heckmann *et al.*, 2007). Le rôle de prédateur de *H. aculeifer* est effectivement reconnu depuis de nombreuses années (Sheals, 1956; Edwards *et al.*, 1967; Usher, 1985), ce qui rend cet organisme spécifique par rapport aux consommateurs primaires. D'autre part, le fait que *H. aculeifer* soit un prédateur peu spécialisé a permis son utilisation en tant qu'agent biologique de lutte contre différents insectes nuisibles (Berndt *et al.*, 2004 a et b ; Vänninen & Koskula, 2004 ; Gerson & Weintraub, 2007 ; Lesna *et al.*, 2009 ; Rahman *et al.*, 2011). Son utilisation en écotoxicologie remonte aux années 1990, les premières recherches portant sur les interactions pesticide-proie-prédateur lors de tests en laboratoire (Hamers & Krogh, 1996 ; Axelsen *et al.*, 1997).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

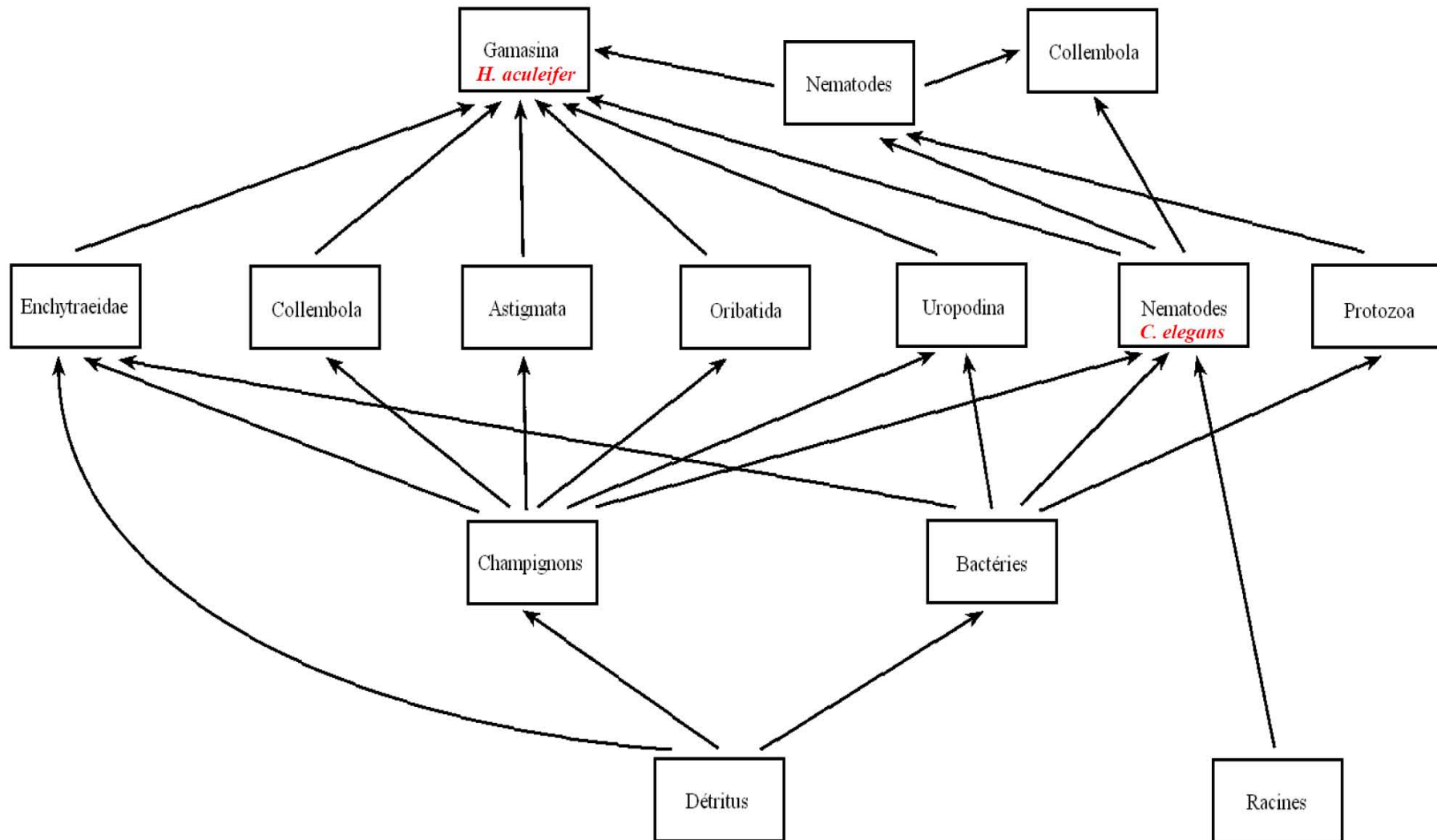


Figure 3 : Exemple de chaîne trophique entre différents groupes d'invertébrés au sein d'un sol agricole (modifié de Laskowski *et al.*, 1998)

III.2. Utilisation de *C. elegans* en écotoxicologie

Dans le courant des années 2000, Sochova *et al.* (2006), dans leur review sur l'utilisation des nématodes en écotoxicologie, résumant les différentes méthodes et approches développées jusqu'à présent. Celles-ci sont présentées dans les Tableaux 8 et 8 bis pour les essais réalisés en milieu aqueux ou assimilé (*i.e.* agar), ainsi dans les Tableaux 9 et 9 bis pour les essais réalisés en matrice solide (*i.e.* sols et sédiments). Pour les deux types d'essai, les critères d'effet suivis incluent la mortalité, la croissance, la reproduction, le suivi du mouvement, le développement des organismes, le pourcentage d'individus gravides ou encore l'évaluation de biomarqueurs ; le critère le plus étudié étant la mortalité. Les effets de différentes substances ont déjà été évaluées avec cet organisme, comme par exemple des ETM, des pesticides (*e.g.* atrazine, carbendazim, chlorpyrifos, diméthoate, malathion, parathion,...), des composés organiques (*e.g.* HAPs, PCBs, perturbateurs endocriniens,...) ou encore des nanoparticules (*e.g.* CeO₂, Al₂O₃, TiO₂, ZnO). Les réponses de *C. elegans* vis-à-vis de différentes substances (*i.e.* ETM et composés organiques), évaluées par une exposition en phase solide pour le critère de mortalité, sont présentée dans le Tableau 10. Ces résultats montrent que *C. elegans* est relativement sensible au DEHP, au toxaphène ainsi qu'aux ETM.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 8 : Résumé des méthodes d'essai en milieu aqueux ou assimilé (*i.e.* agar) utilisant *C. elegans* en tant qu'organisme modèle (tiré de Sochova *et al.*, 2006)

Endpoint	Medium	Duration (hrs)	Organism	Chemicals	References
Lethality	Agar	24	<i>C. elegans</i>	Al ^{1,3} , Be ¹ , Cd ^{1,2,3} , Cu ³ , ethanol ² , Hg ¹ , malathion ¹ , Pb ¹ , Sr ¹ , vaponal ¹ , Zn ^{1,3}	¹ Williams and Dusenbery, 1988; ² Dhawan et al., 1999, ³ 2000
		24–96	<i>C. elegans</i>	Cu, Zn	Williams and Dusenbery, 1990b
	Aqueous	24	<i>C. elegans</i>	Ag ¹ , Al ^{1,10} , As ¹ , Ba ⁸ , Be ¹ , Ca ^{6,8} , Cd ^{1,4,5,6,7,8,9,10} , Co ⁸ , Cr ^{1,8} , Cs ⁸ , Cu ^{1,4,6,7,10,12} , Fe ⁸ , fluoroacetic acid ² , glucosinolates ³ , Hg ^{1,4,6} , K ⁸ , La ⁸ , Li ⁸ , Mg ^{6,8} , Mn ⁶ , Na ⁸ , Ni ^{1,6,8} , Pb ^{1,4,10} , pentachlorophenol ⁵ , pentachlorophenate, Sb ¹ , sodium lauryl sulphate ⁵ , Sr ^{1,8} , Ti ¹ , Zn ^{1,6,8,10}	¹ Williams and Dusenbery, 1990b; ² Middendorf and Dusenbery, 1993; ³ Donkin and Williams, 1995; ⁴ Donkin et al., 1995; ⁵ Cressman and Williams, 1997; ⁶ Tatara et al., 1997; ⁷ Freeman et al., 1998; ⁸ Tatara et al., 1998; ⁹ Dhawan et al., 1999, ¹⁰ 2000; ¹¹ Boyd and Williams, 2003b; ¹² Graves et al., 2005
		48	<i>C. elegans</i>	Ag ¹ , Al ^{1,4} , As ¹ , Be ¹ , Cd ^{5,3,4} , Co ⁴ , Cr, Cu ^{1,3,4} , Hg ⁴ , K ⁴ , Mn ⁴ , Na ² , Ni ^{1,4} , Pb ^{1,4} , pentachlorophenol ⁵ , sodium lauryl sulphate ² , Sb ¹ , Sr ¹ , Ti, Zn ^{1,4}	¹ Williams and Dusenbery, 1990b; ² Cressman and Williams, 1997; ³ Freeman et al., 1998; ⁴ Wah Chu and Chow, 2002
		72	<i>C. elegans</i>	Ag ¹ , Al ¹ , As ¹ , Be ¹ , Cd ¹ , Cr ¹ , Cu ¹ , Hg ¹ , Ni ¹ , Pb ¹ , Sb ¹ , Sr ¹ , Ti ¹ , waste water ² , Zn ¹	¹ Williams and Dusenbery, 1990b; ² Hitchcock et al., 1998
		96	<i>C. elegans</i>	Ag ¹ , Al ¹ , As ¹ , Be ¹ , Cd ^{1,2} , Cr ¹ , Cu ^{1,2} , Hg ^{1,2} , Ni ¹ , pentachlorophenate ² , Pb ¹² , Sb ¹ , Sr ¹ , Ti ¹ , Zn ¹	¹ Williams and Dusenbery, 1990b; ² Donkin et al., 1995
	Agar	72	<i>C. elegans</i>	Cd, Cu	Boyd et al., 2003
		96	<i>C. elegans</i>	Atrazine, fluoranthene, lansoprazole, PCB52	Menzel et al., 2005
		24–120	<i>C. elegans</i>	Cholesterol ² , diethylstilbestrol ² , estradiol ² , estriol ² , estrone ² , ethynylestradiol ² , methyltestosterone ² , nonylphenol ¹ , <i>p</i> -octylphenol ¹ , pregnenolone ² , testosterone ² , tributyltin chloride ¹ , triphenyltin chloride ¹	¹ Tominaga et al., 2002, ² 2003
		To the end of reproduction	<i>H. paucianmulatus</i>	Cu	Kammenga and Riksen, 1996
		Reproduction of the 2nd generation	<i>P. acuminatus</i>	Fluoroacetic acid	Middendorf and Dusenbery, 1993
Reproduction	Agar	To the end of reproduction	<i>C. elegans</i>	Carbendazim, Cd, Cu	Jonker et al., 2004a
		72	<i>C. elegans</i>	Cd ^{1,3} , Cu ^{1,3} , 4-nonylphenol ² , Pb ^{1,3}	¹ Anderson et al., 2001; ² Höss et al., 2002; ³ Boyd et al., 2003
		96	<i>C. elegans</i>	Cd, Cu, Hg, pentachlorophenate	Donkin and Williams, 1995
		24	<i>C. elegans</i>	Surfactants	Mutwakil et al., 1997
		2; 3; 4; 5; 6; 8 d	<i>C. elegans</i>	Carbendazim, Cd, Cu	Jonker et al., 2004a
	Aqueous	24	<i>C. elegans</i>	Cd ² , Cu ² , 4-nonylphenol ³ , Pb ² , surfactants ¹	¹ Mutwakil et al., 1997; ² Anderson et al., 2001; ³ Höss et al., 2002
		4	<i>C. elegans</i>	Cu ¹ , demeton-S-methylsulfone ² , dichlorvos ² , dimethoate ² , ethephon ² , ethyl paraoxon ² , fensulfothion ² , fenamiphos ² , glyphosate ² , methamidophos ² , methidathion ² , methyl parathion ² , mevinphos ² , monocrotophos ² , omethoate ² , parathion ²	¹ Anderson et al., 2001; ² Cole et al., 2004
	Agar	24	<i>C. elegans</i>	Cd ^{1,2} , Cu ^{1,2,3} , Pb ^{1,2}	¹ Anderson et al., 2001; ² Boyd et al., 2003; ³ Graves et al., 2005
		4	<i>C. elegans</i>	Acetone, Al, chlorpyrifos, Cu, DMSO, EtOH, levamisole, mebendazole	Anderson et al., 2004
		24	<i>C. elegans</i>	Al ³ , Be ¹ , Cd ^{1,2,3} , Cr ³ , Cu ³ , ethanol ² , Hg ² , malathion ³ , Pb ³ , vaponal ³ , Zn ³	¹ Williams and Dusenbery, 1990a; ² Dhawan et al., 1999, ³ 2000
Development	Aqueous	24–96	<i>C. elegans</i>	Pb	Williams and Dusenbery, 1990a
		96	<i>C. elegans</i>	Cu, Hg, Pb, pentachlorophenate	Donkin and Williams, 1995

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

(Suite du tableau 8)

Endpoint	Medium	Duration (hrs)	Organism	Chemicals	References
Feeding	Aqueous	24	<i>C. elegans</i> ^{1,2,3} , <i>P. redivivus</i> ³ , <i>P. pacificus</i> ³	Cd ¹ , ² , Cu ^{1, 2, 3} , Pb ^{1, 2}	¹ Anderson et al., 2001; ² Boyd et al., 2003; Boyd and Williams, 2003b
Biomarkers	Agar Agar	5; 60; 120 min 48	<i>P. acuminatus</i> <i>C. elegans</i>	Cd, Cu, heat Atrazine, fluoranthene, lansoprazole, PCB52	Kammenga et al., 1998 Menzel et al., 2005
Length of juv. period	Pore water Agar	24	<i>C. elegans</i> <i>C. elegans</i> , <i>P. acuminatus</i>	Cd, Cu, Zn Carbendazim ² , Cd ² , Cu ²	Power and de Pomerai, 1999 ¹ Kammenga et al., 1996b; ² Jonker et al., 2004a
Population growth rate	Agar	To the end of reproduction	<i>P. acuminatus</i> ^{1,2,3} , <i>H. paucianulatus</i> ¹	Cd ² , Cu ¹ , 3,4-dichloraniline ² , pentachlorophenol ³	¹ Kammenga and Riksen, 1996; ² Kammenga et al., 1996a, 31997
Hermaph./males	Agar	24–120	<i>C. elegans</i>	Cholesterol ¹ , nonylphenol ¹ , p-octylphenol ¹ , tributyltin chloride ¹ , triphenyltin chloride ¹	¹ Tominaga et al., 2002; ² Alda-Alvarez and Kammenga, 2004
Respiratory	Aqueous	10 s–30 min	<i>C. elegans</i>	DMSO, EtOH, nonylphenol	Kohra et al., 2002
Maturity Ind.	Water	24	Nematodes in sample	Cu	Bongers et al., 2001
Body length	Pore water	72	<i>C. elegans</i>	Cd	Traunspurger et al., 1997; Höss et al., 2001
Num. of eggs inside worm	Pore water	72	<i>C. elegans</i>	Cd	Traunspurger et al., 1997
Num. of offspring per worm	Pore water	72	<i>C. elegans</i>	Cd	Traunspurger et al., 1997
Percent of gravid worms	Pore water	72	<i>C. elegans</i>	Cd	Traunspurger et al., 1997

Tableau 8 bis : Résumé des méthodes d'essai en milieu aqueux ou assimilé (*i.e.* agar) utilisant *C. elegans* en tant qu'organisme modèle (études après 2006)

Critère d'effet	Substrat	Durée (heures)	Substances	Référence
Survie	Agar	24	Chlorpyrifos	Roh & Choi, 2008
		24	Nanoparticules de CeO ₂ , TiO ₂	Roh <i>et al.</i> , 2010
		24 et 48	Quinoline, acridine, phénazine, 1,10-phénanthroline, toxaphène, hexachlorobenzène, paraffines chlorées à courte chaîne	Sochova <i>et al.</i> , 2007
	Aqueux	24	Acetyl-hexamethyl-tetrahydronaphtalène et hexahydro-hexamethylcyclopenta-benzopyran (composés de parfums)	Mori <i>et al.</i> , 2006
		72	Chlorure de vinyle	Nam & An, 2010
		24, 48 et 72	Acenaphtène, phenanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)pyrène	Sese <i>et al.</i> , 2009
		24	Cd, Cr, Hg, Pb	Xing <i>et al.</i> , 2009
		24 et 48	Quinoline, acridine, phénazine, 1,10-phénanthroline, toxaphène, hexachlorobenzène, paraffines chlorées à courte chaîne	Sochova <i>et al.</i> , 2007
		24	Nanoparticules de ZnO, Al ₂ O ₃ et TiO ₂	Wang <i>et al.</i> , 2009

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

(Suite du tableau 8 bis)

Critère d'effet	Substrat	Durée (heures)	Substances	Référence
Reproduction	Agar	36 (suivi quotidien des juvéniles pendant la période de reproduction)	Cd, Cu, SDS, détergents	Harada <i>et al.</i> , 2007
	Aqueux	24 (suivi quotidien des juvéniles pendant la période de reproduction)	Acetyl-hexamethyl-tetrahydronaphtalène et hexahydro-hexamethylcyclopenta-benzopyran (composés de parfums)	Mori <i>et al.</i> , 2006
		72	Chlorure de vinyle	Nam & An, 2010
		72	Acenaphtène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)pyrène	Sese <i>et al.</i> , 2009
		120	Nanoparticules de ZnO, Al ₂ O ₃ et TiO ₂	Wang <i>et al.</i> , 2009
Croissance	Agar	24	Cd, Cu, SDS, détergents	Harada <i>et al.</i> , 2007
		24	Chlorpyrifos	Roh & Choi, 2008
		24	Nanoparticules de CeO ₂ , TiO ₂	Roh <i>et al.</i> , 2010
	Aqueux	55	Acetyl-hexamethyl-tetrahydronaphtalène et hexahydro-hexamethylcyclopenta-benzopyran (composés de parfums)	Mori <i>et al.</i> , 2006
		24, 48 et 72	Acenaphtène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)pyrène	Sese <i>et al.</i> , 2009
		120	Nanoparticules de ZnO, Al ₂ O ₃ et TiO ₂	Wang <i>et al.</i> , 2009
Biomarqueurs	Agar	24	Chlorpyrifos	Roh & Choi, 2009
		24	Nanoparticules de CeO ₂ , TiO ₂	Roh <i>et al.</i> , 2010
Nombre d'œuf/individu hermaphrodite	Agar	24	Chlorpyrifos	Roh & Choi, 2009
		24	Nanoparticules de CeO ₂ , TiO ₂	Roh <i>et al.</i> , 2010
	Aqueux	120	Nanoparticules de ZnO, Al ₂ O ₃ et TiO ₂	Wang <i>et al.</i> , 2009
% d'individus gravides	Aqueux	55	Acetyl-hexamethyl-tetrahydronaphtalène et hexahydro-hexamethylcyclopenta-benzopyran (composés de parfums)	Mori <i>et al.</i> , 2006

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 9 : Résumé des méthodes d'essai appliquées pour les sols et les sédiments utilisant *C. elegans* en tant qu'organisme modèle (tiré de Sochova *et al.*, 2006)

Endpoint	Duration (h)	Organism	Chemicals	Soil (medium)	References
Mortality	24	<i>C. elegans</i>	Cu ^{1,2,3,4,6,7,8} , Ni ^{3,4,7} , Pb ^{3,7} , sediment ⁵ , Zn ^{3,4,6,7}	Natural soils: Cecil (sandy loam) ^{1,2,3,6,7} - Worsham (sandy loam) ¹ - Davidson (loam) ¹ - Dyke (clay loam) ¹ - Albany ⁷ - Tifton ^{3,6} , ASTM soil ^{3,7} , sediment ^{5,8}	¹ Donkin and Dusenbery, 1993; ² Freeman et al., 2000; ³ Peredney and Williams, 2000a, ⁴ b; ⁵ Black and Williams, 2001; ⁶ Boyd et al., 2001; ⁷ Boyd and Williams, 2003a; ⁸ Graves et al., 2005
	48	<i>C. tripartitum</i>	Contaminated soil	Soil	Lau et al., 1997
	96	<i>P. redivivus</i>	Sludge	SPT method	Black and Williams, 2001
	7 d	<i>C. elegans</i>	Cd, Cu, ipridione, Pb, Zn	LUFA 2.2	Jonker et al., 2004a,b
Movement	1	<i>C. elegans</i>	Sediment	SPT method	Gerhardt et al., 2002
	24	<i>P. redivivus</i> , <i>P. pacificus</i>	Cu	Albany natural soil	Boyd and Williams, 2003b
	96	<i>P. acuminatus</i>	Oil polluted soil	Extract of polluted soil	van Gestel et al., 2001
Body length	72	<i>C. elegans</i>	Cd ^{1,3} , Cu ²	Sediment ^{1,2,3} , pore water ^{1,3}	¹ Traunspurger et al., 1997; ² Höss et al., 1997, 1999, ³ 2001
Biomarkers	24	<i>C. elegans</i>	Cd, Cu, Zn	Sediment, pore water	Power and de Pomerai, 1999
Bioavailability	24	<i>C. elegans</i>	Cd, Ni, Pb, Zn	Albany natural soil, Cecil natural soil, ASTM soil	Boyd and Williams, 2003a
	7 d	<i>C. elegans</i>	Cd, carbendazim, Cu, ipridione, Pb, Zn	LUFA 2.2	Jonker et al., 2004a,b
Competition	14 d	<i>H. paucianmulatus</i> , <i>P. acuminatus</i>	Cu	OECD artificial soil	Kammenga et al., 1998
Feeding	96	<i>P. redivivus</i>	Sludge	SPT method	Sarabia and Villagómez, 2001
Growth	96	<i>P. redivivus</i>	Sludge	SPT method	Sarabia and Villagómez, 2001
Respiratory	48	<i>C. tripartitum</i>	Contaminated soil	Soil	Lau et al., 1997
Maturity index	24	Nematodes in sample	Cu	Water, dune sand, sandy soil	Bongers et al., 2001
Maturation	96	<i>P. redivivus</i>	sludge	SPT method	Sarabia and Villagómez, 2001
Num. of adults and juveniles	21 d	<i>P. acuminatus</i>	Cd, Cu, pentachlorophenol	OECD artificial soil	Kammenga et al., 1996b
Eggs per worm	72	<i>C. elegans</i>	None	Sediment	Höss et al., 1999
Num. of eggs inside nematode	72	<i>C. elegans</i>	Cd	Sediment, pore water	Traunspurger et al., 1997
Num. of offspring per worm	72	<i>C. elegans</i>	Cd	Sediment, pore water	Traunspurger et al., 1997
Percent of gravid worms	72	<i>C. elegans</i>	Cd ¹	Sediment ^{1,2} , pore water ¹	¹ Traunspurger et al., 1997; ² Höss et al., 1999

Tableau 9 bis : Résumé des méthodes d'essai appliquées pour les sols et les sédiments utilisant *C. elegans* en tant qu'organisme modèle (études après 2006)

Critère d'effet	Substrat	Durée (heures)	Substances	Référence
Survie	Sols naturels	24 et 48	Quinoline, acridine, phenazine, 1,10-phenanthroline, toxaphene, hexachlorobenzene, paraffines chlorées à courte chaîne	Sochova <i>et al.</i> , 2007
		48	Paraffines chlorées à courte chaîne	Bezchlebova <i>et al.</i> , 2007 a
		48	Toxaphene	Bezchlebova <i>et al.</i> , 2007 b
		24 et 48	Quinoline, acridine, phenazine et 1,10-phenanthroline	Kobeticova <i>et al.</i> , 2008
		24	Di(2-ethylhexyl)phtalate	Roh <i>et al.</i> , 2007

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

(Suite du tableau 9 bis)

Critère d'effet	Substrat	Durée (heures)	Substances	Référence
Reproduction	Sédiments naturels contaminés	96	Contaminations anthropogènes	Tuikka <i>et al.</i> , 2011
Croissance	Sols naturels	24	Di(2-ethylhexyl)phtalate	Roh <i>et al.</i> , 2007
	Sols naturels contaminés	96	Contaminations anthropogènes	Höss <i>et al.</i> , 2009
		96	Sol ayant supporté la croissance d'OGM	Höss <i>et al.</i> , 2008
	Sédiments naturels contaminés	96	Contaminations anthropogènes	Höss <i>et al.</i> , 2010
		96	Contaminations anthropogènes	Tuikka <i>et al.</i> , 2011
Biomarqueurs	Sols naturels	24	Di(2-ethylhexyl)phtalate	Roh <i>et al.</i> , 2007
Nombre d'œuf/individu hermaphrodite	Sols naturels	24	Di(2-ethylhexyl)phtalate	Roh <i>et al.</i> , 2007
	Sols naturels contaminés	96	Contaminations anthropogènes	Höss <i>et al.</i> , 2009
		96	Sol ayant supporté la croissance d'OGM	Höss <i>et al.</i> , 2008
% d'individus gravides	Sols naturels contaminés	96	Contaminations anthropogènes	Höss <i>et al.</i> , 2009
		96	Sol ayant supporté la croissance d'OGM	Höss <i>et al.</i> , 2008

L'essai de mortalité utilisant le nématode *C. elegans* a été intégré dans des batteries de bio-essais pour évaluer la toxicité de substances seules (Bezhlebova *et al.*, 2007a et b ; Kobetikova *et al.*, 2008) ou de sédiments contaminés (Tuikka *et al.*, 2010 ; Höss *et al.*, 2010), et sa réponse a été comparée à celles d'autres organismes terrestres ou vivant à l'interface sédimentaire. En ce qui concerne les essais en milieu terrestre, les substances testées étaient respectivement des paraffines chlorées à courte chaîne carbonée, le toxaphène et quatre HAPs azotés. La réponse du nématode a été comparée aux vers de terre (*Eisenia fetida*), aux enchytraeides (*Enchytraeus crypticus*) et aux collemboles (*Folsomia candida/fimetaria*). En ce qui concerne l'effet des paraffines chlorées à courte chaîne et du toxaphène sur le paramètre de mortalité, *C. elegans* fut le second organisme le plus sensible après le collembole *F. candida*. Pour les HAP azotés, le nématode s'est avéré être l'organisme le moins sensible.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Pour l'évaluation de sédiments contaminés, les essais de mortalité et de reproduction utilisant *C. elegans* ont également permis de déterminer la toxicité de ces matrices environnementales, au même titre que les espèces sédimentaires les plus sensibles (*i.e.* le vers *Lumbriculus variegatus*, le chironome *Chironomus riparius*) parmi celles utilisées (*i.e.* vers, chironome, escargot, poisson, plantes aquatiques et nématode).

Que ce soit en milieu terrestre, aquatique ou à l'interface sédimentaire, le nématode *C. elegans* en est un organisme modèle qui a déjà fait ses preuves en écotoxicologie. Par ailleurs, l'intérêt pour cet organisme a conduit au développement de protocoles normalisés (ISO 10872, 2010 ; ASTM E2172, 2008), qui permettent d'harmoniser la façon de mener des essais quel que soit le compartiment étudié.

Tableau 10 : Sensibilité de *C. elegans* aux substances chimiques pour des expositions en phase solide (critère de mortalité)

Durée (heures)	Substrat	Substance	LC ₅₀ (mg/kg)	Référence
24	Sol artificiel ASTM	Cd	1641	Peredney & Williams, 2000
		Cu	1272	
		Ni	2490	
		Pb	2293	
		Zn	1915	
	Sol naturel (limono-sableux)	Quinoline	>2500	Sochova <i>et al.</i> , 2007
		Acridine	>2500	
		Phenazine	> 2000	
		1,10-phenantroline	> 2500	
		Toxaphène	1285	
		Hexachlorobenzène	>1000	
		Paraffine chlorée	5450	
	Sol artificiel ASTM	Di (2-éthyl) phtalate (DEHP)	22,6	Roh <i>et al.</i> , 2007
48	Sol naturel (limono-sableux)	Quinoline	>2500	Sochova <i>et al.</i> , 2007
		Acridine	>2500	
		Phenazine	> 2000	
		1,10-phenantroline	>2500	
		Toxaphène	376	
		Hexachlorobenzène	>1000	

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

(Suite du tableau 10)

Durée (heures)	Substrat	Substance	LC ₅₀ (mg/kg)	Référence
48	Sol naturel (limono-sableux)	Paraffine chlorée	8833	Sochova <i>et al.</i> , 2007
	Sol artificiel ASTM	Paraffine chlorée	8863	Bezchlebova <i>et al.</i> , 2007 a
	Sol naturel (limono-sableux)	Toxaphène	261	Bezchlebova <i>et al.</i> , 2007 b
168	Sol naturel LUFA 2.2	Cd	110	Jonker <i>et al.</i> , 2004
		Cu	83	
		Pb	870	
		Zn	126	

III.3. Utilisation de *H. aculeifer* en écotoxicologie – Article « The use of soil mites in ecotoxicology : a review »

Les acariens du sol jouent un rôle essentiel au sein des écosystèmes, en tant que consommateurs primaires ainsi que prédateurs. Ceux-ci sont relativement moins étudiés que d'autres organismes utilisés pour mener des bio-essais terrestres, tels que les vers de terre et les collemboles, bien que le taxon des acariens soit le seul pour lequel des tests standardisés existent pour des organismes prédateurs. Les récentes avancées en termes de méthodologies (*i.e.* de laboratoire, de terrain et semi-terrain) concernant les acariens du sol ont permis d'évaluer les effets d'un nombre grandissant de substances.

Il est donc apparu pertinent de récapituler les différentes données concernant les méthodes utilisées, ainsi que la sensibilité de ces organismes. Ceci permet d'avoir un aperçu des tendances actuelles de l'utilisation des acariens en écotoxicologie (« The use of soil mites in ecotoxicology : a review », publié dans le journal *Ecotoxicology*). Dans cette revue, les données de toxicité recueillies ont été discutées aux regards de la sensibilité d'autres invertébrés terrestres. L'article conclut sur l'utilité de considérer les acariens du sol en écotoxicologie, et des pistes futures de recherche sont proposées dans ce domaine.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Bilan des données relatives à l'utilisation de *H. aculeifer* en écotoxicologie

L'analyse de la littérature scientifique concernant l'acarien prédateur *H. aculeifer* a montré :

- qu'il est possible d'évaluer des effets sur les critères de mortalité, de reproduction et de comportement d'évitement des acariens, le critère de reproduction étant généralement le plus sensible ;
- qu'il existe peu de données concernant l'évaluation d'échantillons environnementaux et les substances autres que pesticides, *H. aculeifer* étant intégré en tant qu'organisme non-cible lors de l'évaluation des biocides ;
- que la sensibilité de l'acarien prédateur aux substances chimiques évaluées en laboratoire (*e.g.* surtout organiques) est équivalente ou plus faible que celles d'autres invertébrés terrestres (*i.e.* vers de terre, enchytréides et collemboles) ;
- que pour les études de semi-terrain ainsi que de terrain, la réponse des communautés d'acariens prédateurs est hétérogène ;
- que les acariens du sol (*i.e.* prédateurs et consommateurs primaires) semblent être tolérants à certaines contaminations d'origine anthropiques (*e.g.* ETM et pesticides).

The use of soil mites in ecotoxicology: a review

Pierre Huguier · Nicolas Manier · Olugbenga John Owojori ·
 Pascale Bauda · Pascal Pandard · Jörg Römbke

Accepted: 4 October 2014 / Published online: 4 November 2014
 © Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Mites, and especially soil-inhabiting ones, have been less studied than the other invertebrates used in bioassays for the assessment of soil quality and the hazards of chemicals, although these organisms are included in the regulatory assessment scheme of pesticides. The recent advances in the development of test methods for soil mites groups have provided more information on their sensitivities towards chemicals, which needs to be presented for a more robust assessment of the current trends in soil mite ecotoxicology. Moreover, interestingly mite is the only taxa for which test methods were developed and standardized on predatory organisms. This review summarizes the different protocols for the assessment of chemicals using soil-inhabiting mites, including laboratory, semi-field and field studies. Among the data found in the literature, most of the chemicals assessed with mites were pesticides, while a few environmental samples were assessed with these organisms. Their sensitivities towards chemicals were then compared and discussed regarding other soil

invertebrates. Finally, we conclude on the usefulness of soil mites in ecotoxicology, and provide future research trail in this area.

Keywords Mites · Soil · Laboratory tests · Semi-field tests · Review

Introduction

Soil provides the basis for key ecological functions and ecosystem services such as nutrient cycling, organic matter turn-over, and is a primary habitat for organisms (Millennium Ecosystem Assessment 2005; Faber et al. 2006). Therefore, pollution of soil is a matter of concern, particularly the potential effects of chemicals, wastes and atmospheric depositions. The classical way for the retrospective assessment of soil is through physico-chemical characterization, i.e. the assessment of soil properties and concentrations of potential pollutants, usually heavy metals, PAHs and some other selected persistent chemicals. However, these qualitative and quantitative data do not give adequate information on the possible toxic effects of chemicals on soil organisms, since total contaminant concentrations do not always correlate with toxicity (Alexander 2000; Peijnenburg et al. 2012). Thus, to avoid these uncertainties, which could lead to over- or under-protection of soil fauna with consequential effects on soil functioning (Cortet et al. 2000), the hazards of chemicals for terrestrial invertebrates have to be assessed using standardized tests with relevant species, representative of different taxonomic, physiological and ecological groups. Among soil organisms, meso-fauna have specific traits which explain their usefulness in soil ecotoxicology. First, they are involved in nutrient and organic matter cycling (Lavelle

P. Huguier (✉) · N. Manier · P. Pandard
 Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques,
 Parc Technologique ALATA, 60550 Verneuil en-Halatte, France
 e-mail: pierre.huguier@ineris.fr; pierre.huguier@gmail.com

P. Huguier · P. Bauda
 Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
 UMR 7360 CNRS, Université de Lorraine, Campus Bridoux, rue
 du Général Delestraint, 57070 Metz, France

O. J. Owojori
 Department of Zoology, Obafemi Awolowo University, Ile-Ife,
 Nigeria

J. Römbke
 ECT Oekotoxikologie GmbH, Böttgerstraße, 65439 Flörsheim,
 Germany

et al. 2006). Moreover they are widespread, abundant and diverse, and have (often) short reproduction cycles, which make their use in ecotoxicological tests practical. Last but not least, they are in close contact (e.g. orally through feeding or dermally) with soil and potential soil contaminants.

During the last decades, international and national standardization organizations (e.g. ISO, ASTM, and Environment Canada) developed several acute, chronic and behavioral bio-assays with terrestrial invertebrates for soil quality assessment, i.e. nematodes, mollusks, enchytraeids, earthworms, collembolans and mites (Van Gestel 2012). In addition, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) has published several test guidelines for the assessment of chemicals on soil invertebrates, including TG 226 regarding soil mites (OECD 2008). Among the species used in bio-assays, mites are the only taxa for which standardized testing protocols are available for predatory organisms. Moreover, some of these predatory species are included as non-target arthropods in the regulatory scheme of the European Union for the assessment of pesticides (EC 2013). Among those species, however, only one soil inhabitant is considered: *Hypoaspis aculeifer* (Laelapidae).

Already, a few reviews have examined the prospects for the use of mites in ecotoxicology when the first set of test guidelines for other commonly used groups, e.g. earthworms, were either standardized or under review (Lebrun and van Straalen 1995). Other more recent reviews have considered their usefulness as bio-indicators of pollution, and hence as important species for bio-monitoring in the environment (Behan-Pelletier 1999; Gergocs and Hufnagel 2009). However, recent advances in the development of test methods for several mite groups have provided more information which needs to be presented for a more robust assessment of the current trends in mite ecotoxicology. Therefore, in this review, a pragmatic state of the art about the current use of soil inhabiting mites in ecotoxicology is provided, beginning with justifications on the usefulness of these organisms in this area. This is followed by an evaluation of current laboratory studies focusing on the selection of mite species used in ecotoxicity testing, as well as on the available protocols and associated endpoints. The sensitivities of mites towards chemicals are also inventoried and discussed in comparison to other soil invertebrates (earthworms, collembolan and enchytraeids). Another section presents then the semi-field and field studies with soil mites at the population and community levels. Finally, conclusions are drawn from the different research data available on the use of mites in ecotoxicological testing, with perspectives on future researches in this domain.

Why consider soil mites in ecotoxicology?

Mites (*Acari*) are a world-wide and diverse group of arthropods belonging to the class Arachnida with over 40,000 species recorded, divided into two super-orders (Acariformes and Parasitiformes). Due to their relative small size (a few μm to a few cm), they occupy specific ecological niches on plants as well as in soils (Hoffmann and Schausberger 2012). Moreover, they belong to various trophic groups like bacteria-fungi grazers, decomposers, herbivores, predators (Usher 1985) or parasites (Chauve 1998).

Some species are known to cause problems in agriculture or for human and livestock health, e.g. respectively *Tetranychus* sp. (Tetranychidae), *Dermatophagoides* sp. (Pyroglyphidae) and *Dermanyssus* sp. (Dermanyssidae) (Jeppson and Baker 1975; Bronswijk and Sinah 1971 in Ree et al. 1997; Moro et al. 2009; Liu et al. 2010). This explains the synthesis of specific products targeting these mite pests, i.e. acaricides. On the contrary, plant-inhabiting mites are well studied predatory organisms as bio-control agents (Decou 1994; McMurtry and Croft 1997; Williams 2001; Wiethoff et al. 2004; Oliveira et al. 2009; Rahman et al. 2011a, b) and some, such as *Typhlodromus pyri* (Phytoseiidae), are used even commercially as effective bio-control agents of pests. Among soil-inhabiting mites, this role of predation is ensured by, for example, *Hypoaspis* sp. (Laelapidae), *Lasioseius athiasae* (Ascidae), *Protogamasellus dioscorus* (Ascidae), and *Coleoscirus simplex* (Cunaxidae) (Zhang 2003; Gerson and Weintraub 2007). Because they are exposed to chemical contamination, mites are already considered in the environmental risk assessment of pesticides, as non-target organisms (EC 2013). Indeed, among the data required for active substances of pesticides, effects on predatory mites have to be assessed, i.e. for the plant-inhabitant *Typhlodromus pyri* (Phytoseiidae) (Candolfi et al. 1999; Blümel et al. 2000; Grimm et al. 2001) and the soil-inhabitant *Hypoaspis aculeifer* (Laelapidae). The following sections focus only on soil mites, for which limited information is available in the context of ecotoxicological testing.

Use of soil mites in laboratory studies

For about 30 years, mites have been isolated from soils, identified, cultured and studied in laboratories. Among them, predaceous mites have gained particular attention, as indicated by the interest in feeding tests of soil inhabiting predatory mites (Lobbés and Schotten 1980; Sardar and Murphy 1987; Berndt et al. 2004a, b; Shikoh et al. 2006; Heckmann et al. 2007; Lesna et al. 2009). Based on the experience of these studies, the species *Hypoaspis*

aculeifer, a common soil predatory mite of the family Laelapidae, was selected as being most appropriate for testing purposes, since it has an acceptable generation time (approximately one month under laboratory conditions), is a generalist predator, and can be handled easily.

The first authors introducing *H. aculeifer* as a test organism in ecotoxicological studies were Schlosser and Riepert (1992). Krogh and Axelsen (1998) later proposed a two-species test system in the European project SECOF-ASE (Sublethal Effects of Chemicals on Fauna in the Soil Ecosystem), including the collembolan *Folsomia fimetaria* as prey. In the context of the development of an ecotoxicological test for the assessment of plant protection products on non-target arthropods (Candolfi et al. 1999); Bakker et al. (2003) further proposed a protocol on soil predatory mites using *H. aculeifer*, which can be used instead of the one developed by the joint initiative of IOBC (International Organization for Biological and Integrated Control), BART (Beneficial Arthropod Regulatory Testing) and EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) using the plant-inhabiting predatory mite *T. pyri* (Blümel et al. 2000; Grimm et al. 2001). More recently, a standard test protocol for the assessment of chemicals was developed for *H. aculeifer* within the frame of the OECD (OECD 2008). The results of the associated international ring-test were published by Smit et al. (2012).

Grazing species of the Oribatida sub-order (Sarcoptiformes) were also proposed as test organisms for the hazard assessment of chemicals, as they are essential actors in decomposition processes (Lebrun and van Straalen 1995). The first species for which acute and chronic tests were developed was *Platynothrus peltifer* (Camisiidae) (Denneman and Van Straalen 1991; Van Gestel and Doornekamp 1998). However, it was not studied afterwards due to its long culture and exposure time required for sublethal experiments, i.e. up to one year from the eggs to the adult, and an exposure of 12 weeks at 15 °C for the chronic test.

In recent years, the oribatid mites *Archegozetes longisetosus* (Trhypochthoniidae) and *Oppia nitens* (Oppiidae) were studied as alternatives to *P. peltifer*. For the pantropical mite *A. longisetosus*, only a few studies can be found on its sensitivity towards chemicals. All of these focused on the effects of cadmium on life-history parameters and on the gut flora (Seniczak and Seniczak 2002; Seniczak et al. 2009). These studies demonstrated that the ingestion of Cd indirectly affected the decomposition activities of these mites, via a decrease of their intestinal flora. This species being representative of tropical regions (rearing optimum: 30 °C, 90 % ambient humidity), it can only be considered for such ecosystems. In contrast, *O. nitens* was proposed as a more relevant test organism in comparison to other boreal and standard soil invertebrates (Princz et al. 2010, 2012; Owojori and Siciliano 2012). For

this oribatid species, for which details are provided in the next sections, most of the studies were performed to set up testing protocols using mortality, reproduction and avoidance endpoints, and to determine its sensitivity towards different categories of chemicals and contaminated field soils.

Available methods for ecotoxicity testing with soil mites

Among soil mites, protocols for the assessment of chemicals already exist for the predator *H. aculeifer*, and the grazer *O. nitens*, which fulfills many criteria relevant to the use of species in general for ecotoxicological tests, including: easy breeding and culturing, wide distribution, relevant exposure, ecological representativeness (in terms of abundance and role in food-webs), and tolerance (Römbke et al. 2009a). For both species, acute and chronic endpoints are appropriate, with reproduction as the most relevant endpoint. In addition, mites can use chemotaxis (Dicke et al. 1993; Hall and Hedlund 1999) to detect and avoid unfavorable habitats. It allows the setting up of bioassays using avoidance behavior, which is an ecologically relevant endpoint that neither acute nor sublethal tests can measure (Yeardley et al. 1996). Moreover, avoidance is representative of the migration of invertebrate populations from unfavorable to favorable habitats (Aldaya et al. 2006).

For both *H. aculeifer* and *O. nitens*, the endpoints studied are similar to those evaluated in standard tests using the earthworm *Eisenia fetida/andrei* (ISO 11268-1 2012a; ISO 11268-2 2012b; ISO 17512-1 2008), the potworm *Enchytraeus* sp. (ISO 16387 2014), and the collembolan *Folsomia candida* (ISO 11267 2013; ISO 17512-2 2011), i.e. mortality, reproduction and avoidance behavior. For soil mites, all the test methods for the assessment of chemicals mentioned in the above section; e.g. with *H. aculeifer*, *O. nitens*, *P. peltifer* and *A. longisetosus*, as well as their respective testing conditions and feeding regime, are summarized in Table 1.

Although the protocol for chemicals testing is standardized for *H. aculeifer* (OECD 2008), there is still a lack of knowledge concerning the ecological requirements of this species. According to Jänsch et al. (2005), this predatory mite demonstrates preferences for acidic (pH 6.0, on the basis of recommended soils for ecotoxicological testing) and for slightly moistened soils (20–30 % d.w.), but the acceptable range for these parameters cannot be defined due to the lack of suitable data. Earlier reports observed that this species was also found in soils of coniferous forests of Finland (Huhta et al. 1986) and Latvia (Salmane and Brumelis 2010), but the possibility of testing with soils of low pH has never been addressed. Other soil properties, such as texture and organic matter content, do not seem to

Table 1 Test methods developed for the assessment of chemicals using mites

Parameters	Test methods				
Test species	<i>Hypoaspis aculeifer</i> ^a	<i>Hypoaspis aculeifer</i> ^b	<i>Platynothrus peltifer</i> ^c	<i>Oppia nitens</i> ^{d, e}	<i>Oppia nitens</i> ^f
Endpoints	Mortality—Reproduction	Avoidance	Mortality—Reproduction	Mortality—Reproduction	Avoidance
Stage	Adult female	Adult female	Adult	Adult	Adult
Feeding species	<i>Tyrophagus putrescentiae</i> , <i>Folsomia candida/fimetaria</i>	None	<i>Desmococcus sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	None
Substrates	Field soil or artificial soil (20 g d.w.)	Artificial soil (10 g d.w. on each side)	Field soil or artificial soil (7.5 g d.w.)	Field soil or artificial soil (30 g d.w.)	Artificial soil (15 g d.w. on each side)
Duration	14d	48 h	12w	4 to 5w	24 h
Temperature	20 °C	20 °C	15 °C	20 °C	20 °C
Light/dark cycle	16 h/8 h	16 h/8 h	12 h/12 h	16 h/8 h	16 h/8 h
Validity criteria	Adult female mortality ≤20 % Mean number of juvenile per replicate ≥50 Juveniles mites per replicate CV ≤30 %	None	Adult recovery >80 %— Number of juveniles >100 per replicate	None	None

d days, h hours, w weeks, d.w. dry weight, OECD Organization for Economic Co-operation and Development, CV coefficient of variation

^a OECD 2008, ^b Owojori et al. 2014, ^c van Gestel and Doornekamp 1998, ^d Princz et al. 2010, ^e Owojori and Siciliano 2012, ^f Owojori et al. 2011

have a major influence on mortality and reproduction, as long as the moisture and the type and amount of prey are sufficient. Concerning the effects of temperature on *H. aculeifer* reproduction, Lobbes and Schotten (1980) demonstrated that it decreases above 25 °C, with optimum reproduction between 15 and 25 °C. By comparison, the reproduction of the grazing mite *O. nitens* was positively correlated with the organic matter content of natural soils (e.g. from 2.1 to 67.8 %), while no correlation were found with the pH of these soils (e.g. from 3.9 to 7.5; Princz et al. 2010). In artificial soil, pH values between 3.1 and 6 had no effects on this parameter, while values from 7.3 and above had significant deleterious effects on the reproduction of this grazing mite (Owojori and Siciliano 2012).

Given the current review of the use of mites in ecotoxicity testing, further effort is needed to assess the tolerance of predatory mites to soil characteristics. Moreover, there is a general uncertainty relative to the pH tolerance of mites.

Interaction of chemicals and test species within a predator–prey system

Actually, *H. aculeifer* is the only soil-living predator species among soil invertebrates for which a standard test is provided (OECD, OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) 2008). In order to set up tests with this organism, mites but also their preys have to be

cultured in parallel and tested together. The toxicological assessment of chemicals with a two-species (predator–prey) test system was highlighted by Axelsen et al. (1997), Hamers and Krogh (1997) and Baatrup et al. (2005), who studied the interactions between the organophosphate dimethoate, the collembolan *Folsomia fimetaria* and the predatory mite *H. aculeifer*. Very recently, a comparable test system was used to assess the effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin, clearly revealing higher toxicity to the prey compared to single-species tests (Jensen and Scott-Fordsmand 2012).

Focusing on the predator–prey relationships, the size ratio of the predator–prey was a determining factor in their capture efficiency, which is related to the predator velocity and encounter rate with the prey (Baatrup et al. 2005). This relationship can also be observed when feeding mass cultures of mites with mass cultures of the collembolan *F. candida*. Adults of collembolans are too big and motile for single adult female mites, while smaller preys (juveniles) are easily captured by all mite stages. In addition, mobility of the collembolan is reduced prior to their molting, but this was demonstrated to have no interaction with their survival when exposed to dimethoate (Baatrup et al. 2005). However, collembolan reproduction and mobility were clearly affected by dimethoate, which facilitated predation from mites. In contrast, *H. aculeifer* mortality and reproduction were not affected at the concentrations tested (Hamers and Krogh 1997). To avoid the problem of

assessing chemicals on two species within a predator–prey system, mites were fed ad libitum in the standard protocol (OECD 2008), to focus on *H. aculeifer* response and to exclude indirect effects on the predator due to deleterious effects on the prey. This feeding regime also permits the use of different preys as food (e.g. the collembolan *F. candida* or the mite *Tyrophagus* sp.).

Sensitivity of the soil predatory mite *Hypoaspis aculeifer* towards chemicals

The mortality and reproduction test with *H. aculeifer* is regularly required as part of the registration process of pesticides in the European Union. Thus, studies are available from the European Food Safety Authority (EFSA) website (<http://www.efsa.europa.eu/fr/publications.htm?text=hypoaspis>). The current information about *H. aculeifer* sensitivity, collected from EFSA and the scientific literature (Table 2), relates mostly to pesticides (21 substances out of 31), especially to the organophosphate dimethoate. Nevertheless, data on boric acid, copper chloride, sodium chloride, phenanthrene, benzo[a]pyrene, linear alkylbenzene sulfonate, emodin, quinizarin, juglone and naphthoquinone were also available. The most studied endpoints are mortality and reproductive output (mainly consistent with the OECD protocol), but some authors emphasized effects of dimethoate on body growth (Folker-Hansen et al. 1996) or on different life-stages (Heckmann et al. 2005), in order to address further chronic endpoints.

Differences of sensitivity towards dimethoate were observed depending upon the endpoint studied, the test substrate used, and the mode of application (e.g. spraying or mixing procedures). With regards to effects of dimethoate on the life stages of *H. aculeifer* (Table 2), Heckmann et al. (2005) reported that larvae were the most sensitive stage, with adults being the least sensitive. Data on adults' mortality, reproduction and avoidance in natural and artificial soils showed that the reproduction and mortality endpoints were in the same range of sensitivities towards dimethoate, while no avoidance was recorded at equivalent concentrations (Krogh 1995; Krogh and Axelsen 1998; Heckmann et al. 2005; Smit et al. 2012; Owojori et al. 2014). Considering the mode of application, Bakker and van Straatum (2003) compared the effect of both mixing and spraying procedures. These authors demonstrated that spraying dimethoate led to a higher toxicity (67 g/ha equivalent to 1.78 mg/kg, causing 92 % mortality) than the mixing procedure (3.6 mg/kg causing 89 % mortality).

From the open access data collected of the risk assessment of active substances of pesticides provided by the EFSA website, and other data on pesticides from the scientific literature (Table 2), one herbicide (i.e. oxyfluorfen) and three insecticides (i.e. chlorpyrifos, ivermectin and

deltamethrin) showed deleterious effects on the mortality and reproduction of *H. aculeifer*. For deltamethrin and chlorpyrifos, for which avoidance data were available, equivalent of EC50 for reproduction concentrations were not avoided (Owojori et al. 2014). In contrast, other fungicides and herbicides substances showed generally lower reproductive toxicity.

Data on *H. aculeifer* sensitivity are also available on non-pesticide chemicals (Table 2), such as boric acid, copper chloride, juglone, linear alkylbenzene sulfonate, 1,4-naphthoquinone, and phenanthrene (Krogh and Axelsen 1998; Sverdrup et al. 2007; Withaker et al. Whitaker et al. 2009; Smit et al. 2012; Owojori et al. 2014). The EC50 s for reproduction of *H. aculeifer* were lower in comparison with LC50 s. According to Sverdrup et al. (2007) and (Whitaker et al. 2009), no effects were recorded after exposure to emodin, benzo[a]pyrene and quinizarin at the concentrations tested (up to 1,024 mg/kg). With regards to avoidance, clear dose–response curves were reported when mites were exposed to different concentrations of phenanthrene, Cu, and NaCl (Owojori et al. 2014).

These results demonstrate that *H. aculeifer* mortality and reproduction are rather sensitive to insecticides and organic chemicals in comparison with copper chloride. The avoidance endpoint showed similar sensitivity when compared to mortality and reproduction ones for non-pesticide chemicals, meaning that avoidance tests with this species could be an ecologically relevant and short screening tool for the assessment of chemicals in soils.

Sensitivity of the soil grazing mite *Oppia nitens* towards chemicals

The ecotoxicity of different chemicals, i.e. boric acid, Cd, Cu, Pb, Zn, benzo[a]pyrene, geraniol and phenanthrene, were assessed with *O. nitens* using mortality, reproduction and avoidance endpoints (Owojori et al. 2011; Owojori and Siciliano 2012). These data, as well as the sensitivities of other oribatid mites towards chemicals, are summarized in Table 3. Among the chemicals tested with *O. nitens*, boric acid, Cd, geraniol and phenanthrene showed deleterious effects on this mite species, with LC50 found in general higher than EC50 for reproduction. For the other chemicals, LC50/EC50 for reproduction were higher than 1,500 mg/kg, and benzo[a]pyrene did not show deleterious effects on any of the endpoints studied.

With regards to avoidance, *O. nitens* was relatively sensitive to geraniol and phenanthrene in comparison with reproduction/mortality, while a lack of sensitivity of the avoidance endpoint was found for the other chemicals (EC50 > 1,000 mg/kg). However, it can be noticed that for copper and zinc the EC50 for avoidance were almost similar to LC50/EC50 for reproduction.

Table 2 Summary of the sensitivity of *H. aculeifer* towards chemicals, for the mortality, reproduction and avoidance endpoints

Chemicals	Endpoints	Duration (days)	Soil type	OM (%)	Effect in mg/kg (CI)	Performed according to OECD 2008	Reference
Dimethoate ^a	Mortality	14	NS (L 2.1)	1	3.6 = 89 % and 11.2 = 100 % mortality ^d	No	Bakker and van Straatum 2003
		14	AS	5	LC50 = 4.1 (3.3–4.8) ^d	Yes	Owojori et al. 2014
		21	NS (L 2.2)	2	LC50 > 4 (n.d.)	No	Krogh and Axelsen 1998
	Reproduction	21	NS (L 2.2)	2	EC50 = 2.7 (n.d.)	No	Krogh and Axelsen 1998
		21	NS (sl)	1.7	EC50 = 0.87 (0.77–0.96) ^d	No	Krogh 1995
		16	AS	5	2.7 < EC50 = 4.9 < 8.3 ^d	Yes	Smit et al. 2012
		14	AS	5	EC50 = 3.9 (3.4–4.5) ^d	Yes	Owojori et al. 2014
		7	AS	5	EC50 = 1.6 (1.2–2.0) ^d	No	Heckmann et al. 2005
	Avoidance	2	AS	5	EC50 > 10 ^d	Yes	Owojori et al. 2014
	LS Mortality	7	AS	5	Sensitivity: larvae > protonymph > males > deutonymph > females ^d	No	Heckmann et al. 2005
Ivermectin ^a	LS Biomass	7	AS	5	Sensitivity: larvae > protonymph > deutonymph ^d	No	Heckmann et al. 2005
	Pop. growth rate	7	AS	5	Significant difference at 2 ^d	No	Heckmann et al. 2005
	Growth	32	NS (sl)	1.6	EC10 ^d = 0.59 (0.51–0.67)	No	Folker-Hansen et al. 1996
	Egg production	32	NS (sl)	1.6	EC10 ^d = 0.68 (0.61–0.76)	No	Folker-Hansen et al. 1996
	Mortality	21	NS (scl)	2.2	LC50 > 5	No	Jensen et al. 2009
	Reproduction	21	NS (scl)	2.2	31.6 = 33 % mortality EC50 > 5	Yes No	Römbke et al. 2010 Jensen et al. 2009
Deltamethrin ^a	Mortality	16	AS	5	EC50 = 17.8 (15.4–20.8)	Yes	Römbke et al. 2010
		14	AS	5	LC50 = 16.3 (13.6–19.6) ^d	Yes	Owojori et al. 2014
	Reproduction	14	AS	5	EC50 = 9.88 (8.7–12) ^d	Yes	Owojori et al. 2014
	Avoidance	2	AS	5	EC50 > 32 ^d	No	Owojori et al. 2014
Chlorpyrifos ^a	Mortality	14	AS	5	LC50 = 5.5 (5.2–5.9) ^d	Yes	Owojori et al. 2014
	Reproduction	14	AS	5	EC50 = 6.4 (5.9–6.7) ^d	Yes	Owojori et al. 2014
	Avoidance	2	AS	5	EC50 = 9 (7–12) ^d	No	Owojori et al. 2014
	Mortality	14	AS	5	NOEC = 3,000 ^d	Yes	EFSA Journal 2011
Azadirachtin ^a	Reproduction	14	AS	5	3,000 = 29–35 % effect ^d	Yes	EFSA Journal 2011

Table 2 continued

Chemicals	Endpoints	Duration (days)	Soil type	OM (%)	Effect in mg/kg (CI)	Performed according to OECD 2008	Reference
Spirotetramat ^a	Mortality	28	n.d.		NOEC = 316 ^d	No	EFSA Journal 2013a
	Reproduction	28	n.d.		EC50 > 1,000 ^d	No	EFSA Journal 2013b
Chlorantraniliprole ^a	Reproduction	16	n.d.		NOEC = 100 ^d	No	EFSA Journal 2013c
Chromafenozide (metabolite M-010) ^a	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 1,000	Yes	EFSA Journal 2013d
Fenproimorph ^a	Reproduction	21	NS (sl)	1.7	NOEC > 6 ^d	No	Krogh 1995
Metaflumizone ^a	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 27.6 ^d	Yes	EFSA Journal 2013e
Primicarb ^a	Reproduction	21	NS (sl)	1.7	NOEC > 2.3 ^d	No	Krogh 1995
Lambda-cyhalothrin (formulation 100 CS) ^a	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 4.7 ^d	Yes	EFSA Journal 2014a
Sulfoxalor (preparation GF-2626) ^a	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 12 ^d	Yes	EFSA Journal 2014b
Sulfoxalor (preparation GF-2372) ^a		14	AS	5	NOEC = 3.1 ^d	Yes	EFSA Journal 2014c
Sulfoxalor (metabolite X11519540) ^a		14	AS	5	NOEC = 10	Yes	EFSA Journal 2014a
Sulfoxalor (metabolite X11579457) ^a		14	AS	5	NOEC = 5	Yes	EFSA Journal 2014a
Ametoctradin (Metabolite M650F03) ^b	Reproduction	14	AS	5	NOEC > 100 ^d	Yes	EFSA Journal 2012a
Ametoctradin (Metabolite M650F04) ^b		14	AS	5	NOEC > 100 ^d	Yes	EFSA Journal 2012b
Penflufen ^b	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 246.5 ^d	Yes	EFSA Journal 2012c
Pyriofenone ^b	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 1,000 ^d	Yes	EFSA Journal 2013a
Sedaxane ^b	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 456 ^d	Yes	EFSA Journal 2012a
Oxyfluorfen ^c	Mortality	14	AS	5	LR50 = 3.42 ^d	Yes	EFSA Journal 2010a
	Reproduction	14	AS	5	n.d.	Yes	EFSA Journal 2010b
Asulam ^c	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 4370 ^d	Yes	EFSA Journal 2010c
Oxadiazon EC250 ^c	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 339 ^d	Yes	EFSA Journal 2010d
Metobromuron ^c	Reproduction	14	AS	5	NOEC = 23.7 ^d	Yes	EFSA Journal 2014a
Boric acid	Mortality	14	AS	5	LC50 = 668 (523–791)	Yes	Owojori et al. 2014
	Reproduction	16	AS	5	EC50 = 296 (70.8–402)	Yes	Smit et al. 2012
		14	AS	5	EC50 = 332 (292–373)	Yes	Owojori et al. 2014
	Avoidance	2	AS	5	EC50 = 1234 (749–2,031)	No	Owojori et al. 2014

Table 2 continued

Chemicals	Endpoints	Duration (days)	Soil type	OM (%)	Effect in mg/kg (CI)	Performed according to OECD 2008	Reference
Copper chloride	Mortality	21	NS (L 2.2)	2	LC50 > 1,000	No	Krogh and Axelsen 1998
	Reproduction	14	AS	5	LC50 = 4,482 (3,885–5,171)	Yes	Owojori et al. 2014
Sodium chloride	Reproduction	21	NS (L 2.2)	2	EC50 = 674 (n.d.)	No	Krogh and Axelsen 1998
	Avoidance	14	AS	5	EC50 = 2,459 (2,020–2,899)	Yes	Owojori et al. 2014
	Mortality	14	AS	5	EC50 = 944 (836–1,067)	No	Owojori et al. 2014
	Reproduction	14	AS	5	LC50 = 25,128 (n.d.)	Yes	Owojori et al. 2014
Phenanthrene	Reproduction	14	AS	5	EC50 = 13,580 (9,766–17,394)	Yes	Owojori et al. 2014
	Avoidance	2	AS	5	EC50 = 11,689 (10,442–13,086)	No	Owojori et al. 2014
	Mortality	14	AS	5	LC50 = 684 (405–1,156)	Yes	Owojori et al. 2014
	Reproduction	14	AS	5	EC50 = 49 (20–77)	Yes	Owojori et al. 2014
Benz[a]pyrene	Avoidance	2	AS	5	EC50 = 26 (20–34)	No	Owojori et al. 2014
	Mortality	21	NS (sl)	2.8	NOEC > 947	No	Sverdrup et al. 2007
Linear alkylbenzene sulfonate	Reproduction	21	NS (sl)	2.8	NOEC > 947	No	Sverdrup et al. 2007
	Mortality	21	NS (L 2.2)	2	LC50 > 1,000	No	Krogh and Axelsen 1998
Emodin	Reproduction	21	NS (L 2.2)	2	EC50 = 961 (n.d.)	No	Krogh and Axelsen 1998
	Mortality	21	AS	5	LC50 > 1,024	Yes	Whitaker et al. 2009
Quinizarin	Reproduction	21	AS	5	EC50 > 1,024	Yes	Whitaker et al. 2009
	Mortality	21	AS	5	LC50 > 1,024	Yes	Whitaker et al. 2009
	Reproduction	21	AS	5	EC50 > 1,024	Yes	Whitaker et al. 2009
	Mortality	21	AS	5	LC50 = 857 (n.d.)	Yes	Whitaker et al. 2009
Juglone	Reproduction	21	AS	5	EC50 > 1,024	Yes	Whitaker et al. 2009
1,4-Naphthoquinone	Mortality	21	AS	5	LC50 = 606 (n.d.)	Yes	Whitaker et al. 2009
	Reproduction	21	AS	5	EC50 > 1,024	Yes	Whitaker et al. 2009

All of the results are expressed on a soil dry weight basis

AS artificial soil, NS natural soil, L2.1 and L2.2 LUFA 2.1 and 2.2 soils respectively, *scf* sandy clay loam, *sf* sandy loam, *CI* 95 % confidence interval, *n.d.* not determined, *LS Mortality* Larval stages mortality, *LS Biomass* Larval stages biomass, *EC50* median effective concentration, *LC50* median lethal concentration, *NOEC* no observed effect concentration, *OM* organic matter content

^a Insecticides

^b Fungicides

^c Herbicides

^d Pesticides assessed as formulated products, expressed in mg/kg of active ingredient

Table 3 Summary of the oribatid sensitivities towards chemicals, for the mortality, reproduction and avoidance endpoints

Species	Chemicals	Endpoints	Duration	Soil type	OM (%)	Effects in mg/kg (CI)	References
<i>Platynothrus peltifer</i>	Dimethoate	Mortality	8–11w	NS (L 2.2)	2	LC50 = 0.47 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
			8–11w	AS	5	LC50 = 0.62 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
		Reproduction	8–11w	NS (L 2.2)	2	EC50 = 1.01 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
			8–11w	AS	5	EC50 = 0.43 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
	Linear alky/benzene sulfonate	Mortality	8–11w	NS (L 2.2)	2	LC50 = 319 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
			8–11w	AS	5	LC50 = 1720 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
		Reproduction	8–11w	NS (L 2.2)	2	EC50 = 467 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
			8–11w	AS	5	n.d.	van Gestel and Doornekamp 1998
	Copper chloride	Mortality	8–11w	NS (L 2.2)	2	LC50 = 242–315 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
			8–11w	AS	5	LC50 = 320 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
		Reproduction	8–11w	NS (L 2.2)	2	EC50 = 112 (n.d.)	van Gestel and Doornekamp 1998
			8–11w	AS	5	n.d.	van Gestel and Doornekamp 1998
<i>Archegozetes longisetosus</i>	Cadmium nitrate	Fecundity	30d	PC	n.d.	Significant effect at 130	Seniczak and Seniczak 2002 ^a
		Juveniles mortality	30d	PC	n.d.	Significant effect at 25	Seniczak and Seniczak 2002 ^a
	Boric acid	Mortality	28d	NS (I)	6.4	LC50 = 530 (424–624)	Princz et al. 2010
			28d	NS (I)	2.1	LC50 = 250 (218–278)	Princz et al. 2010
		Mortality	28d	AS	5	LC50 = 1468 (1,299–1,757)	Owojori et al. 2011
			28d	NS (I)	6.4	EC50 = 96 (16–152)	Princz et al. 2010
		Reproduction	28d	NS (I)	2.1	EC50 = 78 (57–80)	Princz et al. 2010
			28d	AS	5	EC50 = 314 (211–382)	Owojori et al. 2011
	Cadmium sulfate	Avoidance	24 h	AS	5	EC50 = 2454 (1,995–2,951)	Owojori et al. 2011
			35d	AS	5	LC50 = 603 (537–691)	Owojori et al. 2011
		Mortality	35d	AS	5	EC50 = 145 (109–181)	Owojori et al. 2011
			24 h	AS	5	EC50 = 1,202 (1,023–1,413)	Owojori et al. 2011
<i>Oppia nitens</i>	Copper sulfate	Mortality	35d	AS	5	LC50 = 3,311 (3,020–3,631)	Owojori et al. 2011
			35d	AS	5	EC50 = 3,592 (2,516–4,668)	Owojori et al. 2011
		Reproduction	24 h	AS	5	EC50 = 4,265 (3,715–4,898)	Owojori et al. 2011
			35d	AS	5	LC50 = 6,761 (5,623–8,128)	Owojori et al. 2011
	Lead nitrate	Mortality	35d	AS	5	EC50 = 1,678 (1,066–2,290)	Owojori et al. 2011
			24 h	AS	5	EC50 = 8,317 (7,244–9,332)	Owojori et al. 2011
		Avoidance	28d	AS	5	LC50 = 2,291 (1,995–2,630)	Owojori et al. 2011
			28d	AS	5	EC50 = 1,997 (1,097–2,897)	Owojori et al. 2011
	Zinc sulfate	Mortality	28d	AS	5	EC50 = 1,585 (1,412–1,738)	Owojori et al. 2011
			24 h	AS	5		

Table 3 continued

Species	Chemicals	Endpoints	Duration	Soil type	OM (%)	Effects in mg/kg (CI)	References
	Benzo[a]pyrene	Mortality	35d	AS	5	LC50 > 1,600	Owojori et al. 2011
		Reproduction	35d	AS	5	EC50 > 1,600	Owojori et al. 2011
		Avoidance	24 h	AS	5	EC50 > 1,600	Owojori et al. 2011
	Geraniol	Mortality	35d	AS	5	LC50 = 251 (229–275)	Owojori et al. 2011
		Reproduction	35d	AS	5	EC50 = 316 (n.d.)	Owojori et al. 2011
		Avoidance	24 h	AS	5	EC50 = 81 (71–91)	Owojori et al. 2011
	Phenanthrene	Mortality	35d	AS	5	LC50 = 388 (330–446)	Owojori et al. 2011
		Reproduction	35d	AS	5	EC50 = 95 (26–345)	Owojori et al. 2011
		Avoidance	24 h	AS	5	EC50 = 83 (56–129)	Owojori et al. 2011

All of the results are expressed on a soil dry weight basis

AS artificial soil, AS natural soil, PC plaster and activated charcoal, L2.2 LUFA 2.2 soil, / loam, CI 95 % confidence interval, n.d. not determined, w weeks, d days, h hours, EC50 median effective concentration, LC50 median lethal concentration, OM organic matter content

^a Studies in which the chemical was administered through food

These data demonstrated that among the chemicals and endpoints assessed, *O. nitens* was more sensitive to the organic compounds in comparison to metals. Moreover, the degree of avoidance was often found to be in the same order of magnitude as mortality and/or reproduction, emphasizing the relevancy of this type of test, similar to *H. aculeifer*

Limitations of the test methods using mites

For both *H. aculeifer* and *O. nitens*, although protocols are available to assess chemicals using different endpoints, their sensitivity is documented for a limited number of substances, focusing mainly on pesticides. Considering *O. nitens*, tests were designed for use with a variety of soil types (Princz et al. 2010, 2012). Indeed, different contaminated (hydrocarbons and salts) and reference field soils were assessed with this species. For *H. aculeifer*, no study has been reported in the literature regarding the use of tests on environmental samples, i.e. contaminated soils or waste mixtures. This can be explained by the fact that these tests were designed for chemical assessment in an artificial substrate. Some authors showed that *H. aculeifer* was attracted by volatile compounds emitted by fungi, e.g. *Alternaria alternate* or *Trichoderma viride* (Hall and Hedlund 1999; Pfeffer and Filser 2010). Consequently, the testing of environmental samples using an avoidance endpoint can be problematic, as natural soils are generally highly colonized by fungi. This statement could also be relevant for oribatid mites, which are fungi-grazers, but has never been demonstrated. Moreover the tolerance of *H. aculeifer* to environmental factors, such as pH, soil texture or organic carbon content, should be addressed to estimate the relevance of these species in the assessment of contaminated soils.

Mites sensitivities in comparison with other commonly used soil invertebrates

When comparing the reproduction sensitivity of *H. aculeifer* (Table 2) with other soil invertebrates (earthworms, enchytraeids and collembolans), the EC50 for dimethoate was similar to those of collembolan (0.8 mg/kg < EC50 < 3.2 mg/kg; Martikainen and Krogh 1999), and lower than enchytraeids (no effects up to 8.1 mg/kg; Martikainen 1996). For phenanthrene, the predatory mite EC50 was found similar to that of the enchytraeids and to the mortality endpoint of the earthworms (EC50 = 33 mg/kg and LC50 = 40.7 mg/kg, respectively; Amorim et al. 2012; Wu et al. 2011) and lower than for collembolan (EC50 = 175 mg/kg; Crouau et al. 1999). For boric acid, the EC50 was in the same order of magnitude as compared to earthworms and enchytraeids (EC50 = 484

and 220 mg/kg, respectively; Becker et al. 2011). In the case of copper, the EC50 for *H. aculeifer* was higher than that of the collembolans, enchytraeids and earthworms (respectively EC50 = 700 mg/kg, EC50 = 305 mg/kg and EC50 = 53.3 mg/kg; Sandifer and Hopkin 1996; Lock and Janssen 2002; Spurgeon et al. 1994). However, the collembolan EC50 for boric acid (54 mg/kg; Amorim et al. 2011) was lower than the predatory mite. In some specific studies in which chemicals were assessed with *H. aculeifer* in parallel with other terrestrial invertebrates (i.e. collembolan and/or earthworms and/or enchytraeids), authors reported that the predatory mite EC50's were among the highest when compared with the other invertebrates (Folker-Hansen et al. 1996; Hamers and Krogh 1997; Sverdrup et al. 2007; Whitaker et al. 2009; Römbke et al. 2010).

Regarding the avoidance endpoint for *H. aculeifer* (Owojori et al. 2014), four substances (chlorpyrifos, copper, dimethoate and sodium chloride) were found in common with avoidance tests using the earthworm *Eisenia fetida/andrei* (Loureiro et al. 2005; De Silva and Van Gestel 2009; Owojori and Reinecke 2009) as well as for the enchytraeid *Enchytraeus albidus* (boric acid, chlorpyrifos, copper, dimethoate; Amorim et al. 2008), and two (boric acid and copper) with the collembolan *Folsomia candida* (Becker et al. 2011; Boiteau et al. 2011). However, comparisons can be made only with boric acid, chlorpyrifos, copper and NaCl, as the EC50 for avoidance of *H. aculeifer* for dimethoate was not determined. Considering boric acid, the predatory mite EC50 for avoidance (Table 2) was found to be lower than that for enchytraeids (EC50 for avoidance > 2,000 mg/kg). For chlorpyrifos, avoidance endpoints EC50 for the predatory mite and the earthworm (EC50 for avoidance = 9.3 mg/kg) were almost similar, and two orders of magnitude lower than that of enchytraeid (EC50 for avoidance = 933 mg/kg). For copper, the collembolan had the lowest EC50 (EC50 for avoidance = 18.4 mg/kg), followed by earthworms (EC50 for avoidance = 181.1 mg/kg), enchytraeids (EC50 for avoidance = 133 mg/kg) and predatory mites. For sodium chloride, the EC50 for avoidance of the predatory mite was one order of magnitude higher than for the earthworm (1,164 mg/kg).

With regards to the grazer *O. nitens*, LC50 and EC50 for reproduction values for cadmium, lead, boric acid and phenanthrene (Table 3) were almost in the same order of magnitude as for earthworms (i.e. from LC50 = 40.7 mg/kg for phenanthrene to LC50 = 3760 mg/kg for lead) (Spurgeon et al. 1994; Lock and Janssen 2001a, b; Becker et al. 2011; Wu et al. 2011), enchytraeids (i.e. from EC50 for reproduction = 33 mg/kg for phenanthrene to LC50 = 476 mg/kg for cadmium) (Amorim et al. 2012; Lock and Janssen 2001a, b) and collembolan (i.e. from LC50 = 54.5 mg/kg for boric acid to EC50 for

reproduction = 3,160 mg/kg for lead) (Sandifer and Hopkin 1996; Droge et al. 2006; Amorim et al. 2011). In contrast, this mite species was less sensitive to copper and zinc than the other invertebrates. While considering the avoidance responses of *O. nitens*, the only chemical for which comparison with earthworms, enchytraeid and collembolan was possible was copper. For this chemical, the EC50 for avoidance of *O. nitens* (Table 3) was found to be one order of magnitude higher than those of the earthworm and enchytraeid (EC50 for avoidance = 181.1 and 133 mg/kg, respectively) (Loureiro et al. 2005; Amorim et al. 2008), and two orders of magnitude higher than those of the collembolan (EC50 for avoidance = 18.4 mg/kg) (Boiteau et al. 2011). In comparison with the predatory mite, *O. nitens* was generally as sensitive for boric acid, copper and phenanthrene irrespective of the endpoint considered.

In comparison with other soil invertebrates, mites showed lower to similar sensitivities towards chemicals. This could be explained by the fact that mites are a taxon that is more resistant to anthropogenic contamination than other terrestrial test species (Smit et al. 2012). Moreover the exposure of the predatory mites to chemicals could be limited. We hypothesized that major uptake routes for mites and their progeny were the ingestion of pore water, and direct contact with the soil with uptake taking place through permeable parts such as the joints of the legs, the latter hypothesis being the most important uptake route for the soil dwelling spider *Oedothorax apicatus* (Erigonidae) (Everts et al. 1991). It was also demonstrated that some oribatid species (i.e. *Chamobates borealis*, *Nothrus silvestris* and *Rhysostritia duplicata*) could compartmentalize metals as spherite in particular glands, with some evidence of removing these materials through the gut (Ludwig et al. 1991, 1992). Taking into consideration reproduction, as juveniles molt regularly until the adult stage, it could be assumed that if metals are deposited in the cuticle (Seniczak and Seniczak 2002), they can be discarded at the same time as the exoskeleton. These phenomena may partially explain the tolerance of mites to heavy metals.

Use of mites in semi-field and field studies

Toxicity tests on single species are the most common assays in hazard assessment. However, to study the effects of chemicals on an assemblage of species from various trophic levels at the laboratory scale, semi-field studies are generally considered as powerful methods. In the review of Morgan and Knacker (1994) concerning the role of terrestrial model ecosystems in the testing of potentially harmful substances, the authors defined such model as "a system that attempts to simulate the processes and

interactions of components in a portion of the terrestrial environment [...] and is subject to investigator control of environmental factors". Different methodologies have been proposed and ring-tested for the assessment of pesticides (Knacker et al. 2004), including tests in field conditions (Schaeffer et al. 2011; Scholz-Starke et al. 2011).

Semi-field methods can be classified as 1—artificially assembled systems, i.e. multispecies (MS) tests, using soils with natural populations of micro-organisms, artificial populations of invertebrates, with or without plants (Burrows and Edwards 2004; Van den Brink et al. 2005; Scott-Fordsmand et al. 2008; Carbonell-Martin et al. 2011); 2—intact soil cores with natural communities of micro-organisms, plants and invertebrates, i.e. terrestrial model ecosystems (TME) (Kools et al. 2009; Förster et al. 2011; Scholz-Starke et al. 2011, 2013); and 3—field enclosures with natural or added organisms. For all of these methods, mites are model organisms frequently assessed in MS and TME tests, among the other invertebrate communities. The effects of chemicals in such studies are mainly assessed with abundance indices, and with principle response curve (PRC) analysis (Van den Brink and Ter Braak 1999; Van den Brink et al. 2003). This statistical method allows assessing the changes over time of the community structure of the treated soils relative to the control community. The weight of each group or species, depending on the determination level, is related to the pattern of the PRC, i.e. the higher the species weight, the more the response pattern of the species is likely to follow the pattern in the PRC.

To date, there is no standardized method for the assessment of chemicals for semi-field tests. This fact explains methodological differences among studies. In general, parameters that differed between studies are: the type of communities studied, i.e. introduced or natural; the type of environmental conditions, i.e. controlled or natural; the time of exposure, i.e. from less than a month to more than a year (Jänsch et al. 2006); and the mode of application of the chemical, which is dependent on the environmental exposure scenario, e.g. ivermectin spiked in dung, to be representative of its environmental fate (Förster et al. 2011), or copper spiked in sewage sludge, to study the effects of copper-enriched sewage sludge (Pernin et al. 2006). Moreover, no recommendations are made on the nature of the introduced communities used in MS tests.

Multispecies (MS) tests

In MS tests using mites, the predatory mite *H. aculeifer* is one the most frequent species included in the introduced group of test organisms, as it is considered a worthy representation of predatory organisms (Pernin et al. 2006; Larsen et al. 2007; Scott-Fordsmand et al. 2008; Domene et al. 2010; Jensen and Scott-Fordsmand 2012; Sechi

et al. 2014). From the PRC analysis of the different chemicals assessed, the weight of *H. aculeifer* species appears heterogeneous, ranging from the lowest (Domene et al. 2010) to the highest weight in the communities (Pernin et al. 2006), meaning that the response pattern of this species did not follow or followed well the global response pattern of the invertebrate communities to the different treatments.

In addition, oribatid species were included in the grazer community only in the study of Pernin et al. (2006). These authors showed that the two oribatid mite species populations (*Archipteria coleoptrata* (Archipteriidae) and *Adoristes* sp. (Liacaridae)) in the control and treatments strongly decreased and did not recover after the first sampling period, which could be due to predation and/or competition with collembolan species.

Terrestrial model ecosystem (TME) tests

Focusing on TME tests used in the hazard assessment of chemicals, natural communities of mites were determined at the species level (oribatid) in two studies (Scholz-Starke et al. 2011, 2013). Otherwise, they were determined at the taxonomical group level, i.e. Astigmata, Cryptostigmata, Mesostigmata and Prostigmata, (Koolhaas et al. 2004) or not determined at all, considering only the total number of mites (Förster et al. 2011). These differences of determination level can be explained by the fact that proper determination keys are lacking for mites, unlike for collembolans (Koolhaas et al. 2004). In the control treatment of the above-mentioned studies, large variations of initial mite abundances were observed, from a minimum of approximately 500 mites per m² (German loamy sand soil; Scholz-Starke et al. 2013) to a maximum of approximately 100,000 mites per m² (Dutch sandy loam soil; Koolhaas et al. 2004).

Considering the effects of three chemicals on mite communities assessed with such methodologies, ivermectin did not show significant effects up to 227 mg/kg (Förster et al. 2011). Moreover, in the latter study it can be noticed that the abundance of mites did not show significant differences over time in the control. For lindane, communities of mites showed the same decrease trend in abundance at 10 and 100 mg/kg, followed by a recovery, but did not reach the same level as the control (Scholz-Starke et al. 2011). This chemical applied one year later (April 2005–April 2006) on the same site (Monheim, Germany) and assessed with the same methodologies showed no deleterious effects on the communities of mites up to 3.2 mg/kg (Scholz-Starke et al. 2013), which is consistent with the previous experiment. It can be noticed that for these studies, low abundances of mites were recorded in comparison with abundances of the previous year (approx.

6,600 individuals/m² in 2005 against 500–2,000 individuals/m² in 2006). Finally for carbendazim, which was used for the field validation of semi-field tests (Koolhaas et al. 2004), the PRC analysis of the pre-test demonstrated a significant decrease of mite abundance at the two highest concentrations tested (13 and 77.8 kg/ha for Amsterdam and Bangor soil TME pre-tests, respectively). However in the final ring-test, the mite numbers showed large variations and it was difficult to find consistent effects of the treatments, up to 87.5 kg/ha (Amsterdam soil TME ring test) (Koolhaas et al. 2004). But in both tests, it was shown that mites of the group Astigmata were the most sensitive to carbendazim treatments. The determination level for mites in TME tests seems problematic and time consuming, e.g. in Koolhaas et al. (2004), only four out of twelve tests were assessed due to time constraints, i.e. at least 160 samples to analyze and determine for one soil, summing ring-test and field validation tests. To our knowledge, no study reported the use of mites in semi-field enclosure tests.

Field studies

Focusing on field tests performed to assess chemicals, mite communities were used since many decades. For example in the study of Hoy (1980), the pesticide lindane had no effects on populations of Mesostigmata (to which *H. aculeifer* belongs) while Cryptostigmata (to which *O. nitens* belongs) were moderately affected. A few years later, Mallow et al. (1985) demonstrated that atrazine had no significant effects on mites communities. On the contrary, Koehler (Koehler 1992) showed that the pesticide aldicarb had negative effects on mites populations when applied, but that these communities recovered over the year period once the product degraded. The same phenomenon of mite population decrease and recovery was demonstrated for different tillage practices (Loring et al. 1980). In the study of Koolhaas et al. (2004), the community of mites showed the same trend for both semi-field and field tests, but the effects of the chemical (carbendazim) were not statistically significant, which did not allow the PRC analysis on mites. Römbke et al. (2009b), providing design and first results for field studies for the assessment of pesticides, found no significant differences for all of the evaluated mite taxa, between control and reference substances (benomyl and chlorpyrifos) as well as for the test substance, of which the identity was kept confidential. More recently, (Al-Assiuty et al. 2014) assessed the environmental impact of two fungicides (metalaxyl and mancozeb) and two biofungicides (respectively composed of antagonist and parasite of fungi). They demonstrated that fungicides may have indirect deleterious effects on oribatids, mediated by changes in the fungal community of soil.

Some other field studies aimed at using mites for soil quality assessment. Although Gamasina are main predators among mesofauna (Ruf and Beck 2005), they are less studied than oribatids in this domain. Indeed, different field surveys followed oribatid communities along heavy metal gradients (Seniczak et al. 1997; Zaitsev and van Straalen 2001; Skubala and Kafel 2004; Khalil et al. 2009). These studies highlight the fact that oribatids are quite tolerant to heavy metal contamination, which is consistent with laboratory experiments. Interestingly, the highest density and species abundance were found at moderate concentrations of heavy metals, indicating a stimulatory effect (Seniczak et al. 1997; Skubala and Kafel 2004). Moreover, dosage of heavy metals in oribatids collected from highly contaminated sites (around 10,000 mg/kg for some metals) and from lowly impacted agricultural sites (El-Sharabasy and Ibrahim 2010) demonstrated that different species of oribatida can accumulate heavy metals in high levels. Concentrations found in mites seemed to be correlated with the presence of high concentrations of heavy metals in the soil, e.g. high levels of iron and zinc in oribatids for soils impacted by these metals (Zaitsev and van Straalen 2001) and high levels of zinc in oribatids for soils impacted with this metal (Skubala and Kafel 2004). However, in soils highly polluted by zinc and lead, Khalil et al. (2009) demonstrated that oribatid mites can display a great variety of responses towards heavy metals and, in their study, no relationship was found between metal pollution and density, species abundance or composition. The previous parameters may thus be influenced by soil characteristics such as the organic matter content, as Axelsen and Kristensen (2000) reported that the input of organic matter from green manure in agricultural soil increased the density of mites in general.

Overall conclusion

Among mites, the predator *Hypoaspis aculeifer* and the grazer *Oppia nitens* are the most studied species in laboratory. For both mite species, the reproduction endpoint was found in general to be more sensitive than mortality and avoidance. Compared to other soil meso-fauna invertebrates, mites were found in general less or as sensitive than other test species, depending on the endpoints and chemicals studied. Moreover, the status of *H. aculeifer* as the only predator among organisms for which a standardized protocol is available highlights its usefulness in ecotoxicological laboratory studies.

Considering semi-field studies, *H. aculeifer* was used as a top predator whereas other soil mites, i.e. oribatids, were ranked in the grazer group, along with collembolan. In these studies, mites showed to be quite tolerant towards

anthropogenic contamination. This statement was also corroborated by field surveys. However, mites represent relevant communities that cannot be omitted in environmental hazard assessment.

Further research on mites should now focus on implementing data on their sensitivity towards a broader range of chemicals. Moreover, the applicability of laboratory test methods for the assessment of environmental samples (contaminated soils, wastes etc.) with mites should be emphasized, as to date a limited number of studies are available. Another point to develop for predatory mites should be their uptake routes of chemicals, which has never been investigated. It opens the way to bio-accumulation studies with this kind of organisms. But no mite species have been studied to provide possible explanations on why mites are more tolerant (in some instances) or sensitive (in other instances) to anthropogenic contamination than other soil invertebrates.

Acknowledgments The financial support from the French Ministry of Ecology, Sustainable Development, and Energy and French Environment and Energy Management Agency (contract 0975C0061) is gratefully acknowledged. The authors would like to thank especially Sandrine Joachim, for her advices and comments on the semi-field and field section, and the different reviewers for their comments, which enhanced the clarity of the manuscript.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Al-Assiuty AIM, Khalil MA, Ismail AA, Van Straalen NM, Ageba MF (2014) Effects of fungicides and biofungicides on population density and community structure of soil oribatid mites. *Sci Tot Environ* 466–467:412–420
- Aldaya MM, Lors C, Salmon S, Ponge J-F (2006) Avoidance bioassays may help to test the ecological significance of soil pollution. *Environ Pollut* 140:173–180
- Alexander M (2000) Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Tech* 29:2713–2717
- Amorim MJB, Novais S, Römbke J, Soares AMVM (2008) *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): a test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. *Environ Int* 34:363–371
- Amorim MJB, Natal-da-Luz T, Sousa J, Loureiro S, Becker L, Römbke J, Soares AMVM (2011) Boric acid as reference substance: pros, cons and standardization. *Ecotoxicology*. doi:10.1007/s10646-011-0832-9
- Amorim MJB, Oliveira E, Teixeira AS, Gravata CS, Loureiro S, Guilhermino LC, Van Gestel CAM, Soares AMVM (2012) Toxicity and bioaccumulation of phenanthrene in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta:Enchytraeidae). *Environ Toxicol Chem* 30:967–972
- Axelsen JA, Kristensen KT (2000) Collembola and mites in plots fertilised with different types of green manure. *Pedobiologia* 44:556–566
- Axelsen JA, Holst N, Hamers T, Krogh PH (1997) Simulations of the predator-prey interactions in a two species ecotoxicological test system. *Ecol Model* 101:15–25
- Baattrup E, Bayley M, Axelsen JA (2005) Predation of the mite *Hypoaspis aculeifer* on the springtail *Folsomia fimetaria* and the influence of sex, size, starvation, and poisoning. *Entomol Exp Appl* 118:61–70
- Bakker F, van Straatum P (2003) Testing *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Laelapidae) on standard soils: notes on testing methodology and species sensitivity. *Pestic Benef Org IOBC/wprs Bull* 26:99–105
- Bakker F, Feije R, Grove A, Hoogendoorn G, Jacobs G, Loose E, van Stratum P (2003) A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *J Soils Sediments* 3:73–77
- Becker L, Scheffczyk A, Förster B, Oehlmann J, Prinz J, Römbke J, Moser T (2011) Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. *J Soils Sediments* 11:238–248
- Behan-Pelletier VM (1999) Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. *Agric Ecosyst Environ* 74:411–423
- Berndt O, Poehling H-M, Meyhöfer R (2004a) Predation capacity of two predatory laelapid mites on soil-dwelling thrips stages. *Entomol Exp Appl* 112:107–115
- Berndt O, Meyhöfer R, Poehling H-M (2004b) The edaphic phase in the ontogenesis of *Frankliniella occidentalis* and comparison of *Hypoaspis miles* and *Hypoaspis aculeifer* as predators of soil-dwelling thrips stages. *Biol Control* 30:17–24
- Blümel S, Bakker FM, Baler B, Brown K, Candolfi MP, Goßmann A, Grimm C, Jäckel B, Nienstedt K, Schirra KJ, Ufer A, Waltersdorfer A (2000) Laboratory residual contact test with the predatory mite *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) for regulatory testing of plant protection products. In: Candolfi MP, Blümel S, Forster R, Bakker FM, Grimm C, Hassan SA, Heimbach U, Mead-Briggs MA, Reber B, Schmuck R, Vogt H (eds) Guidelines to evaluate side effects of plant protection products to non-target arthropods: IOBC BART Eppo joint initiative. Dreier Druck, Reinheim, pp 121–143
- Boiteau G, Lynch DH, MacKinley P (2011) Avoidance tests with *Folsomia candida* for the assessment of copper contamination in agricultural soils. *Environ Pollut* 159:903–906
- Bronswijk J, Sinah RN (1971) Pyroglyphid mites (Acari) and house dust allergy. *J Aller* 47:31–52
- Burrows LA, Edwards CA (2004) The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems. *Ecotoxicology* 13:143–161
- Candolfi MP, Bakker F, Cañez V, Miles M, Neumann C, Pilling E, Primiani M, Romijn K, Schmuck R, Storck-Weyhermüller S, Ufer A, Waltersdorfer A (1999) Sensitivity of non-target arthropods to plant protection products: could *Typhlodromus pyri* and *Aphidius spp.* be used as indicator species? *Chemosphere* 39:1357–1370
- Carbonell-Martin G, Pro-Gonzalez J, Aragonese-Grunert P, Babin-Vich MM, Fernandez-Torija C, Tarazona-Lafarga JV (2011) Targeting the environmental assessment of veterinary drugs with the multi-species-soil system (MS-3) agricultural soil microcosms: the ivermectin case study. *Span J Agric Res* 9:433–443
- Chauve C (1998) The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol* 79:239–245
- Cortet J, Gomot-DeVaulflery A, Poinot-Balaguer N, Gomot L, Texier C, Cluzeau D (2000) The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur J Soil Biol* 35:115–134
- Crouau Y, Chenon P, Gisclard C (1999) The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Appl Soil Ecol* 12:103–111

- De Silva PM, van Gestel CA (2009) Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere* 77:1609–1613
- Decou GC (1994) Biological control of the two-spotted spider mite (Acarina: Tetranychidae) on commercial strawberries in Florida with *Phytoseiulus persimilis* (Acarina: Phytoseiidae). *Fla Entomol* 77:33
- Denneman CAJ, Van Straalen NM (1991) The toxicity of lead and copper in reproduction tests using the oribatid mite *Platynothrus peltifer*. *Pedobiologia* 35:297–304
- Dicke M, Baarlen PV, Wessels R, Dijkman H (1993) Herbivory induces systemic production of plant volatiles that attract predators of the herbivore: extraction of endogenous elicitor. *J Chem Ecol* 19:581–599
- Domene X, Chelinho S, Sousa J (2010) Effects of nonylphenol on a soil community using microcosms. *J Soils Sediments* 10: 556–567
- Droge STJ, Paumen ML, Bleeker EAJ, Kraak MHS, van Gestel CAM (2006) Chronic toxicity of polycyclic aromatic compounds to the springtail *Folsomia candida* and the enchytraeid *Enchytraeus crypticus*. *Environ Toxicol Chem* 25:2423–2431
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010) Scientific Opinion on outline proposals for assessment of exposure of organisms to substances in soil. *EFSA J* 8:1442 (38)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance oxadiazon. *EFSA J* 8:1389 (92)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance oxyfluorfen. *EFSA J* 8:1906 (78)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance asulam. *EFSA J* 8:1822 (71)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azadirachtin. *EFSA J* 9:1858 (76)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance sedaxane. *EFSA J* 10:2823 (76)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penflufen. *EFSA J* 10:2860 (74)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ametoctradin. *EFSA J* 10:2921 (84)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyriofenone. *EFSA J* 11:3147 (84)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorantraniliprole. *EFSA J* 11:3143 (107)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spirotetramat. *EFSA J* 11:3243 (90)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metaflumizone. *EFSA J* 11:3373 (98)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chromafenozide. *EFSA J* 11: 3461 (63)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metobromuron. *EFSA J* 12:3541 (78)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance lambda-cyhalothrin. *EFSA J* 12:3677 (171)
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance sulfoxaflor. *EFSA J* 12:3692 (170)
- El-Sharabasy HM, Ibrahim A (2010) Communities of oribatid mites and heavy metal accumulation in oribatid species in agricultural soils in Egypt impacted by waste water. *Plant Prot Sci* 46:159–170
- [EC] European Commission (2013) Commission Regulation 283/2013 of the European Parliament and of the Council of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. *OJEU* L93:1–84
- Everts JW, Aukema B, Mullié WC, Van Gemerden A, Rottier A, Van Katz R, Van Gestel CAM (1991) Exposure of the ground dwelling spider *Oedothorax apicatus* (Blackwall) (Erigonidae) to spray and residues of deltamethrin. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:13–19
- Faber J, Van der Pol JJC, Rutgers M (2006) Database for distributed landscape classification and land use data of selected distributors based on scientific evidence of importance. *NOMIRACLE Deliverable Report D.1.1.4*, p 72
- Folker-Hansen P, Krogh PH, Holmstrup M (1996) Effect of dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna. *Ecotoxicol Environ Saf* 33:207–216
- Förster B, Boxall A, Coors A, Jensen J, Liebig M, Pope L, Moser T, Römke J (2011) Fate and effects of ivermectin on soil invertebrates in terrestrial model ecosystems. *Ecotoxicology* 20:234–245
- Gergocs V, Hufnagel L (2009) Application of Oribatid mites as indicators. *Appl Ecol Environ Res* 7:79–98
- Gerson U, Weintraub PG (2007) Mites for the control of pests in protected cultivation. *Pest Manag Sci* 63:658–676
- Grimm C, Schmidli H, Bakker F, Brown F, Campbell P, Candolfi M, Chapman P, Harrison EG, Mead-Brigg M, Schmuck R, Ufer A (2001) Use of standard toxicity tests with *Typhlodromus pyri* and *Aphidius rhopalosiphii* to establish a dose-response relationship. *J Pest Sci* 74:72–84
- Hall M, Hedlund K (1999) The predatory mite *Hypoaspis aculeifer* is attracted to food of its fungivorous prey. *Pedobiologia* 43:11–17
- Hamers T, Krogh PH (1997) Predator-prey relationships in a two-species toxicity test system. *Ecotoxicol Environ Saf* 37:203–212
- Heckmann L-H, Maraldo K, Krogh PH (2005) Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environ Sci Technol* 39:7154–7157
- Heckmann L-H, Ruf A, Nienstedt KM, Krogh PH (2007) Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. *Appl Soil Ecol* 36:130–135
- Hoffmann D, Schausberger P (2012) Plant-mediated aboveground-belowground interactions: the spider mite perspective. *Acarol* 52:17–27
- Hoy JB (1980) Ecological impact of lindane on a pine plantation soil microarthropod community. *Environ Entomol* 9:164–174
- Huhta V, Hyvönen R, Kaasalainen P, Koskeniemi A, Muona J, Mäkelä I, Sulander M, Viikamaa P (1986) Soil fauna of finish coniferous forests. *Ann Zool Fenn* 23:345–360
- ISO (International Organization for Standardization) (2008) Soil quality—Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior—Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). *ISO 17512-1*. Geneva, Switzerland
- ISO (International Organization for Standardization) (2011) Soil quality—Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior—Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*). *ISO 17512-2*. Geneva, Switzerland

- ISO (International Organization for Standardization) (2012) Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/Eisenia Andrei. ISO 11268-1. Geneva, Switzerland
- ISO (International Organization for Standardization) (2012) Soil quality—Effects of pollutants on earthworms—Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/Eisenia Andrei. ISO 11268-2. Geneva, Switzerland
- ISO (International Organization for Standardization) (2013) Soil quality—Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil contaminants. ISO 11267. Geneva, Switzerland
- ISO (International Organization for Standardization) (2014) Soil quality—Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.)—Determination of effects on reproduction and survival. ISO 16387. Geneva, Switzerland
- Jänsch S, Amorim MJB, Römcke J (2005) Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environ Rev* 13:51–83
- Jänsch S, Frampton GK, Römcke J, Van den Brink PJ, Scott-Fordsmand JJ (2006) Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: a review and comparison with laboratory toxicity data. *Environ Toxicol Chem* 25:2490–2501
- Jensen J, Scott-Fordsmand JJ (2012) Ecotoxicity of the veterinary pharmaceutical ivermectin tested in a soil multi-species (SMS) system. *Environ Pollut* 171:133–139
- Jeppson LR, Baker EW (1975) Mites injurious to economic plants. University of California Press, California
- Khalil MA, Janssens TKS, Berg MP, Van Straalen NM (2009) Identification of metal-responsive oribatid mites in a comparative survey of polluted soils. *Pedobiologia* 52:207–221
- Knacker T, van Gestel CM, Jones S, Soares AMVM, Schallnaß H-J, Förster B, Edwards CA (2004) Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME)—an instrument for testing potentially harmful substances: conceptual approach and study design. *Ecotoxicology* 13:9–27
- Koehler HH (1992) The use of soil mesofauna for the judgement of chemical impact on ecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 40: 193–205
- Koolhaas J, Van Gestel CM, Römcke J, Soares AMVM, Jones SE (2004) Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME)—An instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on soil microarthropod communities. *Ecotoxicology* 13:75–88
- Kools SAE, Boivin M-EY, Van Der Wurff AWG, Berg MP, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2009) Assessment of structure and function in metal polluted grasslands using terrestrial model ecosystems. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:51–59
- Krogh PH (1995) Effects of pesticides on the reproduction of *Hypoaspis aculeifer* (Gamasida: Laelapidae) in the laboratory. *Acta Zool Fenn* 196:333–337
- Krogh PH, Axelsen JA (1998) Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Løkke H, Van Gestel CAM (eds) Handbook of soil invertebrate toxicity tests. Wiley, Chichester, pp 239–251
- Larsen T, Luxhøi J, Magid J, Jensen LS, Krogh PH (2007) Properties of anaerobically digested and composted municipal solid waste assessed by linking soil mesofauna dynamics and nitrogen modelling. *Biol Fertil Soils* 44:59–68
- Lavelle P, Decaens T, Aubert M, Barot S, Blouin M, Bureau F, Margerie P, Mora P, Rossi J-P (2006) Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur J Soil Biol* 42:S3–S15
- Lebrun P, van Straalen NM (1995) Oribatid mites: prospects for their use in ecotoxicology. *Exp Appl Acarol* 19:361–379
- Lesna I, Wolfs P, Faraji F, Roy L, Komdeur J, Sabelis M (2009) Candidate predators for biological control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Exp Appl Acarol* 48:63–80
- Liu J, Sheha H, Tseng SCG (2010) Pathogenic role of *Demodex* mites in blepharitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10:505–510
- Lobbes P, Schotten C (1980) Capacities of increase of the soil mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Mesostigmata: Laelapidae). *Z Angew Entomol* 90:9–22
- Lock K, Janssen CR (2001a) Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. *Ecotoxicology* 10:315–322
- Lock K, Janssen CR (2001b) Test design to assess the influence of soil characteristics on the toxicity of copper and lead to the oligochaete *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicology* 10:137–144
- Lock K, Janssen CR (2002) Mixture toxicity of zinc, cadmium, copper and lead to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 52:1–7
- Loring SJ, Snider RJ, Robertson LS (1980) The effects of three tillage practices on Collembola and Acarina populations. *Pedobiologia* 22:172–184
- Loureiro S, Soares AMVM, Nogueira AJA (2005) Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ Pollut* 138:121–131
- Ludwig M, Kratzmann M, Alberti G (1991) Accumulation of heavy metals in two oribatid mites. In: Dusbábek F, Bukva V (eds) Modern Acarology. Academia, Prague and SPB Academic Publishing, The Hague, pp 431–437
- Ludwig M, Kratzmann M, Alberti G (1992) Observations on the proventricular glands (“organes racémiformes”) of the oribatid mite *Chamobates borealis* (Acari, Oribatida): an organ of interest for studies on adaptation of animals to acid soils. *Exp Appl Acarol* 15:49–57
- Mallow D, Snider RJ, Robertson LS (1985) Effects of different management practices on Collembola and Acarina in corn production systems II. The effects of moldboard plowing and atrazine. *Pedobiologia* 28:115–131
- Martikainen E (1996) Toxicity of dimethoate to some soil animal species in different soil types. *Ecotoxicol Environ Saf* 33:128–136
- Martikainen EAT, Krogh PH (1999) Effects of soil organic matter content and temperature on toxicity of dimethoate to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomiidae). *Environ Toxicol Chem* 18:865–872
- McMurtry JA, Croft BA (1997) Life-styles of Phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annu Rev Entomol* 42:291–321
- Millennium Ecosystem Assessment (MEA) (2005) Ecosystems and human well-being: synthesis. Island Press, Washington, D.C.
- Morgan E, Knacker T (1994) The role of laboratory terrestrial model ecosystems in the testing of potentially harmful substances. *Ecotoxicology* 3:213–233
- Moro CV, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE, Zenner L (2009) The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp Appl Acarol* 48:93–104
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (2008) Predatory mite (*Hypoaspis* (Geolaelaps) *aculeifer*) reproduction test in soil. OECD Guidelines for the testing of chemicals 226. Paris, France
- Oliveira H, Fadini MAM, Venzon M, Rezende D, Rezende F, Pallini A (2009) Evaluation of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) as a biological control agent of the two-spotted spider mite on strawberry plants under greenhouse conditions. *Exp Appl Acarol* 47:275–283
- Owojori OJ, Reinecke AJ (2009) Avoidance behaviour of two ecophysiological different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere* 75:279–283
- Owojori OJ, Siciliano SD (2012) Accumulation and toxicity of metals (copper, zinc, cadmium, and lead) and organic compounds (geraniol and benzo[a]pyrene) in the oribatid mite *Oppia nitens*. *Environ Toxicol Chem* 31:1639–1648

- Owojori OJ, Healey J, Princz J, Siciliano SD (2011) Can avoidance behavior of the mite *Oppia nitens* be used as a rapid toxicity test for soils contaminated with metals or organic chemicals? *Environ Toxicol Chem* 30:2594–2601
- Owojori OJ, Waszak K, Roembke J (2014) Avoidance and reproduction tests with the predatory mite *Hypoaspis aculeifer*: effects of different chemical substances. *Environ Toxicol Chem*. doi:10.1002/etc.2421
- Peijnenburg W, Capri E, Kula C, Liess M, Luttik R, Montforts M, Nienstedt K, Römbke J, Sousa JP, Jensen J (2012) Evaluation of exposure metrics for effect assessment of soil invertebrates. *Crit Rev Environ Sci Tech* 42:1862–1893
- Pernin C, Ambrosi J-P, Cortet J, Joffre R, Le Petit J, Tabone E, Torre F, Krogh PH (2006) Effects of sewage sludge and copper enrichment on both soil mesofauna community and decomposition of oak leaves (*Quercus suber*) in a mesocosm. *Biol Fertil Soils* 43:39–50
- Pfeffer SP, Filser J (2010) Attraction to prey and prey-associated odours by the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* in a soil experimental system. *Soil Biol Biochem* 42:1355–1357
- Princz JI, Behan-Pelletier VM, Scroggins RP, Siciliano SD (2010) Oribatid mites in soil toxicity testing—the use of *Oppia nitens* (C.L. Koch) as a new test species. *Environ Toxicol Chem* 29:971–979
- Princz JI, Moody M, Fraser C, Van der Vliet L, Lemieux H, Scroggins R, Siciliano D (2012) Evaluation of a new battery of toxicity tests for boreal forest soils: assessment of the impact of hydrocarbons and salts. *Environ Toxicol Chem* 31:766–777
- Rahman T, Broughton S, Spafford H (2011a) Effect of spinosad and predatory mites on control of *Frankliniella occidentalis* in three strawberry cultivars. *Entomol Exp Appl* 138:154–161
- Rahman T, Spafford H, Broughton S (2011b) Single versus multiple releases of predatory mites combined with spinosad for the management of western flower thrips in strawberry. *Crop Prot* 30:468–475
- Ree HI, Lee IY, Kim TE, Jeon SH, Hong CS (1997) Mass culture of house dust mites, *Dermatophagoides* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Med Entomol Zool* 48:109–116
- Römbke J, Jänsch S, Meier M, Scheffczyk A, Liebig M (2009a) General recommendations for soil ecotoxicological tests suitable for the environmental risk assessment of genetically modified plants. *Integr Environ Assess Manag* 6:287–300
- Römbke J, Schmelz RM, Knaebe S (2009b) Field studies for the assessment of pesticides with soil mesofauna, in particular enchytraeids, mites and nematodes: design and first results. *Soil Org* 81:237–264
- Römbke J, Krogh K, Moser T, Hilbeck A, Teichmann H, Tappeser B (2010) Effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:332–340
- Ruf A, Beck L (2005) The use of predatory soil mites in ecological soil classification and assessment concepts, with perspectives for oribatid mites. *Ecotoxicol Environ Saf* 62:290–299
- Salmane I, Brumelis G (2010) Species list and habitat preference of Mesostigmata mites (Acari, Parasitiformes) in Latvia. *Acarologia* 50:373–394
- Sandifer RD, Hopkin SP (1996) Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola) in a standard laboratory test system. *Chemosphere* 33:2475–2486
- Sardar MA, Murphy PW (1987) Feeding tests of grassland soil-inhabiting gamasine predators. *Acarologia* 28:117–121
- Schaeffer A, Brink PJ van den, Heimbach F, Hoy SP, de Jong FMW, Rombke J, Roß-Nickoll M, Sousa JP (2011) Semi-field methods for the environmental risk assessment of pesticides in soil. Taylor & Francis US
- Schlosser HJ, Riepert F (1992) Entwicklung eines prüfverfahrens für chemikalien an bodenraubmilben (Gamasida). Teil 2: erste ergebnisse mit linden und kaliumdichromat in subletaler dosierung. *Zoologische Beitrage* 34:413–433
- Scholz-Starke B, Nikolakis A, Leicher T, Lechelt-Kunze C, Heimbach F, Theißen B, Toschki A, Ratte HT, Schäffer A, Roß-Nickoll M (2011) Outdoor terrestrial model ecosystems are suitable to detect pesticide effects on soil fauna: design and method development. *Ecotoxicology* 20:1932–1948
- Scholz-Starke B, Beylich A, Moser T, Nikolakis A, Rümpler N, Schäffer A, Theißen B, Toschki A, Roß-Nickoll M (2013) The response of soil organism communities to the application of the insecticide lindane in terrestrial model ecosystems. *Ecotoxicology* 22:339–362
- Scott-Fordsmand JJ, Maraldo K, van den Brink PJ (2008) The toxicity of copper contaminated soil using a gnotobiotic soil multi-species test system (SMS). *Environ Int* 34:524–530
- Sechi V, D'Annibale A, Maraldo K, Johansen A, Bossi R, Jensen J, Krogh PH (2014) Species composition of a soil invertebrate multi-species test system determines the level of ecotoxicity. *Environ Pollut* 184:586–596
- Seniczak A, Seniczak S (2002) The effect of cadmium on *Archeogozetes longisetosus* (Acari, Oribatida) in laboratory conditions. *Eur J Soil Biol* 38:315–317
- Seniczak S, Klimek A, Gackowski G, Kaczmarek S, Zalewski W (1997) Effect of copper smelting air pollution on the mites (Acari) associated with young Scots pine forests polluted by a copper smelting works at Glogow, Poland. II Soil mites. *Water Air Soil Poll* 97:287–302
- Seniczak A, Ligocka A, Seniczak S, Paluszak Z (2009) The influence of cadmium on life-history parameters and gut microflora of *Archeogozetes longisetosus* (Acari: Oribatida) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 47:191–200
- Shikoh K, Haruka K, Hiroshi A (2006) Development, oviposition, and predation of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Laelapidae) feeding on *Tyrophagus similis* (Acari: Acaridae). *J Acarol Soc Jpn* 15: 139–143
- Skubala P, Kafel A (2004) Oribatid mite communities and metal bioaccumulation in oribatid species (Acari, Oribatida) along the heavy metal gradient in forest ecosystems. *Environ Pollut* 132:51–60
- Smit CE, Moser T, Römbke J (2012) A new OECD test guideline for the predatory soil mite *Hypoaspis aculeifer*: results of an international ring test. *Ecotoxicol Environ Saf* 82:56–62
- Spurgeon DJ, Hopkin SP, Jones DT (1994) Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ Pollut* 84:123–130
- Sverdrup LE, Hagen SB, Krogh PH, van Gestel CAM (2007) Benzo(a)pyrene shows low toxicity to three species of terrestrial plants, two soil invertebrates, and soil-nitrifying bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 66:362–368
- Usher MB (1985) Population and community dynamics in the soil ecosystem. *Spec Publ Br Ecol Soc* 4:243–265
- Van den Brink PJ, Braak CJT (1999) Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ Toxicol Chem* 18:138–148
- Van den Brink PJ, Van den Brink NW, Ter Braak CJ (2003) Multivariate analysis of ecotoxicological data using ordination: demonstrations of utility on the basis of various examples. *Australas J Ecotoxicol* 9:141–156
- Van den Brink PJ, Tarazona JV, Solomon KR, Knacker T, Van den Brink NW, Brock TCM, Hoogland JPH (2005) The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products. *Environ Toxicol Chem* 24:820–829

- Van Gestel CAM (2012) Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. In Štrus J, Taiti S, Sfenthourakis S (eds) Advances in terrestrial isopod biology. ZooKeys 176:275–296
- Van Gestel CAM, Doornekamp A (1998) Tests on the oribatid mite *Platynothrus peltifer*. In: Løkke H, Van Gestel CAM (eds) Handbook of soil invertebrate toxicity tests. Wiley, Chichester, pp 113–130
- Whitaker J, Chaplow JS, Potter E, Scott WA, Hopkin S, Harman M, Sims I, Sorokin N (2009) The comparative toxicity to soil invertebrates of natural chemicals and their synthetic analogues. Chemosphere 76:345–352
- Wiethoff J, Poehling H-M, Meyhöfer R (2004) Combining plant- and soil-dwelling predatory mites to optimise biological control of thrips. Exp Appl Acarol 34:239–261
- Williams MEDC (2001) Biological control of thrips on ornamental crops: interactions between the predatory mite *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) and western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), on cyclamen. Biocontrol Sci Technol 11:41–55
- Wu S, Wu E, Qiu L, Zhong W, Chen J (2011) Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. Chemosphere 83:429–434
- Yeardley RB, Gast LC, Lazorchak JM (1996) The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. Environ Toxicol Chem 15:1532–1537
- Zaitsev AS, van Straalen NM (2001) Species diversity and metal accumulation in oribatid mites (Acari, Oribatida) of forests affected by a metallurgical plant. Pedobiologia 45:467–479
- Zhang ZQ (2003) Mites of greenhouses: identification, biology and control. CAB International, Wallingford

Partie II. MATERIELS ET METHODES

Chapitre I. Matériels utilisés

Dans ce chapitre sont présentés en premier lieu l'habitat, la morphologie, l'origine ainsi que l'élevage des organismes modèles *C. elegans* et *H. aculeifer*. La seconde partie de ce chapitre décrit les substrats utilisés ainsi que les MF étudiées. La dernière partie résume les différentes méthodes analytiques appliquées pour caractériser les différents substrats d'essais ainsi que les MF.

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Le nématode *Caenorhabditis elegans*

I.1.1.1. Habitat et morphologie

C. elegans (Nematoda) fait partie de la famille des Rhabditidae, de la classe Secernentea. C'est un ver non segmenté d'une longueur d'environ 1-1,5 mm une fois adulte. Dans la nature, cet invertébré ubiquiste (*i.e.* retrouvé en Afrique du nord, Amérique du nord, Europe, Asie et Australie) vit dans l'eau interstitielle du sol. Ce ver colonise rapidement les zones riches en matières organiques et en microorganismes. Cependant, son régime alimentaire dans les sols, constitué de bactéries, est encore mal connu. Un des modes majoritaires de propagation de cette espèce est la phorésie, par association à un hôte porteur (*i.e.* insectes, isopodes, arachnides, gastéropodes) (Kiontke, 2006).

D'un point de vue anatomique, *C. elegans* est composé d'un système nerveux central, de muscles, d'un appareil reproducteur, d'une cavité buccale (pharynx) ainsi que d'un système digestif (Figure 4), mais n'a pas d'appareil circulatoire ni respiratoire. Les échanges gazeux sont réalisés *via* des micro-pores situés sur son corps (Altun & Hall, 2012). D'autre part, cet invertébré présente deux modes de reproduction : un mode asexué (*i.e.* individus hermaphrodites), assurant une colonisation optimale du milieu ; et un mode sexué (*i.e.* fréquence d'apparition de mâles de 0,1 % en conditions favorables), assurant un brassage génétique de la population (Lints & Hall, 2005).

MATERIELS ET METHODES

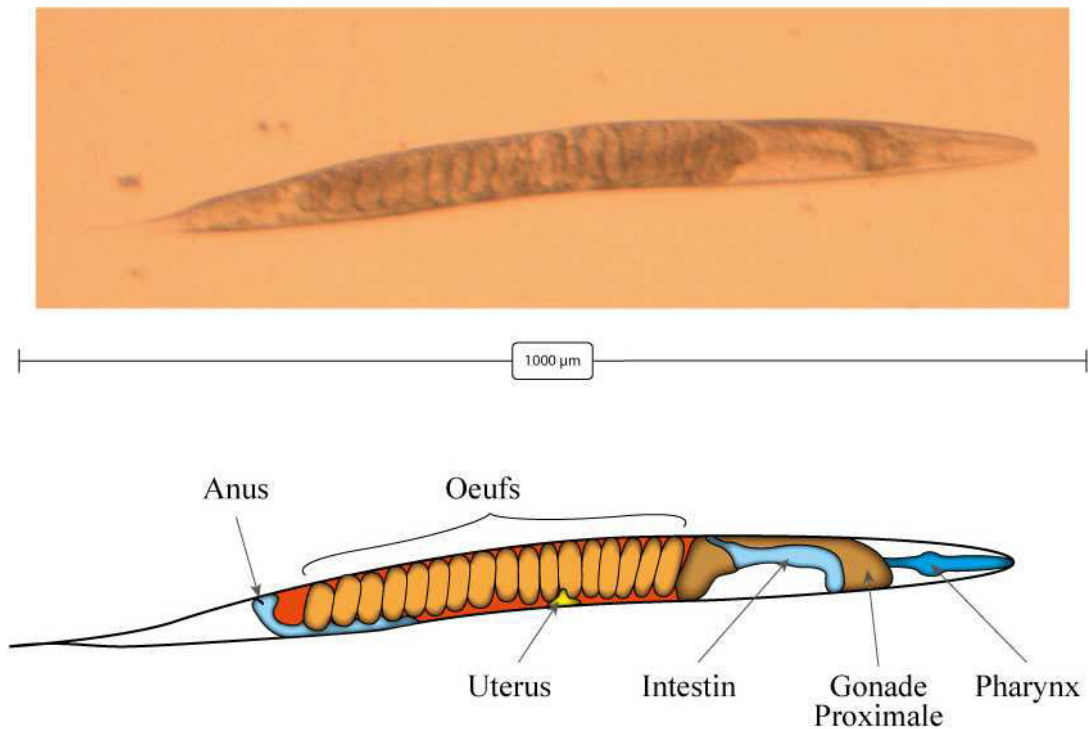


Figure 4 : Morphologie d'un nématode (*C. elegans*) adulte hermaphrodite.

I.1.1.2. Origine des souches de nématode et de bactérie utilisées

Les souches de nématode et de bactérie sont celles préconisées par la norme ISO 10872 (2010). La souche de nématode *C. elegans* utilisée au cours des travaux de thèse est une souche de type sauvage référencée N2 (Bristol), obtenue auprès du *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC, Université du Minnesota, USA). Le CGC est un centre spécialisé dans la collection, le maintien et la distribution de différentes souches de nématodes de l'espèce *C. elegans*. La souche N2 provient initialement de la collection de Cambridge (Angleterre). Cette variété a été isolée à partir d'un compost de champignons en 1951 (http://www.wormbase.org/species/c_elegans/strain/N2). Elle a été récupérée en 1993 par le CGC. La source de nourriture utilisée est une souche uracile déficiente d'*Escherichia coli* référencée OP50. Celle-ci a également été obtenue auprès du CGC.

I.1.1.3. Cycle de vie et maintien des élevages de nématode au laboratoire

Au laboratoire, le temps de génération de *C. elegans* est d'environ 72 h (*i.e.* \approx 60 h de l'œuf à l'adulte fécond) à 20 °C. La durée de vie moyenne d'un adulte est de 3 semaines. Le cycle de vie de ce nématode, (Figure 5) commence dans l'œuf, puis se poursuit par différents

MATERIELS ET METHODES

stades larvaires séparés par des mues. Ces stades sont respectivement appelés J1 (*e.g.* mesure moyenne : 276,5 μm), J2 (*e.g.* mesure moyenne : 379,3 μm), J3 (*e.g.* mesure moyenne : 484,4 μm) et J4 (*e.g.* mesure moyenne : 612,3 μm). Il existe également un stade pré-adulte non fécond (*e.g.* mesure moyenne : 870,9 μm). Dans des conditions de stress au cours des stades J1 et J2, comme par exemple un manque de nourriture, les vers juvéniles entrent en latence, appelé stade ou larve « dauer » (*e.g.* mesure moyenne : 413,5 μm). Les tailles des différents stades de vie indiquées ci-dessus ont été mesurées au laboratoire sur 10 individus issus de la même cohorte (loupe binoculaire grossissement 12X, logiciel d'analyse d'image Saisam, Micro-vision Instruments). Ces mesures ont été effectuées aux différents temps composant le cycle de vie de *C. elegans*.

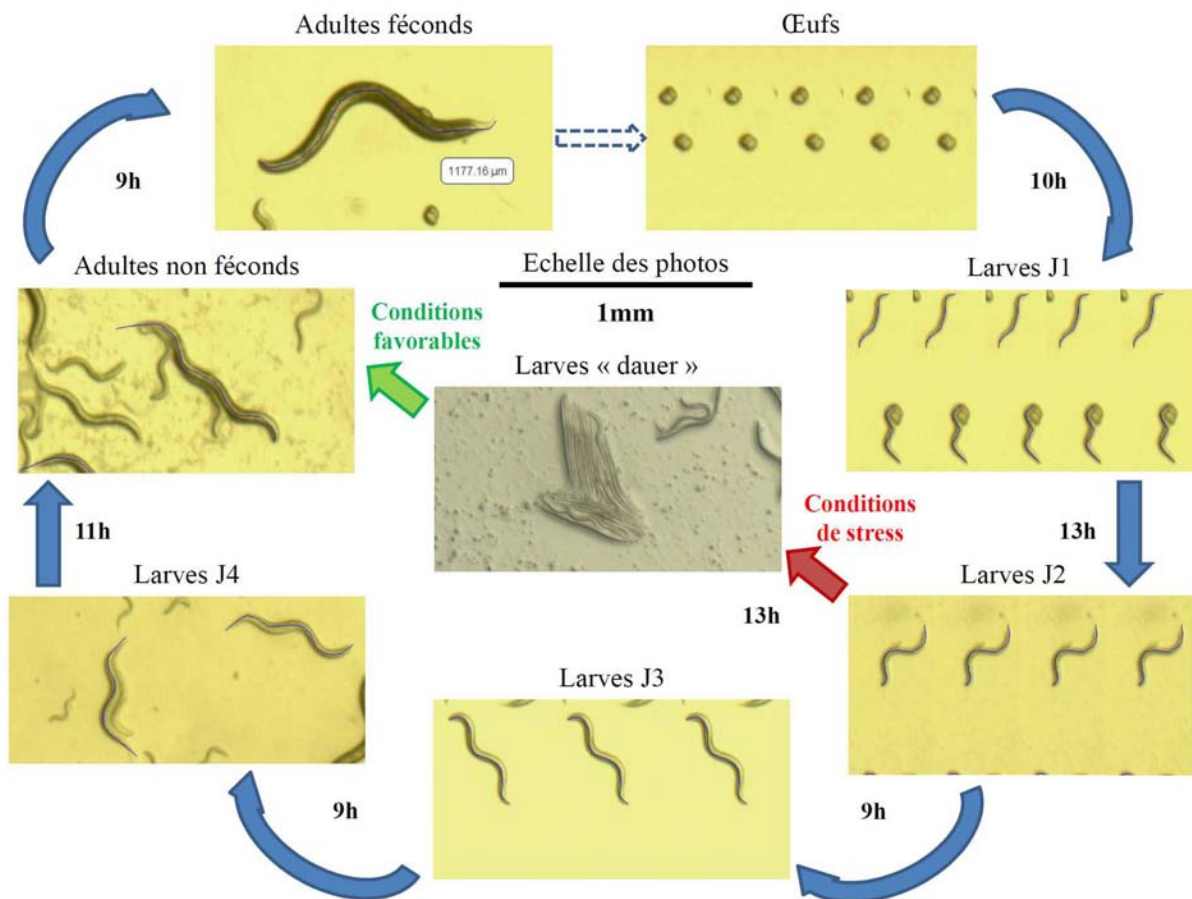


Figure 5 : Cycle de vie du nématode *C. elegans*.

MATERIELS ET METHODES

Les élevages de nématodes sont maintenus sur une gélose spécifique (*i.e.* gélose Nematode Growth Medium), préalablement coulée à une épaisseur d'environ 1 cm dans des boîtes de Pétri stériles (50x20 mm, polystyrène, Thermo Fischer Sterilin). Les élevages sont maintenus à l'obscurité dans une chambre thermostatée à 20 °C (Figure 6). Afin d'assurer la nutrition des nématodes, et préalablement à leur introduction, la gélose est recouverte, en conditions stériles, d'un tapis de bactéries *E. coli* OP50 (ISO 10872, 2010). Ce tapis est obtenu en étalant 200 µl d'une suspension bactérienne dont la turbidité est de 1000 FAU, à l'aide d'une spatule de Drigalski. Cette suspension est obtenue à partir d'une culture nocturne (*i.e.* inoculation de 20 µl de culture stock décongelée (voir I.1.1.4) pour 50 ml de milieu de croissance LB (LB commercial, Sigma Aldrich), incubé 17 h à 37 °C sous agitation dans un bain-marie ; ISO 10872, 2010). Les boîtes de Pétri contenant la gélose et le tapis bactérien sont, par la suite, scellées hermétiquement à l'aide de film plastique étirable. Celles-ci peuvent être ainsi conservées plusieurs semaines à 20 °C à l'obscurité. Les boîtes préparées au préalable sont utilisées directement lors du repiquage des nématodes.

Quelle que soit la nature de la matrice testées (*e.g.* liquide, sol ou sédiment), les essais utilisant *C. elegans* comme organisme modèle nécessitent de disposer d'organismes juvéniles de stade J1 issus de la même cohorte. Afin d'obtenir des cohortes synchrones, les nématodes sont repiqués d'une gélose à l'autre. Pour cela, environ 1 cm² de gélose NGM provenant d'une boîte de Pétri préparée trois semaines auparavant, où seules des larves au stade « dauer » sont présentes, est remplacé au centre d'une gélose contenant un tapis frais d'*E. coli*. Après trois semaines et sans ajout de nourriture, les boîtes ainsi préparées ne contiennent que des larves « dauer ». L'opération de repiquage est réalisée chaque semaine.

Après environ 24 h d'incubation à 20 °C des boîtes de Pétri fraîchement repiquées, les larves « dauer » sont devenues des adultes hermaphrodites féconds. Après environ 96 h d'incubation, des juvéniles de stade J1 sont également présents. Deux boîtes de Pétri suffisent normalement afin de disposer d'un nombre suffisant d'organismes juvéniles J1 synchrones pour mettre en place un essai ; ceux-ci étant obtenus après filtration. D'une manière générale, quatre boîtes de Pétri sont repiquées de façon hebdomadaire afin de pallier d'éventuelles contaminations des élevages (*i.e.* bactéries, champignons).

MATERIELS ET METHODES

I.1.1.4. Maintien de la souche de bactérie *E. coli* OP50 au laboratoire

Des aliquotes concentrées de bactéries *E. coli* OP50 sont conservées à -20 °C. Ces aliquotes sont obtenues après remise en croissance des bactéries obtenues auprès du CGC dans du milieu LB pendant 17 h à 37 °C sous agitation. Puis 800 µl de cette culture (*e.g.* à une concentration correspondant à une turbidité de 1000 FAU) sont introduits dans des tubes Eppendorf (1,5 mL, polypropylène) contenant préalablement 200 µl de glycérol stérilisés par l'autoclave (20 minutes, 121 °C). Les tubes contenant le mélange de glycérol et de culture bactérienne sont conservés au congélateur à -20 °C. Ces aliquotes sont renouvelées tous les six mois (ISO 10872, 2010).

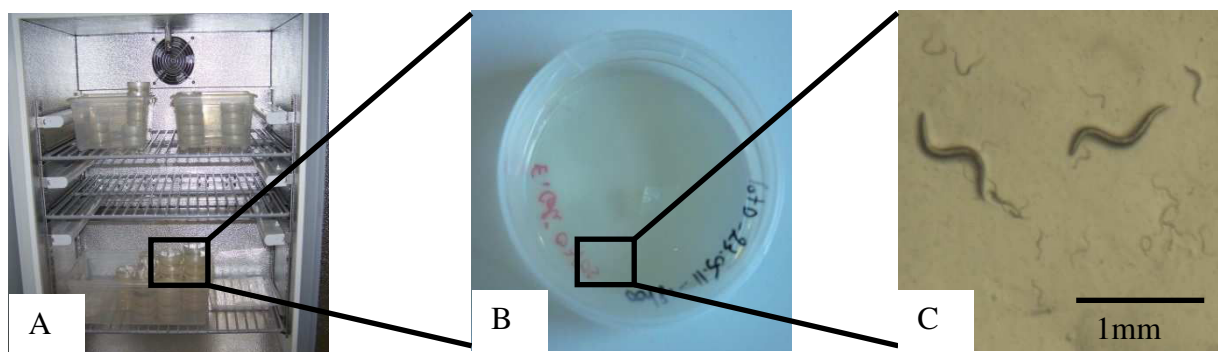


Figure 6 : Illustration de l'élevage de *C. elegans* au laboratoire.

A : enceinte thermostatée à 20 °C; B : boîte de Pétri contenant la gélose NGM et les organismes; C : *C. elegans*.

I.1.2. L'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer*

I.1.2.1. Habitat et morphologie

L'acarien *H. aculeifer* (Acaria) fait partie de la famille des Laelapidae, de l'ordre Mesostigmata. C'est un arachnide vivant à la surface des sols, d'une longueur d'environ 1 mm une fois adulte. Dans la nature, ce prédateur ubiquiste (*i.e.* présence en Europe, en Amérique du Nord et en Asie) peut être retrouvé dans différents types d'habitats tels que les prairies, les landes ou encore les agro-écosystèmes (Krogh & Axelsen, 1998 ; Manu, 2008 ; Zhang, 2003). Son régime alimentaire n'est pas spécifique. Il peut se nourrir aussi bien de nématodes, d'enchytréides, de collembolles ou encore d'autres acariens. Lorsque la nourriture vient à manquer, cet acarien prédateur se propage par phorésie (Manu, 2008).

MATERIELS ET METHODES

D'un point de vue anatomique, *H. aculeifer* est segmenté en deux parties : le gnathosoma et l'idiosoma (Figure 7). Le premier comprend les chélicères, qui servent à percer les proies et y injecter des sucs digestifs, ainsi que les palpes, qui servent à manipuler les proies. L'idiosoma est la partie ovoïde comprenant les 4 paires de pattes, le bouclier dorsal, l'appareil reproducteur ainsi que le système digestif. La première paire de pattes, à ne pas confondre avec des antennes, sert à la chimiotaxie. Cet acarien ne présente pas d'appareil respiratoire, les échanges gazeux étant réalisés à travers la cuticule (Zhang, 2003). De plus, cet invertébré présente un mode de reproduction parthénogénétique particulier : l'arrhénotoquie. Pour ce mode de reproduction, largement répandu chez les acariens, les œufs non fécondés donnent naissance à des mâles haploïdes, alors que les œufs fécondés donnent naissance à des femelles diploïdes (Cabrera *et al.*, 2009).

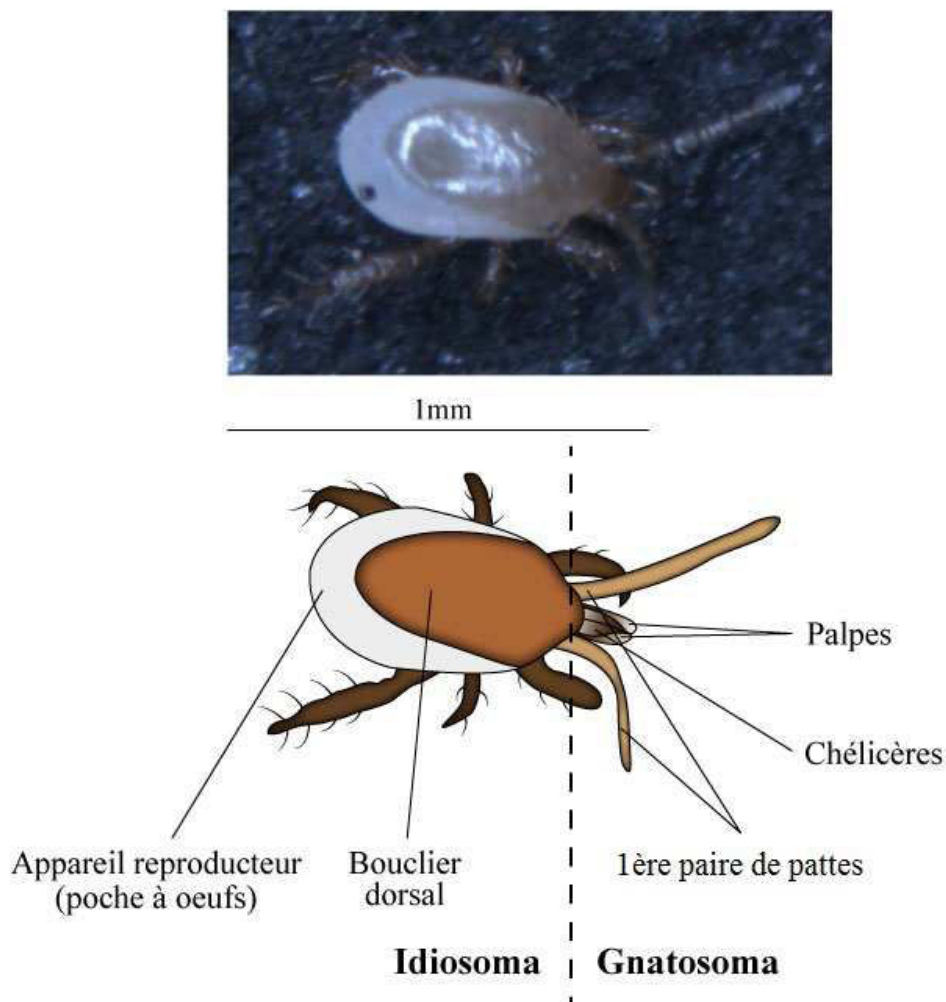


Figure 7 : Morphologie d'une femelle adulte *H. aculeifer*.

MATERIELS ET METHODES

I.1.2.2. Origine des souches d'acariens prédateurs et d'acariens du fromage

La souche d'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer* ainsi que la souche de proies, l'acarien du fromage *Tyrophagus putrescentiae*, sont des souches naturelles sauvages. Celles-ci nous ont été fournies par le laboratoire ECT Oekotoxikologie (Flörsheim, Allemagne), qui utilise ces souches depuis plusieurs années.

I.1.2.3. Cycle de vie et maintien des acariens prédateurs au laboratoire

En laboratoire, le temps de génération de *H. aculeifer* est d'environ 30 jours à 20 °C, lorsque les organismes sont nourris *ad libitum*. La durée de vie des adultes est d'environ 2 mois (OCDE, 2008). Après l'éclosion des œufs, son cycle de vie est divisé en 3 stades larvaires entrecoupés par des mues. Le 1^{er} stade dit « larve » (*e.g.* taille moyenne : 312 µm) pour lequel les organismes possèdent 3 paires de pattes. Le 2nd dit « deutonymphe » (*e.g.* taille moyenne : 360 µm) avec apparition de la quatrième paire de pattes. Le 3^{ème} dit « protonymphe » (*e.g.* taille moyenne : 655 µm), pour lequel les individus ont pratiquement atteint la taille adulte, mais ne présentent pas encore le bouclier dorsal en chitine caractéristique de ceux-ci (Figure 8). Les tailles des différents stades de vie ont été mesurées au laboratoire sur 10 individus issus d'élevages d'organismes synchrones (loupe binoculaire grossissement 12X, logiciel d'analyse d'image Saisam, Micro-vision Instrument). Ces mesures ont été effectuées aux différents temps composant le cycle de vie de *H. aculeifer*.

Les élevages d'acariens *H. aculeifer* sont maintenus dans des cristallisoirs en verre de diamètre 15 cm contenant 150 g d'un mélange (ratio 9:1) de plâtre fin (plâtre dont l'émission de substances volatiles dans l'air intérieur est classée A+) et de charbon actif en poudre (n° CAS : 7440-44-0, Fisher Scientific). Ce mélange, une fois pris en masse et séché à l'air libre, est hydraté à 50 % (poids sec) avec de l'eau déminéralisée (OCDE, 2008). Les cristallisoirs contenant les acariens sont, par la suite, recouverts d'un film plastique alimentaire afin de maintenir l'humidité du substrat. Celle-ci est vérifiée une fois par semaine par pesée, et réajustée si nécessaire. Ces cristallisoirs sont maintenus à l'obscurité dans une chambre thermostatée à 20 °C (±2 °C) (Figure 9). Les acariens prédateurs sont nourris trois fois par semaine.

MATERIELS ET METHODES

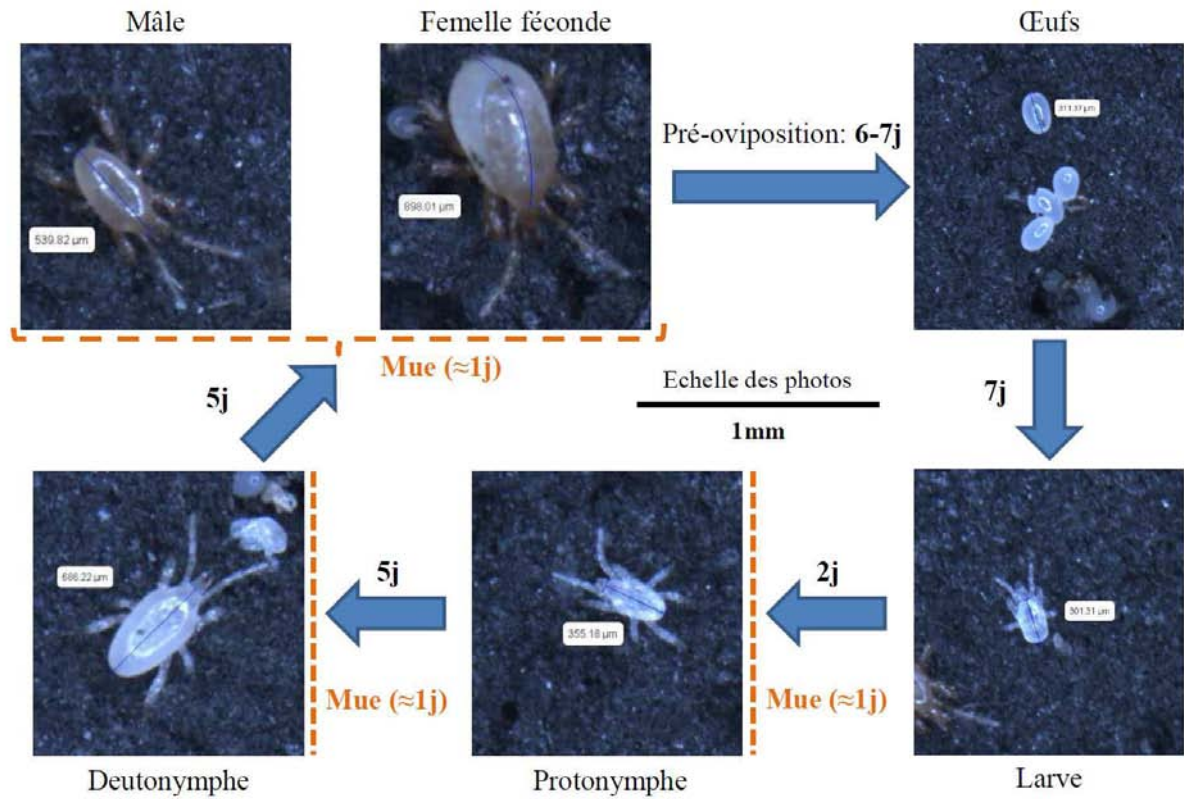


Figure 8 : Cycle de vie de l'acarien prédateur *H. aculeifer*.

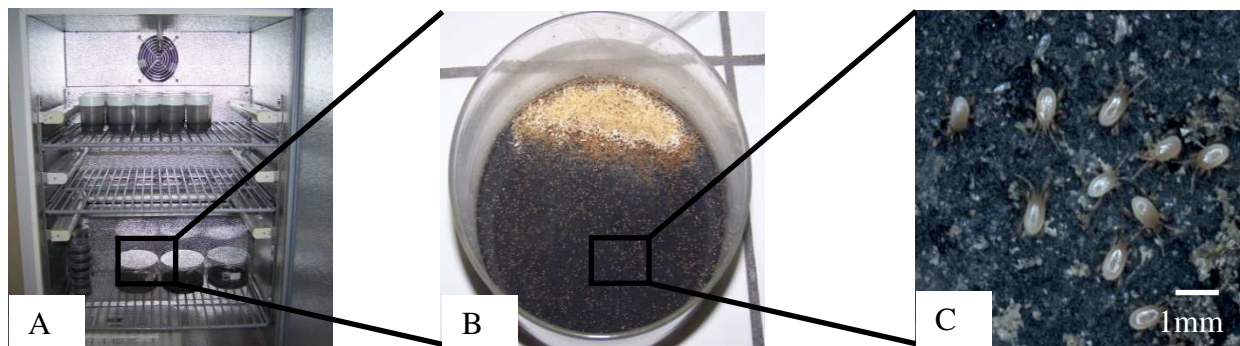


Figure 9 : Illustration de l'élevage de l'acarien prédateur *H. aculeifer* au laboratoire.

A : enceinte thermostatée à 20 °C ; B : boîte en verre contenant le mélange de plâtre/charbon actif (ratio 9:1) hydraté et les organismes ; C : *H. aculeifer*.

MATERIELS ET METHODES

Les essais avec *H. aculeifer* nécessitent de disposer de femelles adultes fécondes issues de la même cohorte (OCDE, 2008). Pour cela, la synchronisation des acariens prédateurs est réalisée dans des boîtes en polystyrène (diamètre 5 cm, hauteur 7,5 cm, Fischer Scientific) fermées hermétiquement à l'aide d'un couvercle, et contenant 20 g d'un mélange de plâtre et de charbon actif préparé de la même manière que pour les élevages. La synchronisation des organismes est réalisée en transférant, à l'aide d'une pompe d'aspiration, 25 adultes femelles issues des élevages sur une nouvelle boîte contenant le substrat hydraté. Après sept jours, les femelles adultes sont retirées des boîtes pour ne laisser que les œufs. Ces boîtes sont ensuite incubées pendant une période de 30 jours, à l'issue de laquelle des individus adultes (*i.e.* mâles et femelles) féconds sont obtenus. Cette opération est réalisée une fois par semaine, à raison de quatre boîtes d'élevages synchrones. Ce nombre a été choisi afin de pallier à des reproductions potentiellement faibles des femelles adultes prélevées des élevages, ainsi que des ratios de mâles potentiellement élevés. D'une manière générale, deux boîtes permettent d'avoir un nombre suffisant de femelles fécondes synchrones pour réaliser un essai.

I.1.2.4. Choix et maintien des organismes utilisés en tant que proies

L'acarien *H. aculeifer* est un prédateur. Il est par conséquent nécessaire de fournir d'autres organismes en tant que proies, à la fois pour les élevages, mais aussi lors des essais. Trois nourrissages par semaine sont suffisants. Plusieurs espèces adaptées à ce prédateur sont proposées dans la ligne directrice 226 de l'OCDE (2008) : les collemboles *Folsomia candida/fimetaria* ou l'acarien du fromage *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank).

Les espèces de collemboles proposées ont un cycle de vie d'environ quatre semaines à 20 °C. Les collemboles adultes étant trop gros pour être capturés efficacement par les acariens prédateurs, et les juvéniles n'étant pas assez nourrissants, il est par conséquent nécessaire de fournir des collemboles âgés de 16 à 19 jours pour mener les essais (Krogh & Axelsen, 1998). D'autre part, une centaine de juvéniles par réplicat doit être apportée lors de chaque nourrissage des acariens (Krogh & Axelsen, 1998). Cela implique la nécessité d'avoir un grand nombre de collemboles synchrones, afin de pouvoir nourrir *ad libitum* les acariens prédateurs.

Les acariens du fromage *T. putrescentiae* ont quant à eux un cycle de vie d'environ trois semaines à 25 °C. Tous les stades de vie, de l'œuf à l'adulte, peuvent être utilisés pour

MATERIELS ET METHODES

nourrir *H. aculeifer*. De plus, il est possible d'obtenir une grande quantité d'acariens du fromage en un temps restreint (*i.e.* population multipliée par environ 300 à 25 °C en six semaines sur un substrat composé de levure de boulanger ; Ree & Lee, 1997). Nous avons donc choisi d'utiliser les acariens *T. putrescentiae* en tant que proies, de par la possibilité d'utiliser différents stades de vie lors des nourrissages de *H. aculeifer*, et pour leur temps de génération plus court par rapport à celui des collemboles. Cependant, aucune quantité de ces organismes n'est indiquée dans la ligne directrice de l'OCDE (2008) pour mener les essais avec *H. aculeifer*. Avec la pratique, une quantité approximative de 50 à 100 individus *T. putrescentiae* par nourrissage, tous stades confondus (estimation visuelle), s'est avérée adéquate pour nourrir les 10 femelles *H. aculeifer* d'un récipient au cours des 14 jours d'essai. De plus, il a été observé qu'une quantité trop importante de nourriture, incluant le substrat des proies composé de levure, pouvait entraîner l'apparition rapide de moisissures. Afin d'éviter une accumulation de levure dans les élevages et lors des essais, il est par conséquent nécessaire d'éliminer régulièrement le surplus dans les boîtes incubées.

Au laboratoire, la souche d'acarien *T. putrescentiae* est maintenue à l'obscurité dans une chambre thermostatée à 23 °C (± 2 °C) dans des cristallisoirs en verre de diamètre 7 cm. Ceux-ci contiennent une épaisseur d'environ 1 cm de levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) (levure commerciale, Dr Oetker) finement broyée et hydratée à 20 % (poids sec) avec de l'eau déminéralisée (Figure 10). Un quart du substrat est renouvelé une fois par semaine. Ces cristallisoirs sont scellés hermétiquement avec du film plastique alimentaire puis placés dans un plus grand récipient fermé contenant environ 1 cm d'eau du réseau, afin de conserver une forte humidité ambiante (supérieure à 60 % ; Ree et Lee, 1997).

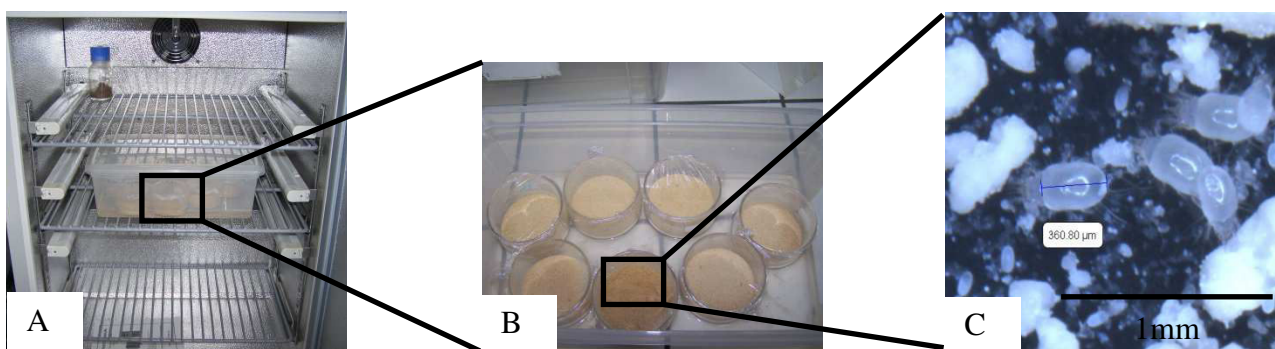


Figure 10 : Illustration de l'élevage de l'acarien *T. putrescentiae* au laboratoire.

A : enceinte thermostatée à 23 °C ; B : conteneur en plastique rempli d'eau (≈ 1 cm) contenant les boîtes en verre avec les organismes ; C : *T. putrescentiae*.

I.2. Matrices utilisées

I.2.1. Les sols

I.2.1.1. Présentation des sols artificiels et naturels

Au cours des travaux de thèse, des sols de textures différentes ont été utilisés. Parmi ceux-ci, sont intégrés des sols de référence : le sol artificiel ISO et le sol naturel LUFA 2.2. Ces substrats ont été utilisés en tant que témoins lors de la réalisation des différents essais.

Le sol artificiel est une matrice préparée au laboratoire à partir d'éléments distincts. Cette matrice est obtenue en mélangeant 70 % de sable (granulométrie : 50-200 μm), 10 % de tourbe broyée finement et 20 % de kaolin. Le pH est ajusté à 6,0 ($\pm 0,5$) avec du carbonate de calcium. D'autre part, un sol à 5 % de tourbe et 75 % de sable a également été utilisé au cours d'expérimentations avec le nématode et l'acarien prédateur, permettant de réduire le taux de matière organique de cette matrice.

Le sol naturel de référence LUFA 2.2 est un sol commercialisé, qui est distribué par : Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungsanstalt Speyer.

Les quatre autres sols naturels étudiés ont été sélectionnés car représentatifs de sols faiblement anthropisés. Ceux-ci proviennent d'une parcelle agricole (sol A), d'une forêt (sol F) ainsi que de deux jardins appartenant à des particuliers (sols J et JM). La parcelle agricole a été sélectionnée car cultivée sur un principe d'agriculture raisonnée, limitant ainsi les impacts environnementaux et l'utilisation de pesticides. De même, la parcelle forestière a été sélectionnée car peu impactée par des actions humaines. Le sol agricole ainsi que le sol de forêt et un sol de jardin (sol J) proviennent de l'Oise, alors que le second sol de jardin (sol JM) provient de Moselle. Ces sols ont été prélevés à une profondeur d'environ 10 cm, à raison de 3 kg (poids humide) par parcelle. Puis ceux-ci ont été séchés à l'air libre (20 °C) pendant une semaine, permettant également de les défauner, et tamisés à 4 mm afin d'enlever les particules grossières. Ces sols ont été par la suite stockés dans des contenants hermétiques (20 °C).

MATERIELS ET METHODES

I.2.1.2. Caractérisation des sols

Un dosage des ETM (*i.e.* Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Tl et Zn) a été réalisé sur l'ensemble des sols (Tableau 11), afin de s'assurer que les teneurs en ETM dans ces sols étaient proches du fond géochimique moyen français. On peut noter que parmi les sols étudiés, le sol JM contient une charge globale en métaux plus importante par rapport aux autres sols naturels.

L'ensemble des sols utilisés ont également été caractérisés en termes de texture et de paramètres physico-chimiques (Tableau 12). Afin de positionner les textures des sols les uns par rapport aux autres, celles-ci ont été replacées dans un triangle des textures français (Figure 11). Ces analyses montrent que les sols étudiés représentent une gamme de textures, allant d'une texture sableuse (*i.e.* sol LUFA 2.2) à argileuse (*i.e.* sol JM).

I.2.1.3. Utilisation des sols

Les sols décrits précédemment ont été utilisés au cours de différentes expérimentations :

- Pour le sol ISO à 10 % de tourbe : comparaison de la réponse de *C. elegans* entre trois sols de référence (*i.e.* LUFA 2.2, ISO 10 % et ISO 5 %) ; effets inhibiteurs potentiels des éluats issus des mélanges de MF et de sol artificiel sur *C. elegans* ;
- Pour le sol ISO à 5 % de tourbe : comparaison de la réponse de *C. elegans* entre trois sols de référence (*i.e.* LUFA 2.2, ISO 10 % et ISO 5 %) ; évaluation des rendements d'extraction pour *H. aculeifer* ; effets inhibiteurs potentiels des ETM en substances seules ainsi qu'en mélange sur *H. aculeifer* ; effets inhibiteurs potentiels des MF sur *H. aculeifer* ;
- Pour le sol LUFA 2.2 : comparaison de la réponse de *C. elegans* entre trois sols de référence (*i.e.* LUFA 2.2, ISO 10 % et ISO 5 %), évaluation des rendements d'extraction pour *C. elegans* et *H. aculeifer* ; effets inhibiteurs potentiels des ETM en substances seules ainsi qu'en mélange sur *C. elegans* ; effets inhibiteurs potentiels des ETM en mélange sur *H. aculeifer* ; effets inhibiteurs potentiels des MF sur *C. elegans* et *H. aculeifer* ; évaluation des éluats issus des mélanges de MF et de sol naturel sur *C. elegans* ;
- Pour les sols naturels (*i.e.* agricole, de forêt, de jardin J et de jardin JM) : évaluation des rendements d'extraction pour *C. elegans* et *H. aculeifer*.

MATERIELS ET METHODES

Tableau 11 : Résumé des dosages de métaux dans le sol artificiel et les sols naturels

Sol	[C] mesurée (mg/kg)								
	Cd	Co	Cr	Cu	Mo	Ni	Pb	Tl	Zn
Artificiel ISO 10%	< 0,02	< 1	5,1	3,3	0,4	1,5	5,8	0,04	5,1
LUFA 2.2	0,1	2,7	28,3	5,1	0,26	9,3	28,2	0,6	24
Agricole	0,3	2,2	25,3	10	0,9	9,9	22,8	0,2	38,2
Forêt	0,5	4,5	44,4	12,9	0,5	11,7	33,8	0,24	203
Jardin JM	0,5	25,6	83,7	56,6	3,2	68,4	54,5	0,5	229
Jardin J	0,3	3,7	32	8,8	0,9	12,1	14,4	0,2	68
Fond géochimique moyen des sols français*	0,4	17,1	75	14,9	n.d.	41,3	64,8	n.d.	149

* : d'après Baize, 2000 ; n.d. : non déterminé

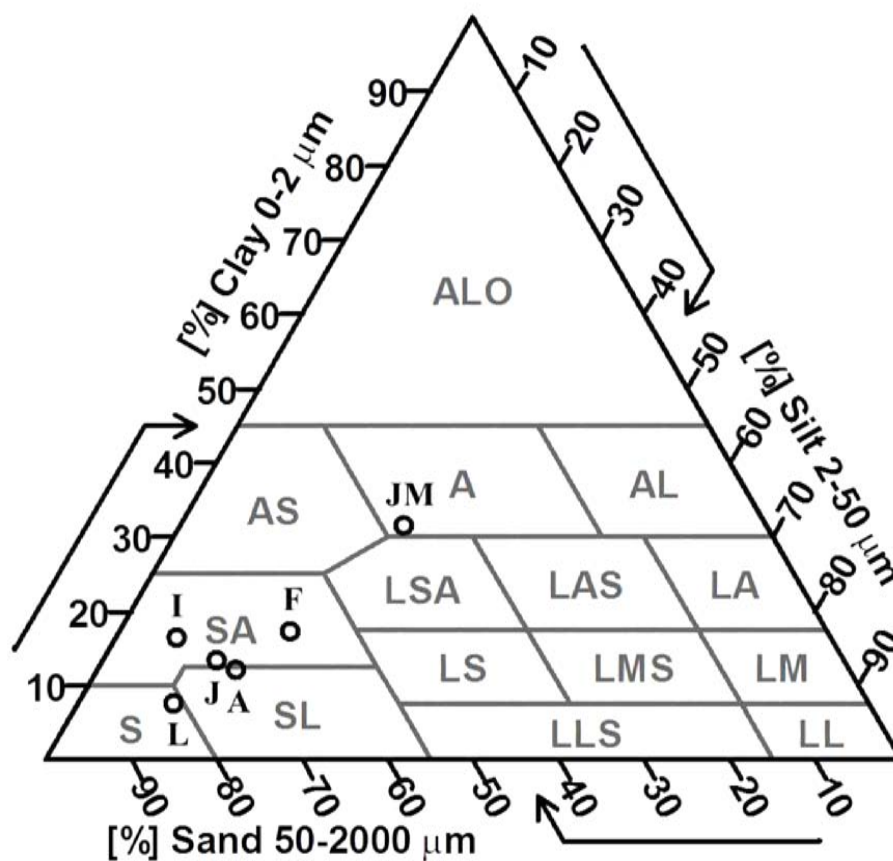


Figure 11 : Triangle des textures français (Richer de Forges, 2010).

Abréviations des sols : I : sol artificiel ISO ; L : LUFA 2.2 ; A : agricole ; F : forêt ; JM : jardin de Moselle ; J : jardin de l'Oise.

MATERIELS ET METHODES

Tableau 12 : Texture et caractéristiques physico-chimiques des sols naturels et artificiel.

Sol	Argiles (g/kg)	Limons fins (g/kg)	Limons grossiers (g/kg)	Sables fins (g/kg)	Sables grossiers (g/kg)	C orga (g/kg)	Matière organique (g/kg)	pH eau	pH KCl	CEC (cmol/ kg)	CRE (%)	Type de texture (Richer de Forges, 2010)	Type de texture (Classification IUSS*)
Artificiel ISO	165	31	39	665	100	25,5	44	n.d.	6,1 [#] (±0,3)	6,4	60	Sable argileux	Sable limoneux
Naturel LUFA 2.2	75	63	48	220	594	6,5	19,3	5,5 [#] (±0,2)	5,3 [#] (±0,3)	10	45	Sable/Sable limoneux	Limono-sableux
Agricole	122	111	50	253	464	13,6	23,6	8,2	7,9	7	40	Sable limoneux	Sable limoneux
Forêt	174	82	117	351	276	39,5	68,4	8,2	7,7	15	70	Sable argileux	Sable argileux limoneux
Jardin JM	315	170	92	87	336	37,7	65,3	8,0	7,5	16,5	65	Argile	Légèrement argileux
Jardin J	134	65	68	270	463	6,67	11,5	8,6	8,0	6,4	35	Sable argileux	Sable limoneux

* IUSS : International Union of Soil Sciences ; [#] : valeurs moyennes ; n.d. : non déterminé

Argiles : < 2 µm ; Limons fins : 2 – 20 µm ; Limons grossiers : 20 – 50 µm ; Sables fins : 50 – 200 µm ; Sables grossiers : 200 – 2000 µm

MATERIELS ET METHODES

I.2.2. Matières fertilisantes

I.2.2.1. Description des matières fertilisantes étudiées

Un des objectifs principaux des travaux de thèse a été d'évaluer les effets écotoxiques de différentes MF (Figure 12). Celles-ci ont été sélectionnées car représentatives de grandes catégories utilisées en agriculture. Les matières étudiées proviennent de l'industrie (*i.e.* boue de désencrage, cendres de matériaux compostés), d'excréments d'animaux d'élevage (*i.e.* fumier bovin), du retraitement des eaux usées (*i.e.* quatre boues de station d'épuration ayant subi différents traitements), ainsi que du compostage de déchets (*i.e.* compost de déchets ménagers et compost issu d'un mélange de boue de station d'épuration et de déchets verts). Le descriptif des traitements de ces neuf matières est détaillé dans le Tableau 13.


D'autre part parmi ces matières, certaines (*i.e.* boue chaulée, boue de désencrage, fumier bovin, compost d'ordures ménagères, cendres de matériaux compostés) ont également été évaluée lors du programme de recherche mis en place par l'ADEME et l'ANSES.

Tableau 13 : Descriptif des traitements appliqués aux MF étudiées

Matière fertilisante	Traitement
Boue chaulée	Boue urbaine chaulée par du chlorure ferrique et déshydratée par filtre presse
Boue de désencrage	Boue de désencrage de papèterie
Fumier bovin	Aucun traitement
Compost de déchets	Compost d'ordures ménagères résiduelles (non triées à la source)
Cendres	Cendres issues de l'incinération de boues de station d'épuration, de déchets de bois et de déchets provenant de la production de papier
Boue digérée et séchée	Boue digérée, épaissie, conditionnée thermiquement et déshydratée par filtre-presse
Boue pelletée	Boue chaulée, séchée et compactée sous forme de granulés
Boue digérée	Boue digérée, épaissie et conditionnée thermiquement
Compost de boue	Compost de matières d'intérêt agronomique issues du traitement de l'eau et de broyats ligneux avec engrais

MATERIELS ET METHODES

I.2.2.2. Caractérisation des matières fertilisantes

Les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les taux d'application respectifs des différentes MF sont présentés dans le Tableau 14. Ces caractéristiques correspondent aux données requises dans le « Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation » (n°50644#01). Celles-ci sont catégorisées de la manière suivante : éléments fertilisants majeurs (*i.e.* N, P₂O₅, K₂O), éléments fertilisants secondaires (*i.e.* CaO, MgO, Na₂O), oligo-éléments (*i.e.* Cu, Zn), ETM (*i.e.* As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Se) et CTO (*i.e.* fluoranthène, benzo(b)fluoranthène, benzo(a)pyrène,  7 PCB).

En complément des analyses physico-chimiques, et afin de démontrer l'innocuité des MF vis-à-vis de l'homme, les matières susceptibles de comporter de la matière organique d'origine végétale et/ou animale nécessitent de réaliser des analyses microbiologiques (*i.e.* énumération de micro-organismes aérobies à 30°C, d'entérocoques, de coliformes, de *Clostridium perfringens* (Veillon & Zuber), de *Salmonella* (Lignieres), de *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), de levures, de moisissures ainsi que d'œufs et de larves de nématodes).

MATERIELS ET METHODES



Figure 12 : Illustration des matières fertilisantes étudiées.

A : boue chaulée ; B : boue de désencrage ; C : fumier bovin ; D : compost de déchets ; E : cendres ; F : boue digérée et séchée ; G : boue pelletée ; H : boue digérée ; I : compost de boue.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 14 : Caractéristiques physico-chimiques des matières fertilisantes étudiées.

Caractéristique	Unité	Boue chaulée	Boue de désencrage	Fumier bovin	Compost de déchets	Cendres	Boue digérée et séchée	Boue pelletée	Boue digérée	Compost de boue
Taux d'application	T/ha	3 (MS)	5 (MS)	10 (MB)	5 (MS)	3 (MS)	8 (MB)	4 (MB)	12 (MB)	8 (MB)
Matière sèche	%	22,1	56	91,3	49,2	99,6	51,1*	87,3*	24,9*	60,1
CRE	%	300	100	290	175	50	135	50	280	120
pH H ₂ O		9,3	8,3	8,6	7,3	12,6	8,4*	10,4*	7,8*	8,1
MO	g/kg MS	508	263	866	638	< 8	239*	550*	590,8*	344
N total	g/kg MS	42,6	3,4	18,5	14,6	0,8	18,8*	50,2*	15,8*	19,8
C organique	g/kg MS	277	163	433	319	< 0,05	274*	276*	98,2*	n.d.
P ₂ O ₅	g/kg MS	36,6	1,9	8,5	7,6	8,3	101,8*	39,6*	25,3*	35,6
K ₂ O	g/kg MS	2,55	0,7	33,3	12,2	8,1	3,9*	3,4*	0,5*	13,7
CaO	g/kg MS	148	403	18,7	60	507	135*	165,2*	36,5*	103
MgO	g/kg MS	7	4,2	6,9	5,9	24,1	14,5*	5,2*	1,4*	4,7
SO ₃	g/kg MS	35,6	1,7	6,8	5,9	11	91,8*	n.d.	n.d.	23,6
As	mg/kg MS	4,6	0,4	0,4	3,9	10,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cd	mg/kg MS	1,74	0,1	0,1	0,7	3,3	4,8*	3,5*	1,1*	1
Cr	mg/kg MS	21,9	4,5	1,6	36,7	60,3	61,6*	29*	56,1*	123
Cu	mg/kg MS	433	79,7	17	96,8	383	620,2*	186,2*	536*	124
Hg	mg/kg MS	0,5	< 0,01	0,03	0,2	0,6	2,9*	1,1*	1,6*	0,3
Ni	mg/kg MS	17,8	1,9	2,7	26,1	42,3	31,6*	22,7*	28,9*	21,8
Pb	mg/kg MS	39,3	3,3	< 2	76,8	492	172,8*	75,3*	97*	74,5

MATÉRIELS ET MÉTHODES

(Suite du tableau 14)

Caractéristique	Unité	Boue chaulée	Boue de désencrage	Fumier bovin	Compost de déchets	Cendres	Boue digérée et séchée	Boue pelletée	Boue digérée	Compost de boue
Se	mg/kg MS	1,9	< 1,5	< 1,5	< 1,5	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	3,2
Zn	mg/kg MS	458	25,1	65,7	395	1549	1946,4*	834,1*	1188*	639
Benzo(b)fluoranthene	mg/kg MS	0,1	< 0,05	4,1	< 0,05	< 0,05	0,37*	0,5*	0,22*	0,45
Benzo(a)pyrene	mg/kg MS	0,06	< 0,05	4,1	< 0,05	< 0,05	0,28*	0,37*	0,19*	0,2
Fluoranthene	mg/kg MS	0,11	< 0,05	47	0,3	< 0,05	0,83*	0,77*	0,43*	0,84
PCB 28	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,01
PCB 52	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,012
PCB 101	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,01
PCB 118	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,01
PCB 138	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,01
PCB 153	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,011
PCB 180	mg/kg MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,01
Σ 7 PCB	mg/kg MS	< 0,07	< 0,07	< 0,07	< 0,14	< 0,07	0,13*	0,1*	0,08*	< 0,07

MS : matière sèche ; MB : matière brute ; n.d. : non déterminé ; * : données moyennes annuelles de 2012.

MATERIELS ET METHODES

I.3. Méthodes analytiques

Les mesures de pH ainsi que de la capacité de rétention d'eau (CRE) des sols ont été réalisées au laboratoire. Les autres analyses physico-chimiques (*e.g.* CEC, analyse granulométrique, dosage de métaux, ...) ont été réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Sols (INRA, Arras). Les différentes méthodes analytiques sont résumées et décrites succinctement dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Résumé des méthodes analytiques suivies pour la caractérisation des matières fertilisantes

Analyse	Principe	Référence
pH	Mesure du pH de l'échantillon solide dilué dans de l'eau ou du KCl (ratio solide:liquide de 1:5).	ISO 10390, 2005
CRE	Différence de masse entre l'échantillon saturé en eau et l'échantillon séché à 105 °C, rapportée à la masse sèche de l'échantillon.	ISO 11269-2, 2012
CEC	Méthode Metson - Percolation de l'échantillon avec une solution d'acétate d'ammonium, puis rinçage à l'alcool. La CEC représente la mesure de NH_4^+ fixé.	NF X 31-130, 1999
Matière organique	Différence de perte de matière entre l'échantillon sec et une calcination à 550 °C.	ISO 10694, 1995
Carbone organique	Digestion acide de l'échantillon (perte des carbonates) puis différence de perte de matière entre l'échantillon sec et une calcination à 550 °C.	ISO 10694, 1995
Granulométrie	Digestion au peroxyde d'hydrogène (élimination des agrégats) et digestion acide de l'échantillon puis mise en suspension des particules minérales. La granulométrie est déterminée par une méthode gravimétrique (fraction inférieure à 2 mm).	NF X 31-107, 2003
Dosage des ETM (Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Tl et Zn)	Calcination de l'échantillon à 450 °C puis mise en solution acide (acide fluorhydrique et perchlorique), évaporation des acides et reprise du résidu par de l'acide chlorhydrique. Dosage des ETM par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) ou par spectrométrie d'émission atomique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-AES).	NF X 31-147, 1996 NF EN ISO 17294-2, 2003 NF EN ISO 22036, 2008
Dosage d'éléments fertilisants	Mise en solution à l'eau et dosage des éléments fertilisants (N, P, K) par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS), par émission atomique de flamme (EAF) ou par spectrocolorimétrie.	Méthode interne INRA

Chapitre II. Méthodes et protocoles utilisés

La première partie de ce chapitre présente les protocoles d'essai des deux organismes utilisés au cours des travaux de thèse. La seconde partie de ce chapitre introduit les protocoles de préparation des échantillons, qui comprennent les mélanges de sols et de métaux, les mélanges de sol et de MF ainsi que le protocole de lixiviation. La dernière partie récapitule les analyses statistiques utilisées.

II.1. Protocoles d'essai

II.1.1. Essai d'inhibition de la croissance, de la fertilité et de la reproduction du nématode *C. elegans*

II.1.1.1. Principe général de l'essai

La détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction du nématode *C. elegans* est définie par la norme ISO 10872 (2010). Le principe général de l'essai consiste à introduire, à l'aide d'une pipette pasteur effilée, 10 organismes juvéniles dans des échantillons aqueux, de sol ou de sédiment (*e.g.* quatre réplicats par condition) contenant différentes dilutions d'échantillon à tester et préparées avec le substrat témoin. Les critères d'effet de mortalité, de croissance et de reproduction sont évalués durant un cycle de vie complet du nématode à 20 °C (*i.e.* 96 h). Compte tenu du mode de vie de *C. elegans* dans l'eau interstitielle des sols, cet essai est applicable à différents types de matrices (*i.e.* solides et liquides). Des protocoles distincts sont par conséquent proposés pour chaque matrice. La substance de référence préconisée pour les essais en milieu aqueux est le chlorure de benzyldimethylhexadecylammonium (C₂₅H₄₆ClN, n° CAS : 122-18-9), abrégé sous la dénomination BAC C-16.

II.1.1.2. Obtention des organismes pour les essais

Afin d'isoler les juvéniles de stade J1, les organismes présents sur la boîte de Pétri, provenant d'élevages synchronisés, sont mis en suspension dans du milieu M9 (*e.g.* 6 mL de milieu M9 pour une boîte de Pétri), puis cette suspension est filtrée à travers un filtre de maille 5 µm (ISO 10872, 2010). Cette étape permet de séparer les organismes au stade J1 des organismes à un stade de développement plus avancé.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'évaluation des effets sur la croissance, les larves de stade J1 non utilisées lors des essais sont colorées au rose de Bengale (*e.g.* 0,3 g/L) et leur croissance est arrêtée par traitement thermique (*e.g.* 80 °C pendant 10 min.). Avant chaque essai, 30 larves de stade J1 sont sélectionnées aléatoirement parmi les individus, puis mesurées afin de calculer la taille moyenne des juvéniles à l'introduction.

II.1.1.3. Critères de validité

Afin de juger de l'acceptabilité des essais et quelle que soit la matrice considérée, certains critères de validité doivent être satisfaits au cours des essais en condition témoin. Tout d'abord, la récupération des adultes doit être comprise entre 80 % et 120 %, avec une proportion de mâles inférieure à 10 %. La fécondité des adultes doit être supérieure à 80 %, et la reproduction doit être supérieure à 30 juvéniles par adulte introduit (ISO 10872, 2010).

II.1.1.4. Essais en phase solide

Les essais en phase solide avec *C. elegans* sont réalisés dans des micro-plaques stérilisées de 12 puits (diamètre 2,5 cm, Thermo Scientific Sterilin) en polystyrène. Dans chaque puits est introduit 0,5 g (équivalent sec) d'échantillon solide à tester, le sol utilisé comme référence étant le sol naturel LUFA 2.2. Avant d'incuber les micro-plaques, celles-ci sont scellées hermétiquement avec du film plastique étirable afin de conserver l'humidité des échantillons au cours de l'essai. Le protocole général de la réalisation des essais terrestres est résumé en Figure 13.

En ce qui concerne l'hydratation des échantillons, la norme ISO 10872 (2010) préconise une hydratation à 20 % du poids sec avec du milieu M9, puis d'ajouter 0,5 mL de suspension bactérienne concentrée de façon à atteindre une turbidité de 12000 FAU (mesures : photomètre WTW Photolab S12). Cependant, le protocole d'hydratation du substrat ne prend pas en compte la CRE des échantillons à tester, qui peut être très différente d'un échantillon à l'autre (*e.g.* de 35 % pour un sol sableux jusqu'à 300 % pour une MF). Cela entraîne une hétérogénéité de l'humidité des échantillons une fois préparés, avec parfois des systèmes à une seule phase (*i.e.* équivalent d'un sol humide) et parfois à double phase (*i.e.* colonne d'eau au-dessus du substrat d'essai).

MATERIELS ET METHODES

Afin d'harmoniser les conditions d'humidité pour les essais terrestres, un protocole a été développé pour permettre une hydratation des échantillons en utilisant un pourcentage défini de CRE, et ainsi éviter les systèmes double phase. Le développement ainsi que la validation de ce protocole sont présentés dans le premier chapitre des résultats expérimentaux. Ceux-ci ont fait l'objet d'une publication intitulée « Improvement of the *Caenorhabditis elegans* growth and reproduction test to assess the ecotoxicity of soils and complex matrices » (cf. Résultats Chapitre I.1) . Les résultats de ces travaux méthodologiques ont permis de définir les conditions d'humidité optimale des échantillons pour la réalisation des essais terrestres. Les essais réalisés avec *C. elegans* pour ce type de substrat ont été menés en utilisant le protocole optimisé au cours des travaux de thèse.

Après la période d'exposition, les essais sont arrêtés par coloration des individus (*e.g.* 1 mL de solution de rose de Bengale à 0,3 g/L par puits) et par traitement thermique des plaques (*e.g.* 80 °C, 10 min.) contenant les échantillons et les nématodes. Les organismes sont extraits du substrat en utilisant une méthode de flottaison, par l'intermédiaire d'une solution de silice colloïdale plus dense que les organismes (*e.g.* LUDOX TM50 dilué au 2/3 pour obtenir une densité de 1,13 g/cm³). Pour ce faire, les échantillons ayant subi la coloration et le traitement thermique sont dilués avec de l'eau du réseau (*e.g.* environ 5 ml par puits), puis sont transférés dans des tubes à centrifuger. Après une première centrifugation (800g, 5 min. ; centrifugeuse Sigma 6-16K), la phase liquide est collectée puis conservée pour une recherche ultérieure d'organismes. Le culot contenant le substrat est ensuite remis en suspension avec 2 mL de solution de LUDOX, à l'aide d'un agitateur de type vortex, et est de nouveau centrifugé (800 g, 5 min.). Cette opération est réalisée trois fois successivement, pour un volume final de LUDOX de 6 mL. Le contenu des tubes (*e.g.* eau et LUDOX) est finalement transféré dans une roue de Ward pour réaliser les comptages et les mesures. Les individus adultes sont dénombrés, mesurés et la présence d'œufs est également observée (*i.e.* critère de fertilité). Les individus juvéniles sont uniquement dénombrés. L'ensemble de ces opérations est réalisée sous loupe binoculaire (Olympus SZX 12) au grossissement X12, et les mesures sont effectuées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Saisam, Micro-vision Instruments).

MATERIELS ET METHODES

II.1.1.5. Essais en milieu aqueux

De la même manière que pour les essais en phase solide, les essais en milieu aqueux sont réalisés dans des micro-plaques stériles de 12 puits. Dans chaque puits sont introduits 0,5 ml d'échantillon liquide à tester, ainsi que 0,5 ml d'une solution de bactéries *E. coli* OP50 concentrée à une turbidité de 1000 FAU (mesures : photomètre WTW Photolab S12). Cette solution est obtenue après centrifugation (2000 g, 20 min. ; centrifugeuse Sigma 6-16K) d'une culture nocturne de bactéries réalisée dans du milieu LB, dont le culot est remis en suspension dans du milieu M9 afin d'obtenir la concentration souhaitée.

Dix juvéniles de stade J1 sont ensuite introduits dans chacun des puits d'essai, à raison de quatre réplicats par condition. Le témoin négatif utilisé est le milieu isotonique M9. Avant d'incuber les micro-plaques, celles-ci sont scellées hermétiquement avec du parafilm afin d'éviter l'évaporation des échantillons. Le protocole général de la réalisation des essais en milieu aqueux est illustré en Figure 13.

A l'issue de la phase d'exposition (*i.e.* 96 h à 20 ± 2 °C), les essais sont arrêtés de la même manière que pour les essais en phase solide (*e.g.* par coloration des individus et par traitement thermique des plaques d'essais). Le contenu des puits est finalement transféré directement dans une roue de Ward pour dénombrer, mesurer et noter la présence d'œufs chez les individus adultes. Les individus juvéniles sont seulement dénombrés. L'ensemble de ces opérations est réalisée avec le même matériel que pour les essais en phase solide.

MATERIELS ET METHODES

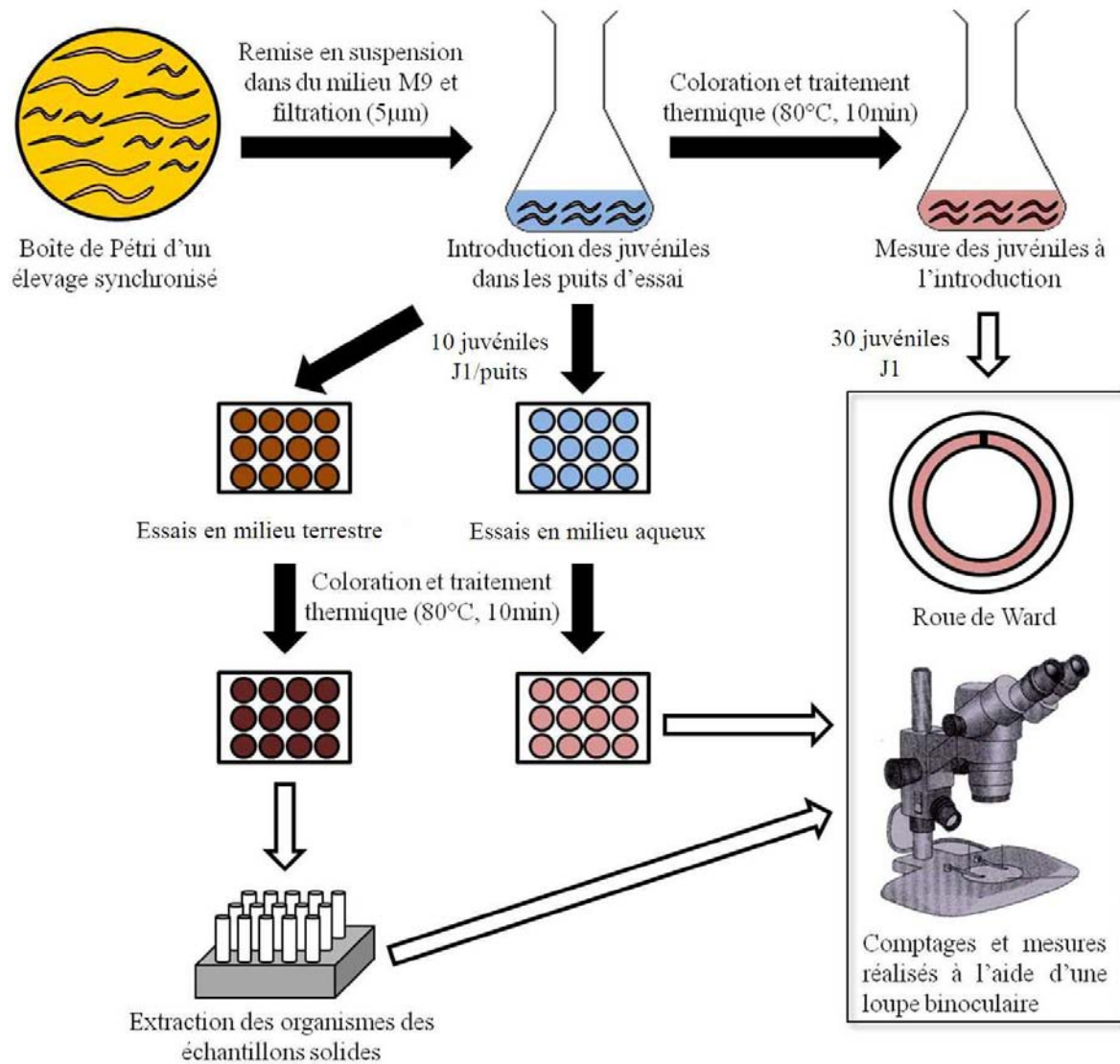


Figure 13 : Schéma récapitulatif de la réalisation des essais d'inhibition de la croissance, de la fertilité et de la reproduction de *C. elegans* en phase solide et liquide

MATERIELS ET METHODES

II.1.2. Essai de mortalité et d'inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur *H. aculeifer*

II.1.2.1. Principe général de l'essai

La détermination des effets létaux et sur la reproduction de l'acarien prédateur *H. aculeifer* est réalisée suivant le protocole défini par la ligne directrice 226 de l'OCDE (2008). Le principe général consiste à exposer 10 organismes adultes femelles à des échantillons à différentes concentrations préparées dans du substrat témoin, et d'évaluer la mortalité ainsi que la production de juvéniles après une période d'incubation de 14 jours à 20 °C (± 2 °C) sous un cycle lumineux (*i.e.* 16 h de lumière et 8 h d'obscurité). A l'issue de cette période, des juvéniles au stade larve et au stade deutonymphe sont présents dans les boîtes d'essai. La substance de référence préconisée pour les essais est l'acide borique (H_3BO_3 , n° CAS : 10043-35-3).

II.1.2.2. Obtention des organismes pour les essais

Les essais utilisant *H. aculeifer* comme organisme modèle sont réalisés en utilisant des adultes femelles issues de la même cohorte, âgées de 28 à 35 jours (OCDE, 2008). Celles-ci sont obtenues à partir d'élevages synchronisés, après cinq semaines d'incubation à 20 °C une fois les femelles de la génération précédente introduites. Comme les élevages synchrones contiennent également des adultes mâles, il est nécessaire de bien différencier les deux sexes pour n'introduire que des adultes femelles dans les boîtes d'essais. Les femelles se différencient des mâles par une taille plus importante et la présence d'une poche à œuf blanche à l'arrière du corps (Figure 7 ; Partie I, Section II.1.2.).

II.1.2.3. Critères de validité

Afin de juger de la validité des essais, certains critères doivent être satisfaits dans les témoins. La mortalité des adultes femelles ne doit pas excéder 20 % à la fin des essais et le nombre moyen de juvéniles par réplicat doit être supérieur ou égal à 50, avec un coefficient de variation inférieur à 30 % (OCDE, 2008).

MATERIELS ET METHODES

II.1.2.4. Protocole d'essai

Les essais sont réalisés dans des boîtes en polystyrène (diamètre 5 cm, hauteur 7,5 cm) fermées hermétiquement avec un couvercle. Dans chaque boîte sont introduits 20 g (équivalent sec) d'échantillon solide à tester, hydraté à 50 % de sa CRE. Les 10 femelles adultes sont nourries trois fois par semaine lors des essais, ce qui permet également d'aérer régulièrement les boîtes d'essais, fermées hermétiquement (OCDE, 2008).

Afin d'évaluer les effets sur la reproduction, il convient d'extraire les organismes de la matrice solide. Le principe est de déshydrater graduellement le substrat par chauffage (*i.e.* de 25 °C à 40 °C) pendant 48 h en utilisant un système d'extraction de type Berlèse-Tullgren (*e.g.* deux rangées de 9 lampes halogènes de 18 W réglables manuellement en hauteur, Figure 14). Cela permet de récupérer les organismes contenus dans chaque boîte d'essai, qui sont par la suite dénombrés sous loupe binoculaire (Olympus SZX 12) au grossissement X10. Le protocole de la réalisation des essais avec *H. aculeifer* est récapitulé en Figure 15.

Concernant l'extraction des organismes, la ligne directrice de l'OCDE (2008) fournit des indications pour la mise en place d'un système Berlèse-Tullgren, ainsi que du gradient de température à appliquer pour extraire les organismes. En accord avec ces recommandations, un protocole spécifique à notre système d'extraction a été mis en place. Ce protocole est le suivant:

- préparation des boîtes d'essai (perçage du fond des boîtes et hermétisation à l'aide de scotch) ;
- à l'issue de la phase d'exposition, remplacement des couvercles des boîtes d'essai par des couvercles percés contenant un filtre de maille 1 mm (Figure 14);
- positionnement des boîtes d'essais sur les boîtes de récupération contenant 5 g de mélange plâtre – charbon actif (ratio 9:1) hydraté à 50 % (poids sec) avec de l'eau déminéralisée ;
- fermeture hermétique des deux boîtes superposées avec du film élastique étirable ;
- découpage du fond des boîtes d'essais ;
- allumage des lampes, avec comme gradient de température : 25 °C/8 h – 30 °C/16 h – 35 °C/8 h – 40 °C/16 h ;
- à l'issue de la période d'extraction, ajout de 15 ml d'éthanol à 70 % par boîte de récupération, afin de fixer les organismes pour le comptage.

MATERIELS ET METHODES

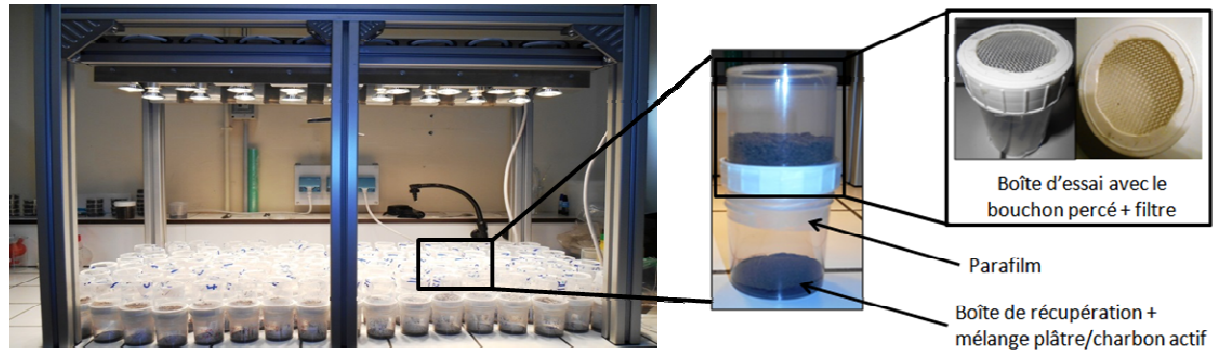


Figure 14 : Illustration du système de type Berlèse-Tullgren développé pour l'extraction des acariens *H. aculeifer*.

A gauche : Système d'extraction de type Berlèse-Tullgren ; A droite : montage d'une boîte d'essai avec la boîte de récupération des organismes

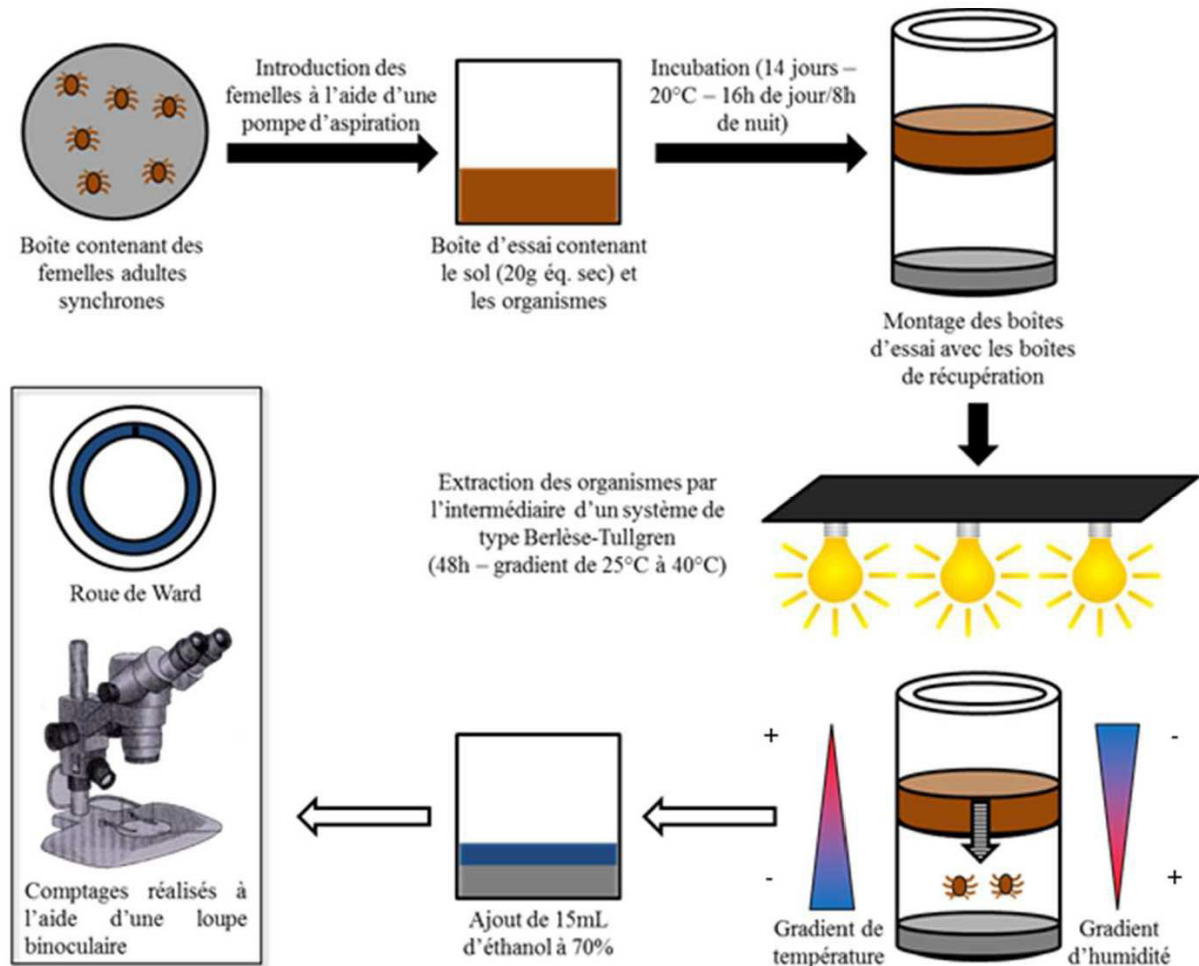


Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'essai de mortalité et d'inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur *H. aculeifer*

II.2. Protocoles de préparation des échantillons

II.2.1. Etude de la sensibilité des organismes exposés aux ETM

Afin d'évaluer l'effet de contaminants susceptibles d'être retrouvés dans les MF, une étude de la sensibilité du nématode *C. elegans* et de l'acarien prédateur *H. aculeifer* aux ETM a été abordée par deux approches. La première focalise sur la sensibilité des deux organismes par rapport à chaque métal pris de manière individuelle (*i.e.* détermination de CE_x). La seconde focalise sur l'effet de ces mêmes métaux en mélange, dans un contexte d'épandage de MF potentiellement contaminées. Ces deux approches ont été mises en œuvre en dopant artificiellement des sols (*i.e.* sol naturel LUFA 2.2 pour le nématode ; sols artificiel ISO et naturel LUFA 2.2 pour l'acarien prédateur) à l'aide de sels métalliques mis en solution (*i.e.* préparation des solutions mères dans du milieu M9 pour les nématodes et dans de l'eau déminéralisée pour les acariens).

Les métaux étudiés ont été sélectionnés en se basant sur ceux étant le plus fréquemment recherchés dans le cadre de l'homologation des MF. Les cinq sels métalliques étudiés ont été : $CdCl_2$ (n° CAS : 10108-64-2) ; $CuCl_2, 2H_2O$ (n° CAS : 10125-13-0) ; $NiSO_4, 6H_2O$ (n° CAS : 10101-97-0) ; $PbCl_2$ (n° CAS : 7758-95-4) et $ZnCl_2$ (n° CAS : 7646-85-7). Dans un premier temps, les sols ont été hydratés à hauteur de 20 % (poids sec) avec les solutions de sels métalliques, et ont été laissés pendant 5 jours dans des cristallisoirs recouverts de film plastique, afin d'atteindre un équilibre hydrostatique. Puis l'hydratation des sols a été ajustée en accord avec les différents protocoles d'essai des deux organismes.

Les concentrations initialement introduites ont été dosées par le Laboratoire d'Analyse des Sols (INRA, Arras), permettant d'exprimer les résultats des essais sur une base de concentrations mesurées (Annexe 3).

II.2.1.1. Evaluation de la sensibilité des organismes *C. elegans* et *H. aculeifer* à différents métaux étudiés en substances seules

Le sol naturel LUFA 2.2 (*e.g.* 500 g secs par concentration) a été utilisé en tant que substrat pour évaluer la toxicité des sels métalliques. Les concentrations pour chaque métal (Tableau 16) ont été définies en se basant sur les travaux de Peredney et Williams (2000) ainsi que de Jonker *et al.* (2004), qui se sont focalisés sur les effets toxiques aigus de sels métalliques sur *C. elegans* en milieu terrestre. De plus, afin d'évaluer la toxicité de la fraction

MATERIELS ET METHODES

entraînable à l'eau, les éluats respectifs des sols dopés ont également été testés avec cet organisme (ISO 10872, 2010).

Pour l'acarien prédateur *H. aculeifer*, le sol naturel LUFA 2.2 ainsi que le sol artificiel ISO ont été utilisés comme substrat d'essai (e.g. 300 g secs par concentration ; OCDE, 2008). Après une analyse de la littérature scientifique, aucune information n'a pu être trouvée concernant la sensibilité de *H. aculeifer* vis-à-vis des sels métalliques étudiés. Deux séries d'expériences ont été menées, afin de déterminer la sensibilité de cet organisme vis-à-vis des différents métaux.

Tableau 16 : Concentrations nominales (mini-maxi) en ions métalliques introduites dans les sols pour les essais avec *C. elegans* et *H. aculeifer*

Organisme	[C] nominales (mg/kg)				
	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺
<i>C. elegans</i>	46-480	59-296	24-122	103-521	63-321
<i>H. aculeifer</i> *	68-1226	41-745	23-418	82-1490	18-480

* : concentrations nominales de l'essai préliminaire sur sol artificiel ISO

Facteur de dilution pour *C. elegans* : 1,5 ; facteur de dilution pour *H. aculeifer* : 3

II.2.1.2. Approche mélange de métaux

Les concentrations nominales en métaux introduites (Tableau 17) ont été définies à partir de différents scénarios d'épandage d'une MF fictive, contenant des concentrations en ETM basées sur la réglementation concernant l'épandage des boues (Directive 86/278/CEE abrogée par la Directive 91/692/CEE).

Ces concentrations sont représentatives, d'une part, d'une MF brute contenant des concentrations en métaux aux limites basses réglementaires européennes. D'autre part, des mélanges de métaux représentatifs de quatre scénarios d'épandage de cette matière théorique ont aussi été évalués. Ces scénarios ont été définis en utilisant des données réglementaires relatives à l'épandage des boues. Le premier scénario est représentatif des flux limites annuels lors d'un épandage de 3 T/ha de la MF brute théorique citée ci-dessus (i.e. dilution au 1/1000). Le second est représentatif des flux limites sur 10 ans imposés dans la réglementation (i.e. un épandage tous les 3 ans, équivalent d'une dilution au 1/300 de la MF

MATERIELS ET METHODES

brute théorique). Le troisième est représentatif d'un épandage de 30 T/ha de la MF brute théorique (*i.e.* équivalent d'une dilution au 1/100 de la MF théorique). Le dernier scénario évalué est représentatif d'un épandage de 300 T/ha de la MF brute théorique (*i.e.* équivalent d'une dilution au 1/10 de la MF théorique).

Les essais en phase solide avec le nématode *C. elegans* ont été réalisés avec le sol naturel LUFA 2.2 (*e.g.* 500 g secs par concentration). Pour l'acarien prédateur *H. aculeifer*, le sol naturel LUFA 2.2 ainsi que le sol artificiel ISO ont été utilisés en tant que substrats d'essai (*e.g.* 300 g secs par concentration).

Pour les deux organismes, les sols ont été dopés en ajoutant progressivement une à une les solutions de sels métalliques. Les éluats (protocole en Partie II, Section II.2.3.) correspondants aux différents scénarios précédents ont également été évalués avec *C. elegans*.

Tableau 17 : Résumé des concentrations (Directive 86/278/EEC) et des équivalences de dilution pour les mélanges de métaux

Equivalent épandage	Equivalent dilution	[C] nominales (mg/kg)				
		Cd ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺
MF brute	1	20	1000	300	750	2500
MF brute appliquée à 3 T/ha, flux annuel	1/1000	0,015	1	0,3	0,9	2
MF brute appliquée à 3 T/ha, flux sur 10ans	1/300	0,05	3,3	1	3	10
MF brute appliquée à 30 T/ha	1/100	0,2	10	3	7,5	25
MF brute appliquée à 300 T/ha	1/10	2	100	30	75	250

II.2.2. Préparation des mélanges de sol et de MF

L'écotoxicité des MF a été évaluée en utilisant des doses d'épandage prédéfinies (Figure 16). Ces doses sont représentatives d'une application usuelle de chaque MF (*i.e.* 1X le taux d'épandage recommandé), ainsi que de scénarios de sur-application (*i.e.* 5X, 10X, 50X et 100X le taux d'épandage recommandé). La relation 1 ha = 3000 T de sol (10000 m² x 0,3 m x 1 T/m³) a été utilisée pour effectuer les calculs de T/ha à mg/kg.

Les mélanges de sols et de MF ont été réalisés dans un mélangeur mécanique, en ajoutant les quantités de MF dans 1kg (poids sec) de sol naturel LUFA 2.2 ou de sol artificiel ISO, selon l'organisme considéré. Puis les mélanges de sol et de MF ont été hydratés à 20 %

MATERIELS ET METHODES

(poids sec) et laissés 5 jours à l'obscurité dans des cristallisoirs recouverts d'un film plastique, afin d'atteindre un équilibre hydrostatique. L'hydratation des mélanges a été par la suite ajustée en fonction des préconisations de chacun des essais. L'écotoxicité des mélanges de sol et de MF a également été évaluée par approche indirecte avec *C. elegans* (*i.e.* extraits aqueux des différents mélanges de sols et de MF).

Ces MF ont également été testées avec des batteries d'essais terrestres (*i.e.* plantes et vers de terre) et aquatique (*i.e.* bactéries, algues, rotifer et crustacés), en parallèle des essais sur *C. elegans* et *H. aculeifer*. Les analyses statistiques descriptives des résultats des batteries d'essais ont permis d'évaluer la pertinence de ces essais dans le cadre de l'évaluation des MF, au regard des essais d'écotoxicité utilisés plus classiquement. Ces travaux ont fait l'objet de l'article « Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: towards a proposal of a suitable test battery » (publié dans le journal *Ecotoxicology & Environmental Safety*). Cet article est inclut dans la section « Discussion » (Chapitre III.1.) du présent manuscrit.

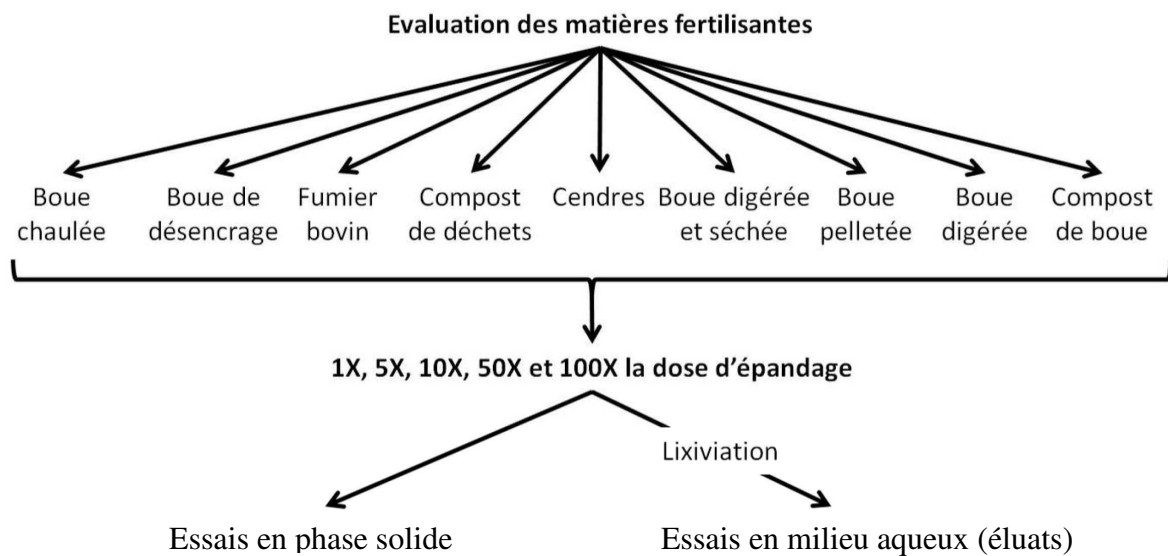


Figure 16 : Schéma récapitulatif de l'évaluation des MF

MATERIELS ET METHODES

II.2.3. Protocole de lixiviation

Les éluats issus de l'évaluation des métaux et de l'évaluation des MF ont été obtenus en suivant le protocole de lixiviation décrit dans la norme XP CEN ISO/TS 21268-2 (2009). Le principe de la lixiviation (Figure 17) consiste à prélever une masse de sol, à laquelle est ajoutée un volume d'eau déminéralisée afin d'obtenir un rapport liquide/solide de 10 L/kg (*e.g.* 90 g de sol équivalent sec pour 900 ml, auxquels ont été soustraits la quantité d'eau continue dans la masse de sol non déshydraté).

Le flacon contenant le mélange est alors disposé horizontalement pendant 24 h sur une table à rouleaux effectuant 10 tours/min. Le mélange est ensuite centrifugé à 2500 g pendant 30 minutes, permettant de séparer la phase liquide de la phase solide. Le surnageant, stocké à 4 °C, a été directement utilisé dans les 48 h pour réaliser les essais avec *C. elegans*. Des mesures de pH, d'O₂ dissous ainsi que de conductivité (Annexe 1) ont été effectuées à température ambiante, préalablement à la réalisation des essais.

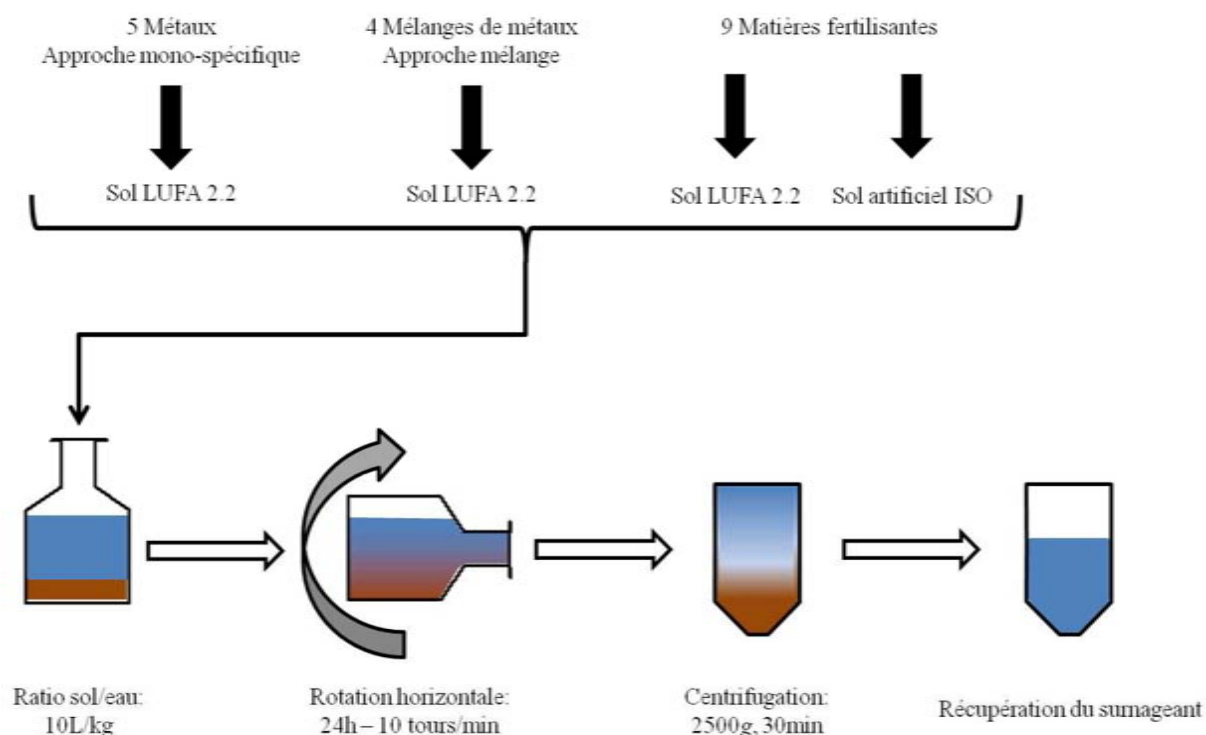


Figure 17 : Schéma récapitulatif des éluats réalisés et du protocole de lixiviation

II.3. Analyses statistiques et logiciels utilisés

II.3.1. Statistiques inférentielles

Les statistiques inférentielles permettent de comparer les réponses des organismes entre elles, et de discriminer celles qui diffèrent des autres. Le choix des tests utilisés est basé sur le guide 54 de l'OCDE (2006), et est présenté en Figure 18. La première étape a pour objectif la détermination de la nature paramétrique ou non des données. Pour cela, la distribution de celles-ci est évaluée par des tests de normalité (*i.e.* test de Shapiro-Wilk) et d'homogénéité des variances (*i.e.* test de Bartlett). Si les données sont paramétriques, le test utilisé est le test d'analyse de variance à un facteur (*i.e.* ANOVA), qui permet d'évaluer s'il y a au moins une différence significative au seuil α (0,05) parmi les groupes de données. Afin de discriminer les groupes différents des autres, le test d'ANOVA est suivi d'un test post-hoc dit « HSD (high significant differences) » de Tukey. Pour les données non-paramétriques, ce sont les tests de Kruskal-Wallis (*i.e.* équivalent de l'ANOVA) et de Dunn (*i.e.* équivalent HSD de Tukey) qui ont été utilisés. Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel libre R (R Development Core Team, 2008)

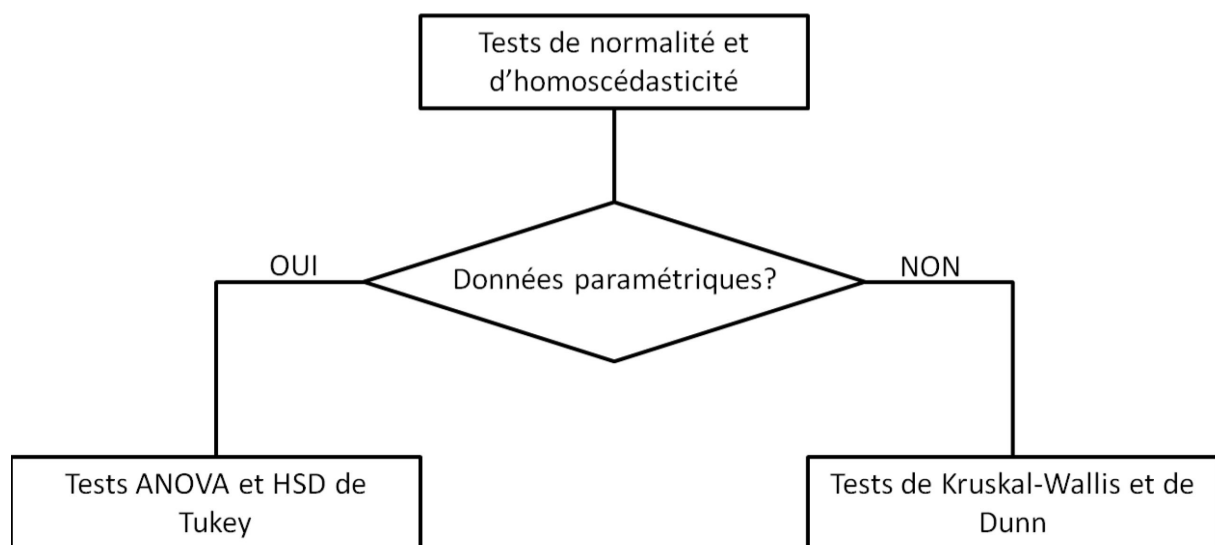


Figure 18 : Schéma décisionnel concernant les statistiques inférentielles

MATERIELS ET METHODES

II.3.2. Détermination des concentrations effectives médianes

La détermination des valeurs de CE_{50} ont été réalisées avec la feuille de calcul Excel REGTOX 7.0.6 (www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html). Cette macro Excel utilise une régression logistique basée sur le modèle de Hill en tant que modèle cinétique, ainsi qu'une estimation des paramètres de type « bootstrap » (méthode itérative) pour l'estimation des valeurs de CE_x .

II.3.3. Statistiques descriptives

Les statistiques descriptives permettent de mettre en avant certaines caractéristiques d'un jeu de données (*e.g.* moyenne, écart-type) et de compiler ces caractéristiques pour pouvoir mieux comparer les données. Des analyses en composantes principales (ACP) ont été utilisées afin de comparer la réponse des deux organismes modèles *C. elegans* et *H. aculeifer* aux MF par rapport aux réponses obtenues pour d'autres organismes composant les batteries d'essais. Ce type d'analyse statistique a notamment été utilisé dans l'article « Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: towards a proposal of a suitable test battery » (section Discussion du présent manuscrit). Les ACP ont été réalisées avec le logiciel libre R (R Development Core Team, 2008).

Partie III. RESULTATS

Chapitre I. Maîtrise et optimisation des protocoles d'essai

Ce premier chapitre concerne l'applicabilité des différents protocoles mis en œuvre au laboratoire pour la réalisation des essais avec *C. elegans* et *H. aculeifer*, dans le contexte de la caractérisation des dangers des MF. En effet, compte tenu de la complexité de ces matrices, il semblait nécessaire de s'assurer que les protocoles normatifs, principalement développés pour caractériser l'écotoxicité de substances introduites dans les sols, étaient adaptés à l'évaluation des MF. Pour cela, plusieurs expérimentations indépendantes ont été réalisées. Celles-ci abordent les points suivants :

- (i) Conditions d'hydratation des échantillons solides soumis à essai.

Les conditions d'exposition des organismes utilisés lors de tests écotoxicologiques doivent être indépendantes des substrats étudiés, et comparables d'un essai à l'autre. Les protocoles d'essais utilisant les acariens prédateurs (OCDE, 2008), les vers de terre (ISO 11268-1 & 2, 2012), les enchytréides (ISO 16387, 2012) ou encore les collemboles (ISO 11267, 2012) préconisent une hydratation des sols sur la base d'un pourcentage CRE. Au contraire, le protocole de l'essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction du nématode *C. elegans* dans les sols (ISO 10872, 2010) ne prend pas en compte la CRE des échantillons lors de leur réhydratation (*e.g.* l'hydratation est réalisée sur une base de poids sec). Les CRE mesurées sur les MF et sur les mélanges préparés à partir de ces matrices peuvent par ailleurs être très variable d'un échantillon à l'autre, entraînant une hétérogénéité des conditions d'exposition des nématodes. Le protocole d'hydratation a donc été harmonisé en tenant compte de la CRE des substrats à tester. Le développement du protocole ainsi optimisé a été publié dans le journal *Environmental Toxicology and Chemistry* (article « Improvement of the *Caenorhabditis elegans* reproduction test to assess the ecotoxicity of soils and complex matrices »).

- (ii) Exposition aux sols artificiels et naturels témoins, ainsi qu'aux éluats de ces sols.

Le protocole d'essai du nématode préconise l'utilisation de sol naturel LUFA 2.2 en tant que substrat témoin pour réaliser les essais (ISO 10872, 2010), alors que du sol artificiel est préconisé pour les essais avec d'autres organismes terrestres (*i.e.* acariens prédateurs, vers de terre, enchytréide et collemboles). Toujours dans le cadre de l'harmonisation des essais, la possibilité d'utiliser le sol artificiel en tant que substrat témoin a donc été étudiée avec *C. elegans*. Par ailleurs, les éluats de ces substrats ont également été testés avec le nématode,

RESULTATS

dans le but de pouvoir comparer la réponse de cet organisme à ceux composant la batterie d'essais aquatiques.

(iii) Efficacité des méthodes de récupération des organismes.

Le suivi de la croissance et/ou de la reproduction de *C. elegans* et de *H. aculeifer* nécessite une extraction efficace des individus adultes et juvéniles des matrices auxquelles ils ont été exposés. Cette information n'est cependant que rarement renseignée, voir inexistante dans le cas des organismes juvéniles. Ainsi, les rendements d'extraction ont été déterminés pour les protocoles d'essai des deux organismes, sur des sols naturels de différentes textures.

(iv) Influence de la quantité de nourriture sur la réponse du nématode *C. elegans*.

Les nématodes sont nourris en début d'essai, alors que la nourriture utilisée pour l'acarien prédateur est régulièrement renouvelée pendant la période d'exposition. Cela implique, pour *C. elegans*, que les bactéries sont également exposées aux substances/échantillons testés. Certaines MF peuvent représenter un apport non négligeable de bactéries. Par conséquent, leur quantité peut être significativement modifiée au cours des essais. Nous avons donc déterminé si ces variations de la concentration en bactéries, étudiées en milieu aqueux, pouvaient avoir un effet limitant sur la réponse des paramètres suivis chez *C. elegans*.

(v) Evolution de la sensibilité et de la réponse des organismes modèles au cours du temps.

Dans le cadre de la maîtrise des protocoles d'essai, la sensibilité des deux organismes modèles vis-à-vis de substances chimiques de référence a été déterminée. De même, les critères d'effet évalués pour chaque organisme en condition témoin ont fait l'objet d'un suivi (Annexe 2). Ces données historiques permettent de quantifier l'amplitude des critères d'effet en condition témoin, et ainsi juger de la significativité biologique des différences observées.

RESULTATS

I.1. Optimisation du protocole d'essai en milieu terrestre pour *C. elegans* **– Article « Improvement of the *Caenorhabditis elegans* growth and reproduction test to assess the ecotoxicity of soils and complex matrices (Environmental Toxicology and Chemistry) »**

Le protocole proposé par la norme ISO 10872 (2010) préconise une hydratation des échantillons de sol rapportée à 40% du poids sec, pour une masse de 0,5g d'échantillon (équ. sec). En complément du volume d'hydratation, un volume de 0,5mL de solution nutritive bactérienne est également ajouté à l'échantillon à tester. Au total, un volume de 0,7mL est utilisé pour hydrater 0,5g d'échantillon (équ. sec). Dans le contexte de l'évaluation des sols et des MF, et compte tenu des CRE très variables que peuvent présenter ces matrices, cette hydratation peut entraîner une hétérogénéité lors de la préparation des substrats d'essai. A titre d'exemple, les CRE des sols naturels étudiés ont été comprises entre 45% (sol LUFA 2.2) et 70% (sol de forêt). Dans le cas des MF, les CRE mesurées sont équivalentes voire plus élevées par rapport aux sols (*e.g.* de 50% pour les cendres à 300% pour la boue chaulée).

Par conséquent, les substrats préparés suivant le protocole normatif peuvent avoir des aspects différents. Pour les échantillons présentant une forte CRE (*e.g.* > 140%), la matrice aura un aspect « sec », alors que pour les échantillons ayant une faible CRE (*e.g.* < 100%), la matrice va présenter une « double phase » (*i.e.* colonne d'eau au-dessus de l'échantillon solide). Les échantillons avec une CRE intermédiaire auront quand à eux un aspect de « boue ». Compte tenu que *C. elegans* évolue principalement dans l'eau interstitielle des sols, certains substrats peuvent présenter un caractère limitant.

Il est donc apparu nécessaire de définir des conditions adéquates d'humidité lors des essais terrestres avec le nématode *C. elegans*, et d'exprimer l'hydratation des échantillons sur la base d'un pourcentage de CRE. Cette approche a permis, d'une part, d'homogénéiser l'hydratation des échantillons et, d'autre part, d'être en adéquation avec les protocoles de préparation des échantillons relatifs à d'autres essais sur organismes terrestres. L'apport de nourriture a également été concentré, de façon à réduire le volume apporté.

RESULTATS

Résumé des résultats obtenus lors de l'optimisation du protocole d'essai terrestre avec *C. elegans* :

Les résultats obtenus ont montré, que :

- parmi la gamme de CRE testée (*i.e.* 40 %, 60 %, 80 % et 100 %) sur cinq sols de différentes textures, les mesures de croissance ainsi que de reproduction se sont révélées équivalentes pour des hydratations comprises entre 60 % et 100 % de CRE. Pour la suite des essais, un pourcentage de 80 % de CRE a été retenu pour hydrater les sols/mélanges d'essai ;
- les rendements d'extraction des juvéniles obtenus pour le protocole normatif (*e.g.* 82,9 % - 99,1 %) et optimisé (*e.g.* 71,7 % - 95,2 %) ont été équivalents pour les cinq sols naturels étudiés. D'autre part, la texture des sols naturels n'a eu qu'une faible influence sur la récupération des organismes ;
- le protocole optimisé a permis de démontrer son applicabilité sur les MF (*i.e.* évaluées selon différents scénarios d'épandage : de 1X à 100X la dose d'application recommandée).

Finalement, l'optimisation du protocole d'essai de *C. elegans* s'est révélée être adaptée à l'étude des matrices complexes telles que les sols et les MF. Ce protocole a été utilisé par la suite des travaux.

IMPROVEMENT OF THE *CAENORHABDITIS ELEGANS* GROWTH AND REPRODUCTION TEST TO ASSESS THE ECOTOXICITY OF SOILS AND COMPLEX MATRICES

PIERRE HUGUIER,*† NICOLAS MANIER,† CAMILLE MÉLINE,† PASCALE BAUDA,‡ and PASCAL PANDARD†

†National Institute of Industrial Environment and Risks, Verneuil-en-Halatte, France

‡Interdisciplinary Laboratory of Continental Environments, Metz, France

(Submitted 9 November 2012; Returned for Revision 17 December 2012; Accepted 7 May 2013)

Abstract: A growth and reproduction test using the nematode *Caenorhabditis elegans* was recently standardized by the International Organization for Standardization (ISO). Performing the ISO 10872 protocol (2010) revealed some drawbacks when applied to soil or soil mixed with complex matrices. The authors propose some modifications to the current protocol to normalize the test conditions. An appropriate range of moisture conditions was determined as a percentage of the water-holding capacity (WHC) of the soil. According to the authors' results, *C. elegans* tests can be performed in the range of 60% to 100% WHC. To ensure that the modifications of the protocol did not affect the organisms' recovery, extraction ratios for the juveniles were subsequently estimated. The modified protocol was found to be as reliable as the standard one concerning recovery of juveniles (over 80%). The protocol was also applied to several chemicals to investigate their potential as reference chemicals for soil toxicity tests. Boric acid, copper chloride, and nickel sulfate showed deleterious effects in a concentration-dependent manner for the growth and reproduction of *C. elegans*. Finally, the modified protocol was used to assess the growth and reproduction of *C. elegans* in soil amended with a limed sewage sludge. The authors conclude that the *C. elegans* modified protocol is a promising tool for the assessment of soil toxicity as well as the toxicity of mixtures with complex matrices. *Environ Toxicol Chem* 2013;32:2100–2108. © 2013 SETAC

Keywords: *Caenorhabditis elegans* Protocol Soil Reference chemical Complex matrix

INTRODUCTION

Nematodes are among the most abundant soil invertebrates (>10⁶ individuals/m² [1,2]), and they play key roles in decomposition, energy flows, nutrient cycling, and microbial regulation [3–5]. Therefore, these organisms may be of significant interest when considering the hazard assessment of soil or complex matrices, along with organisms such as plants [6,7], collembola [7–10], and earthworms [7,10,11].

The mortality [12], fertility, growth, and reproduction [13] tests using *Caenorhabditis elegans* are standardized for different types of environmental samples (i.e., aquatic media, sediment, and soil). Several published studies have shown that the current International Organization for Standardization (ISO) protocol [13] for the testing of sediments and aqueous samples is adequate [14–16]. Nevertheless, performing the ISO protocol for the hazard assessment of soil or complex matrices demonstrates some limitations because the samples are moistened according to their mass without taking into account their water-holding capacities (WHC). The WHC of soil and complex matrices is influenced by their composition and texture [17], which can be highly variable. Under some circumstances, this becomes a drawback in the current ISO protocol because the addition of growth medium and food to the tested sample can lead to a 2-phase system (i.e., water layer above the matrix) or a suspension, depending on the water retention characteristics of the samples. Moreover, for complex materials (such as wastes or organic materials) with a high WHC (e.g., up to 300%), preparation of mixtures with soil following the ISO protocol showed differences in moisture conditions depending on the

material tested. Therefore, it was essential to consider the quantity of water that the materials can absorb to ensure homogeneous conditions. Performing the *C. elegans* ecotoxicity test for soil and complex matrices based on the WHC should be useful to harmonize the test conditions and to allow further comparison between samples and with other tests conducted on the same materials.

We thus propose a modified protocol of the current ISO one [13], to conduct *C. elegans* tests in solid phase, for which the moisture condition is based on the WHC of the sample instead of its dry weight. Because the moisture of samples is a common issue with both ASTM International [12] and ISO [13] protocols, the present study might also be suitable for testing complex matrices with high retention characteristics using the ASTM International mortality test [12].

The results obtained with the current ISO protocol and our modified one were compared to evaluate the reliability of the modified protocol while ensuring that the modifications of the protocol fulfilled the validity criteria of the ISO standard (recovery of introduced organisms, adult fertility, reproduction rate, and proportion of males). In addition, the extraction ratio of juveniles, which is of primary importance for this kind of test, was evaluated for the modified protocol and compared with the current standardized one. The modified protocol was applied to assess the toxicity of several different chemicals to evaluate their suitability as reference chemicals for soil, a step missing from the current ISO 10872 [13] for the testing of solid matrices [18]. Finally, the modified protocol was applied to a natural soil amended with a limed sewage sludge.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemicals used in the present study were of analytical-grade purity. The different soil preparations were moistened with

All Supplemental Data may be found in the online version of this article.
* Address correspondence to pierre.huguiet@ineris.fr.
Published online 22 May 2013 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/etc.2282

RESULTS

M9 buffer as growth medium [13], which is composed of 6 g/L Na₂HPO₄ (Acros Organics), 3 g/L KH₂PO₄ (Acros Organics), 5 g/L NaCl (Fisher Scientific), and 0.25 g/L MgSO₄ · 7H₂O (Fisher Scientific). Nematodes were stained with a solution of Rose Bengal (Sigma-Aldrich; CAS no. 632-69-9) at 0.3 g/L, which facilitated counting of the nematodes after recovery. Separation from the soil was performed with a solution of colloidal silica (LUDOX TM50; Sigma-Aldrich; density 1.13 g/cm³). Stock solutions of boric acid (H₃BO₃; Acros Organics; CAS no. 10043-35-3; 10 000 mg/L), copper (II) chloride (CuCl₂ · 2H₂O; Acros Organics; CAS no. 10125-13-0; 5330 mg/L), and nickel (II) sulfate (NiSO₄ · 6H₂O; Acros Organics; CAS no. 10101-97-0; 3650 mg/L) were prepared in M9 buffer.

Soil preparation and handling

The natural soils were sampled in northern France (agricultural, forest, and garden 1 from Oise department, garden 2 from Moselle department; see characteristics in Table 1) in the amount of approximately 2 kg of fresh soil from each location (upper layer of soil without grass; ~15 cm × 15 cm × 15 cm). Soils were defaunated by air-drying prior to their use and stored in darkness at 4 °C. The agricultural and forest soil samples were chosen because of the low anthropization around the sampling sites. Agricultural soil was selected because it was cultivated according to sustainable agriculture principles aiming at minimizing the environmental impact, including integrated pest management. Both garden soils were sampled from private gardens. The LUFA 2.2 soil was purchased from the German company Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungsanstalt speyer. The natural soil samples were characterized at the Laboratory of Soil Analysis (Arras, France) of the French National Institute for Agronomic Research. Prior to analysis, soil samples were dried, ground, and sieved at 2 mm [19]. The soil texture was determined by a gravimetric method [20]. The soil pH, cation exchange capacity, and WHC were also measured according to standardized methods [17,21,22].

Test organisms

Caenorhabditis elegans nematodes (variety Bristol, strain N2) were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) as well as the *Escherichia coli* strain OP50. Stock cultures of *C. elegans* were maintained on nematode growth medium agar plates. Prior to the introduction of nematodes, these plates were spread with *E. coli* as food. The stock culture was starved, resulting in the formation of dauer larvae [13], a dormant juvenile stage that occurs when nutrient or food resources are low. Prior to the tests, dauer larvae were transferred to agar plates containing a fresh lawn of bacteria to obtain synchronous adults. After 72 h at 20 °C ± 2 °C, these adults reproduced, and the resulting age-synchronous first-stage (L1) juveniles were available for the tests. For each test, 30 L1 juveniles, picked randomly, were

measured under a binocular microscope (×15 magnification) to determine the mean of the initial body length. Growth endpoint was calculated as final body length minus mean of initial body length.

Determination of the optimal range of moisture conditions

The first step of the present study was to establish whether *C. elegans* could grow and reproduce satisfactorily under both unsaturated and saturated soil conditions, as well as to determine the optimal moisture conditions for performing solid-phase tests. Five natural soils with different textures were moistened across a range of different percentages of their WHC (i.e., 40%, 60%, 80%, and 100%). For comparison, these soils were also prepared following the current ISO protocol 10872 [13].

A quantity of 10 g of each soil, previously air dried, was moistened at the desired WHC value with growth medium (M9 buffer), subtracting the food volume. The soils were then sealed and stored at 4 °C for 24 h to equilibrate before introducing the organisms. It was assumed that, given the low quantity of soil prepared, 24 h was sufficient to reach equilibrium. A mass of 0.5 g of soil (dry wt) was added to each well (25 mm diameter) of a 12-well plate (BioLite 12-well-multidish; Thermo Fisher Scientific). Four wells were used for each soil sample. The food source (*E. coli* strain OP50) was then added directly into the wells. The current ISO standard requires the addition of 0.5-mL bacterial suspension (12 000 formazine absorption units [FAU], equivalent to ~10¹⁰ cells/mL) in growth medium as a food source, which is not adapted for an expression of moisture based on the sample WHC. Consequently, the food volume was concentrated 10-fold (~100,000 FAU), leading to the addition of a volume of 0.05 mL to supply the same number of bacteria. We did not investigate the selection of an optimal number of bacteria, as the recommendations of the ISO standard were considered sufficient for the test procedure. The test duration (96 h) and the temperature (20 ± 2 °C), as well as the number of nematodes introduced (10 synchronous L1 juveniles), the staining and heat-killing protocol, along with the extraction method, were identical to those described in the current standard.

Comparison of the juveniles' recovery

The *C. elegans* reproduction toxicity test requires an acceptable recovery ratio of juveniles from the samples. Thus, the separation step appears as one of the most important for providing relevant and reliable data. It was important to demonstrate that the nematode separation protocol was still efficient when the modified protocol was applied. Therefore, we determined the extraction ratio in both modified (moisture: 80% WHC including food volume) and current ISO protocols. The separation method for solid matrices was performed according to ISO 10872 [13], which includes 3 successive centrifugations (5 min, 800 g) after the addition of a silica solution (LUDOX TM50; density 1.13 g/cm³) to the solid matrix. We determined the extraction ratios for the 5 natural soils and for different

Table 1. Physicochemical properties of the natural soils

Soil	Clay % (<2 μm)	Silt % (2–20 μm)	Sand % (20–2000 μm)	Organic C (%)	pH (H ₂ O)	Cation exchange capacity (cmol/kg)	WHC (%)	Soil classification (IUSS)
L	7.5	6.3	86.2	1.9	5.5	10	45	Loamy sand
A	12.2	11.1	76.7	1.4	8.2	6.9	40	Sandy loam
F	17.4	8.2	74.4	4	8.2	15	70	Sandy clay loam
G1	13.4	6.5	80.1	0.7	8.6	6.4	35	Sandy loam
G2	31.5	17	51.5	3.8	8.0	16.5	65	Light clay

L = LUFA 2.2; A = agricultural; F = forest; G1 = garden 1; G2 = garden 2; WHC = water holding capacity; IUSS = International Union of Soil Sciences.

numbers of L1 juveniles of test nematode. The introduced L1 juveniles represented low to expected reproduction rates for the 10 test organisms after 96 h (i.e., 75, 150, 300, and 1200 individuals per well; 3 replicates per condition). Nematodes obtained by filtration of synchronous cultures through a 5 μm mesh were introduced into the wells and were allowed to dwell in the samples overnight. The organisms were stained, heat killed, and separated from the soil samples 18 ± 2 h after their introduction, then counted under a binocular microscope at 15-fold magnification.

Investigating possible reference chemicals for soil tests with *C. elegans*

Boric acid, copper chloride dihydrate, and nickel sulfate hexahydrate were tested as potential reference chemicals for soil using aqueous solutions prepared as volumetric dilutions to obtain the desired concentrations. Boric acid was tested because it has been identified in the literature as a recommended reference chemical for other soil-dwelling invertebrates (i.e., earthworms, collembola, and enchytraeids [23]). The concentrations used for copper chloride and nickel sulfate were based on the work of Peredney and Williams [24]. Prior to the tests, the moisture content of the soil was adjusted to 20% (dry wt; equivalent to 44% WHC for LUFA 2.2 soil) with the chemical solutions in M9 buffer, and mixtures were allowed to equilibrate for 5 d. Solutions of boric acid were added to 100 g air-dried LUFA 2.2 soil to obtain the following nominal concentrations: 346 mg/kg, 536 mg/kg, 831 mg/kg, 1288 mg/kg, and 1997 mg/kg. For copper chloride and nickel sulphate, a quantity of 500 g of air-dried LUFA 2.2 soil was prepared for each test concentration. A quantity of 100 g of each of the soil samples spiked with heavy metals salts was stored at 4 °C for atomic absorption analysis, which was performed by the Laboratory of Soil Analysis (Arras, France). The following measured ion concentrations in soil were tested: 55 mg/kg, 82 mg/kg, 124 mg/kg, 152 mg/kg, and 228 mg/kg of Cu^{2+} , as well as 29 mg/kg, 45 mg/kg, 62 mg/kg, 81 mg/kg, and 121 mg/kg of Ni^{2+} . Before introducing L1 juveniles, equilibrated spiked soils were moistened with distilled water and the food solution according to the modified protocol to reach 80% WHC. The pH values of the spiked soils were always within the acceptable range for *C. elegans* (3.5–11) [25]. The other steps of the protocol (duration, temperature, extraction of the organisms, and so on) were identical to those described in the current ISO protocol [13].

Suitability of the modified protocol for the assessment of a complex matrix

Finally, the modified protocol was applied to assess the toxicity of a soil amended with a limed sewage sludge (see Supplemental Data, Table S1). The tested doses ranged from 1 to 100 times the recommended application rate of this material (3 T/ha dry wt), representative of both normal use and overapplication. A quantity of 1 kg dry weight of each mixture was prepared in fresh LUFA 2.2 soil, moistened up to 20% (dry wt) and allowed to equilibrate for 5 d. Before the start of the tests, the moisture was adjusted according to the modified protocol to reach 80% WHC, including the bacterial suspension. The other steps of the protocol (duration, temperature, extraction of the organisms, etc.) were identical to those described in the current ISO standard.

Statistical analyses

The statistical analyses of the data were set up following Organization for Economic and Co-Operation Development

(OECD) recommendations [26]. The determination of the optimal range of moisture and the suitability of the modified protocol for the assessment of a complex matrix was carried out by analysis of the distribution of the data sets for growth and reproduction first by Shapiro–Wilk normality test ($\alpha = 0.05$). For parametric data, significant differences were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA; $\alpha = 0.05$), followed by the Tukey honestly significant difference post hoc test ($\alpha = 0.05$). Otherwise, equivalent nonparametric tests were used, including Kruskal–Wallis one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$) followed by the Dunn multiple-comparisons test. For comparison of the juveniles' extraction ratio, ratios (i.e., number of juveniles recovered after extraction divided by the number of nematodes introduced, multiplied by 100) were compared using pairwise Student's *t* tests ($\alpha = 0.05$). These statistical analyses were carried out in R software [27].

Growth and reproduction data from the tests on reference chemicals were used to estimate the median effective concentration (EC50) using a logistic Hill model with bootstrap estimation of confidence intervals. Calculations were performed with REGTOX software (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html). The no-observed-effect concentration (NOEC) values were determined following OECD recommendations [26].

RESULTS

Determination of the optimal range of moisture conditions

Results of growth and reproduction obtained for the different moisture conditions tested on the 5 natural soils are summarized in Figures 1 and 2, respectively; percentages of recovery for adults are given as Supplemental Data, Table S2. With the current ISO protocol, the growth and reproduction of *C. elegans* in different soil samples were similar, with a mean growth recorded for the adults between 960 μm and 1150 μm and a mean number of offspring between 104 and 148 per adult for each soil tested.

With regard to the modified protocol, only the driest condition (40% WHC) was unsuited for the growth and reproduction of *C. elegans*. For this modality in garden 1 and garden 2 soil, we found only limited growth and negligible reproduction (2.5 offspring per adult for garden 2 soil), which was not sufficient to fulfill the validity criterion for reproduction (>30 offspring per adult). Given the low percentage of WHC, the *C. elegans* test was valid for the recommended control soil (LUFA 2.2), but growth ($\approx 960 \mu\text{m}$) and reproduction (≈ 35 offspring per adult) were significantly lower compared with the other conditions (growth mean $> 1100 \mu\text{m}$ and reproduction mean > 100 offspring per adult).

Other moisture conditions (60%, 80%, and 100% WHC) satisfied the validity criteria recommended in the standard and were in the same range as the soils tested following the current ISO protocol. From the acceptable range (60–100% WHC), we selected 80% WHC for further tests. This was demonstrated to be suitable for samples with a wide range of WHC as it permits to avoid their complete saturation and to limit their drying over the 96 h test duration.

Comparison of juveniles' extraction ratios

The results obtained are presented in Table 2. They show that the extraction ratios recorded for the modified protocol are almost in the same range as those recorded for the current ISO protocol. Extraction ratios ranged from 72% to 99%, and only a few significant differences were observed among the conditions

RESULTS

Using *C. elegans* for soil hazard assessment

Environ Toxicol Chem 32, 2013 2103

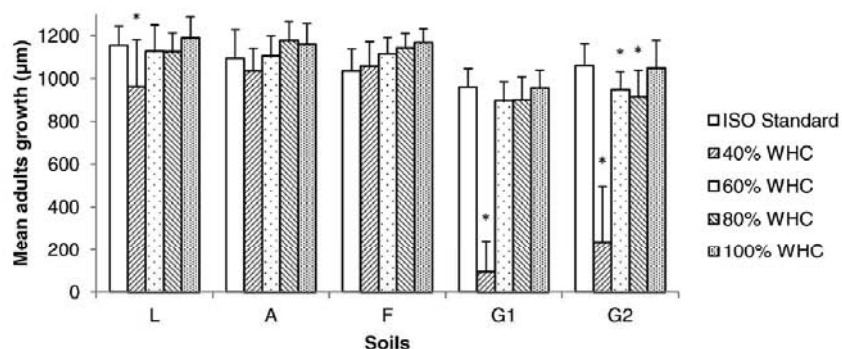


Figure 1. Growth of adults (final body length – mean of initial body length; \pm standard deviation) under different soil and moisture conditions (3 replicates per condition). L = LUFA 2.2; A = agricultural; F = forest; G1 = garden 1; G2 = garden 2, * = significant difference after Dunn multiple-comparisons test ($\alpha = 0.05$) with soils prepared according to the current ISO 10872.

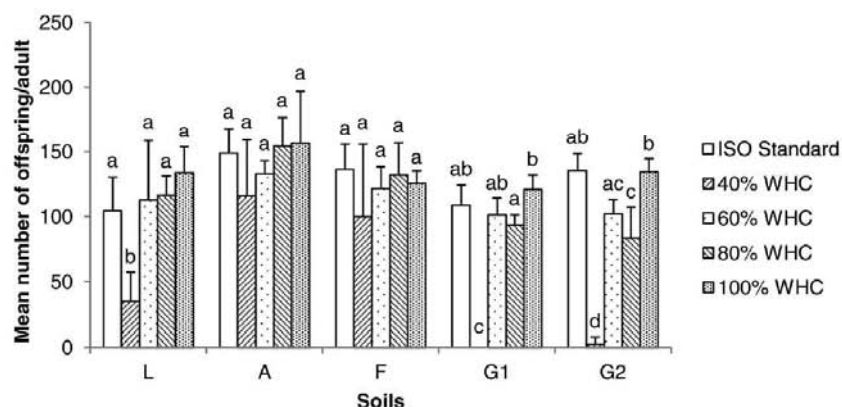


Figure 2. Reproduction of adults (number of recovered juveniles/number of introduced adults; \pm standard deviation) under different soil and moisture conditions (3 replicates per condition). L = LUFA 2.2; A = agricultural; F = forest; G1 = garden 1; G2 = garden 2. Letters (a–d) indicate significant differences among each soils, after analysis of variance and Tukey honestly significant difference tests ($\alpha = 0.05$).

Table 2. Juveniles' extraction ratios under standard and modified conditions

Soils ^a	Number of juveniles introduced	Mean of extraction ratio (% \pm standard deviation)	
		ISO 10872 method	Modified method
L	1200	82.9 \pm 4.7	82.8 \pm 6.9
	300	95 \pm 2.3	95.2 \pm 4.2
	150	95.6 \pm 2.5	92.0 \pm 5.9
	75	94.7 \pm 6.9	86.7 \pm 9.3
A	1200	88.2 \pm 5.2	85.1 \pm 7.7
	300	96.3 \pm 1.9	91.7 \pm 5.5
	150	98.4 \pm 1.7	89.3 \pm 6.4
	75	95.6 \pm 4.1	93.3 \pm 10.4
F	1200	90.2 \pm 9	80.9 \pm 13.3
	300	94.2 \pm 2.2	77.6 \pm 2.3 ^a
	150	96.2 \pm 2.8	89.8 \pm 9.8
	75	99.1 \pm 1.5	94.2 \pm 5
G1	1200	90.1 \pm 1.3	81.5 \pm 8.9
	300	93.3 \pm 1.5	71.7 \pm 9.1 ^a
	150	97.8 \pm 2	74.2 \pm 12.2 ^a
	75	97.3 \pm 4.6	76.9 \pm 5.4 ^b
G2	1200	92.9 \pm 3.3	89.9 \pm 4.9
	300	95.9 \pm 2	91 \pm 3.2
	150	92.7 \pm 2.7	88 \pm 3.1
	75	92.4 \pm 2	80.9 \pm 14.3

^aSignificant differences after pairwise Student's *t* test ($\alpha = 0.05$).

ISO = International Organization for Standardization; L = LUFA 2.2; A = agricultural; F = forest; G1 = garden 1; G2 = garden 2.

tested. More specifically, the extraction ratios for the LUFA 2.2 soil were similar among the 2 protocols and among the different conditions tested. The extraction ratios for the other soil samples were slightly lower for the modified protocol, and significant differences were recorded only for G1 and F soils. When considering the modified protocol for G1, mean extraction ratios of 81.5%, 71.7%, 74.2%, and 76.9% were recorded for the 1200, 300, 150, and 75 initially introduced nematodes, respectively. By comparison, with the current standard protocol, mean extraction ratios of 90.1%, 93.3%, 97.8%, and 97.3% were recorded for the 1200, 300, 150, and 75 test nematodes, respectively. To verify that this difference was due to the soil itself and not to an experimental bias, a second independent separation experiment was carried out on G1 soil prepared following the modified method. The results obtained, 78.6%, 81.2%, 72.7%, and 82.7% for 1200, 300, 150, and 75 L1 juveniles, respectively, confirmed earlier G1 soil extraction ratios.

Investigating possible reference chemicals for soil tests with *C. elegans*

Dose–response relationships for boric acid, copper chloride, and nickel sulfate were obtained for both growth and reproduction under the modified protocol (Figure 3). For boric acid, *C. elegans* growth was inhibited of 24% at 1288 mg/kg and of 86% at 1997 mg/kg. The calculated EC50 growth was 1559 (95% confidence interval [CI] 1503–1626) mg/kg, and the NOEC growth was 536 mg/kg. Inhibitions of 57% at 1288 mg/kg and 100% at 1997 mg/kg were recorded for the reproduction endpoint. The calculated EC50 reproduction was 1259 (95% CI 1135–1299) mg/kg, and the determined NOEC reproduction was 831 mg/kg. The following heavy-metal concentrations are expressed as measured ions concentrations. The highest concentration tested of copper chloride (228 mg/kg of Cu^{2+}) inhibited the growth of 53%, leading to an EC50 growth of 235 (95% CI 205–269) mg/kg. The NOEC growth was determined to be 55 mg/kg. The reproduction was inhibited by 97% for the highest concentration (228 mg/kg), and the EC50 reproduction was 68 (95% CI 58–85) mg/kg. The NOEC reproduction was determined to be 45 mg/kg. For nickel sulfate, the highest concentration tested (121 mg/kg of Ni^{2+}) inhibited the growth by 86% and the reproduction by 100%. The EC50 growth and EC50 reproduction were respectively 93 (95% CI 88–97) mg/kg and 52 (95% CI 47–56) mg/kg. The NOEC growth and NOEC reproduction were 62 mg/kg and 45 mg/kg, respectively.

Suitability of the modified protocol for the assessment of a complex matrix

To estimate the suitability of using the *C. elegans* test for assessing the ecotoxicity of complex matrices such as agricultural, municipal, and industrial organic materials (AMIOM), mixtures of soil (LUFA 2.2) amended with a limed sewage sludge (Supplemental Data, Table S1) were tested for their ecotoxicity to *C. elegans* growth and reproduction. Because of the high WHC of this material (300%), performing the *C. elegans* test based on the current ISO standard was not suitable. Indeed, the different mixtures (up to 100 times the application rate of the limed sewage sludge) have induced a wide range of WHC while mixed with the soil, from 45% for the control soil to 205% for the highest rate tested. Therefore, the moisture conditions of the mixtures under standard conditions were not homogeneous, and the highest rate tested was too dry to perform the tests. Thus, only the modified protocol was suitable

to achieve the assessment of this material. The results obtained are illustrated in Figure 4. The tests conducted met all the validity criteria recommended in the current ISO standard (i.e., adults' recovery, fertility, reproduction, and sex ratio). At the highest rate tested, no growth inhibition and no mortality were recorded. However, adverse effects on reproduction (mean of 13 offspring per adult, which is 8 times lower compared with the control soil) were found for this condition. At lower application rates, no statistically significant adverse effects were observed. These results demonstrate that the modified method can be applied to study these kinds of complex matrices.

DISCUSSION

The first step of the present study was to harmonize the *C. elegans* test conditions for solid matrices (1-phase system) and to avoid unsuitable moisture conditions (very dried mixtures). For that purpose, we demonstrated that this bioassay can be performed with samples moistened according to their WHC, considering the test protocol. *Caenorhabditis elegans* requires a high ambient moisture content to live and reproduce, in addition to a convenient food source. These parameters are of relative importance while running hazard assessment tests for chemicals or complex matrices, as they directly affect the acquisition of endpoint data. Moreover, harmonized conditions between the samples should prevail to allow further comparisons between them. Preparation of soil or mixtures following the standard ISO 10872 [13] showed that these criteria were not satisfied in all cases because the preparations can lead to a 2-phase (water layer above the soil) or to a 1-phase system, in part because of addition of the food volume. In some specific cases, samples with a high WHC (e.g., wastes or AMIOM) were demonstrated to be unsuitable for the growth and reproduction tests with *C. elegans* under standard conditions because the samples were not sufficiently moistened. With these considerations taken into account, experiments were set up to improve the current ISO protocol. Our data demonstrate that this organism can grow and reproduce satisfactorily in unsaturated as well as saturated soil under laboratory conditions. Peredney [28] demonstrated that 24 h mortality tests could be performed using a soil moisture of 20% dry weight. However, the 96 h growth and reproduction tests were not valid below 60% of the soil WHC (i.e., 40% WHC, equivalent to 18% dry wt for LUFA 2.2 soil). Several factors may explain these differences: the test duration (24 or 48 h for lethal tests, 96 h for sublethal tests, engendering a higher evaporation during the tests), the physiological need reduced for survival (no food addition for 24 h mortality tests), and the endpoints studied (lethal or sublethal, which differed in sensitivity). Otherwise, the recovery of adults from the soil samples and the growth, fertility, and reproduction validity criteria recommended in the standard document [13] were all met, from 60% to 100% WHC of the 5 soils used, including the reference soil LUFA 2.2. These modifications also permitted a harmonization of the moisture conditions in comparison with ecotoxicity tests on other soil organisms (e.g., earthworms, enchytraeids, and collembola) because the soil moisture content is based on the WHC of the samples.

The second objective of the present study was to compare the separation of juveniles from the soil between the current and the modified methods; this is an important step to provide relevant data. There is actually a lack of information concerning this parameter. To our knowledge, only 1 published article has reported an extraction ratio for the juveniles of $77 \pm 20\%$ in LUFA 2.2 soil under standard conditions [29]. In contrast,

RESULTS

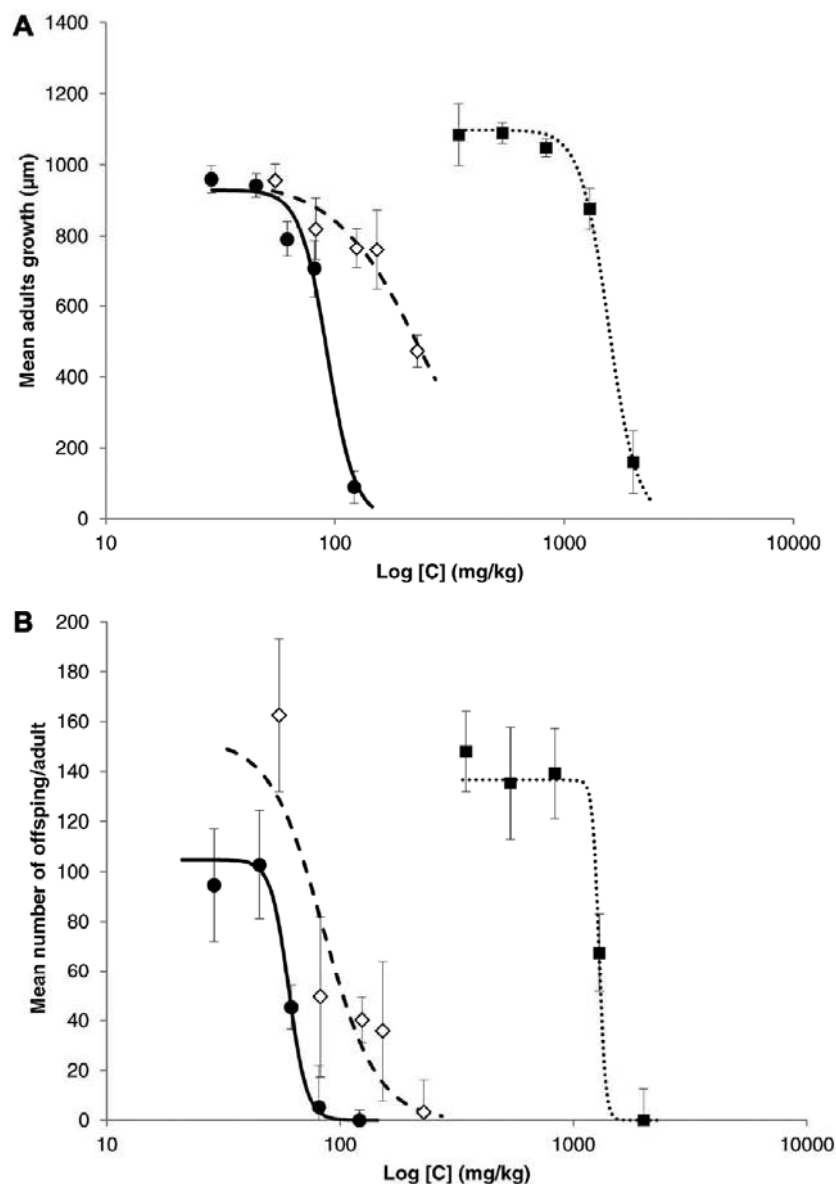


Figure 3. Dose–response data and estimated curves for growth (A: final body length – mean of initial body length; \pm standard deviation [SD]) and reproduction of adults (B: number of recovered juveniles/number of introduced adults; \pm SD) for reference chemicals in LUFA 2.2 soil. Experimental data are shown together with estimated dose–response curves obtained by fitting with the logistic Hill model. Circles and solid curve = nickel sulfate hexahydrate; lozenges and dashed curve = copper chloride dihydrate; squares and dotted curve = boric acid.

separation of adults is known and acceptable. An adult separation over 80% is recommended in the current standard [13], and Peredney and Williams [24] found an average of 99.9%, with their lowest adult recovery at 95%. It was thus necessary to gain knowledge about the separation of juveniles from the samples. For that purpose, different reproduction scenarios were tested to be representative of a low to expected reproduction in soil for 10 adults after the test period. For 4 of the 5 soils tested, the recovery of juveniles was similar (over 80%) between the current standard and the proposed methodology. However, the extraction ratios for soils prepared according to

the ISO standard were generally higher (~5–10%) and more homogenous than for the modified method. This can be explained by the fact that, in a 2-phase system, the nematodes can be in both phases; therefore, the separation could be enhanced because of a soil as well as a water recovery. Although during the separation protocol, attention might be kept on both coarser particles (e.g., sand), which can drag down individuals when shaking the tubes with soil and nematodes, and on floating materials (e.g., organic matter), which can interfere with the counting of juveniles. If soil samples with a high content of organic matter or containing indigenous nematodes have to be

RESULTATS

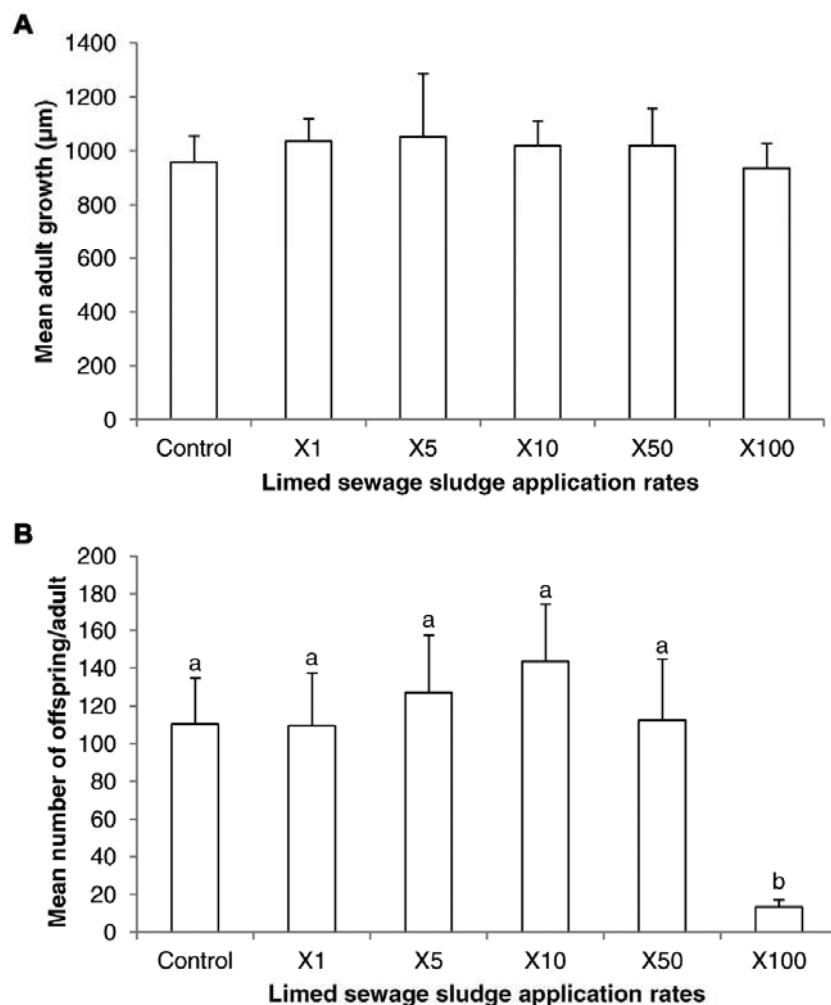


Figure 4. Growth (A; final body length – mean of initial body length; \pm standard deviation [SD]) and reproduction of adults (B; number of recovered juveniles/number of introduced adults; \pm SD) in mixtures of soil and limed sewage sludge (4 replicates per condition). Multiples of the application rate: $\times 1$, $\times 5$, $\times 10$, $\times 50$, and $\times 100$. Letters (a,b) indicate significant differences among test conditions, after analysis of variance and Tukey honestly significant difference tests ($\alpha = 0.05$).

tested, a luminescent transgenic strain that expressed green fluorescent protein (GFP) could be used as an alternative to the wild type, as has already been used for mortality purposes [30]. On comparing our results (over 80% of juvenile extraction) with those found in the literature [29], the modified methodology was acceptable in terms of the recovery of juveniles.

Using this methodology, we focused next on selecting a reference chemical for soil. Indeed, because no reference chemical is recommended for soil in the ISO 10872 [13], investigations were made regarding potential toxicants to determine dose–response effects under modified conditions using the standard soil, LUFA 2.2. The selected chemicals were already known to have adverse effects on soil invertebrates. Boric acid is a reference chemical widely used in ecotoxicological tests on soil invertebrates [18,31,32]. It was previously used by Becker et al. [23] to evaluate its suitability as a reference chemical for different organisms, including *C. elegans*, following the current ISO 10872 [13]. They determined an EC50 reproduction of 747 (95% CI 589–949) mg/kg. In the

present study, an EC50 reproduction of 1259 (95% CI 1135–1299) mg/kg was estimated under modified conditions. In the absence of interlaboratory variability evaluation, we hypothesized that the toxicity phenomenon in a 2-phase system is not acting in the same manner as in a 1-phase system. This difference in sensitivity between the methods highlights the fact that the moisture conditions of the samples can influence the endpoint responses. For comparison with other soil invertebrates, EC50s were recorded for this toxicant to different organisms such as collembola and enchytraeids [31] or earthworms [23]. The EC50 ranged from approximately 50 mg/kg (*Folsomia candida* reproduction endpoint) to 1400 mg/kg (*F. candida* avoidance endpoint), which means that the *C. elegans* endpoint responses under modified conditions are among the least sensitive to this chemical. Between the 2 heavy-metal salts tested, nickel sulfate was shown to be the most toxic compound to *C. elegans* under modified conditions. Unlike the previous chemicals, the effects on *C. elegans* of soil samples spiked with heavy metals are well documented [24,33]. Indeed, Peredney and Williams

[24] assessed the acute effects of nitrate and chloride salts of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) in K-medium spiked artificial (ASTM International) and natural (Tifton and Cecil) soils. Their objectives were first to evaluate the suitability of *C. elegans* as a test organism following survival endpoint [33] and then to determine the effects of both the carrier salt and the soil composition on heavy metal toxicity. Finally, they established acceptable exposure concentrations for soil [24]. More specifically, Peredney and Williams found high differences in sensitivity depending on the soil type, which were negatively correlated with the organic carbon content of soil samples. With regard to the soil type, the heavy metals spiked in the natural soil samples, close in texture and pH to the LUFA 2.2 soil, showed higher toxicities than in artificial soil. On average of the 3 soils, Peredney and Williams found that NiCl_2 was the most toxic compound (median lethal concentration [LC50] ranging from 44 mg/kg for Tifton soil to 165 mg/kg for Cecil soil, expressed as Ni^{2+}), followed by CuCl_2 (LC50 ranging from 25 mg/kg for Tifton soil to 251 mg/kg for Cecil soil, expressed as Cu^{2+}). In agreement with the results of the present study for sublethal endpoints in LUFA 2.2 soil, it was also found that the nickel salt was the most toxic. Moreover, whether reproduction or growth was the endpoint for both heavy metals, the calculated EC50s were in the same range as found by Peredney and Williams [24] in natural soils for survival. Differences in sensitivity, which were not investigated in the present study, could be explained by the vehicle solutions used for spiking heavy metals (K-medium compared with M9 buffer) and the spiked soils (Tifton and Cecil soils compared with LUFA 2.2); these factors may interact and influence the bioavailability of the metals.

Finally, the toxicity of a soil amended with a limed sewage sludge was assessed using the modified methodology, to assess the suitability of the protocol for the study of complex matrices. The mixtures moistened based on their WHC were found to be adapted for the study of this complex material because all the introduced organisms grew and reproduced under each condition. However no dose–response relationship was found for this material, for neither growth nor reproduction. In comparison with the control, responses of these endpoints were in the same range until 50 times the application rate of the limed sludge, which showed that this material had no toxic effect on *C. elegans* at its recommended application rate and even at overapplication rates. Nevertheless, the modified protocol allowed us to discern adverse effects after exposure to the highest rate.

CONCLUSION

In the present study, modifications of the current ISO standard protocol [13] using the nematode *C. elegans* as model organism were carried out to assess soil and complex materials. The current protocol was modified to moisten the samples on a WHC basis. Results showed that tests can be performed between 60% and 100% of the sample's WHC, with the same food supply in a lower volume. The separation of juveniles was efficient in both methods (>80%), and the difference between the 2 methods was minimal. At this step, the changes of the protocol were shown not to affect the recovery of juveniles. No reference chemical was recommended for soil in the standard, so our investigations demonstrated that *C. elegans* was sensitive to heavy-metal salts, especially nickel; therefore, this metallic salt can be suitable as a reference chemical for soil for both lethal and sublethal endpoints. For the complex matrix assessment, the protocol developed allowed us to discern adverse effects on the

endpoints studied. However, the limed sewage sludge used is not representative of the wide variety of AMIOM, so further work should focus on AMIOM testing with this methodology. With the overview of all of these results, it can be concluded that ecotoxicity test using *C. elegans* is a promising tool for the assessment of complex matrices such as soil and mixtures with AMIOM. The present study will contribute to the integration of the *C. elegans* growth and reproduction test in a test battery for further ecotoxicity assessment of AMIOM.

SUPPLEMENTAL DATA

Tables S1–S2. (19 KB DOCX)

Acknowledgment—The financial support from the French Ministry of Ecology, Sustainable Development, and Energy and French Environment and Energy Management Agency (contract 0975C0061) is gratefully acknowledged. Some strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by National Institutes of Health Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). The authors would like to thank especially the editor and the anonymous reviewers, whose comments on the manuscript at the reviewing stage greatly enhanced its clarity.

REFERENCES

- Yeates GW. 2003. Nematodes as soil indicators: Functional and biodiversity aspects. *Biol Fert Soils* 37:199–210.
- Salamon JA, Wolters V. 2009. Nematoda response to forest conversion. *Eur J Soil Biol* 45:184–191.
- Freckman DW, Baldwin JG. 1990. Nematoda. In Dindal DI, ed. *Soil Biology Guide*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp 155–200.
- Sochova I, Hofman J, Holoubek I. 2006. Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environ Int* 32:374–383.
- Neher DA. 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *J Nematol* 33:161–168.
- Oleszczuk P. 2008. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:496–505.
- Wilke BM, Riepert F, Koch C, Kühne T. 2008. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicol Environ Saf* 70:283–293.
- Domene X, Alcaniz JM, Andrés P. 2007. Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan *Folsomia candida*. *Appl Soil Ecol* 35:461–472.
- Domene X, Colon J, Uras MV, Izquierdo R, Avila A, Alcaniz JM. 2010. Role of soil properties in sewage sludge toxicity to soil collembolans. *Soil Biol Biochem* 42:1982–1990.
- Natal-da-Luz T, Serena T, Jesus B, Morais PV, Sousa JP. 2009. The use of sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. *J Soils Sediments* 9:246–240.
- Gunadi B, Edwards CA. 2003. The effects of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity, and survival of *Eisenia fetida* (Savigny; Lumbricidae). *Pedobiologia* 47:321–329.
- ASTM International. 2008. Standard Guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. E2172-01. In *Annual Book of ASTM Standards*. West Conshohocken, PA.
- International Organization of Standardization. 2010. Water quality—Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO 10872. Geneva, Switzerland.
- Sese BT, Grant A, Reid BJ. 2009. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Env Health* 72:1168–1180.
- Höss S, Ahlf W, Fahnenstich C, Gilberg D, Hollert H, Melbye K, Meller M, Hammers-Wirtz M, Heininger P, Neumann-Hensel H, Ottermann R, Ratte HT, Seiler TB, Spira D, Weber J, Feiler U. 2010. Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination: Determination of toxicity thresholds. *Environ Pollut* 158:2999–3010.
- Höss S, Ahlf W, Bergtold M, Bluebaum-Gronau E, Brinke M, Donnevert G, Menzel R, Möhlenkamp C, Ratte HT, Trauspurger W, von Danwitz B, Pluta HJ. 2012. Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872). *Environ Toxicol Chem* 31:1525–1535.

RESULTATS

2108 *Environ Toxicol Chem* 32, 2013

P. Huguier et al.

17. Wilke BM. 2005. Determination of chemical and physical soil properties. In Margesin R, Schinner F, eds, *Manual of Soil Analysis—Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Springer, Berlin, Germany, pp 47–95.
18. Römcke J, Athiainen J. 2007. The search for the “ideal” soil toxicity test reference substance. *Integr Environ Assess Manag* 3:464–466.
19. International Organization for Standardization. 2006. Soil quality: Pretreatment of samples for physico-chemical analysis. NF ISO 11464. Geneva, Switzerland.
20. French Association for Standardization. 2003. Soil quality: Particle size determination by sedimentation—Pipette method. NF X 31-107. Paris, France.
21. International Organization for Standardization. 2005. Soil quality: Determination of pH. ISO 10390. Geneva, Switzerland.
22. French Association for Standardization. 1999. Soil quality: Chemical methods—Determination of cationic exchange capacity (CEC) and extractable cations. NF X 31-130. Paris, France.
23. Becker L, Scheffczyk A, Förster B, Oehlmann J, Prinz J, Römcke J, Moser T. 2011. Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. *J Soils Sediments* 11:238–248.
24. Peredney CL, Williams PL. 2000. Comparison of the toxicological effects of nitrate versus chloride metallic salts on *Caenorhabditis elegans* in soil. In Price F, Brix V and Lane K, eds, *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Recent Achievements in Environmental Fate and Transport*, 9th Volume, ASTM STP 1381. ASTM International, West Conshohocken, PA, pp. 256–268.
25. Khanna N, Cressman CP III, Tatara CP, Williams PL. 1997. Tolerance of the nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, salinity, and hardness in aquatic media. *Arch Environ Contam Toxicol* 32:110–114.
26. Organization for Economic Co-Operation and Development. 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Paris, France.
27. R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
28. Peredney CL. 2004. Nematode bioassay protocol for soil toxicity screening. Washington State Department of Ecology, Seattle, WA, USA.
29. Höss S, Jänsch S, Moser T, Junker T, Römcke J. 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotox Environ Safe* 72:1811–1818.
30. Graves AL, Boyd WA, Williams PL. 2005. Using transgenic *Caenorhabditis elegans* in soil toxicity testing. *Arch Environ Con Tox* 48:490–494.
31. Amorim M, Natal-da-Luz T, Sousa J, Loureiro S, Becker L, Römcke J, Soares A. 2012. Boric acid as reference substance: Pros, cons, and standardization. *Ecotoxicology* 21:919–924.
32. Stegger P, Ebke KP, Römcke J. 2011. Boric acid as alternative reference substance for earthworm field tests. *J Soils Sediments* 11:330–335.
33. Peredney CL, Williams PL. 2000. Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. *Arch Environ Con Tox* 39:113–118.

I.2. Adéquation des protocoles d'essai de *C. elegans* aux substrats artificiels et naturels témoins, ainsi qu'aux éluats issus de ces substrats.

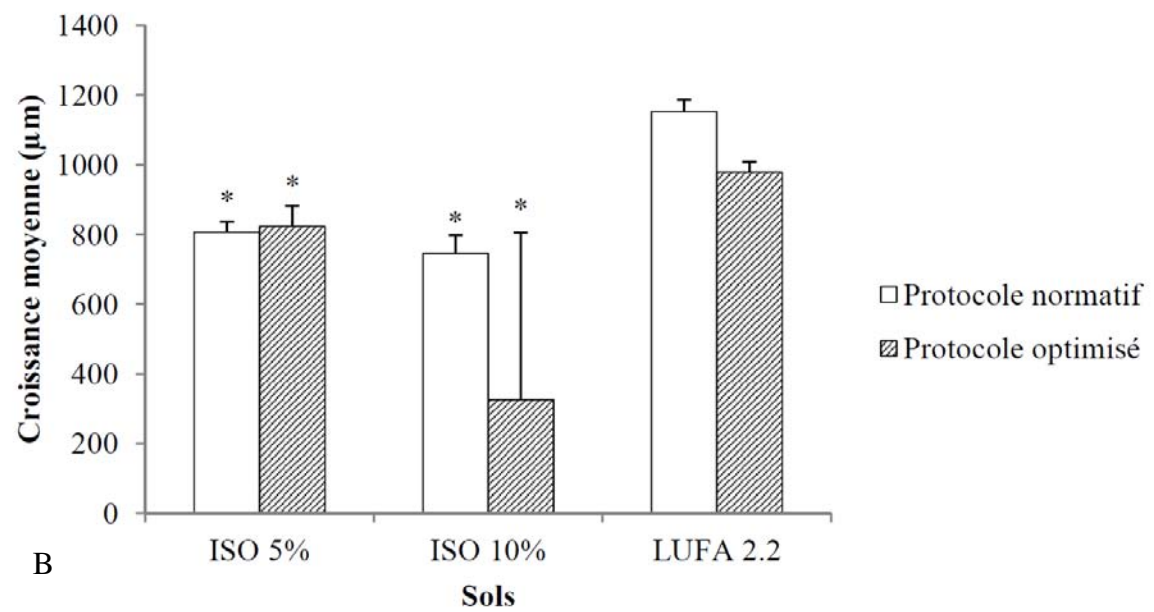
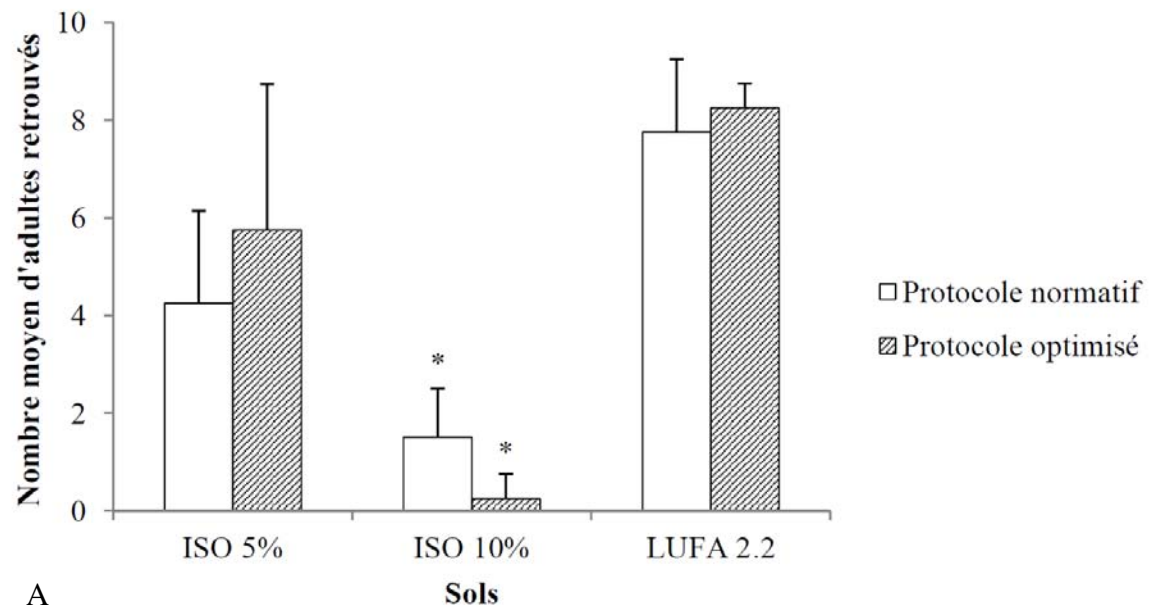
I.2.1. Applicabilité des essais à différents substrats témoins

Le substrat témoin préconisé par la norme ISO 10872 (2010) pour la réalisation des expositions terrestres avec *C. elegans* est le sol naturel LUFA 2.2. Cependant, le substrat témoin préconisé pour la plupart des autres organismes modèles du compartiment terrestre (*i.e.* collemboles, vers de terre, enchytréides et acariens prédateurs) est un sol artificiel (*e.g.* 10 % ou 5 % de tourbe).

Une série d'expériences a été mise en place afin de déterminer l'applicabilité des essais au sol artificiel. Pour cela, les organismes ont été exposés à du sol artificiel ISO à 5 % et à 10 % de tourbe, ainsi qu'à du sol naturel LUFA 2.2. Ces substrats témoins ont été testés en appliquant à la fois le protocole normatif et optimisé (quatre réplicats par condition).

Les résultats concernant la survie (*i.e.* nombre d'organismes adultes retrouvés), la croissance ainsi que la reproduction des nématodes sont présentés en Figure 19.

RESULTATS



RESULTATS

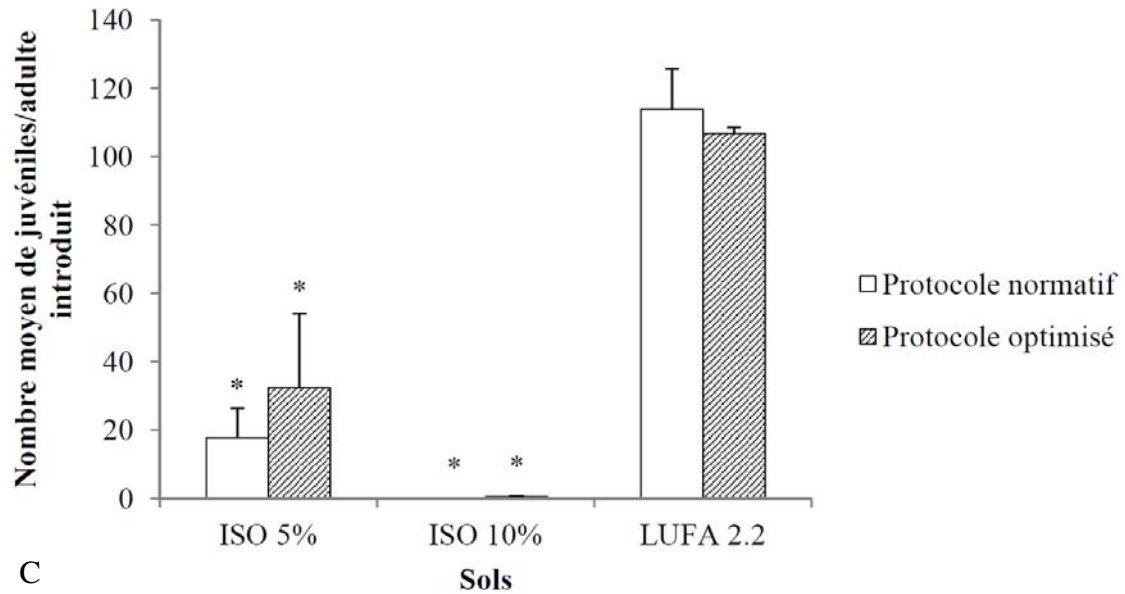


Figure 19 : Survie (A), croissance (B) et reproduction (C) de *C. elegans* exposé aux sols artificiels (*i.e.* 5 %, à 10 % de tourbe) ainsi qu’au sol naturel LUFA 2.2, préparés en utilisant les protocoles normatif et optimisé.

* : différences significatives avec le sol LUFA 2.2 (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

Ces résultats montrent une faible survie des organismes adultes pour le sol artificiel contenant 10 % de tourbe (*i.e.* < 2 adultes en moyenne). La croissance et la reproduction des nématodes dans les sols artificiels à 5 % et 10 % de tourbe sont également significativement inférieures par rapport au sol naturel LUFA 2.2. On peut noter que le critère de reproduction a été le plus affecté. Cela est notamment le cas pour le sol artificiel à 10 % de tourbe, où un très faible nombre de juvénile (*i.e.* < 1 juvénile/adulte retrouvé en moyenne) a été comptabilisé, quel que soit le protocole appliqué.

D’autre part, bien que les adultes aient montré une croissance moyenne d’environ 800 μm dans le sol artificiel à 5 % de tourbe, pour les deux protocoles, les nombres moyens de juvéniles retrouvés (*i.e.* respectivement 18 et 32 juvéniles/adulte introduit) sont inférieurs ou proches de la limite du critère de validité du paramètre de reproduction pour cet essai (*i.e.* ≥ 30 juvéniles/individus introduits). Ces résultats sont également statistiquement différents par rapport au nombre moyen de juvéniles/individus retrouvés comptabilisés dans le sol LUFA 2.2 (*i.e.* respectivement 106 et 113 juvéniles/adulte introduit).

RESULTATS

Ces différences entre les sols artificiels et le sol naturel peuvent être expliquées par la teneur élevée en kaolin des substrats artificiels, qui peut provoquer des effets négatifs sur la croissance et la reproduction de *C. elegans*, du moins pour les sédiments artificiels (ISO 10872, 2010). Par ailleurs, nous avons pu remarquer qu’au cours de l’extraction des nématodes à partir des sols artificiels, une partie de la tourbe était retrouvée dans les extraits aqueux à l’issue des quatre centrifugations successive. La présence de tourbe flottant dans les extraits contenant les nématodes a entraîné une difficulté de comptage des individus récupérés à partir des matrices artificielles, pouvant être source d’erreurs.

En tenant compte de l’écart constaté entre les sols artificiels (*e.g.* à 5% et 10% de tourbe) et le sol naturel LUFA 2.2, nous avons confirmé la non adéquation des matrices artificielles en tant que substrat témoin pour la réalisation des essais nématodes. Les essais menés par la suite ont donc été réalisés avec du sol naturel LUFA 2.2.

I.2.2. Applicabilité des essais aux éluats de différents substrats témoins

Dans le but de déterminer l’applicabilité des essais aux extraits aqueux de substrats de référence, les nématodes ont été exposés au milieu M9 (milieu témoin) ainsi qu’aux éluats de sol artificiel (*i.e.* 10 % de tourbe) et de sol naturel. Les données de croissance et de reproduction acquises pour cet essai sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Comparaison de la croissance et de la reproduction de *C. elegans*, exposé au milieu M9, aux éluats de sol artificiel ISO ou naturel LUFA 2.2 (quatre réplicats par condition).

	Croissance (μm)		Nombre de juvéniles/adulte introduit	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Milieu M9	1198,4	90,2	151,5	19,8
Eluat de sol artificiel ISO	1180,3	99,1	141,5	12,0
Eluat de sol naturel LUFA 2.2	1201,2	98,9	157,9	15,5

RESULTATS

Ces résultats montrent que la croissance et la reproduction du nématode sont équivalentes, après exposition des nématodes au milieu M9, aux éluats de sol artificiel ISO et de sol naturel LUFA 2.2. Les extraits aqueux de sol artificiel et de sol naturel ont donc été utilisés par la suite en remplacement du milieu M9, au cours de l'étude des MF par approche indirecte.

I.3. Détermination des rendements d'extraction des organismes pour les protocoles d'essai mis en place au laboratoire

L'étape d'extraction des organismes est une étape clé pour la mesure des différents critères d'effets (mortalité, croissance et reproduction). Il est donc apparu essentiel de caractériser les rendements d'extraction, plus particulièrement des nématodes et acariens juvéniles, pour les protocoles d'essai terrestre mis en place au laboratoire. L'examen de la littérature scientifique confirme l'absence de données dans ce domaine.

I.3.1. Adéquation du protocole d'extraction de *C. elegans* lors des essais en phase solide

Un protocole d'extraction est proposé dans la norme ISO 10872 (2010) concernant les sols, mais aucune donnée n'est fournie à propos des rendements d'extraction des juvéniles. Pour les nématodes adultes, ce paramètre fait partie des critères de validité des essais en conditions témoins (*i.e.* extraction > 80 % des individus introduits). Pour rappel, ce protocole préconise de rincer à l'eau du réseau les échantillons contenant les nématodes, après exposition, puis de centrifuger/éliminer le surnageant. Cette étape est suivie de trois extractions successives réalisées à l'aide d'une suspension de silice colloïdale (LUDOX). Afin de renseigner les rendements d'extraction des juvéniles, deux séries d'expériences en conditions témoins ont été mises en place.

La première vise à déterminer si les modifications apportées par le protocole optimisé n'influent pas sur l'extraction d'un nombre connu d'organismes introduits, par rapport au protocole normatif. Cette série d'expériences est présentée dans le Chapitre I.1 de cette partie.

La seconde vise à déterminer si le protocole d'extraction proposé dans la norme ISO 10872 (2010) permet d'extraire efficacement les organismes de sols présentant des textures différentes. Pour ce faire, les nématodes ont été exposés à trois sols naturels (LUFA 2.2, agricole et de forêt ; Tableau 12), en utilisant le protocole optimisé. A l'issue de la période

RESULTATS

d'exposition, les organismes ont été extraits puis dénombrés séparément dans le surnageant (*i.e.* eau et LUDOX) à chacune des étapes du protocole d'extraction. Une quatrième étape d'extraction au LUDOX a également été examinée, afin de déterminer si les indications du protocole normatif permettaient d'extraire effectivement la totalité des organismes adultes et juvéniles. Les résultats sont présentés en Figure 20.

Peu d'organismes ont en revanche été récupérés lors de la première extraction à l'eau (*i.e.* aucun adulte et moins de 0,5 % des juvéniles). Les adultes et les juvéniles ont été par ailleurs extraits en totalité au cours des trois centrifugations successives des sols avec la solution de silice colloïdale. On peut noter que les deux premières séries d'extraction au LUDOX ont permis de récupérer la totalité des adultes pour les sols agricole et LUFA 2.2 (*e.g.* 70 % pour le sol de forêt), et plus de 90 % des juvéniles pour les trois sols. La quatrième série d'extraction au LUDOX confirme l'efficacité des trois étapes d'extraction précédentes (*i.e.* récupération de moins de 0,5 % des adultes et des juvéniles).

Le protocole d'extraction des nématodes préconisé par la norme ISO 10872 (2010) permet donc d'extraire efficacement les nématodes adultes et juvéniles de sols présentant des textures différentes. Ce protocole a été par conséquent utilisé en l'état au cours des travaux de thèse.

RESULTATS

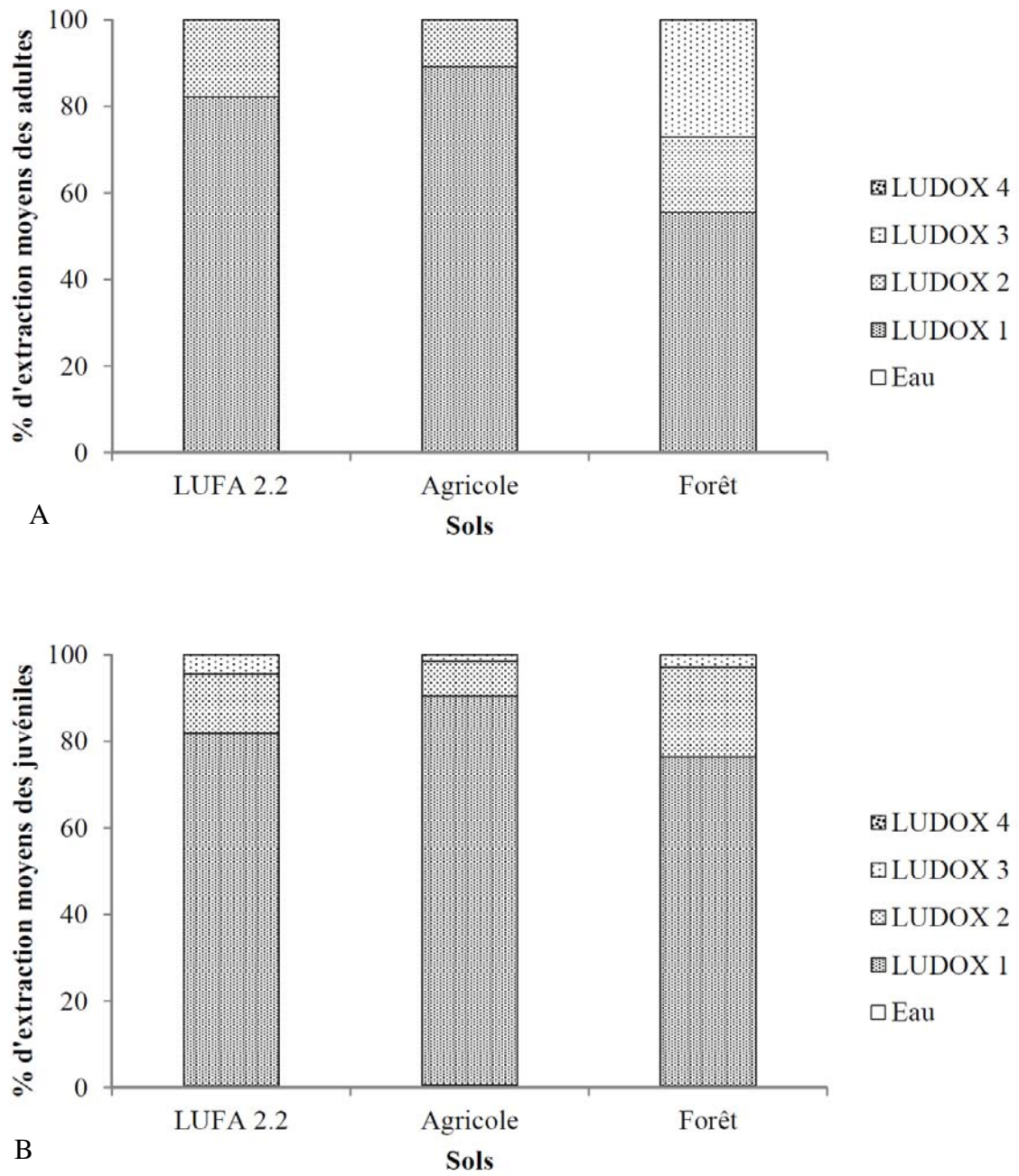


Figure 20 : Cumul des pourcentages d'extraction moyens des nématodes adultes (A) et juvéniles (B)

RESULTATS

I.3.2. Adéquation du protocole d'extraction mis en place pour *H. aculeifer*

Malgré l'existence d'un protocole standardisé pour l'acarien prédateur *H. aculeifer* (OCDE, 2008), aucune information relative à l'extraction des juvéniles ni à l'efficacité des méthodes proposées n'est disponible. L'efficacité du protocole d'extraction mis en place au laboratoire a donc été évaluée, en déterminant les rendements d'extraction sur un nombre connu de juvéniles introduits dans des sols de différentes textures.

Les six mêmes sols que ceux utilisés pour le nématode (*i.e.* sol artificiel ISO, sol naturel LUFA 2.2, sol agricole, sol de forêt et deux sols de jardin ; Tableau 12) ont été considérés pour évaluer l'influence de la texture sur la récupération des acariens prédateurs. Les sols ont été préparés selon la ligne directrice 226 de l'OCDE (2008). Différents scénarios de reproduction ont été testés, potentiellement représentatifs de la reproduction de dix femelles ayant une reproduction inhibée (*e.g.* 25 juvéniles/boîte), du critère de validité de la reproduction proposé dans la ligne directrice (*e.g.* 50 juvéniles/boîte) et de reproductions optimales (*e.g.* 100 et 150 juvéniles/boîte). Les résultats sont présentés dans le Tableau 19.

Pour tous les sols étudiés, les rendements d'extraction moyens ont été compris entre 61,1 % et 89 % (*e.g.* écart-types compris entre 0,7 % et 15,1 %). Les analyses statistiques intra-sols n'ont montré aucune différence significative entre les résultats obtenus pour chaque scénario de reproduction au sein de chaque sol. Le nombre de juvéniles introduits n'a donc pas d'influence sur l'extraction de ceux-ci.

RESULTATS

Tableau 19 : Rendements d'extraction de juvéniles *Hypoaspis aculeifer* obtenus pour des sols des différentes textures (trois réplicats par condition d'essai).

Sols	Nombre moyen de juvéniles introduits	Rendement d'extraction moyen (% \pm écart-type)
Artificiel ISO	25	72,0 \pm 8,0
	50	70,0 \pm 6,0
	100	69,0 \pm 4,6
	150	74,0 \pm 0,7
LUFA 2.2	25	62,7 \pm 4,6
	50	78,7 \pm 6,1
	100	72,3 \pm 15,1
	150	76,2 \pm 5,0
Agricole	25	70,7 \pm 12,2
	50	68,7 \pm 8,1
	100	82,3 \pm 2,5
	150	61,1 \pm 12,5
Forêt*	25	82,0 \pm 8,5
	50	86,7 \pm 6,1
	100	89,0 \pm 6,1
	150	79,6 \pm 8,3
Jardin JM	25	80,0 \pm 4,0
	50	72,7 \pm 3,1
	100	75,7 \pm 4,7
	150	75,1 \pm 3,7
Jardin J	25	77,3 \pm 11,5
	50	83,3 \pm 4,2
	100	66,7 \pm 6,8
	150	62,4 \pm 12,6

* : différences significatives avec le sol LUFA 2.2 (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

Les analyses statistiques inter-sols, comparant entre eux les résultats obtenus pour chaque type de sol, ont montré que les rendements d'extraction obtenus pour le sol de forêt (*i.e.* en moyenne 84,3 %) étaient significativement différents par rapport à ceux obtenus pour les autres sols (*i.e.* en moyenne 71,3 % pour le sol ISO, 72,5 % pour le sol LUFA 2.2, 70,7 % pour le sol agricole, 75,9 % pour le sol de jardin JM et 72,4 % pour le sol de jardin J). Ces résultats indiquent que les juvéniles ne sont pas extraits en totalité de sols artificiel ou naturels présentant des textures différentes.

Malgré cette constatation, il apparaît que les pourcentages d'extraction obtenus pour les sols étudiés sont relativement homogènes. On peut donc admettre que le taux d'erreur lors de la récupération des acariens juvéniles est similaire pour l'ensemble des conditions d'essai (*i.e.* environ 70 %).

I.4. Evaluation du caractère limitant de la nourriture lors des essais en milieu aqueux avec *C. elegans*

Les essais avec le nématode *C. elegans* nécessitent un apport de nourriture en début d'essai (*e.g.* suspension bactérienne d'*E. coli* de concentration connue). Dans le contexte de l'étude des MF par approche indirecte, les éléments contaminants apportés par ces matrices peuvent entraîner une toxicité sur les bactéries, diminuant ainsi la concentration bactérienne lors des essais. *A contrario*, les MF issues de déjections peuvent être une source de micro-organismes tels qu'*E. coli*, augmentant ainsi la concentration bactérienne lors des essais.

Même s'il existe des recommandations dans le protocole normatif (ISO 10872, 2010) concernant les concentrations bactériennes à utiliser pour les essais en milieu liquide (*i.e.* 1000 FAU, soit $1,1 \cdot 10^9$ cellules/mL) et en phase solide (*i.e.* 12000 FAU, soit $1,3 \cdot 10^{10}$ cellules/mL), il n'y a que peu d'informations dans la littérature scientifique concernant la tolérance du nématode vis-à-vis des concentrations en bactéries.

Par conséquent, il est apparu pertinent de déterminer l'effet d'une diminution ou d'une augmentation de la quantité de bactéries sur les critères d'effet de croissance et de reproduction de *C. elegans*. Pour cela, différentes suspensions bactériennes ont été testées en milieu aqueux à différentes concentrations : $1,0 \cdot 10^8$ cellules/mL, $5,5 \cdot 10^8$ cellules/mL, $2,2 \cdot 10^9$ cellules/mL et $1,1 \cdot 10^{10}$ cellules/mL (*i.e.* respectivement équivalentes à 100 FAU, 500 FAU, 2000 FAU et 10000 FAU). Les résultats, pour chacun des critères d'effet, ont été comparés à ceux obtenus pour une concentration en bactéries identique à celle préconisée par le protocole normatif pour ce type d'essai. Les tests ont été réalisés en conditions témoin, c'est-à-dire en ajoutant 0,5 ml de suspension bactérienne à 0,5 ml de milieu isotonique M9 (*i.e.* quatre réplicats par concentration). Les résultats sont présentés en Figure 21.

RESULTATS

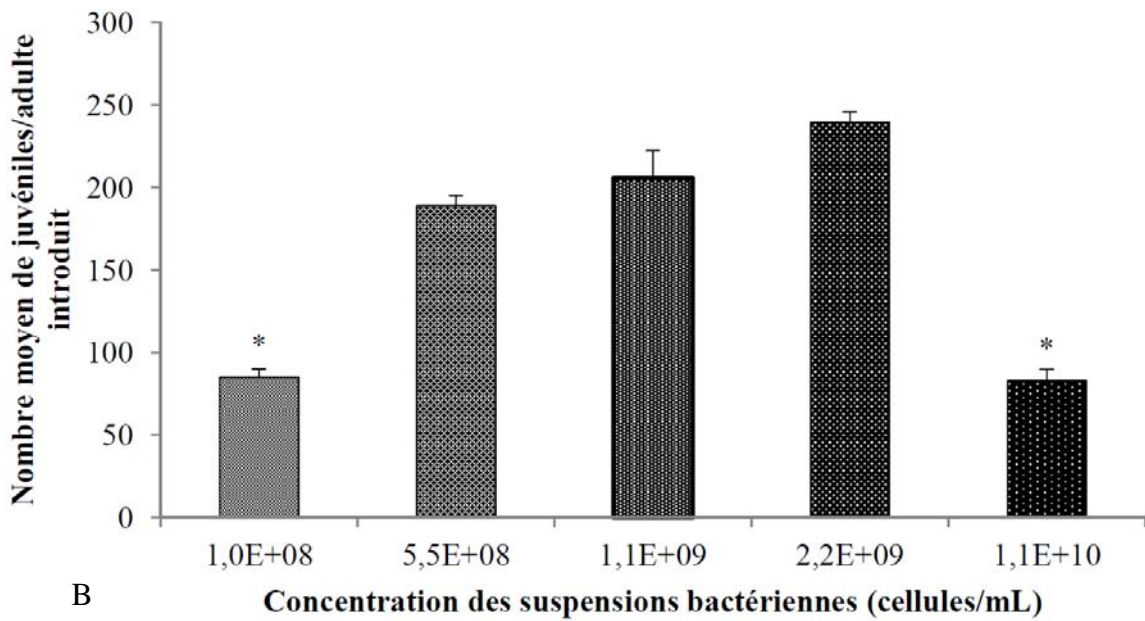
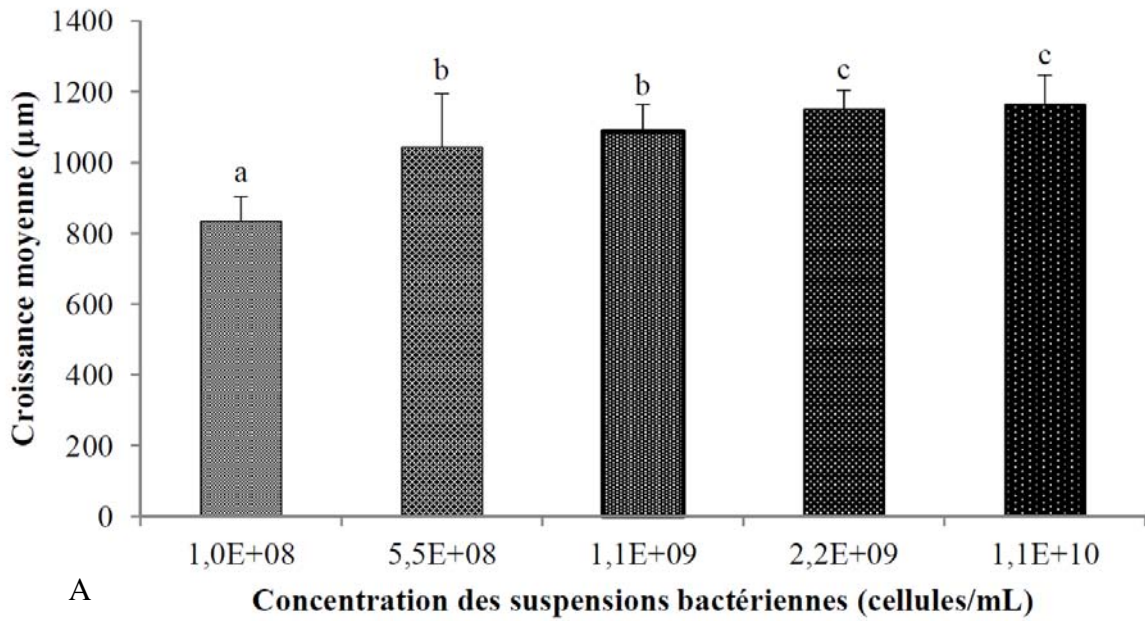


Figure 21 : Influence de la concentration en bactéries *E. coli* sur la croissance (A) et la reproduction (B) du nématode *C. elegans* en milieu aqueux

a, b, c : différences significatives avec la concentration en bactéries de $1,1 \times 10^9$ cellules/mL (1000 FAU) (données paramétriques, tests ANOVA et HSD de Tukey ; $\alpha = 0,05$).

* : différences significatives avec la concentration en bactéries de $1,1 \times 10^9$ cellules/mL (1000 FAU) (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

La croissance du nématode est similaire pour une concentration en bactéries de $1,1 \cdot 10^9$ cellules/mL (*i.e.* en moyenne : 1088 μm), soit la concentration préconisée par la norme ISO 10872 (2010), et de $5,5 \cdot 10^8$ cellules/mL (*i.e.* en moyenne : 1044 μm). Pour la plus faible concentration en bactérie étudiée (*i.e.* $1,0 \cdot 10^8$ cellules/mL), une réduction de la croissance d'environ 23 % (*i.e.* en moyenne : 834 μm) a été observée par rapport aux résultats obtenus en conditions témoins. Pour les deux plus fortes concentrations testées (*i.e.* $2,2 \cdot 10^9$ cellules/mL et $1,1 \cdot 10^{10}$ cellules/mL), les croissances mesurées (*i.e.* en moyenne : 1150 μm et 1165 μm , respectivement) ont été supérieures d'environ 10 % par rapport à celles mesurées en condition témoin.

Aucune différence significative n'a été déterminée sur la reproduction entre $5,5 \cdot 10^8$ cellules/mL et $1,1 \cdot 10^9$ cellules/mL. Par contre, des quantités dix fois moindre (*i.e.* $1,0 \cdot 10^8$ cellules/mL) ou dix fois plus importantes en nourriture (*i.e.* $1,1 \cdot 10^{10}$ cellules/mL), par rapport à ce qui est préconisé, ont entraîné des effets inhibiteurs d'environ 60 % (*i.e.* en moyenne : 85 juvéniles/adulte introduit et 83 juvéniles/adulte introduit, respectivement) pour ce critère. On peut noter qu'une reproduction supérieure d'environ 15 % (*i.e.* 239 juvéniles/adulte introduit) par rapport aux résultats acquis en condition témoin (*i.e.* en moyenne : 206 juvéniles/adulte introduit) a été mise en évidence pour la solution à $2,2 \cdot 10^9$ cellules/mL.

Compte tenu de ces résultats, on peut considérer que le nématode *C. elegans* présente une certaine tolérance par rapport à la concentration bactérienne préconisée dans le protocole normatif pour les essais en milieu aqueux (*i.e.* $1,1 \cdot 10^9$ cellules/mL, soit 1000 FAU). En effet, les critères de croissance et de reproduction ont été similaires pour des concentrations comprises entre $5,5 \cdot 10^8$ cellules/mL et $2,2 \cdot 10^9$ cellules/mL. Dans le cadre de l'étude des MF, l'apport de nourriture ne devrait donc pas être un facteur limitant pour caractériser les dangers de ces matices.

I.5. Evaluation de la sensibilité des deux organismes modèles à différentes substances de référence

Afin de vérifier la sensibilité des organismes modèles, il est coramment admis de tester régulièrement une substance chimique dont la toxicité est connue pour chaque espèce. Cela permet de suivre les éventuelles variations de la sensibilité des critères d'effet suivis, et par conséquent d'envisager, le cas échéant, un renouvellement des souches d'organismes.

RESULTATS

I.5.1. Sensibilité de *C. elegans* au BAC C-16

La substance de référence préconisée pour les essais en milieu liquide est le chlorure d'hexadécylbenzyltriméthylammonium monohydrate (BAC C-16) (ISO 10872, 2010), un produit surfactant utilisé comme désinfectant. Pour cette substance et d'après le document normatif, la CE_{50} du paramètre de croissance devrait être comprise entre 8 mg/L et 22 mg/L. Aucune information n'est en revanche fournie concernant les effets sur la reproduction. Les résultats des différents essais réalisés en milieu aqueux avec le BAC C-16 sont présentés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Résumé des CE_{50} obtenues avec *C. elegans* pour la substance de référence BAC C-16.

Substance : BAC C-16	CE_{50} croissance (mg/L)	(IC 95%)	CE_{50} reproduction (mg/L)	(IC 95%)
Essai 1	16,4	(16,0 – 17,0)	11,5	(11,2 - 11,9)
Essai 2	10,8	(10,4 - 11,4)	6,7	(6,0 - 7,2)
Essai 3	13,3	(12,9 - 13,7)	8,1	(7,7 - 8,3)
Essai 4	8,3	(7,9 - 8,6)	5,2	(4,9 - 5,4)
Essai 5	12,6	(12,0 - 13,2)	7,1	(6,4 - 7,6)
Essai 6	11,5	(10,4 - 13,1)	8,4	(7,9 - 9,2)

IC 95% : intervalle de confiance à 95%

Les résultats obtenus au laboratoire sur la croissance de *C. elegans* pour le BAC C-16 (*i.e.* 8,3 mg/L < CE_{50} croissance < 16,4 mg/L) sont en accord avec l'intervalle indiqué dans le document normatif. On peut également remarquer que la sensibilité du paramètre de reproduction (*i.e.* 5,2 mg/L < CE_{50} reproduction < 11,5 mg/L) est du même ordre de grandeur que celle du paramètre de croissance pour cette substance. En prenant chaque essai individuellement, les CE_{50} déterminées pour la reproduction sont toutefois toujours inférieures par rapport aux CE_{50} calculées pour la croissance.

Aucune substance de référence n'est par contre préconisée pour les matériaux solides (*i.e.* sols et sédiments). En complément de la validation de la sensibilité de notre souche de nématode, différentes substances chimiques (*i.e.* l'acide borique, le chlorure de cuivre, le sulfate de nickel et le BAC C-16), ayant une toxicité avérée sur d'autres organismes

RESULTATS

terrestres, ont été testées afin d'évaluer leur adéquation en tant que substance de référence potentielle pour les essais en phase solide.

Les résultats concernant l'acide borique, le chlorure de cuivre et le sulfate de nickel sont détaillés dans l'article concernant l'optimisation des essais terrestre avec *C. elegans* (Chapitre I.1. de cette partie). Quant au BAC C-16, aucun effet n'a été mis en évidence sur les différents critères d'effet aux concentrations évaluées (*i.e.* jusqu'à 100 mg/kg éq. sec, données non présentées).

I.5.2. Sensibilité de *H. aculeifer* à l'acide borique

L'acide borique est la substance de référence préconisée pour l'acarien prédateur *H. aculeifer* (OCDE, 2008). Ce produit est utilisé comme antiseptique et insecticide. La ligne directrice définit un intervalle de sensibilité acceptable compris entre 100 et 500 mg/kg (éq. sec) en ce qui concerne les valeurs de CE_{50} sur la reproduction ; le sol artificiel ISO étant utilisé en tant que substrat. Des essais ont été réalisés également avec le sol naturel LUFA 2.2, dans le but de comparer les réponses obtenues pour les deux substrats.

Les valeurs de toxicité calculées pour le sol artificiel et le sol naturel (*i.e.* CE_{50} = 294,2 mg/kg éq. sec ; IC 95% : 220,5 – 298,2 et CE_{50} = 214,2 mg/kg éq. sec ; IC 95% : 191,5 – 236,3, respectivement) sont en accord avec l'intervalle défini dans la ligne directrice de l'OCDE. Ces résultats indiquent que le type de substrat n'a pas d'influence sur la toxicité de l'acide borique vis-à-vis de *H. aculeifer*.

De plus, les valeurs de toxicité obtenues au cours de nos travaux sont similaires aux données de l'essais circulaire inter-laboratoire (*i.e.* CE_{50} min. – max. : 70,8 mg/kg – 402 mg/kg ; CE_{50} moyenne : 296 mg/kg) (Smit *et al.*, 2012).

Chapitre II. Evaluation de la sensibilité des organismes modèles aux éléments métalliques

Dans le cadre de l'homologation et de la mise sur le marché des MF, les ETM sont des contaminants potentiels dont la teneur doit être mesurée, et se trouver en deçà de valeurs seuils définies par la réglementation. Il est donc apparu pertinent de tester la toxicité de certains ETM sur le nématode *C. elegans* et l'acarien prédateur *H. aculeifer*, ce qui est, par ailleurs, peu renseigné dans la littérature scientifique. Les éléments sélectionnés sont parmi les plus représentatifs des apports au sol lors de l'épandage de MF (*i.e.* Cd, Cu, Ni, Pb et Zn).

Dans un premier temps, les deux organismes ont été exposés à chaque ETM afin de déterminer leur toxicité intrinsèque. Les essais avec *C. elegans* ont été menés en utilisant du sol naturel LUFA 2.2, alors que du sol artificiel à 5 % de tourbe a été utilisé avec *H. aculeifer*.

Dans un second temps, les ETM cités précédemment ont été testés en mélange, conformément aux quatre scénarios décrits au Chapitre II.2.1.2 de la partie Matériels & Méthodes.

Pour les deux organismes, les ETM introduits ont été par la suite dosés par ICP (Annexe 3), afin d'exprimer les résultats en fonction de concentrations mesurées.

II.1. Caractérisation de la toxicité des ETM vis-à-vis de *C. elegans*

II.1.1. Exposition de *C. elegans* aux ETM en milieu terrestre

Les résultats de toxicité mesurés pour cinq métaux (*i.e.* Cd, Cu, Ni, Pb et Zn), testés en utilisant du sol naturel LUFA 2.2 en tant que substrat d'essai, sont présentés en Figure 22, 23 et 24, respectivement pour le critère de survie, de croissance et de reproduction. Les valeurs de CE₅₀/CL₅₀ et de NOEC sont récapitulées dans les Tableaux 21 et 22, respectivement.

Concernant le cadmium, seule la plus forte concentration testée (*i.e.* 422 mg Cd²⁺/kg) a entraîné un effet toxique chez le nématode. Nous avons constaté environ 70 % de mortalité pour les organismes exposés à cette concentration. L'allure de la courbe concentration/réponse obtenue pour ce critère ne permet pas de calculer de CE_x par régression linéaire. Cependant, la CL₅₀ peut être estimée à environ 300 mg/kg (interpolation linéaire entre deux points, 193 mg/kg et 422 mg/kg). La croissance a été réduite de près de 60 % et 90 % pour les deux plus fortes concentrations évaluées (*i.e.* 193 mg Cd²⁺/kg et 422 mg Cd²⁺/kg), alors que la reproduction a été totalement inhibée à ces mêmes concentrations.

RESULTATS

Pour le cuivre, bien que la courbe effets/concentrations obtenue pour la mortalité soit plus prononcée par rapport à l'élément précédent, seule la plus forte concentration testée (*i.e.* 228 mg Cu²⁺/kg) a entraîné un effet létal chez les adultes (*i.e.* environ 80 % de mortalité observée par rapport au témoin). De même pour le paramètre de croissance, seule la plus forte concentration testée a entraîné une inhibition de ce critère, de l'ordre de 50 %. La reproduction a été quant à elle inhibée à plus de 60 %, pour des concentrations supérieures ou égales à 82 mg Cu²⁺/kg.

Concernant le nickel, la survie a été affectée à partir de 61 mg Ni²⁺/kg, alors que pour le paramètre de croissance, seule la plus forte concentration testée (*i.e.* 121 mg Ni²⁺/kg) a entraîné un effet significatif par rapport au témoin (*i.e.* proche de 90 %). La reproduction a été inhibée de 60 % pour 61 mg Ni²⁺/kg, et de plus de 90 % pour les deux plus fortes concentrations testées (*i.e.* 81 mg Ni²⁺/kg et 121 mg Ni²⁺/kg).

Aucun effet significatif n'a été mis en évidence sur la mortalité et la croissance aux concentrations maximales de plomb testées (*i.e.* 316 mg Pb²⁺/kg). A cette même concentration, une diminution d'environ 50 % de la reproduction a été constatée.

Quant au zinc, seule la plus forte concentration testée (*i.e.* 290 mg Zn²⁺/kg) a affecté la survie des organismes (diminution proche de 80 % par rapport au témoin). Il en va de même pour les critères d'effet de croissance et de reproduction, respectivement réduits d'environ 55 % et 95 % à cette même concentration.

RESULTATS

Tableau 21 : Résumé des CL₅₀ et CE₅₀ obtenues avec *C. elegans* après exposition à du sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par différents sels métalliques.

ETM	CL ₅₀ (mg/kg)	(IC 95%)	CE ₅₀ croissance (mg/kg)	(IC 95%)	CE ₅₀ reproduction (mg/kg)	(IC 95%)
Cd ²⁺	n.d.	n.d.	174,7	(162,9 - 185,4)	79,1	(68,1 - 90,7)
Cu ²⁺	172,5	(149,3 - 200,6)	234,9	(207,2 - 269,7)	85,2	(73,1 - 106,4)
Ni ²⁺	75,3	(69,6 - 81,2)	93,6	(88,7 - 98,6)	60,1	(55,8 - 63,0)
Pb ²⁺	> 316	n.d.	> 316	n.d.	> 316	n.d.
Zn ²⁺	262,1	(242,9 - 281,4)	283,3	(272,1 - 292,4)	236,4	(218,4 - 253,3)

n.d. : non déterminé

Tableau 22 : Résumé des NOEC obtenues avec *C. elegans* après exposition à du sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par différents sels métalliques.

ETM	NOEC mortalité (mg/kg)	NOEC croissance (mg/kg)	NOEC reproduction (mg/kg)
Cd ²⁺	193	108	61
Cu ²⁺	152	124	54,7
Ni ²⁺	61,7	81,1	45,1
Pb ²⁺	316	316	206
Zn ²⁺	226	226	226

RESULTATS

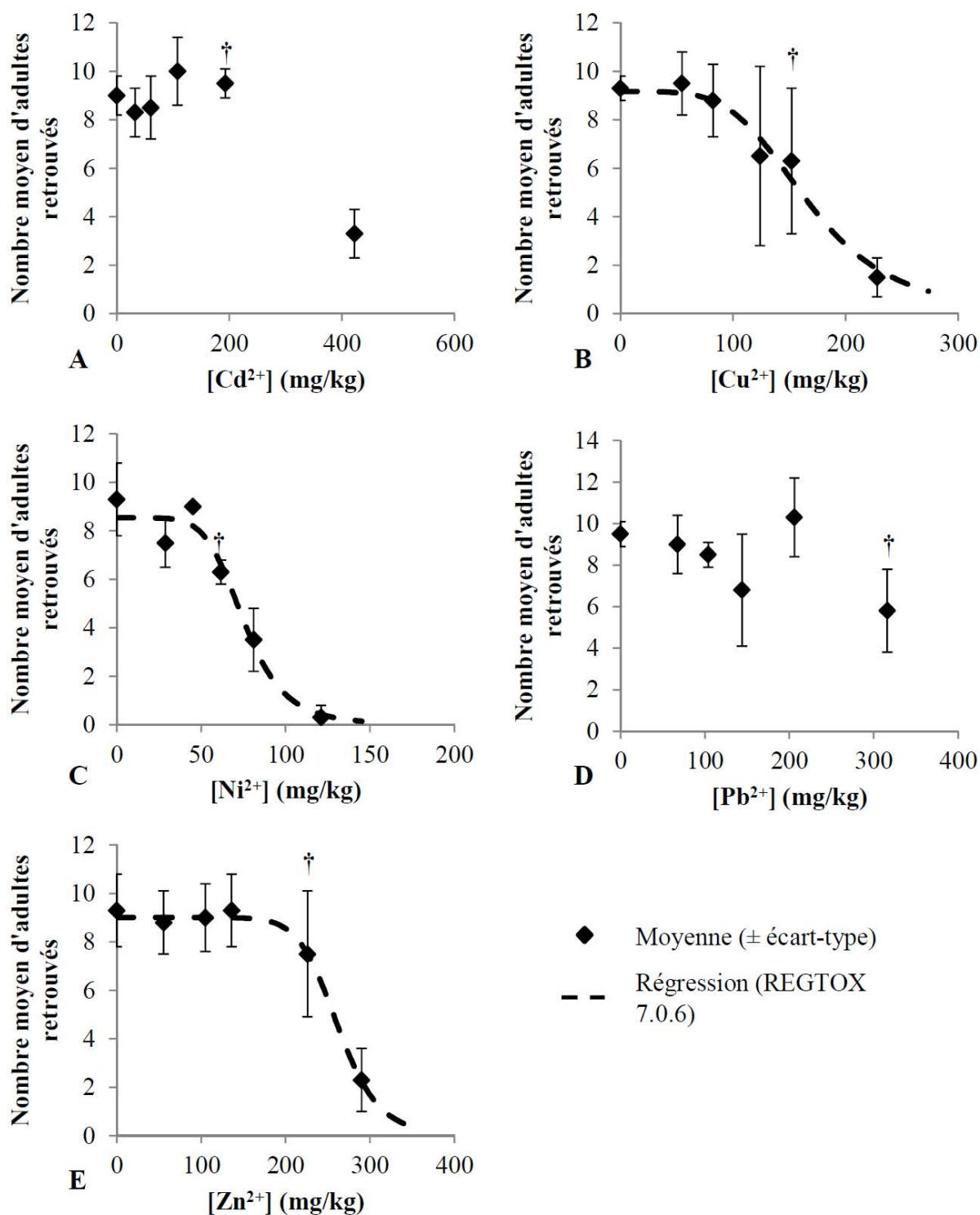


Figure 22 : Survie des nématodes adultes exposés au sol LUFA 2.2, artificiellement contaminé par différents sels métalliques

A : Cadmium ; B : Cuivre ; C : Plomb ; D : Nickel ; E : Zinc

Les concentrations sont exprimées en équivalent d'ions métalliques mesurés.

† : valeur de NOEC

RESULTATS

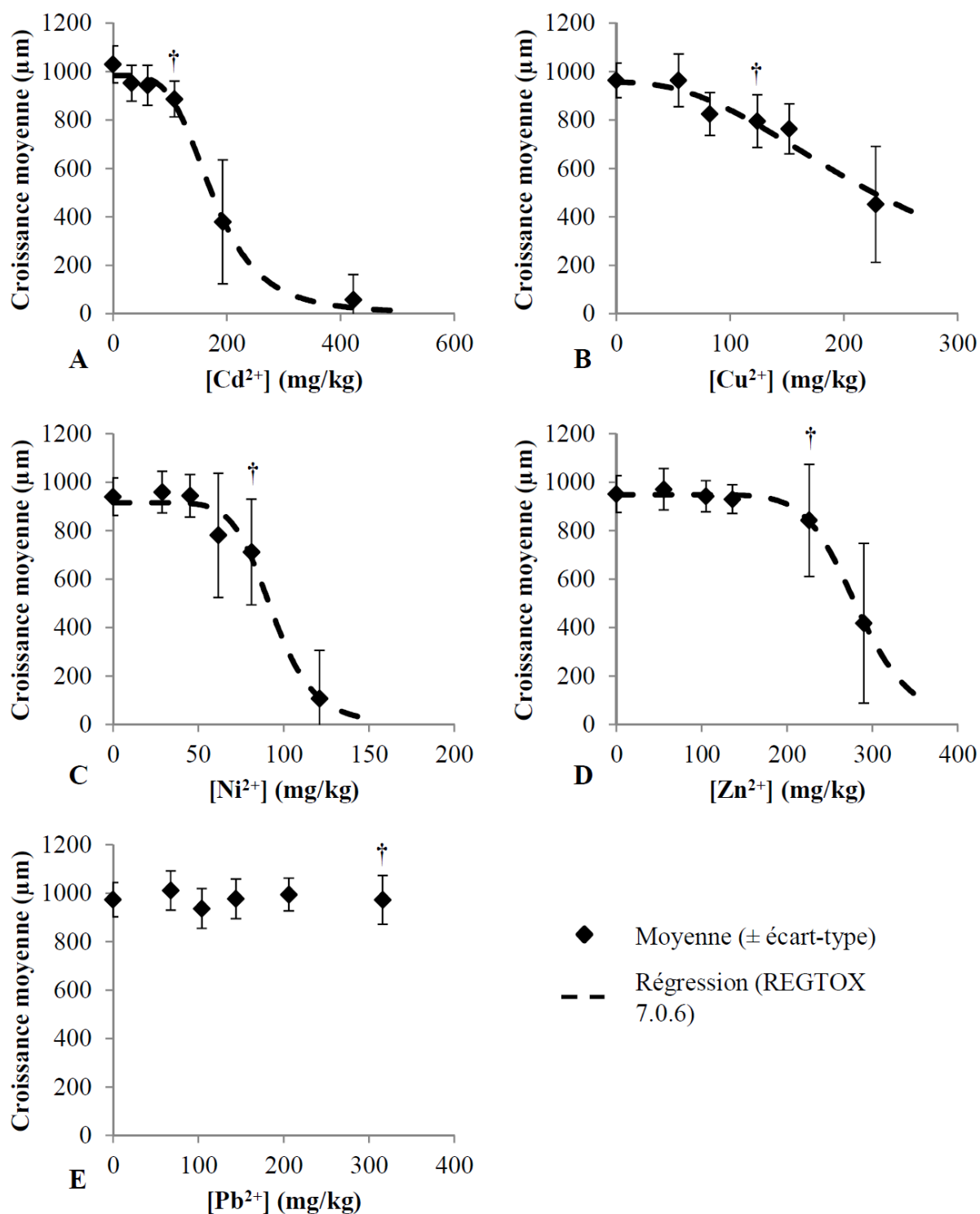


Figure 23 : Croissance des nématodes adultes exposés au sol LUFA 2.2, artificiellement contaminé par différents sels métalliques

A : Cadmium ; B : Cuivre ; C : Plomb ; D : Nickel ; E : Zinc

Les concentrations sont exprimées en équivalent d'ions métalliques mesurés.

† : valeur de NOEC

RESULTATS

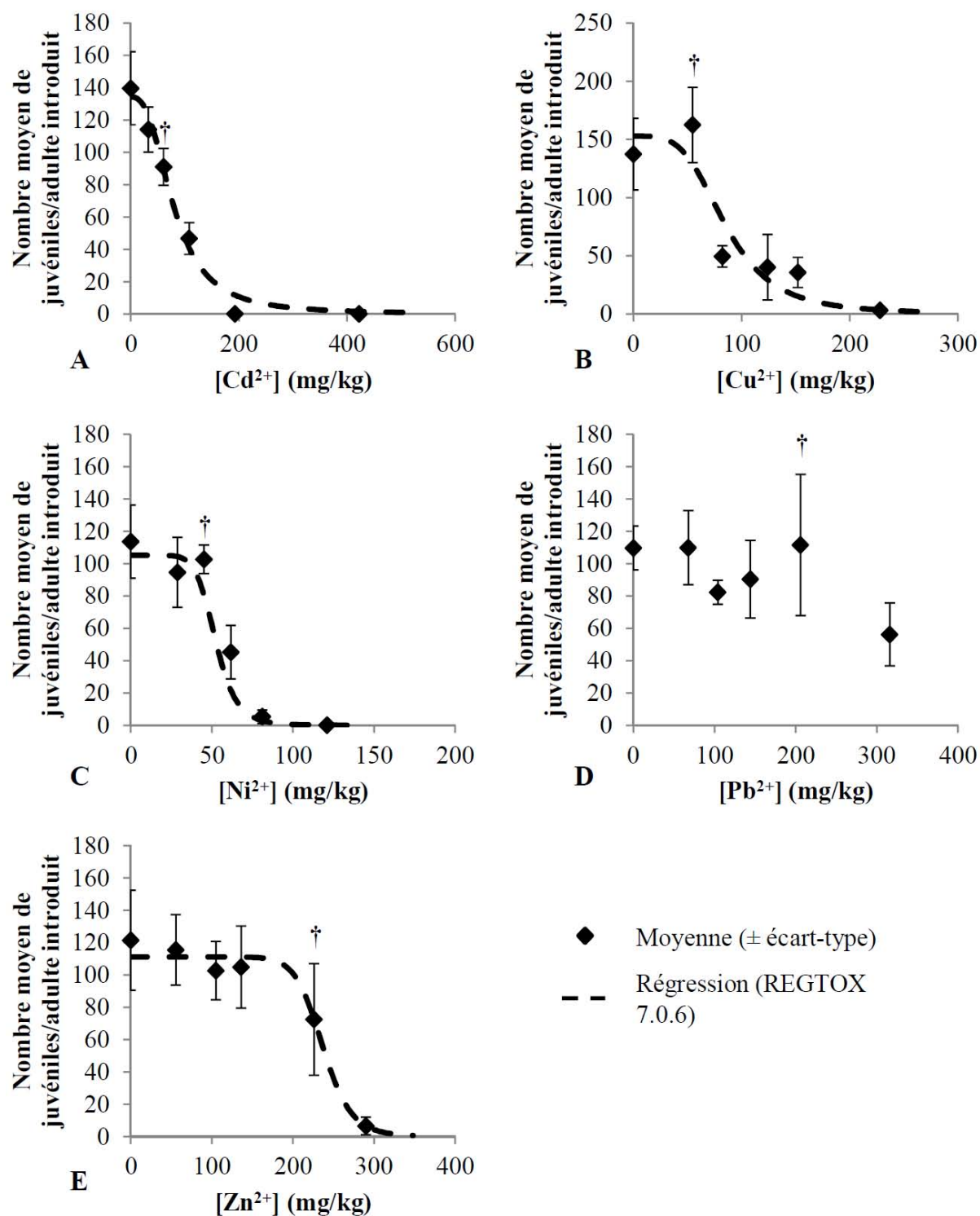


Figure 24 : Reproduction des nématodes adultes exposés au sol LUFA 2.2, artificiellement contaminé par différents sels métalliques

A : Cadmium ; B : Cuivre ; C : Plomb ; D : Nickel ; E : Zinc

Les concentrations sont exprimées en équivalent d'ions métalliques mesurés.

† : valeur de NOEC

RESULTATS

Parmi les ETM étudiés avec *C. elegans*, les concentrations létales et effectives médianes ainsi que les concentrations sans effet observé calculées pour le nickel ont été les plus faibles (*i.e.* CL₅₀ et CE₅₀ comprises entre 60,1 mg Ni²⁺/kg et 93,6 mg Ni²⁺/kg ; NOEC comprises entre 61 mg Ni²⁺/kg et 193 mg Ni²⁺/kg), quel que soit le critère d'effet, confirmant que cet élément le plus toxique parmi les ETM testés.

La sensibilité du paramètre de reproduction du nématode pour le cadmium (*i.e.* CE₅₀ = 79,1 mg Cd²⁺/kg) est proche de celle du nickel. Par contre, les critères de croissance et de survie des organismes ont été significativement réduits à des concentrations supérieures (*i.e.* NOEC survie = 152 mg Cd²⁺/kg ; NOEC croissance = 124 mg Cd²⁺/kg) par rapport au nickel.

Pour le cuivre, les valeurs de CL₅₀, de CE₅₀ et de NOEC ont été similaires, voire légèrement supérieures, aux valeurs déterminées pour le cadmium.

Les valeurs de CL₅₀ et de CE₅₀ obtenues avec *C. elegans* pour le zinc (*i.e.* comprises entre 236,4 mg Zn²⁺/kg et 283,3 mg Zn²⁺/kg) sont supérieures à celles obtenues pour le cuivre. La sensibilité de cet organisme vis-à-vis du zinc est donc plus faible par rapport aux ETM cités précédemment.

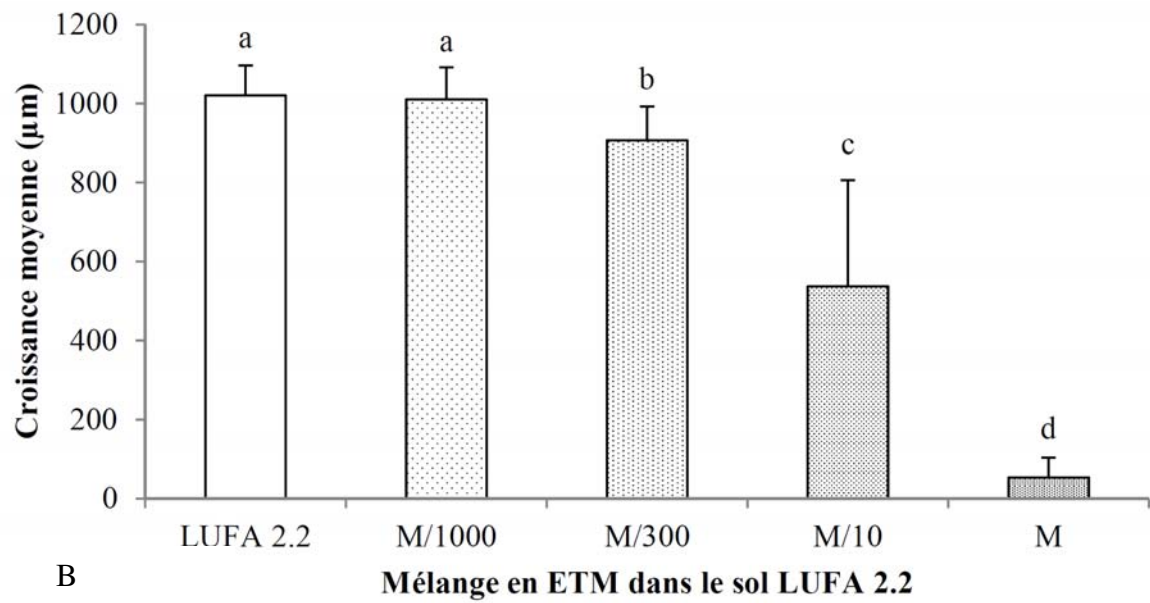
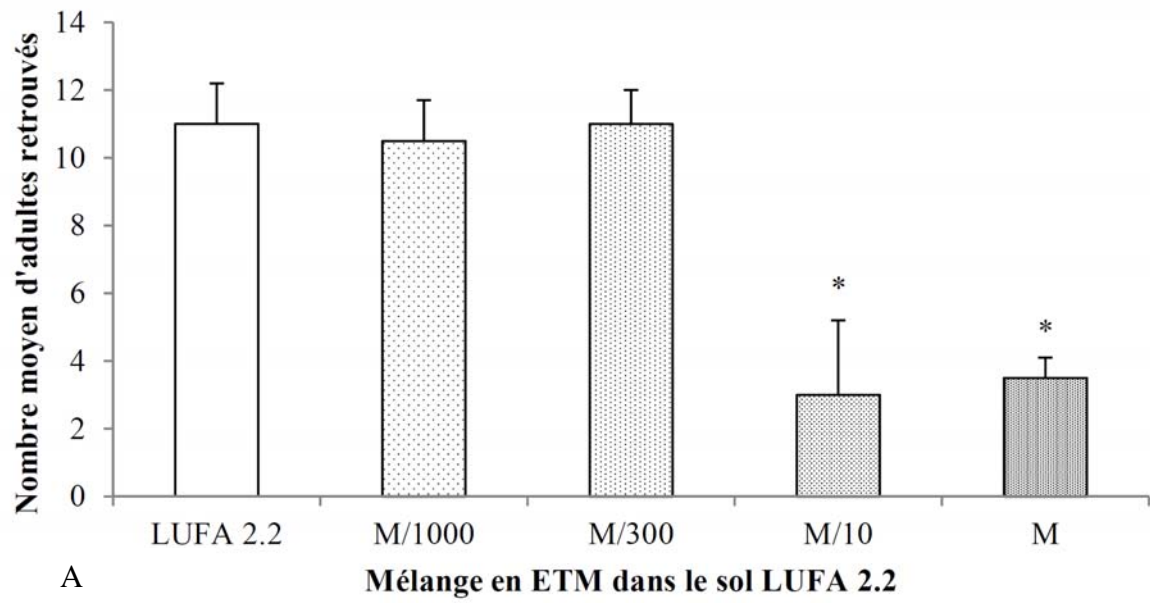
Les concentrations de plomb testées n'ont pas permis le calcul de CL₅₀/CE₅₀ sur les critères d'effet mesurés. La concentration maximale évaluée (*i.e.* 316 mg Pb²⁺/kg) n'a entraîné aucun effet ni sur la survie, ni sur la croissance des organismes. La reproduction a été significativement réduite de près de 50 % à cette même concentration, alors que les concentrations inférieures n'ont entraîné aucun effet (*i.e.* NOEC reproduction = 206 mg Pb²⁺/kg). On peut donc considérer que le plomb est l'élément le moins toxique parmi les ETM testés.

Par ailleurs, en comparant les valeurs de toxicité obtenues pour chaque ETM, le critère d'effet de reproduction apparaît plus sensible que les autres critères d'effet mesurés. Ces différences de sensibilité sont probantes pour le cadmium et le cuivre, mais plus faibles pour le nickel et le zinc.

II.1.2. Exposition de *C. elegans* à des mélanges d'ETM en milieu terrestre

Les résultats de l'étude des mélanges d'ETM en phase solide obtenus pour la survie, la croissance et la reproduction de *C. elegans* sont présentés en Figure 25.

RESULTATS



RESULTATS

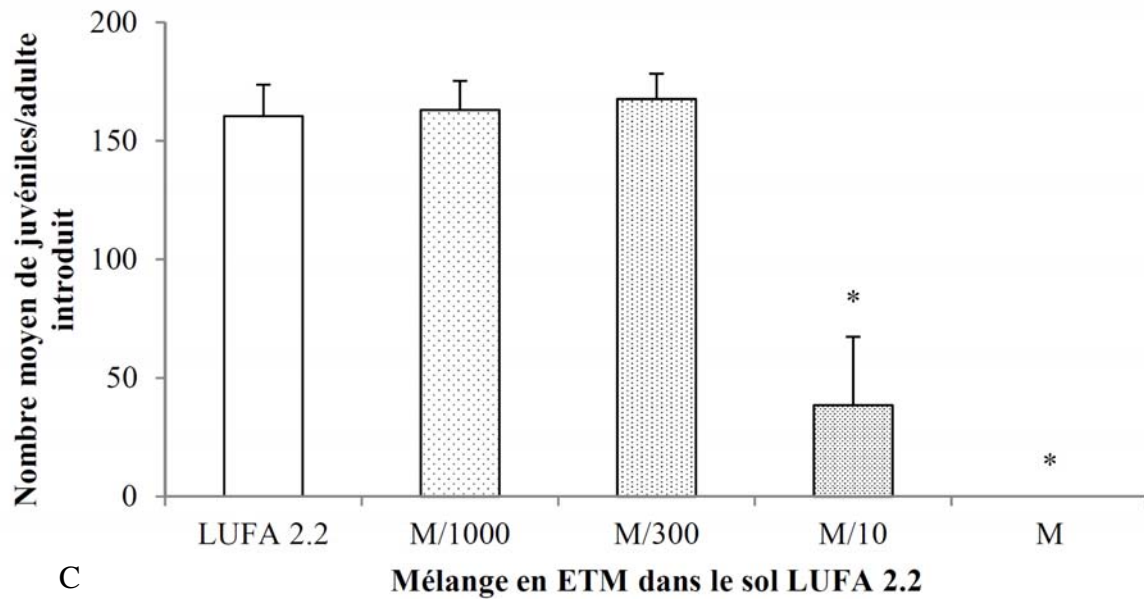


Figure 25 : Survie (A), croissance (B) et reproduction (C) de *C. elegans* exposé au sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par des mélanges d'ETM

* : différences significatives avec le sol LUFA 2.2 (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

a, b, c, d : différences significatives avec le sol LUFA 2.2 (données paramétriques, tests ANOVA et HSD de Tukey ; $\alpha = 0,05$).

Des effets significatifs, compris entre 73 % et 100 % d'inhibition, ont été observés pour la survie et la reproduction des organismes à des concentrations en ETM équivalentes aux concentrations acceptables dans les boues (*i.e.* M), ainsi que pour celles correspondant au scénario de « sur-épandage » (*i.e.* M/10). La croissance a été réduite (*i.e.* 86 %) seulement aux concentrations en ETM correspondant aux concentrations acceptables dans les boues. Les autres mélanges d'ETM testés n'ont eu aucun effet sur les paramètres mesurés.

Ces résultats montrent que des concentrations en ETM équivalentes aux quantités maximales annuelles (*i.e.* M/1000) et sur 10 ans (*i.e.* M/300) pouvant être introduites dans les sols lors de l'épandage de MF n'ont pas d'effet toxique sur le nématode *C. elegans*. Les concentrations équivalentes à celles pouvant être admises dans les MF avant incorporation dans les sols ont tout de même présenté une forte toxicité vis-à-vis de cet organisme.

RESULTATS

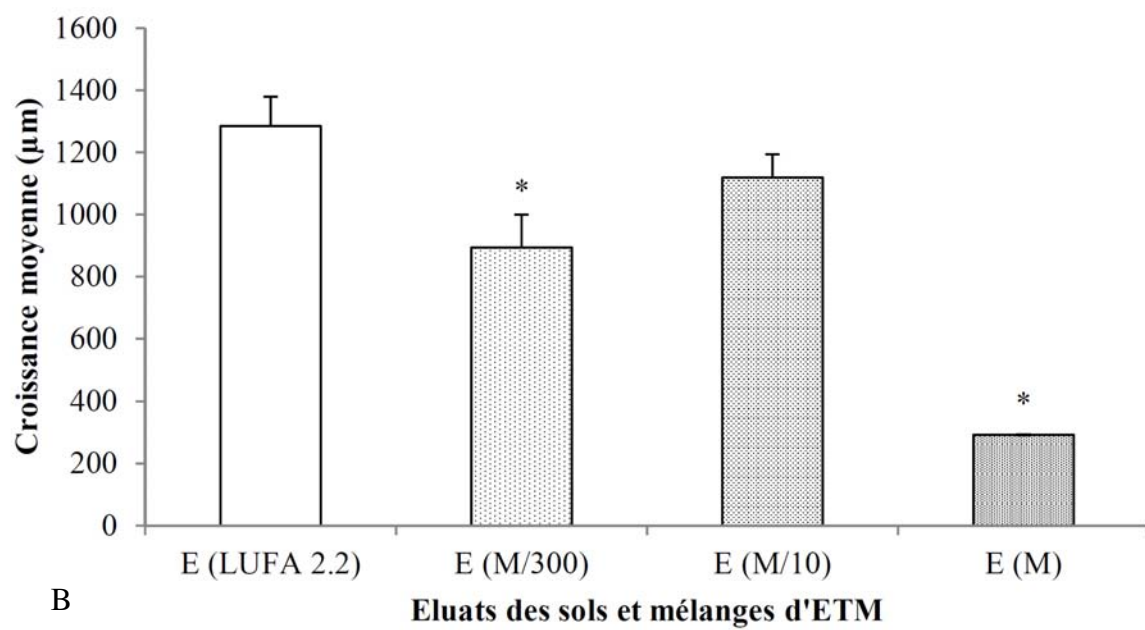
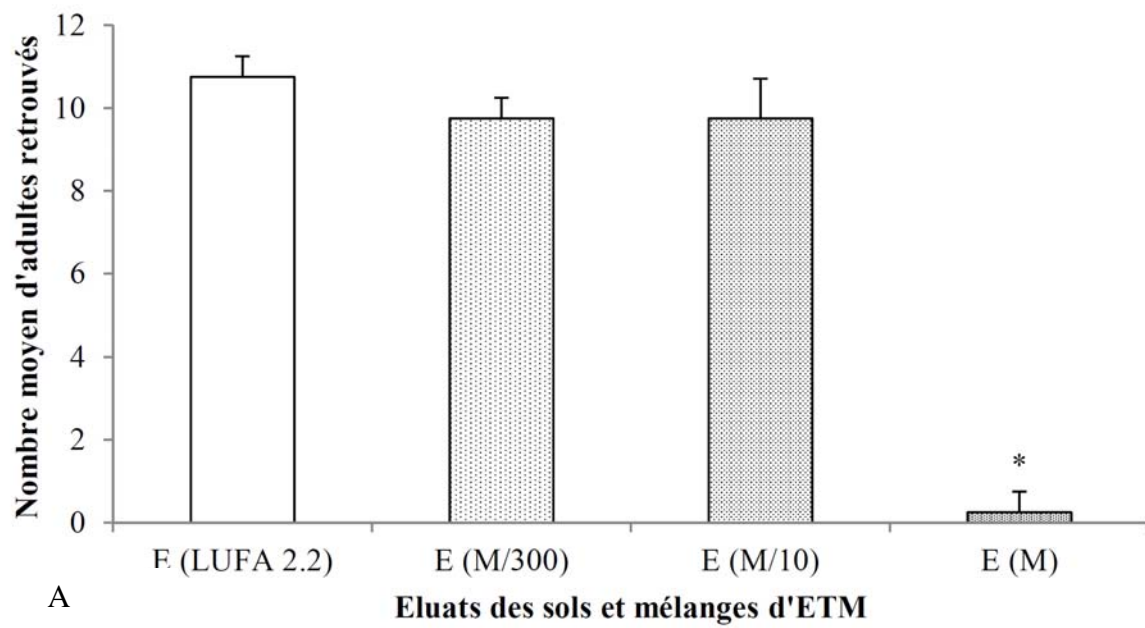
II.1.1. Exposition de *C. elegans* aux éluats de sols artificiellement contaminés par des mélanges d'ETM

Les sols artificiellement contaminé avec les différents mélanges des cinq ETM ont été utilisés pour effectuer les extractions aqueuses. L'éluat correspondant aux quantités annuelles d'ETM pouvant être introduites dans les sols cultivés (*i.e.* dilution 1/1000^{ème}) n'a pas été testé, car les concentrations en ETM potentiellement retrouvées (*i.e.* inférieures à 1 mg/L) étaient relativement faibles par rapport aux autres scénarios étudiés. La Figure 26 présente les résultats obtenus pour la survie, la croissance et la reproduction de *C. elegans* pour les trois autres scénarios.

Pour la mortalité, la croissance et la reproduction, l'éluat obtenu à partir du sol artificiellement contaminé à des concentrations en ETM équivalentes à celles acceptables dans les boues (*i.e.* E (M)) a entraîné une toxicité importante (*i.e.* comprise entre 77 % et 100 % d'inhibition par rapport au témoin). Une inhibition de la croissance et de la reproduction a également été observée pour les deux autres éluats testés (*e.g.* 13 % et 33 %).

Ces résultats montrent que les extraits aqueux des mélanges d'ETM à des concentrations représentatives d'une boue peuvent présenter une toxicité vis-à-vis de *C. elegans*, de la même manière que pour l'exposition en phase solide. Par contre, il apparaît que les éluats des mélanges d'ETM représentatifs d'apport au sol lors de l'épandage de MF présentent une toxicité vis-à-vis de *C. elegans*, du fait d'une certaine mobilité de ces éléments et une biodisponibilité plus importante par rapport au sol correspondant.

RESULTATS



RESULTATS

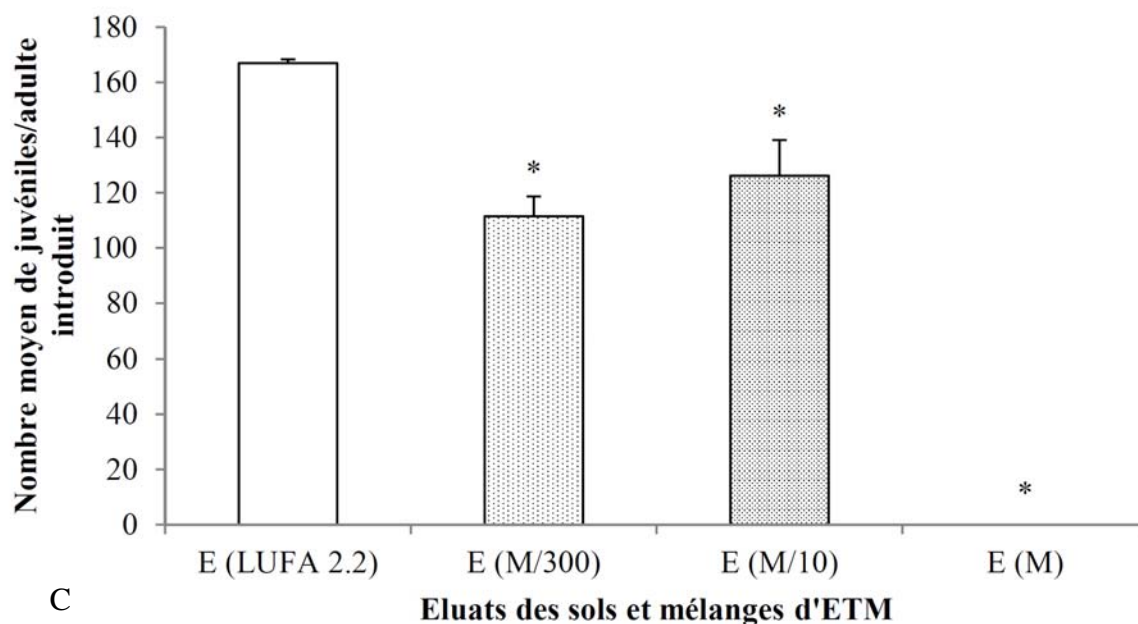


Figure 26 : Survie (A), croissance (B) et reproduction (C) de *C. elegans* exposé aux éluats de sol naturel LUFA 2.2 artificiellement contaminé par différents mélanges d'ETM.

* : différences significatives avec l'éluat de sol LUFA 2.2 (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

II.2. Caractérisation de la toxicité d'ETM vis-à-vis de *H. aculeifer*

II.2.1. Exposition de *H. aculeifer* aux ETM

Dans un premier temps, la toxicité des ETM a été testée en exposant les organismes à la fois en utilisant du sol artificiel ISO et du sol naturel LUFA 2.2. L'objectif de cette série d'expériences était d'avoir un premier niveau de connaissance quand aux effets potentiels de ces éléments sur la survie et la reproduction de l'acarien prédateur. D'autre part, l'utilisation de ces deux substrats a permis d'identifier leur potentielle influence sur la toxicité des ETM. Les données acquises ont été utilisées pour mettre en place une seconde série d'essais (avec le sol artificiel ISO), permettant de déterminer plus précisément les valeurs de CL_x/CE_x .

Les résultats de la première série, présentés en Figure 27 et 28 respectivement pour le sol artificiel et le sol naturel, sont exprimés en fonction des concentrations nominales introduites. Pour la seconde série (Figure 29), les résultats sont exprimés en fonction de concentrations mesurées par ICP. Les NOEC obtenues pour les deux séries sont présentées dans le Tableau 23.

RESULTATS

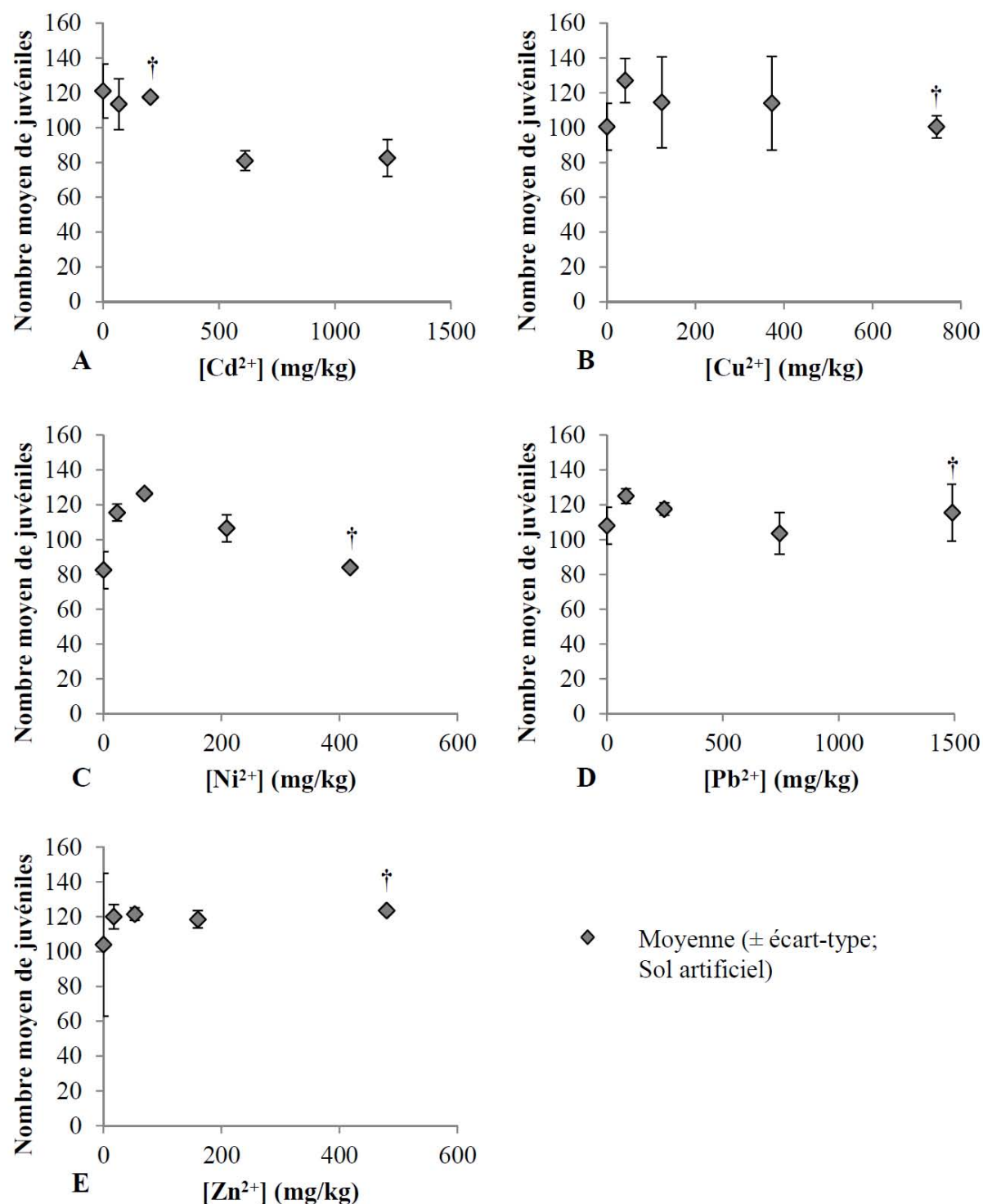


Figure 27 : Reproduction de l'acarien *H. aculeifer* exposé au sol artificiel ISO, contaminé par différents sels métalliques (Série 1)

A : Cadmium ; B : Cuivre ; C : Plomb ; D : Nickel ; E : Zinc

Les concentrations sont exprimées en équivalent d'ions métalliques nominales.

† : valeur de NOEC

RESULTATS

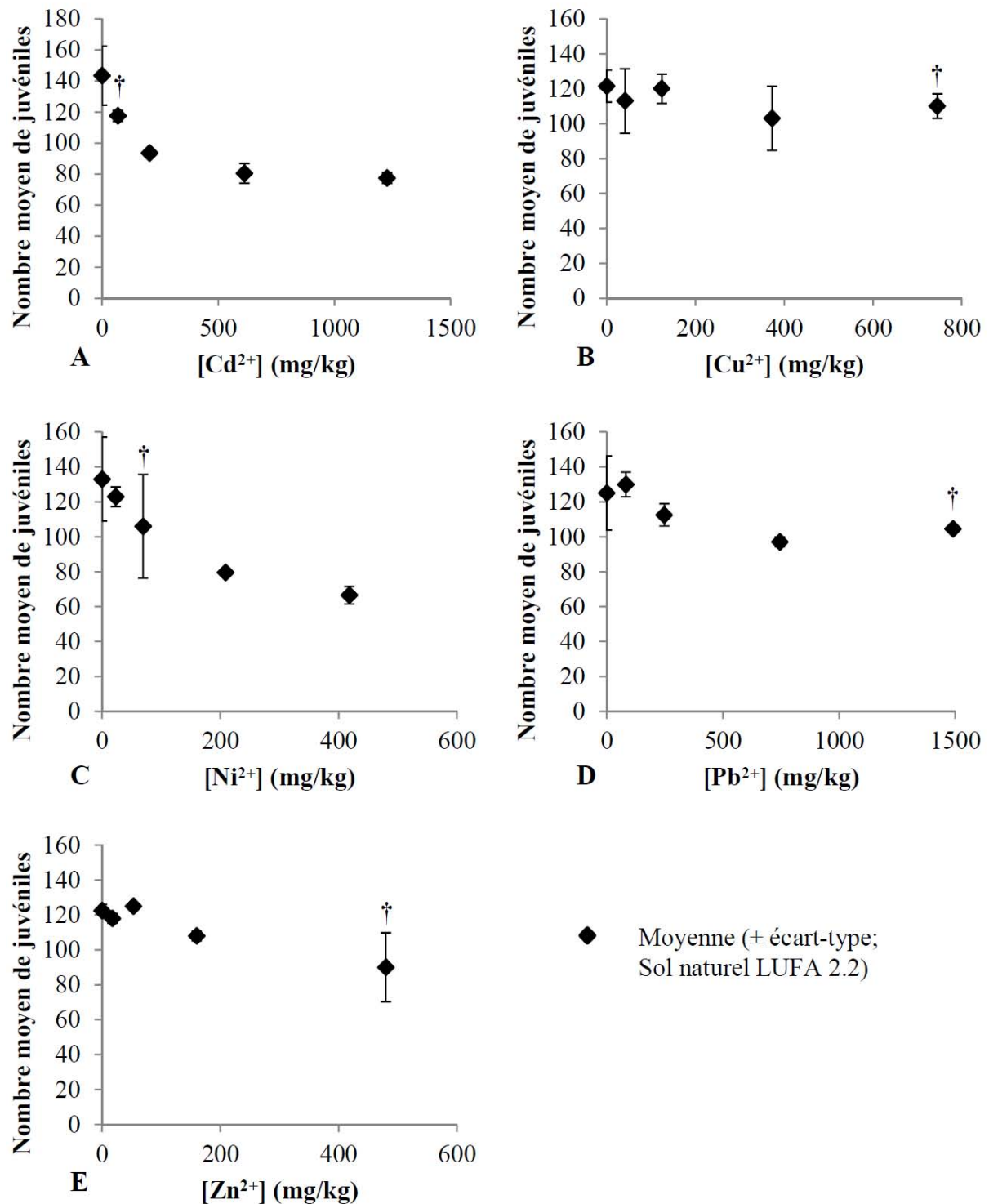


Figure 28 : Reproduction de l'acarien *H. aculeifer* exposé au sol naturel LUFA 2.2 contaminé par différents sels métalliques (Série 1)

A : Cadmium ; B : Cuivre ; C : Plomb ; D : Nickel ; E : Zinc

Les concentrations sont exprimées en équivalent d'ions métalliques nominales.

† : valeur de NOEC

RESULTATS

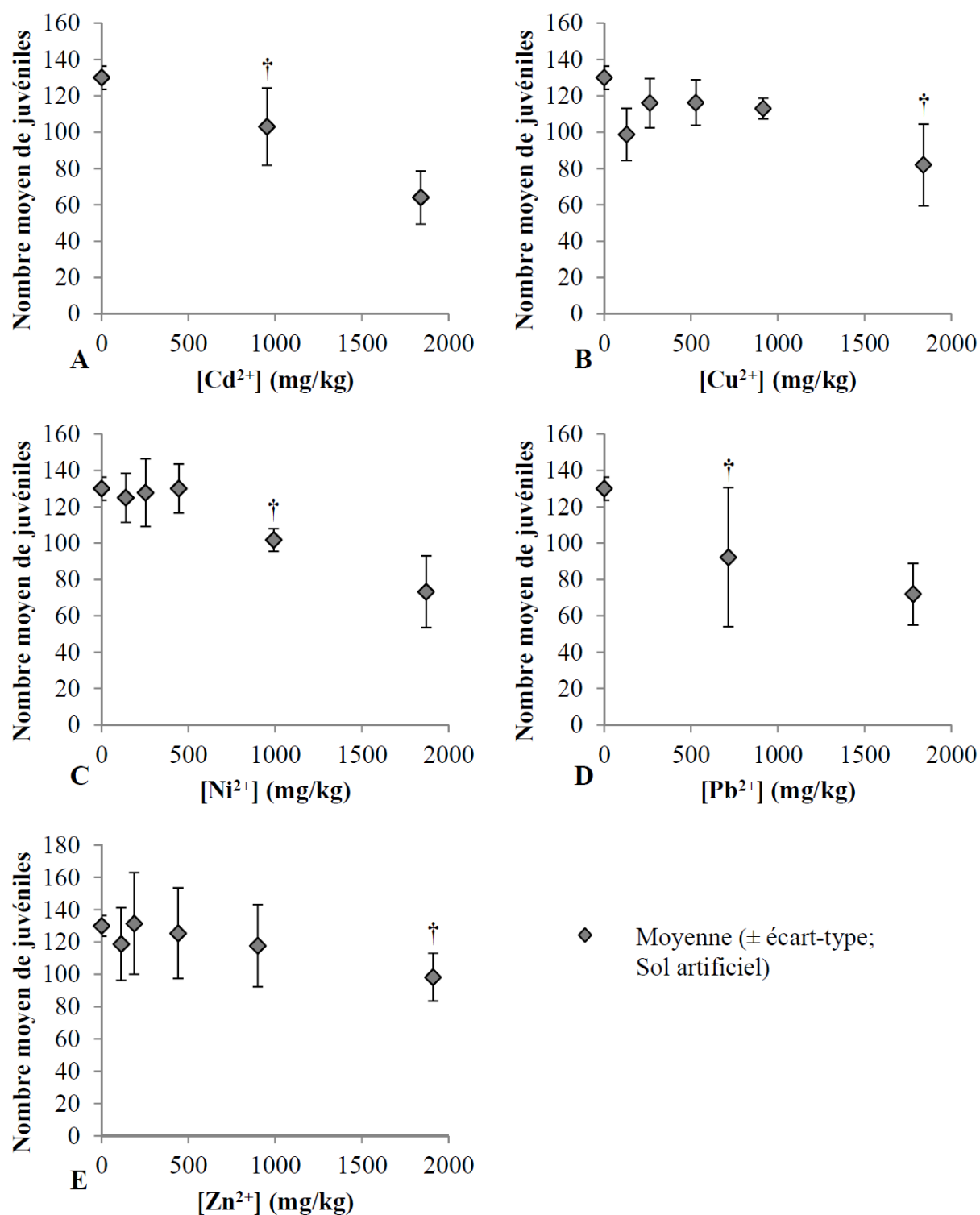


Figure 29 : Reproduction de l'acarien *H. aculeifer* exposé au sol artificiel ISO contaminé par différents sels métalliques (Série 2)

A : Cadmium ; B : Cuivre ; C : Plomb ; D : Nickel ; E : Zinc

Les concentrations sont exprimées en équivalent d'ions métalliques mesurées.

† : valeur de NOEC

RESULTATS

Tableau 23 : Résumé des NOEC déterminées avec *H. aculeifer* pour le cadmium, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc.

ETM	NOEC sol ISO - série 2 (mg/kg)
Cd ²⁺	953
Cu ²⁺	1840*
Ni ²⁺	992
Pb ²⁺	715
Zn ²⁺	1910*

* : valeurs par défaut

Au cours de la première série de tests réalisés avec le sol artificiel ISO, les concentrations maximales testées pour le cuivre (*i.e.* 745 mg Cu²⁺/kg), le nickel (*i.e.* 418 mg Ni²⁺/kg), le plomb (*i.e.* 1490 mg Pb²⁺/kg) et le zinc (*i.e.* 480 mg Zn²⁺/kg) n'ont eu aucun effet toxique sur la reproduction des acariens. Pour le cadmium, les deux plus fortes concentrations testées (*i.e.* 613 mg Cd²⁺/kg et 1226 mg Cd²⁺/kg) ont entraîné des inhibitions statistiquement significatives de l'ordre de 25 % par rapport au témoin, sans toutefois faire apparaître de relation concentration/effet distincte.

En se focalisant sur les essais réalisés avec le sol naturel LUFA 2.2, les concentrations maximales évaluées pour le cuivre (*i.e.* 745 mg Cu²⁺/kg), le plomb (*i.e.* 1490 mg Pb²⁺/kg) et le zinc (*i.e.* 480 mg Zn²⁺/kg) n'ont eu aucun effet toxique sur le critère d'effet de reproduction. Des effets significatifs, compris entre 35 % et 45 % d'inhibition par rapport au témoin, ont été déterminés sur le paramètre de reproduction pour des concentrations comprises entre 204 mg Cd²⁺/kg et 1226 mg Cd²⁺/kg. De façon identique au sol ISO, ces résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une relation concentration/effet nette. Les deux plus fortes concentrations testées pour le plomb (*i.e.* 745 mg Pb²⁺/kg et 1490 mg Pb²⁺/kg) ont entraîné des effets sur la reproduction (*i.e.* 40 % et 50 % d'inhibition, respectivement). Par ailleurs, la réponse des organismes concernant le cuivre, le plomb et le zinc a été similaire pour les deux substrats utilisés.

Au cours de la seconde série d'expérimentations, les concentrations maximales évaluées pour le cuivre et le zinc (*i.e.* 1840 mg Cu²⁺/kg et 1910 mg Zn²⁺/kg, respectivement) n'ont entraîné aucun effet sur la reproduction de l'acarien *H. aculeifer*. Pour le cadmium, le plomb, ainsi que pour le nickel, seules les concentrations maximales testées (*i.e.* 1839 mg Cd²⁺/kg, 1870 mg Ni²⁺/kg et 1780 mg Pb²⁺/kg) ont entraîné une inhibition de la reproduction, de l'ordre de 50 %.

RESULTATS

Ces résultats montrent que l'acarien *H. aculeifer* est relativement peu sensible aux cinq ETM évalués, présentant des NOEC comprises entre 715 mg/kg et 1910 mg/kg pour la seconde série d'expériences. On peut raisonnablement estimer que les valeurs de CE₅₀ sont proches de 2000 mg/kg pour le cadmium, le nickel et le plomb.

II.2.2. Exposition de *H. aculeifer* aux mélanges d'ETM

La toxicité des mélanges d'ETM a également été étudiée pour *H. aculeifer*, de la même manière que pour *C. elegans*. Concernant l'acarien, les essais ont été menés en utilisant du sol artificiel ISO ainsi que du sol naturel LUFA 2.2. Les résultats obtenus pour les critères de survie et de reproduction sont présentés en Figure 30.

Les concentrations en ETM équivalentes à celles acceptables dans les boues destinées à l'utilisation agricole (*i.e.* M) n'ont entraîné aucun effet sur la survie des adultes. En revanche pour le nombre de juvéniles produits, des inhibitions supérieures à 80 % ont été mises en évidence, et ce pour les deux substrats utilisés. Les concentrations en ETM représentatives des flux limites acceptables dans les sols lors de l'utilisation de MF (*i.e.* M/1000, M/300 et M/10) n'ont entraîné aucun effet sur la survie ni sur la reproduction des acariens.

Les concentrations en ETM équivalentes aux quantités maximales annuelles (*i.e.* M/1000) et sur 10 ans (*i.e.* M/300) pouvant être introduites dans les sols lors de l'épandage de MF n'ont donc pas d'effet sur *H. aculeifer*. Seules les concentrations équivalentes à celles pouvant être admises dans les MF avant incorporation dans les sols ont présenté une forte toxicité vis-à-vis de la reproduction de cet organisme, et ce pour les deux substrats utilisés.

RESULTATS

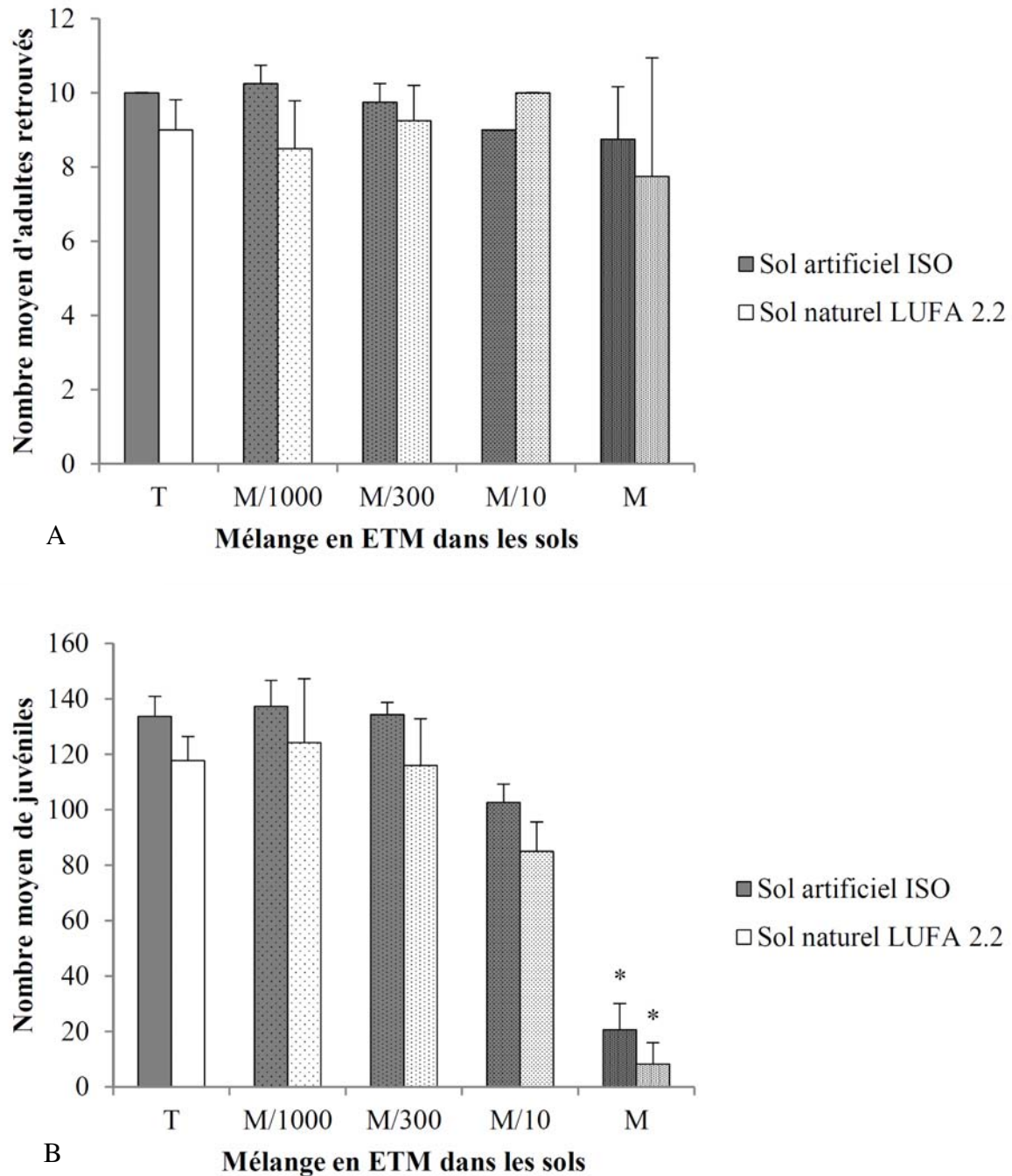


Figure 30 : Survie (A) et reproduction (B) de *H. aculeifer* exposé au sol artificiel ISO et naturel LUFA 2.2 contaminés avec des mélanges d'ETM.

* : différences significatives avec les témoins respectifs de chaque série (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

Chapitre III. Caractérisation des dangers de différentes MF avec *C. elegans* et *H. aculeifer*

Les MF étudiées proviennent de deux campagnes de prélèvements successives. La première série d'échantillons comprend une boue chaulée, une boue de désencrage, un fumier, un compost de déchets ménagers ainsi que des cendres. La seconde série comprend une boue digérée et séchée, une boue pelletée, une boue digérée ainsi qu'un compost de boue. Ces MF ont été étudiées en utilisant différents scénarios d'épandage (*i.e.* 1X, 5X, 10X, 50X et 100X le taux d'application recommandé pour chaque MF). L'intégralité des MF a été testée avec *C. elegans*, alors que seule la seconde série a été testée avec *H. aculeifer*.

Le sol naturel LUFA 2.2 a été utilisé en tant que substrat d'essai pour les nématodes pour l'approche directe. Les acariens prédateurs ont, quant à eux, été exposés à des préparations réalisées avec du sol artificiel ISO, en accord avec les recommandations du protocole normatif. De plus, le sol naturel LUFA 2.2 a également été utilisé en tant que substrat d'essai, afin de pouvoir comparer la réponse des deux organismes. Pour la caractérisation des dangers des MF par approche indirecte (*i.e.* extraits aqueux des mélanges de sol et de MF) avec *C. elegans*, les éluats des préparations réalisées avec le sol naturel LUFA 2.2 ont été testés, afin de comparer les réponses obtenues pour les deux approches. Dans le contexte de l'intégration du nématode aux batteries de bio-essais, les extraits aqueux des préparations réalisées avec du sol artificiel ISO ont également été considérés.

III.1. Exposition de *C. elegans* aux mélanges de sol et de MF

III.1.1. Exposition par approche directe

Les MF étudiées n'ont entraîné aucun effet sur la survie des nématodes adultes (données non présentées). Les résultats de l'exposition aux MF obtenus pour les critères d'effet de croissance et de reproduction de *C. elegans* sont présentés en Figure 31 et en Figure 32, respectivement.

RESULTATS

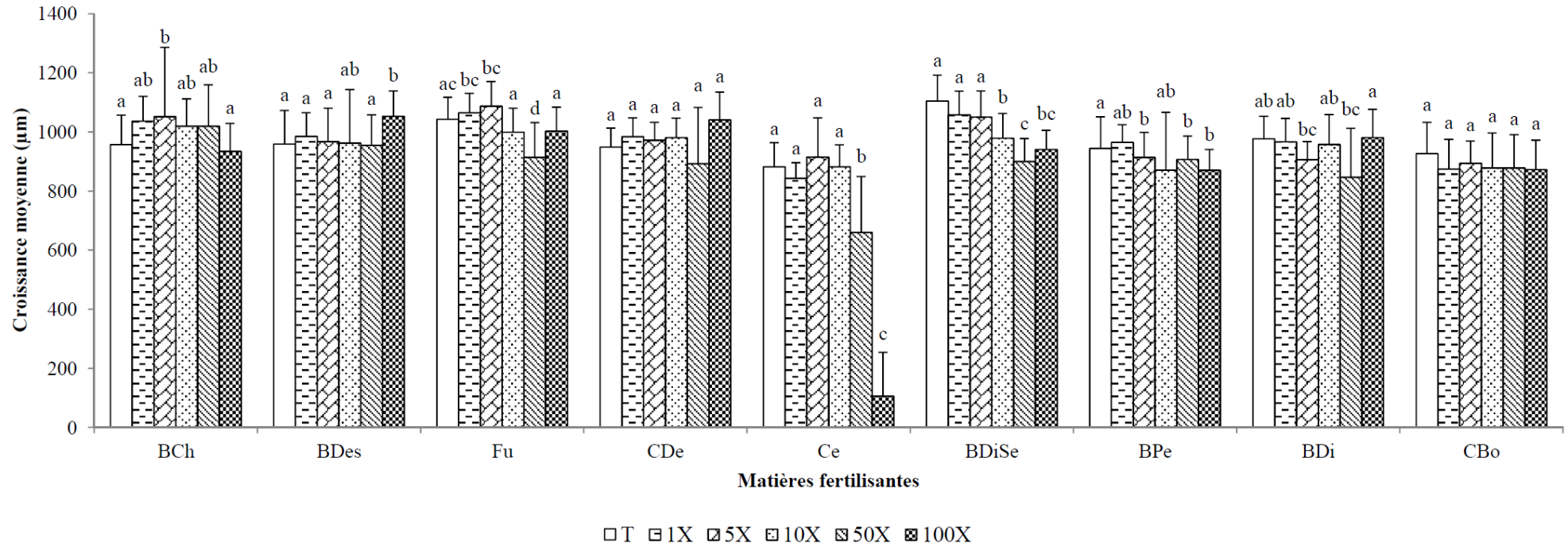


Figure 31 : Croissance de *C. elegans* exposé aux MF par approche directe

BCh : Boue chaulée ; BDes : Boue de désencrage ; Fu : Fumier ; CDe : Compost de déchets ; Ce : Cendres ; BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

a, b, c : différences significatives intra-sols (données paramétriques, tests ANOVA et HSD de Tukey ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

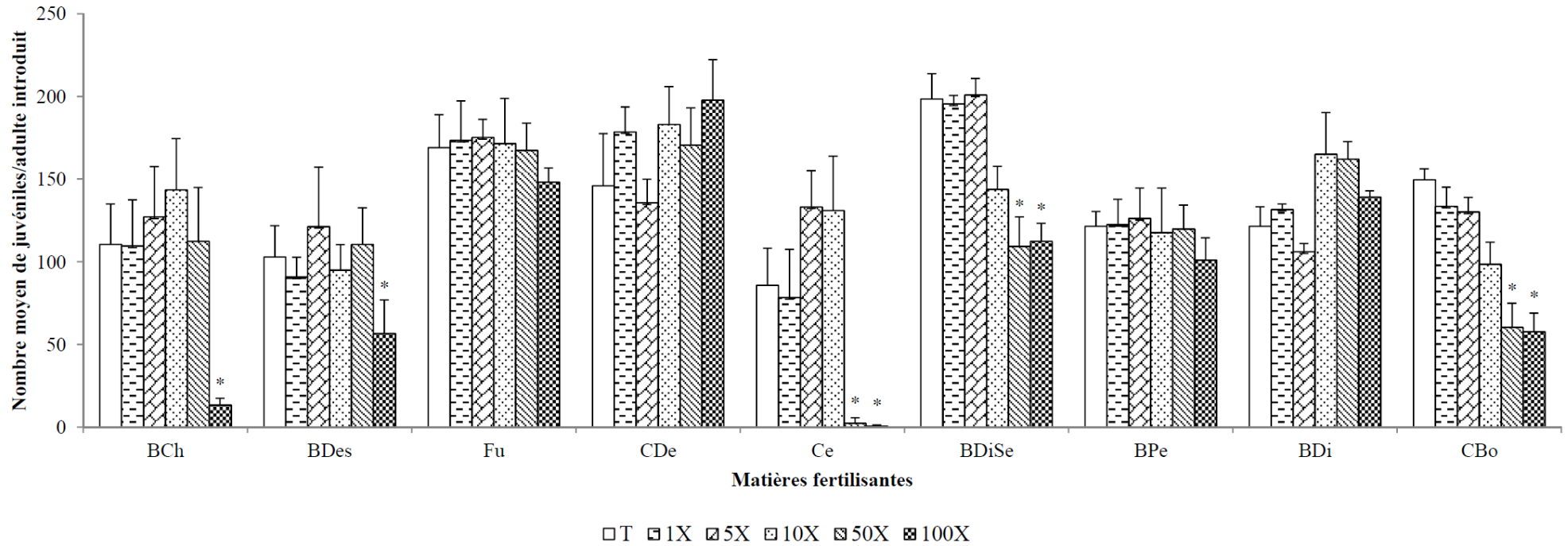


Figure 32 : Reproduction de *C. elegans* exposé aux MF par approche directe

BCh : Boue chaulée ; BDes : Boue de désencrage ; Fu : Fumier ; CDe : Compost de déchets ; Ce : Cendres ; BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

* : différences significatives intra-sols (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

Aucun effet significatif (*i.e.* supérieur à 10 % d'inhibition) n'a été observé sur le critère de croissance des organismes, quel que soit le taux d'application testé, pour sept des neuf MF étudiées (*i.e.* la boue chaulée, la boue de désencrage, le fumier, le compost de déchets ménagers, la boue pelletée, la boue digérée ainsi que le compost de boue). En revanche, pour les cendres et de la boue digérée et séchée, les deux plus forts taux d'application testés (*i.e.* 50X et 100X) ont entraîné une inhibition significative de la croissance (*i.e.* entre 14 % et 84 %).

Concernant la reproduction des nématodes, le fumier, le compost de déchets ménagers ainsi que la boue pelletée n'ont entraîné aucun effet sur ce paramètre, quel que soit le taux d'application testé. Pour la boue chaulée et la boue de désencrage, des inhibitions significatives de la reproduction (*i.e.* 89 % et 43 %, respectivement) ont été observées, après exposition aux mélanges contenant 100X la dose d'application de ces matières. Pour les cendres, la boue digérée et séchée ainsi que le compost de boue, les deux plus forts taux d'application utilisés (*i.e.* 50X et 100X) ont entraîné des inhibitions de ce paramètre comprises entre 40 % et 95 %. On peut également noter que des effets positifs (*i.e.* effet d'hormèse), de l'ordre de 20 % par rapport au témoin, ont été mesurés pour les taux d'application intermédiaires (*i.e.* 5X et/ou 10X) du compost de déchets, des cendres ainsi que de la boue digérée.

Les MF étudiées par approche directe ne présentent donc pas de toxicité vis-à-vis de *C. elegans* à la dose d'application recommandée. Les deux taux les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) de certaines MF ont eu des effets inhibiteurs sur les critères d'effet mesurés. L'analyse de ces résultats a permis de faire ressortir les MF ne présentant pas de toxicité par approche directe aux taux d'applications utilisés (*i.e.* le fumier, le compost de déchets et la boue digérée) par rapport aux MF ayant entraîné une toxicité sur *C. elegans* (*i.e.* la boue chaulée, la boue de désencrage, les cendres, le compost de boues, la boue pelletée ainsi que la boue digérée et séchée)

III.1.2. Exposition de *C. elegans* aux éluats des mélanges sol/MF

Les résultats obtenus sur les paramètres de croissance et de reproduction sont présentés en Figure 33 et 34, respectivement. Les éluats réalisés à partir des mélanges de sol naturel LUFA 2.2 et de MF n'ont entraîné aucun effet sur la survie des organismes adultes (données non présentées).

RESULTATS

Pour le critère de croissance, les extraits aqueux de la boue de désencrage, du compost de déchets ménagers, de la boue digérée et séchée ainsi que de la boue digérée n'ont entraîné aucun effet, quel que soit le taux d'application testé. En revanche, l'éluat du plus fort taux d'application (*i.e.* 100X) du fumier, ainsi que les éluats des deux plus forts taux d'application (*i.e.* 50X et 100X) de la boue chaulée, des cendres, de la boue pelletée et du compost de boue ont entraîné une inhibition de la croissance, comprise entre 15 % et 39 %.

Les éluats des mélanges réalisés avec la boue de désencrage, le fumier, le compost de déchets ménagers, la boue digérée et séchée ainsi que la boue digérée n'ont eu aucun effet sur la reproduction, quel que soit le taux d'application. Par contre, l'éluat du plus fort taux d'application (*i.e.* 100X) de la boue chaulée, ainsi que les éluats des deux taux d'application les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) des cendres, de la boue pelletée et du compost de boue ont entraîné une inhibition de la reproduction, comprise entre 17 % et 92 %. Des effets « positifs » (*i.e.* effet d'hormèse), compris entre 24 % et 70 %, ont également été observés pour les extraits aqueux du plus fort taux d'application du compost de déchets, de la boue digérée et séchée ainsi que de la boue digérée.

RESULTATS

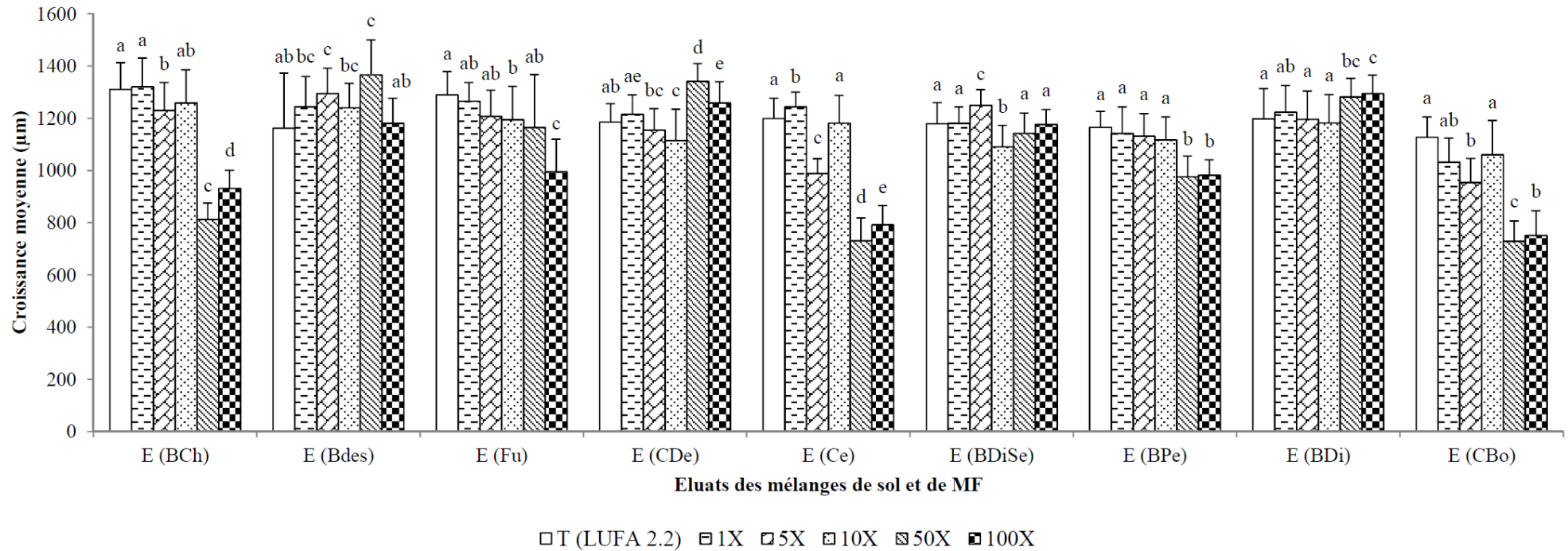


Figure 33 : Croissance de *C. elegans* exposé aux éluats des mélanges de de MF et de sol naturel LUFA 2.2.

BCh : Boue chaulée ; BDes : Boue de désencrage ; Fu : Fumier ; CDe : Compost de déchets ; Ce : Cendres ; BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

a, b, c, d : différences significatives intra-éluats (données paramétriques, tests ANOVA et HSD de Tukey ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

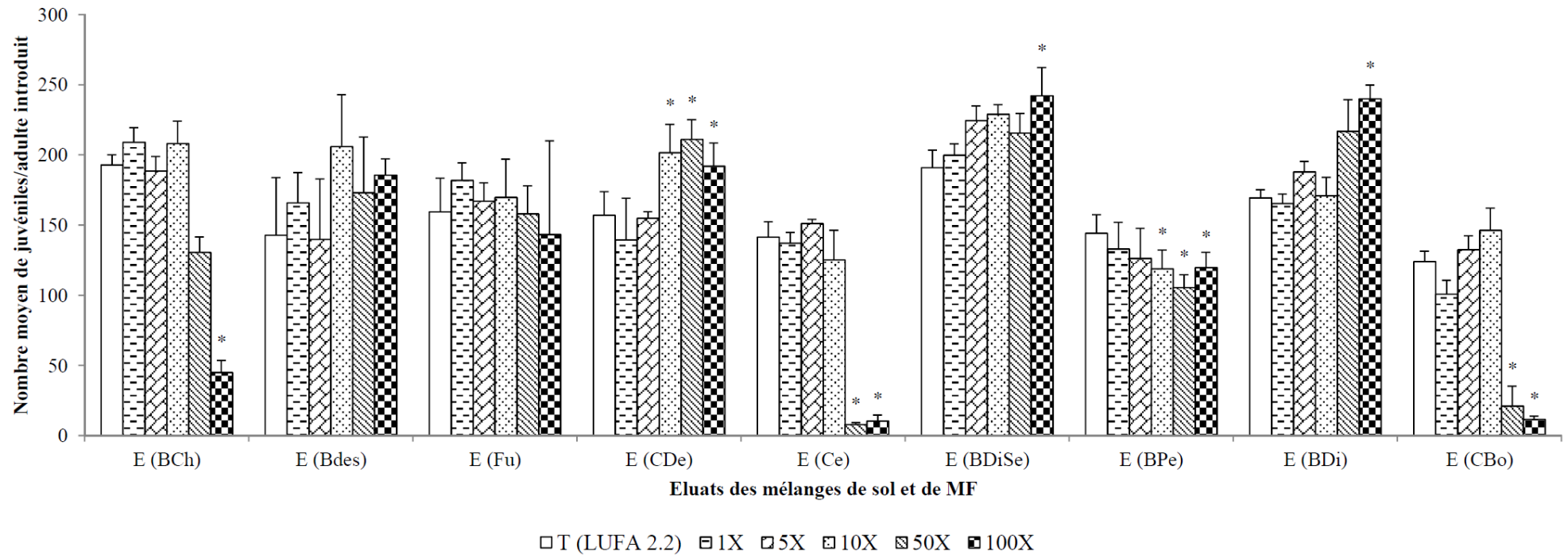


Figure 34 : Reproduction de *C. elegans* exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2.

BCh : Boue chaulée ; BDes : Boue de désencrage ; Fu : Fumier ; CDe : Compost de déchets ; Ce : Cendres ; BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

* : différences significatives intra-éluats (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

La comparaison des résultats obtenus sur extraits aqueux obtenus des mélanges sol/MF fait apparaître des effets similaires entre les deux approches pour le fumier, le compost de déchets, la boue digérée, la boue chaulée, les cendres, la boue pelletée et le compost de boue. La boue de désencrage ainsi que la boue digérée et séchée ont eu des effets délétères sur le nématode par approche directe, alors que les éluats de ces mêmes mélanges n'ont entraîné aucun effet.

Les résultats pour les paramètres de croissance et de reproduction du nématode, dans le cas des extraits aqueux issus des mélanges de sol artificiel ISO et de MF sont présentés en Figure 35 et 36, respectivement. Aucun effet n'a été mis en évidence sur la survie des organismes adultes (données non présentées). Les éluats des mélanges réalisés avec la boue de désencrage, le compost de déchets ménagers, la boue digérée et séchée, la boue pelletée ainsi qu'avec la boue digérée n'ont entraîné aucun effet sur la croissance, indépendamment du taux d'application testé. En revanche, les éluats des deux taux d'application les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) ont quant à eux entraîné une inhibition de la croissance des nématodes, comprise entre 17 % et 29 %.

Les éluats de sol artificiel ISO en mélange avec la boue de désencrage, le fumier, le compost de déchets ménagers, la boue digérée et séchée, la boue pelletée ainsi que la boue digérée n'ont entraîné aucun effet sur la reproduction, quel que soit le taux d'application utilisé. *A contrario*, l'éluat du plus fort taux testé (*i.e.* 100X) de la boue chaulée, ainsi que les éluats des deux taux les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) des cendres, de la boue pelletée et du compost de boue ont entraîné une inhibition significative du nombre de nématodes juvéniles produits, comprise entre 58 % et 88 %. On peut également noter que des effets positifs, compris entre 10 % et 49 %, ont été mesurés pour les extraits aqueux du plus fort taux d'application de la boue de désencrage, du compost de déchets ainsi que de la boue digérée. Pour les éluats des mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2, les effets observés apparaissent globalement similaires à ceux observés avec le substrat artificiel, ne permettant pas de privilégier l'un ou l'autre substrat.

RESULTATS

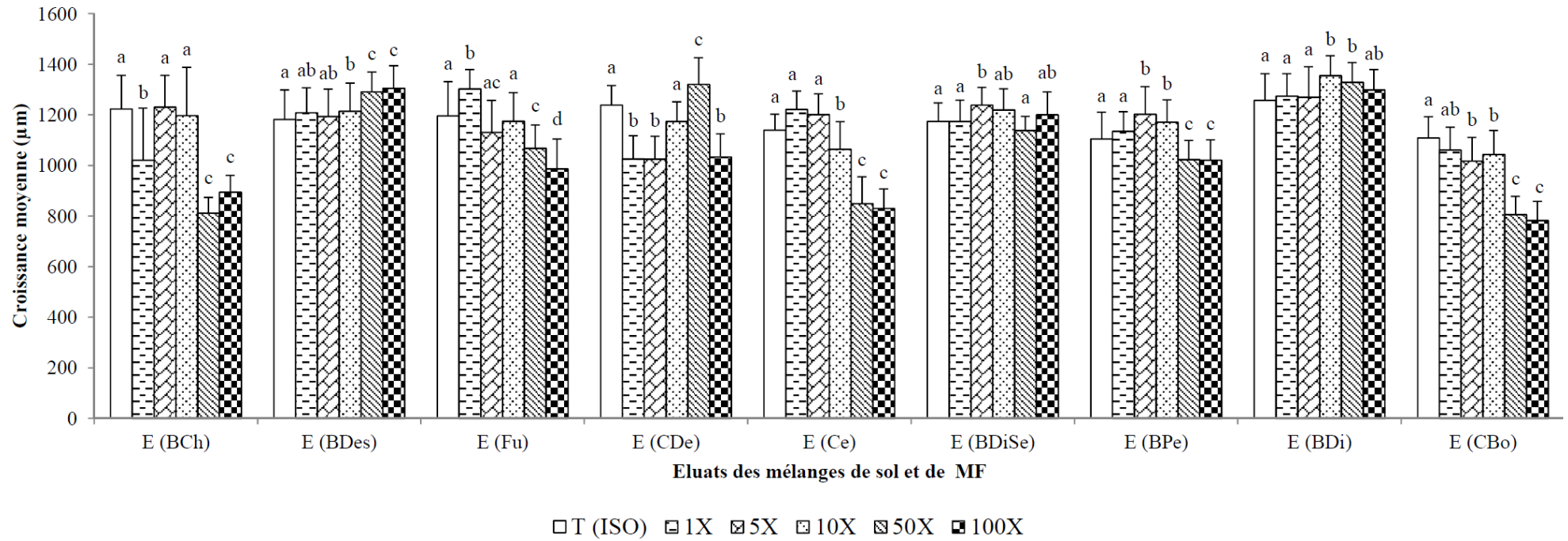


Figure 35 : Croissance de *C. elegans* exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol artificiel ISO.

BCh : Boue chaulée ; BDes : Boue de désencrage ; Fu : Fumier ; CDe : Compost de déchets ; Ce : Cendres ; BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

a, b, c, d : différences significatives intra-éluats (données paramétriques, tests ANOVA et HSD de Tukey ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

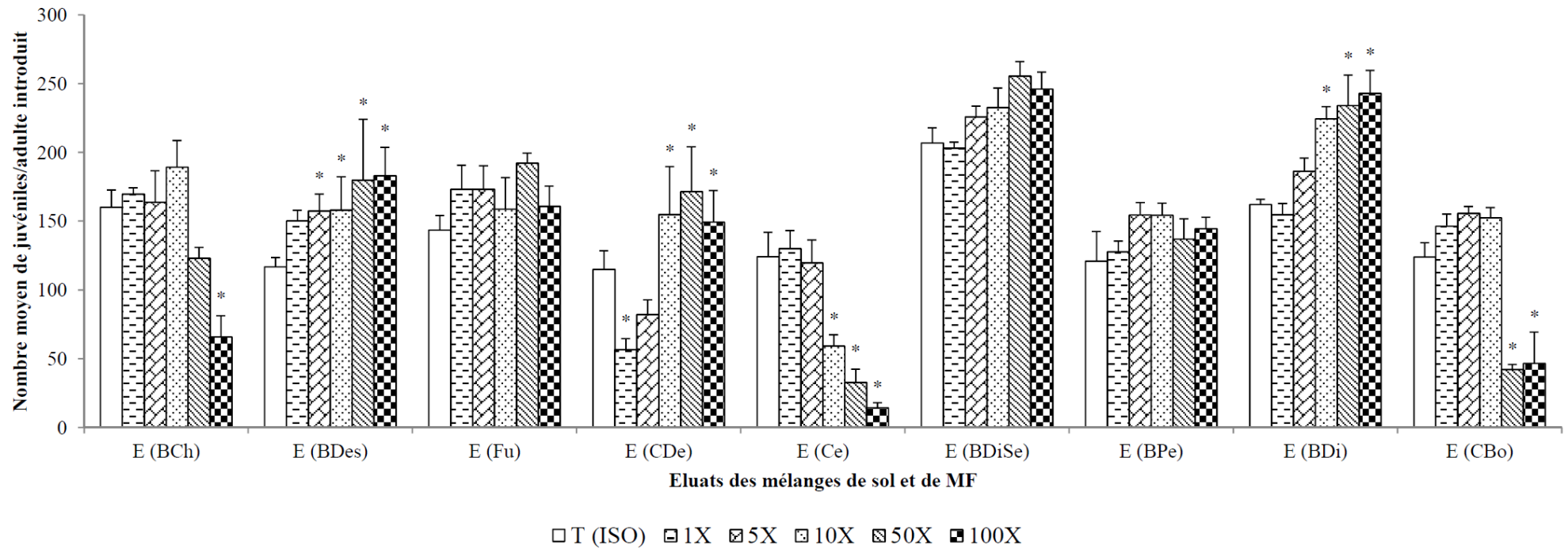


Figure 36 : Reproduction de *C. elegans* exposé aux éluats des mélanges de MF et de sol artificiel ISO.

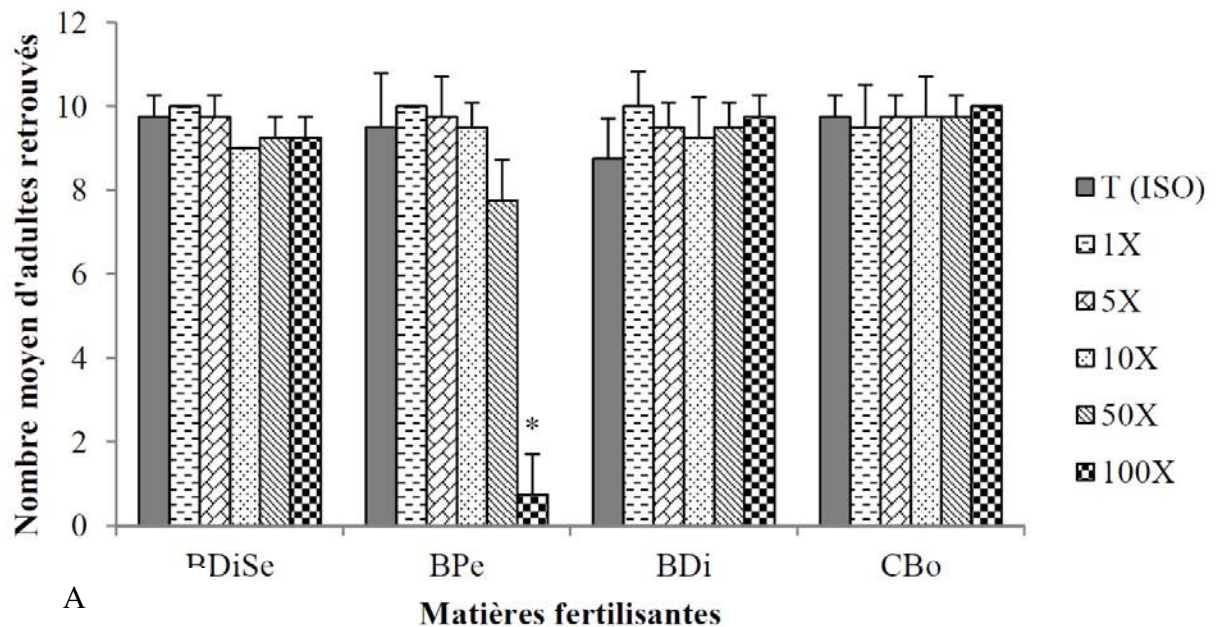
BCh : Boue chaulée ; BDes : Boue de désencrage ; Fu : Fumier ; CDe : Compost de déchets ; Ce : Cendres ; BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

* : différences significatives intra-éluats (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

III.2. Exposition de *H. aculeifer* aux mélanges de sol et de MF

Les résultats relatifs à la survie et à la reproduction de *H. aculeifer* pour les mélanges de MF et de sol artificiel ISO sont présentés en Figure 37. Concernant la survie des organismes adultes, seule la boue pelletée, au plus fort taux d'application testé, a entraîné des effets sur ce paramètre (*i.e.* 92 % d'inhibition). Une inhibition de la reproduction, comprise entre 51 % et 100 %, a été constatée pour les deux taux d'application les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) de la boue digérée et séchée ainsi que de la boue pelletée. Il est à noter que des effets « positifs » (*i.e.* effet d'hormèse), de l'ordre de 50 % par rapport au témoin, ont été mis en évidence pour les deux plus forts taux d'application (*i.e.* 50X et 100X) de la boue digérée.



RESULTATS

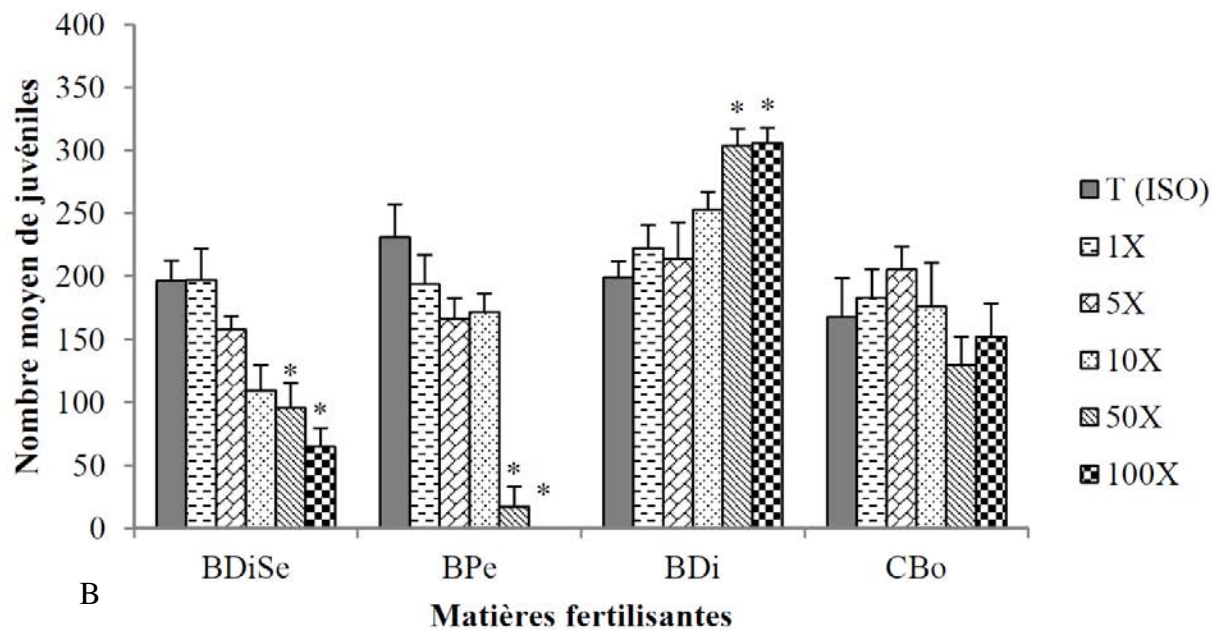


Figure 37 : Survie (A) et reproduction (B) de *H. aculeifer* exposé aux mélanges de MF et de sol artificiel ISO.

BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

* : différences significatives avec le sol ISO (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

Les résultats de l'exposition de *H. aculeifer* aux mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2 sont présentés en Figure 38. Seul le plus fort taux testé de la boue pelletée (*i.e.* 100X) a entraîné une diminution de la survie des adultes (*i.e.* 85 %). Concernant le critère de reproduction, des inhibitions comprises entre 42 % et 100 % ont été déterminées pour les deux taux les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) de la boue digérée et séchée ainsi que de la boue pelletée. De plus, les effets mesurés pour 10X, 50X et 100X la dose d'application recommandée de la boue digérée ont montré une tendance d'effet « positif », de l'ordre de 20 % - 30 %. Les résultats obtenus pour les mélanges de MF réalisés avec du sol naturel LUFA 2.2 sont donc en accord avec les résultats obtenus pour les mélanges réalisés avec le substrat artificiel.

RESULTATS

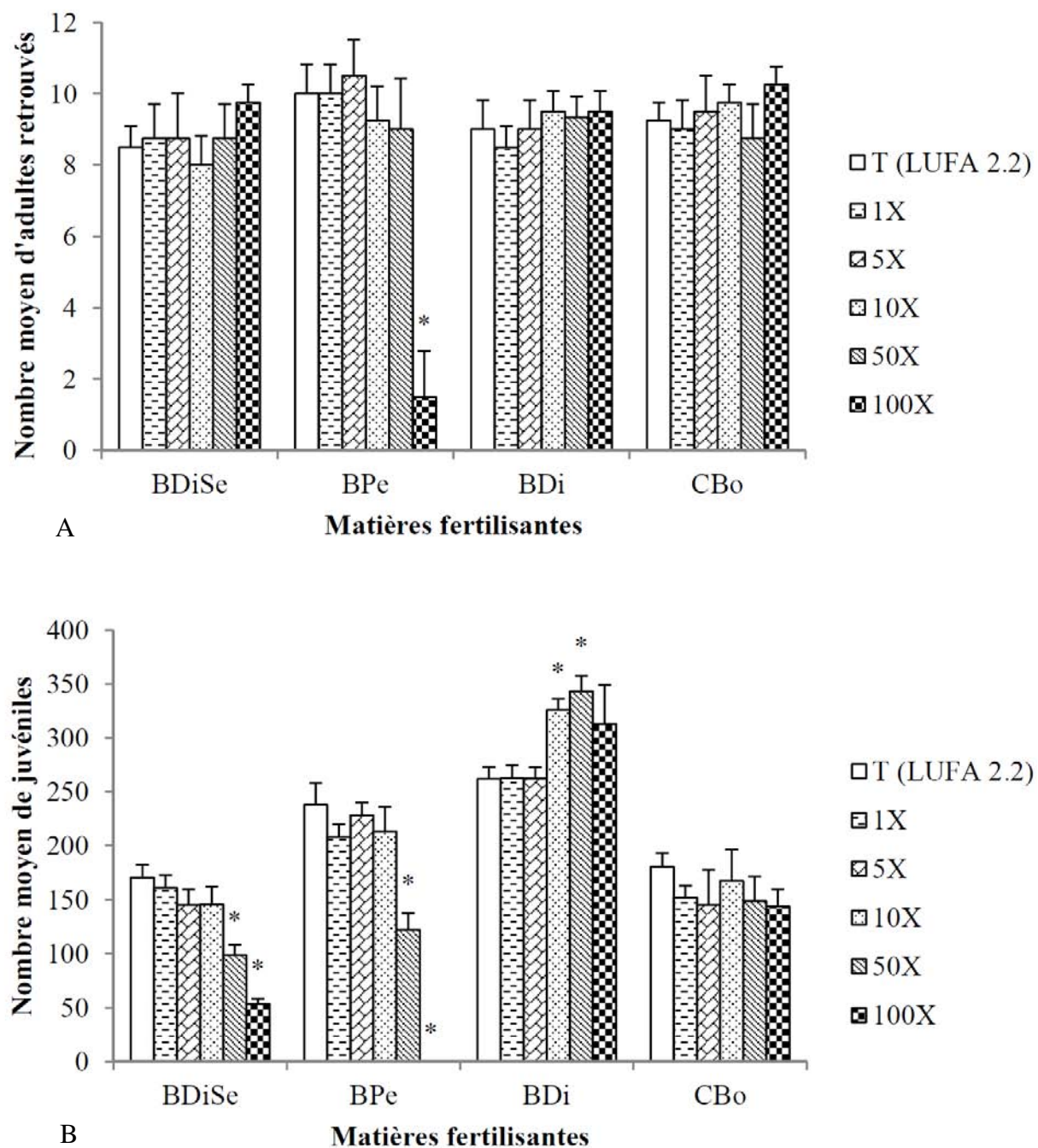


Figure 38 : Survie (A) et reproduction (B) de *H. aculeifer* exposé aux mélanges de MF et de sol naturel LUFA 2.2.

BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

* : différences significatives avec le sol LUFA 2.2 (données non paramétriques, tests de Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunn ; $\alpha = 0,05$).

RESULTATS

Les MF issues de la seconde campagne de prélèvements ne présentent pas de toxicité vis-à-vis de l'acarien prédateur *H. aculeifer* à la dose d'application recommandée (*i.e.* 1X), quel que soit le substrat utilisé. Parmi les différents taux d'application testés (*i.e.* de 5X à 100X), les deux taux les plus élevés (*i.e.* 50X et 100X) de certaines MF ont entraîné des effets, plus particulièrement sur la reproduction.

III.3. Bilan de l'exposition des organismes aux MF

Les MF sont des matrices complexes composées d'un cocktail d'éléments (*i.e.* fertilisants et potentiellement de contaminants). Une première approche a été envisagée afin de déterminer s'il existe un lien entre la composition des MF et les effets toxiques/d'hormèse chez le nématode et l'acarien prédateur. Parmi les MF étudiées, une corrélation entre la teneur en éléments contaminants et les effets d'inhibition observés a pu être mise en évidence pour deux MF (*e.g.* les cendres ainsi que la boue digérée et séchée). Par contre, à concentrations en contaminants équivalentes, certaines MF ont entraîné des effets toxiques (*e.g.* boue digérée et séchée) alors que d'autres (*e.g.* boue digérée) ont entraîné des effets d'hormèse chez les deux organismes modèles. Se pose également la question de la toxicité du compost de boue, faiblement contaminé, qui a entraîné une toxicité sur la reproduction du nématode. Cette hétérogénéité de la réponse des organismes en fonction de la composition des MF a également été mise en évidence par Domene *et al.* (2007) sur le collembole *F. candida*.

DISCUSSION

Partie IV. DISCUSSION

DISCUSSION

La valorisation agricole des MF, et plus particulièrement des boues issues du retraitement des eaux, suscite de nombreuses interrogations concernant leur innocuité vis-à-vis de l'environnement. Ainsi, depuis une quinzaine d'années, des actions de recherche sont menées dans le but de développer des outils permettant de caractériser les dangers de ces matrices complexes.

Dans ce contexte, le sujet de cette thèse a concerné l'intérêt et l'applicabilité des essais utilisant le nématode *Caenorhabditis elegans* et l'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer* à l'étude de l'écotoxicité des MF. L'objectif principal des travaux présentés visait à déterminer la pertinence d'intégrer les essais utilisant *C. elegans* et *H. aculeifer* dans les stratégies d'évaluation des MF. Ces deux invertébrés ont été sélectionnés de prime abord car complémentaires en termes de chaîne trophique et de rôle fonctionnel dans les écosystèmes par rapport à d'autres invertébrés utilisés plus classiquement (*i.e.* vers de terre, collemboles et/ou enchytréides).

Les travaux présentés se sont déroulés en trois étapes complémentaires. Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si les protocoles d'essais mis en place au laboratoire pour les deux invertébrés étaient applicables à l'étude de matrices solides telles que les sols et les MF. Ce questionnement nous a conduits à améliorer le protocole d'essai du nématode *C. elegans* pour ce type de matrices. Par la suite, nous nous sommes demandés si les concentrations/apports de contaminants préconisés dans la réglementation concernant l'utilisation des MF, dans notre cas les ETM, pouvaient présenter une toxicité vis-à-vis des deux organismes modèles. Enfin, des typologies différentes de MF ont été testées avec *C. elegans* et *H. aculeifer*.

Cette discussion s'intéresse, en premier lieu, aux intérêts et à certains questionnements à propos des essais réalisés. En second lieu, les sensibilités du nématode et de l'acarien prédateur vis-à-vis des substances chimiques (*i.e.* substances de référence et ETM) ont été positionnées par rapport à celles d'autres invertébrés terrestres. Finalement, les réponses obtenues avec les deux organismes modèles après exposition aux MF ont été comparées à celles obtenues avec d'autres organismes, afin de juger la pertinence d'intégrer *C. elegans* et *H. aculeifer* aux batteries de bio-essais. Cela a ainsi conduit à proposer une batterie d'essais optimale, applicable dans le cadre de l'homologation des MF.

Chapitre I. Intérêts et limitations des essais utilisant *C. elegans* et *H. aculeifer*

La mise en pratique des essais avec le nématode et l'acarien prédateur a permis d'acquérir un certain recul sur ces derniers, et ainsi identifier les intérêts de ces essais ainsi que soulever certains questionnements.

I.1. Intérêt des essais

I.1.1. Essais avec le nématode *C. elegans*

Parmi les avantages du nématode *C. elegans*, on peut tout d'abord noter un cycle de vie court (*i.e.* reproduction 96 h après éclosion à 20 °C), une durée de vie courte (*i.e.* 21 jours à 20 °C) et une forte fécondité (Byerly *et al.*, 1976). Ainsi, les essais de toxicité chronique sont relativement courts (*i.e.* 96 h) par rapport aux invertébrés aquatiques (*i.e.* 7 jours pour le cladocère *Ceriodaphnia dubia*, ISO 20665, 2008 ; 21 jours pour le cladocère *Daphnia magna*) et terrestres (*i.e.* 28 jours pour le collembole *Folsomia candida*, ISO 11267, 2012 ; 42 jours pour l'enchytréide *Enchytraeus albidus*, ISO 16387, 2008 ; 56 jours pour le vers de terre *Eisenia fetida*, ISO 11268-2). La petite taille des nématodes (*i.e.* environ 1 mm pour les adultes) permet également de réaliser les essais en microplaques, ce qui conduit à un gain d'espace, et ne nécessite qu'une faible quantité d'échantillon à tester (*i.e.* 0,5 mL pour les échantillons liquides et 0,5 g équivalent sec pour les échantillons de sol/sédiment).

Le protocole normatif utilisant *C. elegans* comme organisme modèle (ISO 10872, 2010) a été développé pour évaluer préférentiellement la toxicité des sédiments et des matrices liquides. Il permet également, dans une moindre mesure, la caractérisation de l'écotoxicité des sols. Cette applicabilité multi-matrice est un avantage par rapport aux essais existants sur d'autres organismes et a permis d'étudier et de comparer la toxicité des MF par approche directe (*i.e.* mélanges de sol et de MF) ainsi qu'indirecte (*i.e.* éluats des mélanges de sol et de MF). Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont également montré que la croissance et la reproduction du nématode étaient répétables et reproductibles quelle que soit le type de matrice étudiée (Annexe 2). Ces résultats concernant la survie, la croissance et la reproduction sont également en accord avec les données publiées par Goussen *et al.* (2015). Ces auteurs ont en effet montré, dans des conditions optimales (*i.e.* élevage sur gélose nutritive à 20 °C), un taux de croissance et un taux de reproduction chez leurs organismes similaire à ceux observés dans les conditions témoins de nos études (*i.e.* croissance moyenne

DISCUSSION

entre 1000 μm et 1200 μm après 96 h ; nombre de juvéniles moyens proche de 150 par adulte après 96 h).

I.1.2. Essais avec l'acarien prédateur *H. aculeifer*

L'intérêt principal de l'acarien *H. aculeifer* en tant qu'organisme modèle réside dans son rôle de prédateur ainsi que dans la voie spécifique d'exposition de ces organismes. Tout comme pour le nématode, *H. aculeifer* présente également un cycle de vie court (*i.e.* se reproduit après 21 jours à 20 °C), une durée de vie courte (*i.e.* 2 mois) ainsi qu'une forte fécondité (Krogh & Axelsen, 1998). Les essais peuvent être réalisés avec du sol artificiel ainsi qu'avec du sol naturel en tant que substrat témoin, contrairement aux essais terrestres avec *C. elegans*. Un autre avantage des essais utilisant *H. aculeifer* est la durée d'exposition des organismes relativement courte (*i.e.* 14 jours) par rapport aux autres invertébrés terrestres.

I.2. Questionnements relatifs aux essais avec *C. elegans*

I.2.1. Influence de la quantité de nourriture

Dans le cas de l'étude de la toxicité des MF, la présence potentielle de contaminants peut affecter la concentration des bactéries ajoutées en début d'essais. Au contraire, la présence de micro-organismes dans ces MF peut également entraîner une augmentation de la quantité de bactéries disponibles pour le nématode. Il est donc apparu important d'évaluer l'influence que pouvait avoir la densité bactérienne sur la croissance et la reproduction du nématode. Les résultats obtenus concernant les effets de la densité en bactéries *E. coli* (*e.g.* en milieu aqueux) ont montré que la densité bactérienne n'entraînait pas d'effet sur la croissance et la reproduction du nématode lorsque la concentration en bactéries était comprise entre $5,8 \times 10^8$ cellules/mL et $2,2 \times 10^9$ cellules/mL. En deçà (*i.e.* $1,0 \times 10^8$ cellules/mL), la croissance et la reproduction du nématode ont été significativement réduites. Au-delà (*i.e.* $1,1 \times 10^{10}$ cellules/mL), la croissance de *C. elegans* n'a pas été affectée, alors que la reproduction a été inhibée.

Par comparaison à une exposition sur de l'agar, Venette & Ferris (1998) ont démontré que des concentrations en bactéries *E. coli* comprises entre 10^6 cellules/nématode et 10^{10} cellules/nématodes (*i.e.* soit 10^7 cellules et 10^{11} cellules pour 10 organismes introduits) n'avaient pas d'influence sur le taux de croissance des populations de *C. elegans*. Par contre,

DISCUSSION

ces mêmes auteurs ont montré que des concentrations de l'ordre de 10^5 cellules/nématode (*i.e.* 10^6 cellules pour 10 individus introduits) pouvaient diminuer la croissance de la population des organismes.

Les nématodes consomment environ 10^6 cellules/individu/jour lorsque ces organismes sont élevés sur une gélose (Ferris *et al.*, 1997), soit environ 4×10^7 cellules en extrapolant à un essai de reproduction d'une durée de 96 h. On peut donc considérer que les bactéries introduites lors des essais par approche directe à la matrice solide (*i.e.* $1,2 \times 10^{10}$ cellules/mL) ou en considérant une matrice liquide (*i.e.* $1,1 \times 10^9$ cellules/mL) sont en excès par rapport à ce qui est potentiellement consommé en condition optimale sur une gélose nutritive.

Venette & Ferris (1998) ont montré qu'une augmentation de la concentration en bactéries (*i.e.* 10^6 cellules/nématode) pouvait entraîner une inhibition des taux de croissance de populations d'autres espèces de nématodes (*i.e.* *Acrobeles buetschlii* (de Man) et *Caenorhabditis briggsae* (Maupas)). Les effets inhibiteurs constatés sur la reproduction de *C. elegans* à la plus forte concentration en bactéries testée (*i.e.* $1,1 \times 10^{10}$ cellules/mL) peuvent être expliqués par une diminution de l'efficacité du nourrissage des organismes, limitée par la taille des juvéniles à l'introduction (Jager *et al.*, 2005), ralentissant ainsi le temps de génération des organismes. Une quantité trop importante de bactéries peut également modifier la pression osmotique du milieu, qui devient défavorable pour les nématodes (Venette & Ferris, 1998).

I.2.2. Efficacité de l'extraction des juvéniles

Les nématodes doivent être extraits des substrats étudiés afin de mesurer la mortalité, la croissance et la reproduction. La question de l'efficacité de la méthode d'extraction des organismes, plus particulièrement des juvéniles, et de l'incertitude associée à cette étape, se pose. Les résultats des rendements d'extraction des juvéniles obtenus pour des sols naturels de différentes textures ont été compris entre 71,7 % et 95,2 % pour le protocole optimisé, démontrant ainsi que les juvéniles ne sont pas extraits en totalité des sols. Compte tenu de ces résultats, il semble important de considérer, à terme, un taux de recouvrement minimal des nématodes juvéniles lorsque l'on s'intéresse à la caractérisation de l'écotoxicité des matrices complexes à l'aide de cet essai.

DISCUSSION

I.2.3. Dénombrement des juvéniles

Les nématodes présentent une reproduction importante. Cela implique un nombre conséquent de juvéniles à dénombrer à l'issue des essais. Afin d'optimiser le temps de comptage des organismes, des méthodes de sous-échantillonnage des extraits aqueux contenant les nématodes pourraient être mises en place. Les quelques essais réalisés (données non présentées) n'ont pas permis de juger la pertinence de cette approche. Par ailleurs, Grosjean *et al.* (2004) ont développé une méthode automatisée de comptage et de mesure des micro-invertébrés (Zooscan). Il serait pertinent et intéressant d'évaluer son adéquation pour ce type d'essai.

I.2.4. Applicabilité des essais aux matrices artificielles

Le protocole normatif recommande l'utilisation de sol naturel LUFA 2.2 en tant que substrat témoin, alors que le sol artificiel ISO est recommandé pour les essais utilisant d'autres organismes terrestres (*i.e.* vers de terre, collemboles, enchytréides et acariens prédateurs). Nous nous sommes donc intéressés à l'applicabilité des essais utilisant *C. elegans* aux matrices artificielles. Les résultats obtenus ont montré que ce type de matrice n'était pas adapté en tant que substrat témoin. Il est à noter que, pour les sédiments artificiels, la teneur en kaolin a été identifiée comme pouvant être limitante pour le bon déroulement de l'essai lorsque celle-ci était supérieure à 5 % (ISO 10872, 2010). En ce qui concerne le sol artificiel ISO, la teneur en kaolin est de 20 %, ce qui pourrait expliquer la non applicabilité de cette matrice à la réalisation des essais.

Cependant, nos résultats sont en contradiction avec les travaux de Peredney (2004) ainsi que les recommandations de la norme ASTM E2172 (2008), qui tous les deux proposent pour les essais de mortalité, une matrice artificielle. La composition de cette matrice est d'autre part identique au sol artificiel ISO, et l'hydratation des échantillons (*i.e.* 64 % du poids sec) est comparable à celle proposée par le protocole ISO (*i.e.* 40 % du poids sec). Seules les différences de masse d'échantillon entre les deux protocoles (*i.e.* 0,5 g éq. sec pour la norme ISO et 2,33 g éq. sec pour la norme ASTM) ainsi que de durée d'équilibration de l'hydratation des échantillons (*i.e.* 48 h lors des travaux présentés et 7 jours lors des travaux de Peredney, 2004) pourraient permettre d'expliquer cette différence.

I.3. Questionnements relatifs aux essais avec *H. aculeifer*

I.3.1. Apports de nourriture

L'apport de nourriture est une des limitations potentielles des essais avec *H. aculeifer*. En premier lieu car les acariens *T. putrescentiae* ne sont pas dénombrés lors des nourrissages des acariens prédateurs, les femelles *H. aculeifer* devant être nourries *ad libitum* lors des essais (OCDE, 2008). En second lieu, car les effets toxiques potentiels engendrés par les substances/matériaux testés sur les organismes utilisés en tant que proies ne sont pas évalués (Krogh & Axelsen, 1998). Afin de pallier ces problèmes, la présence de proies a été vérifiée à chaque nourrissage. Au cours des essais, des individus *T. putrescentiae* étaient retrouvés d'un nourrissage à l'autre pendant la phase d'exposition des acariens prédateurs, et cela également pour des substances/MF ayant eu une toxicité significative sur la reproduction de *H. aculeifer*. La quantité de nourriture apportée, estimée visuellement à une cinquantaine d'individus *T. putrescentiae* par nourrissage, a donc été jugée suffisante pour mener les essais.

I.3.2. Efficacité de l'extraction des acariens juvéniles

Il existe une incertitude concernant l'extraction des acariens prédateurs juvéniles, de la même manière que pour les essais en milieu terrestre avec *C. elegans*. En regard des recommandations de la ligne directrice de l'OCDE (2008) à propos de la méthode d'extraction de *H. aculeifer*, une certaine liberté est permise quant à la mise en place du système Berlèse-Tullgren, ainsi qu'au système de récupération des acariens. Pour la méthode utilisée lors des travaux de thèse, les rendements d'extraction des juvéniles *H. aculeifer* obtenus pour des sols naturels de différentes textures ont été compris entre 61,1 % et 89 %, démontrant ainsi que les juvéniles ne sont pas extraits en totalité des sols. Ainsi, les remarques formulées sur le nématode concernant l'importance de suivre le taux de récupération des juvéniles lors de l'applicabilité de cet essais aux matrices complexes peuvent être reprises ici concernant les essais avec *H. aculeifer*.

Chapitre II. Sensibilités de *C. elegans* et de *H. aculeifer* aux substances chimiques, comparées à d'autres organismes terrestres

Ce chapitre est consacré à la comparaison de la sensibilité des différents critères d'effet suivis chez le nématode et l'acarien prédateur par rapport à d'autres invertébrés terrestres utilisés en écotoxicologie.

La première section de ce chapitre compare les réponses des critères d'effet suivis chez *C. elegans* et *H. aculeifer* les uns par rapport aux autres. La complémentarité et/ou la redondance de ces critères pour chacun des organismes étudiés, ainsi que l'intérêt de ces critères, y sont discutés.

La seconde section de ce chapitre positionne la sensibilité du nématode et de l'acarien prédateur vis-à-vis de l'acide borique, par rapport à d'autres invertébrés du sol.

La troisième et dernière section de ce chapitre aborde la comparaison de la sensibilité de *C. elegans* et *H. aculeifer* aux ETM par rapport à d'autres organismes terrestres.

II.1. Sensibilités comparées des critères d'effet mesurés chez *C. elegans* et *H. aculeifer*

II.1.1. Comparaison des critères d'effet de *C. elegans*

Les données de toxicité obtenues au cours des travaux de thèse concernant les MF ont été synthétisées sous la forme de ratios mortalité/croissance, mortalité/reproduction et croissance/reproduction (*i.e.* pourcentages d'inhibition pour les MF) (Figure 39). Les ratios < 1 et compris entre 1 et 2 correspondent à des sensibilités identiques, le ratio > 2 à des sensibilités proches, et le ratio > 5 à des sensibilités significativement différentes.

A l'égard de la caractérisation des dangers des MF par approche directe, les ratios croissance/reproduction ont été inférieurs à 2 pour plus de 90 % des mélanges de sol et de MF testés. Ces mêmes ratios ont également été inférieurs à 2 pour environ 80 % des éluats testés. Ainsi, la reproduction apparaît plus sensible que la croissance (*i.e.* ratio > 5) pour seulement 2,2 % à 4,4 % des échantillons testés.

DISCUSSION

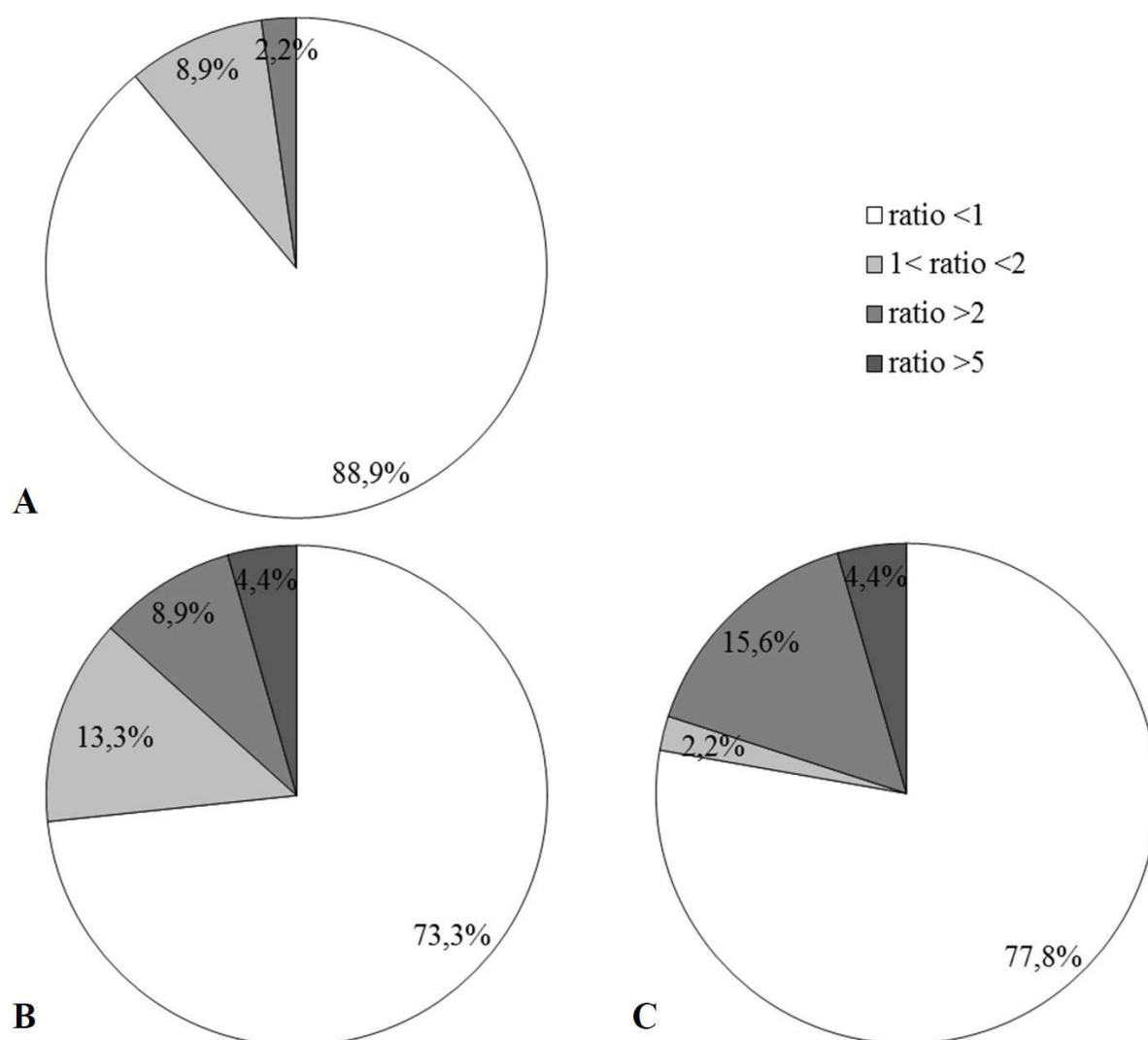


Figure 39 : Récapitulatif des ratios croissance/reproduction de *C. elegans* obtenus pour les mélanges de sol LUFA 2.2 et de MF (A), pour les éluats de ces mélanges (B) ainsi que pour les éluats des mélanges réalisés avec du sol artificiel ISO (C).

Pour la substance de référence BAC C-16, les ratios croissance/reproduction ont été compris entre 1,4 et 1,8. Les trois ratios cités précédemment ont été compris entre 0,8 et 1,6 pour le nickel et le zinc. Les ratios mortalité/reproduction et croissance/reproduction obtenus pour le cuivre et le cadmium ont été compris entre 2,0 et 2,7.

A l'exception du nickel et du zinc pour lesquels la reproduction semble être légèrement plus sensible en comparaison aux autres paramètres suivis, la sensibilité observée d'une façon générale pour les trois paramètres biologiques suivis chez le nématode est apparue similaire après exposition aux autres métaux, au BAC C-16 ainsi qu'aux différentes MF testées. Ce constat nous amène à nous interroger sur l'intérêt de conserver ces trois

DISCUSSION

critères d'effet. Le seul critère de croissance pourrait, en effet, être suffisant pour caractériser l'écotoxicité des MF vis-à-vis de cet organisme dans nos conditions d'expérience.

II.1.2. Comparaison des critères d'effet de *H. aculeifer*

Les résultats obtenus avec l'acarien prédateur *H. aculeifer* indiquent que l'acide borique, les ETM ainsi que les MF testées ont une toxicité limitée sur la survie des adultes (*e.g.* aucun effet de l'acide borique ni des ETM, seule une MF a entraîné des effets significatifs sur ce paramètre). Dans la majorité des cas, la reproduction s'est révélée être plus sensible que le suivi de la survie des organismes. Pour ce critère, des valeurs de CE₅₀ ont été calculées après exposition à l'acide borique. D'autre part, deux des quatre MF testées ont entraîné une diminution du nombre de juvéniles produits.

II.1.3. Hypothèses d'explication des effets hormétiques observés chez les deux organismes

Lors de l'évaluation des MF avec *C. elegans* et *H. aculeifer*, certaines matières ont entraîné des effets « positifs », ou effets hormétiques, sur la reproduction de ces invertébrés (*e.g.* maximum de 90 % pour *C. elegans* pour l'approche indirecte et de 50 % pour *H. aculeifer*). Ce type d'effet est défini, pour une substance chimique, comme étant une dose-réponse à deux phases caractérisée par une stimulation des paramètres à faible dose et une inhibition à forte dose (Calabrese & Baldwin, 2003).

Certaines substances potentiellement présentes dans les MF, telles que les surfactants ou le nonylphénol (Eriksson *et al.*, 2008 ; Clarke & Smith, 2011), ont des effets hormétiques avérés sur les paramètres de croissance et/ou de reproduction des nématodes. Ainsi, Mutwakil *et al.* (1997) ont montré une stimulation de la croissance et de la reproduction du nématode *C. elegans* après exposition à différents surfactants en milieu aqueux. D'autre part, Höss *et al.* (2002) ont également montré une stimulation des paramètres de croissance et de reproduction après exposition à de faibles concentrations en 4-nonylphénol (40 µg/L et 66 µg/L). Ainsi, l'augmentation du nombre de juvéniles produits pour les éluats des mélanges réalisés avec la boue de désencrage, le compost de déchets ainsi que la boue digérée pourrait être attribué à la présence de ce type de molécules en faibles concentrations dans les extraits aqueux. De la même façon, l'apport *via* les MF d'éléments nutritifs à des teneurs importantes peuvent également avoir une influence sur la croissance et la reproduction des nématodes. Cependant

DISCUSSION

les travaux de Höss *et al.* (2001) ont montré que l'apport de matière organique dans des sédiments n'influençait pas la croissance de *C. elegans*. Compte tenu des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, il serait intéressant de renseigner sur l'influence potentielle d'autres éléments nutritifs présents dans les MF (*e.g.* N/P/K, notamment).

Concernant *H. aculeifer*, il n'existe aucune donnée concernant les effets d'hormèse sur le critère de reproduction. Cependant, ce type d'effet particulier a été mis en évidence chez l'acarien *Oppia nitens* (*e.g.* à 200 mg/kg, 1000 mg/kg et 2000 mg/kg de géraniol, de Cu^{2+} et de Zn^{2+} , respectivement ; Owojori & Siciliano, 2012).

II.2. Sensibilité comparée des organismes terrestres exposés à l'acide borique

L'acide borique, dont les propriétés et les effets basés sur le bore sont bien connus (Goldberg, 1997), est une substance chimique préconisée comme substance de référence pour les essais utilisant le ver de terre *E. fetida* (ISO 11268-1 & 2, 2012) ainsi que l'acarien prédateur *H. aculeifer* (OCDE, 2008). Cette substance a également été suggérée en tant que substance de référence pour le collembole *F. candida*, les enchytréides *E. albidus* (Amorim *et al.*, 2011) et *E. crypticus* (Becker *et al.*, 2011), ainsi que pour l'acarien *O. nitens* (Princz *et al.*, 2010). Le tableau 24 résume les données recensées dans la littérature concernant la sensibilité des invertébrés terrestres exposés à l'acide borique.

Lors de notre étude, la CE_{50} pour le paramètre de reproduction a été calculée à 1259 mg/kg chez *C. elegans*, alors que Becker *et al.* (2011) ont déterminé une CE_{50} plus faible (*i.e.* 747 mg/kg), et relativement proche de celle des vers de terre *E. fetida*. Ces auteurs indiquent également que la variabilité de ce critère pour le nématode peut être élevée, en citant des valeurs de CE_{50} de l'ordre de 1650 mg/kg (données non publiées). Parmi les organismes terrestres, le nématode s'est avéré être parmi les organismes les moins sensibles à l'acide borique.

La sensibilité de *H. aculeifer*, exposé à du sol artificiel et du sol naturel, s'est révélée être intermédiaire par rapport à celle du vers de terre *E. fetida*, des enchytréides *E. albidus*/*E. crypticus* et de l'acarien *O. nitens*. Les données obtenues avec l'acarien prédateur sont également en accord avec les données obtenues lors des essais inter-laboratoires pour cet organisme (Smit *et al.*, 2012).

DISCUSSION

Tableau 24 : Résumé de la sensibilité du critère de reproduction de différents invertébrés terrestres vis-à-vis de l'acide borique

Organisme	Reproduction (CE ₅₀ , mg/kg)	Sol	Référence
<i>Eisenia fetida</i>	484	Artificiel (ISO)	Becker <i>et al.</i> , 2011
<i>Folsomia candida</i>	54,5	Naturel (LUFA 2.2)	Amorim <i>et al.</i> , 2011
<i>Enchytraeus albidus</i>	105,1	Naturel (LUFA 2.2)	Amorim <i>et al.</i> , 2011
<i>Enchytraeus crypticus</i>	220	Artificiel (ISO)	Becker <i>et al.</i> , 2011
<i>Oppia nitens</i>	96	Naturel (terrain)	Princz <i>et al.</i> , 2010
<i>Caenorhabditis elegans</i>	747	Naturel (LUFA 2.2)	Becker <i>et al.</i> , 2011
	1259		Présents résultats
<i>Hypoaspis aculeifer</i>	294,2	Artificiel (ISO)	Présents résultats
	214,2	Naturel (LUFA 2.2)	Présents résultats

II.3. Sensibilité comparée des organismes terrestres exposés aux ETM

Afin de comparer la sensibilité de *C. elegans* et *H. aculeifer* vis-à-vis des ETM par rapport aux autres organismes terrestres, un recensement des données existantes pour les cinq métaux étudiés au cours des travaux de thèse (*i.e.* Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) a été réalisé. Les différentes valeurs de CL₅₀ et de CE₅₀ disponibles pour *E. fetida*, *F. candida*, *E. albidus* et *O. nitens* sont présentées dans le tableau 25. Les données obtenues au cours des travaux de thèse sont également mis en regard dans ce tableau.

Concernant *C. elegans*, les valeurs de CL₅₀ obtenues après exposition aux mélanges réalisés avec le sol naturel LUFA 2.2 (*i.e.* 75,3 mg/kg – 417,8 mg/kg) sont inférieures aux valeurs obtenues pour les mélanges réalisés avec la matrice artificielle ASTM (*i.e.* 1272 mg/kg – 2490 mg/kg ; Peredney & Williams, 2000). Cette différence peut s'expliquer par la plus faible biodisponibilité de ces éléments dans la matrice artificielle, qui contient une plus forte teneur en matière organique par rapport au sol naturel (Crommentuijn *et al.*, 1997 ; Boyd & Williams, 2003 ; Van Gestel, 2008). Les valeurs de CE₅₀ calculées pour *C. elegans* concernant le cadmium, le cuivre et le zinc (*i.e.* 60,1 mg/kg – 236,4 mg/kg) sont similaires aux valeurs déterminées pour le ver de terre *E. fetida* (*i.e.* 46,3 mg/kg – 236 mg/kg) et l'enchytréide *E. albidus* (*i.e.* 158 mg/kg – 305 mg/kg), et sont également parmi les plus faibles en regard des autres invertébrés terrestres.

DISCUSSION

Tableau 25 : Résumé de la sensibilité des paramètres de mortalité et de reproduction de différents invertébrés vis-à-vis du cadmium, du cuivre, du nickel, du plomb et du zinc

Organisme	ETM	Mortalité (CL ₅₀ , mg/kg)	Reproduction (CE ₅₀ , mg/kg)	Sol	Référence
<i>Eisenia fetida</i>	Cd	>300	46,3	Artificiel (ISO)	Spurgeon <i>et al.</i> , 1994
	Cu	683	53,3	Artificiel (ISO)	Spurgeon <i>et al.</i> , 1994
	Ni	/	362	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2002a
	Pb	4480	1940	Artificiel (ISO)	Spurgeon <i>et al.</i> , 1994
	Zn	1010	276	Artificiel (ISO)	Spurgeon <i>et al.</i> , 1994
<i>Folsomia candida</i>	Cd	2310	315	Artificiel (ISO)	Greenslade & Vaughan, 2003
	Cu	1810	751	Artificiel (ISO)	Greenslade & Vaughan, 2003
	Ni	/	476	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2002a
	Pb	/	2560	Artificiel (ISO)	Greenslade & Vaughan, 2003
	Zn	5150	865	Artificiel (ISO)	Greenslade & Vaughan, 2003 ; Lock & Janssen, 2001a
<i>Enchytraeus albidus</i>	Cd	476	158	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2001a
	Cu	799	305	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2001b; 2002b
	Ni	/	275	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2002b
	Pb	11400	320	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2001b; 2002b
	Zn	566	267	Artificiel (ISO)	Lock & Janssen, 2001c
<i>Oppia nitens</i>	Cd	603	137	Artificiel (ISO)	Owojori & Siciliano, 2012
	Cu	3311	2896	Artificiel (ISO)	Owojori & Siciliano, 2012
	Ni	/	/	/	/
	Pb	6761	1671	Artificiel (ISO)	Owojori & Siciliano, 2012
	Zn	2291	1562	Artificiel (ISO)	Owojori & Siciliano, 2012

DISCUSSION

(Suite du tableau 25)

Organisme	ETM	Valeur de CL ₅₀ (mg/kg)	Valeur de CE ₅₀ reproduction (mg/kg)	Sol	Référence
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cd	1641	/	Artificiel (ASTM)	Peredney & Williams, 2000
	Cu	1272	/	Artificiel (ASTM)	Peredney & Williams, 2000
	Ni	2490	/	Artificiel (ASTM)	Peredney & Williams, 2000
	Pb	2293	/	Artificiel (ASTM)	Peredney & Williams, 2000
	Zn	1915	/	Artificiel (ASTM)	Peredney & Williams, 2000
	Cd	417,8	79,1	Naturel (LUFA 2.2)	Présents résultats
	Cu	172,5	85,2	Naturel (LUFA 2.2)	Présents résultats
	Ni	75,3	60,1	Naturel (LUFA 2.2)	Présents résultats
	Pb	> 316	> 316	Naturel (LUFA 2.2)	Présents résultats
	Zn	262,1	236,4	Naturel (LUFA 2.2)	Présents résultats
<i>Hypoaspis aculeifer</i>	Cd	> 1839	> 1839	Artificiel (ISO)	Présents résultats
	Cu	> 1840	> 1840	Artificiel (ISO)	Présents résultats
	Ni	> 1870	> 1870	Artificiel (ISO)	Présents résultats
	Pb	> 1780	> 1780	Artificiel (ISO)	Présents résultats
	Zn	> 1910	> 1910	Artificiel (ISO)	Présents résultats

DISCUSSION

Les concentrations maximales en ETM testées avec *H. aculeifer* (i.e. 2000 mg/kg pour chaque ETM) n'ont entraîné aucun effet sur la survie des organismes adultes, et n'ont pas permis le calcul de CE₅₀ sur le paramètre de reproduction (e.g. proches de 2000 mg/kg pour le cuivre et le nickel). L'acarien *O. nitens* est également peu sensible aux ETM (CE₅₀ comprises entre 1562 mg/kg et 2896 mg/kg pour le cuivre, le zinc et le plomb ; Owojori & Siciliano, 2012).

La différence de sensibilité entre le nématode et l'acarien prédateur peut s'expliquer, d'une part, en fonction des voies d'exposition des organismes, dépendantes de leur mode de vie dans les sols. D'autre part, ces deux organismes présentent des voies de détoxification des ETM relativement différentes. Le nématode *C. elegans* présente plusieurs systèmes cellulaires, tels que le glutathion, les métallothionéines, les protéines « heat shock » ainsi que divers pompes et transporteurs, qui permettent de détoxifier et d'excréter les métaux (Martinez-Finley & Aschner, 2011). Pour l'acarien prédateur *H. aculeifer*, les voies de détoxification sont inconnues. Celles-ci pourraient être comparables à celles d'autres espèces d'acariens des sols, tels que *Chamobates borealis* (Tragardh) et *Nothrus silvestris* (Nicolet). Chez ces espèces, il a été démontré que les métaux pouvaient être séquestrés sous la forme de sphérites, éliminées par la suite par voie intestinale (Ludwig *et al.*, 1991 et 1992). Une autre voie d'élimination des ETM chez les acariens juvéniles serait une accumulation de ces éléments dans la cuticule (Seniczak & Seniczak, 2002), qui est éliminée après les différentes mues jusqu'au stade adulte. Ces phénomènes pourraient expliquer en partie la tolérance de *H. aculeifer* vis-à-vis des ETM.

Chapitre III. Intérêt du nématode et de l'acarien prédateur dans l'évaluation écotoxicologique des MF

Ce chapitre est dédié à l'intégration de la réponse aux MF des deux organismes modèles, par rapport aux réponses obtenues avec d'autres organismes terrestres et aquatiques. Dans un premier temps, ce chapitre présente l'intégration de la réponse de *C. elegans* aux organismes composant les batteries de bio-essais, sous la forme d'un article intitulé « Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land : towards a proposal of a suitable test battery » (publié dans le journal *Ecotoxicology and Environmental Safety*). Pour *H. aculeifer*, compte tenu du plus faible nombre de matrices testées (*i.e.* quatre), la comparaison avec les autres organismes a été réalisée MF par MF.

A partir de ces éléments, nous pouvons conclure quant à la pertinence d'intégrer le nématode *C. elegans* et l'acarien prédateur *H. aculeifer* dans des batteries de bio-essai, dans le cadre de la caractérisation des dangers liés à l'utilisation agricole des MF.

III.1. Sensibilité de *C. elegans* aux MF comparée aux organismes composant les batteries de bio-essais – Article « Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land : towards a proposal of a suitable test battery (*Ecotoxicology and Environmental Safety*) »

Les neuf MF de différentes origines ont été évaluées par approche directe, avec une batterie de bio-essais terrestres (*i.e.* végétaux supérieurs, vers de terre et nématodes), et par approche indirecte (*i.e.* éluats des mélanges solides), avec une batterie de bio-essais aquatiques (*i.e.* bactéries, algues, rotifères, crustacés et nématodes). Ces bio-essais ont été sélectionnés car complémentaires en terme de chaîne trophique (*i.e.* producteurs primaires et consommateurs primaires) ainsi qu'en terme de critère d'effet évalué (*i.e.* comportemental, aigu et chronique). Les MF ont été testées en utilisant une gamme de taux d'application, comprenant la dose d'application recommandée pour chaque MF (*i.e.* 1X) ainsi que des multiples de cette valeur (*i.e.* 5X, 10X, 50X et 100X). Les réponses des organismes composant les batteries de bio-essais ont été par la suite comparées à l'aide d'outils de statistiques multivariées (*i.e.* ACP) afin de proposer une stratégie d'essai pertinente pour évaluer l'écotoxicité des MF.

DISCUSSION

Les résultats obtenus ont montré que :

- les essais réalisés sur organismes terrestres (*i.e.* exposition par approche directe) ont été plus sensibles que les essais faisant intervenir des organismes aquatiques (*i.e.* approche indirecte). Comme peu d'effet ont été mis en évidence par approche indirecte, il se pose la question de l'intérêt de conserver cette approche. Par la suite, seuls les essais terrestres ont été considérés afin d'être proposés dans la batterie d'essai optimale ;
- parmi les doses d'application utilisées pour les deux approches, les deux plus forts taux étudiés (*i.e.* 50X et 100X la dose d'application recommandée) n'ont pas été discriminants, car les réponses obtenues ont été de type « tout ou rien » (*i.e.* soit une inhibition des critères d'effet proche de 100 %, soit aucune inhibition des critères d'effet). Il a donc été proposé de ne considérer par la suite que les taux d'application compris entre 1X et 10X la dose d'application préconisée, respective à chaque MF ;
- parmi les organismes terrestres, les essais utilisant les plantes (*i.e.* critères d'effet : croissance racinaire et biomasse) ainsi que les vers de terre (*i.e.* critères d'effet : comportement d'évitement et reproduction) ont été plus sensibles et plus discriminants par rapport aux essais utilisant le nématode *C. elegans*. Cet organisme, bien que parmi les plus sensibles en ce qui concerne les ETM, n'a donc pas été conservé dans la batterie d'essai proposée.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: Towards a proposal of a suitable test battery

Pierre Huguier^{a,b}, Nicolas Manier^a, Laure Chabot^a, Pascale Bauda^b, Pascal Pandard^{a,*}^a Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Parc Technologique ALATA, 60550 Verneuil-en-Halatte, France^b Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux UMR 7360 CNRS – Université de Lorraine, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2014

Received in revised form

19 November 2014

Accepted 21 November 2014

Keywords:

Organic wastes

Test battery

Terrestrial bioassays

Aquatic bioassays

ABSTRACT

The land spreading of organic wastes in agriculture is a common practice in Europe, under the regulation of the Directive 86/278/EEC. One of the objectives of this Directive is to prevent harmful effects of organic wastes on soil, plants and animals. Despite this regulatory framework, there is still a lack of harmonized ecotoxicological test strategy to assess the environmental hazard of such wastes.

The aim of this study was to provide a first step towards the *a priori* ecotoxicological assessment of organic wastes before their land use. For that purpose, nine different organic wastes were assessed using direct (i.e. terrestrial tests) and indirect (i.e. tests on water eluates) approaches, for a total of thirteen endpoints. Then, multivariate analyzes were used to discriminate the most relevant test strategy, among the application rates and bioassays used.

From our results, a draft of test strategy was proposed, using terrestrial bioassays (i.e. earthworms and plants) and a concentration range between one and ten times the recommended application rates of organic wastes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The implementation of the European Directive 86/278/EEC (EC, 1986) and of the Directive 91/271/EEC (EC, 1991a), respectively on the use of sewage sludge in agriculture and on urban wastewater treatment, has led to an increase in the production and recycling of organic wastes as fertilizers or soil amendments in Europe. With a production of raw materials of approximately 250 million tons of municipal wastes per year in the EU, and more than 850 million tons of industrial wastes (SOER, 2010), the recycling of organic wastes in agriculture has now become a common practice, and thus a major issue for both producers and farmers. To comply with sustainable practices, stakeholders are proposing a wide variety of organic wastes for agricultural use. For example, in France, the National Agency for Food Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) already approved the agricultural recycling of organic wastes (individually or mixed) such as sewage sludge, ashes, composted wastes, sawdust, household wastes, industrial residues, animal feces, or more specific residues, like homogenate of eggshell, shellfish wastes or extinguisher powder mixed with beet wastes (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>).

As such wastes are a potential source of organic matter and fertilizing compounds, e.g. nitrogen, phosphorus and/or potassium, they can be used to improve soil characteristics and crop production. However, regarding their origin and treatments, organic wastes can also be a potential source of pollutants affecting soil biota (Düring and Gäth, 2002) and water resources quality (Smith et al., 1999). Potential contaminants that may be found in these materials ranged from heavy metals to persistent organic compounds, including emerging contaminants such as pharmaceuticals and endocrine disruptors (Eriksson et al., 2008; Clarke and Smith, 2011), as well as nanoparticles and/or their derivatives (Kim et al., 2010; Lombi et al., 2012). Therefore, the land use of these wastes is raising concern considering soil protection (EC, 2002), and also because it is essential to demonstrate their innocuousness towards human being and the environment before their land use.

The adverse effects of organic wastes on the environment and especially the effects on living organisms (i.e. micro-organisms, plants and invertebrates) are still under-represented in the regulatory assessment of these complex matrices. This is due to the fact that the environmental assessment of these materials is mainly based on their physico-chemical characteristics. For example, heavy metals contents must comply with defined thresholds as raw materials, and also with heavy metals thresholds in the soil to which it is applied. To date, the ecotoxicological assessment

* Corresponding author.

E-mail address: pascal.pandard@ineris.fr (P. Pandard).

of organic wastes is not mandatory before their approval. Nevertheless, potential priority organic pollutants were highlighted in sewage sludge (Eriksson et al., 2008; Clarke and Smith, 2011), but it is not reasonably achievable to include all of them in European regulations. The physico-chemical characterization cannot thus be considered sufficient alone for the determination of the potential ecotoxicity of these materials, as claimed by several authors (Kapanen and Itävaara, 2001; Alvarenga et al., 2007; Natal-da-Luz et al., 2009; Delgado et al., 2012).

Over the last years, there were many attempts to determine the ecotoxicity of various organic wastes, from sewage sludge to ashes, also including different composted materials and/or animal feces. Due to the non-harmonization of the environmental assessment of such kind of materials, the available studies and produced data are heterogeneous, from field studies (Axelsen and Kristensen, 2000; Cole et al., 2001) or semi-field studies (Andrés and Domene, 2005; Carbonell et al., 2009; Delgado et al., 2012) to laboratory studies, including tests on bacteria (Mantis et al., 2005), on terrestrial organisms or terrestrial plants (Gunadi and Edwards, 2003; Oleszczuk, 2008; Ramírez et al., 2008) as well as tests battery approaches (Selivanovskaya and Latypova, 2003; Bostan et al., 2005; Alvarenga et al., 2007; Chiochetta et al., 2014).

Among European studies aiming at assessing the ecotoxicity of organic wastes before their land use, two complementary approaches are usually applied: a direct approach, i.e. solid-phase tests, and an indirect one, i.e. liquid-phase tests, assessing extracts of the samples. For terrestrial approaches (Alvarenga et al., 2007; Domene et al., 2008; Moreira et al., 2008; Oleszczuk, 2008; Ramírez et al., 2008), methodologies differ according to the soil used, i.e. natural and/or artificial, and according to the metrics used to express the results, i.e. as application rates (t/ha) or in mass ratio (g/kg or as a % of the organic waste mixed with soil). For liquid-phase approaches, the main differences concern the extraction procedures performed, i.e. eluates of mixtures from microcosms (Delgado et al., 2013), different water and solvent extracts (Domene et al., 2008) or water extracts using standard protocols (Alvarenga et al., 2007; Lapa et al., 2007; Malara and Oleszczuk, 2013; Mantis et al., 2005). In these standards (DIN 38414-S4, 1984; CEN, 2002), eluates are obtained from mixtures prepared in water using a ratio of 10 L/kg, followed by agitation and centrifugation. However, for all of these studies, the ecotoxicity in liquid-phase was expressed using different percentages of eluates diluted in bioassay media, in order to calculate LC50 and/or EC50 values.

Bioassays used in the above-mentioned studies were mainly *in vivo*, using higher plants, earthworms, collembolan for solid-phase tests; and bacteria, algae, crustacean for liquid-phase tests. Some authors also proposed *in vitro* bioassays, assessing the cytotoxicity on fish cell lines (Delgado et al., 2013). To date, no test strategy was however developed for the ecotoxicity assessment of organic wastes recycled in agriculture. Most efforts focused on propositions of test strategies to determine effluent quality (Manusadzianan et al., 2003; Hernando et al., 2005; Mendonça et al., 2009; Tigini et al., 2011), soil quality (Bierkens et al., 1998; Van Gestel et al., 2001; Achazi, 2002; Eisentraeger et al., 2004), sediment quality (Ahlf et al., 2002; Ahlf and Heise, 2005; Höss et al., 2010; Tuikka et al., 2011) and the HP14 (ecotoxic) property of wastes included in the European Directive 2008/98/EC (EC, 2008) (repealing Directive 91/689/EEC (EC, 1991b)) for waste classification (Pandard et al., 2006; Wilke et al., 2008; Pablos et al., 2009; Stiernstroem et al., 2009; Weltens et al., 2012; Pandard and Römbke, 2013). But some authors stressed the need of a specific ecotoxicological assessment for organic wastes before their spreading (Domene et al., 2008; Natal-da-Luz et al., 2009). For that purpose, these authors assessed the suitability of different terrestrial and aquatic bioassays test batteries for the evaluation of organic wastes. These test batteries were built up to allow a tiered

approach assessment, e.g. organic waste toxicity screening using behavioral responses, followed by acute and chronic toxicity tests with different endpoints. Furthermore, species used in the above-mentioned studies were selected to be representative of the soil and aquatic communities, as well as of producers (bacteria, algae, plants), primary consumers (crustacean, collembolan) and decomposers (earthworms).

The aims of the present study were thus (i) to provide a first step towards the *a priori* ecotoxicological assessment of organic wastes before their land use, and (ii) to propose an evaluation strategy combining the most relevant *in vivo* bioassays, selected from batteries of solid-phase and liquid-phase tests. For that purpose, the potential ecotoxicity of nine organic wastes were assessed in mixtures with artificial soil (and natural soil for nematode tests), which is representative of their environmental use and also permit to comply with standard procedures. Test organisms used for the direct approach (plants, earthworms, nematodes) and the indirect approach (bacteria, algae, crustacean, rotifer, nematodes) were chosen as they were complementary in term of trophic level (i.e. producers, primary consumers and decomposers) as well as in term of studied endpoints (i.e. behavioral, acute and chronic endpoints). The ecotoxicity of the studied organic wastes was determined using different spreading schemes. This test strategy includes both the respective recommended application rates of each material and multiples of these application rates (five, ten, fifty and one hundred times). The last two were added to determine the limitations of the selected bioassays with high application rates and to set up a first draft of biological responses database for such materials. Results of the bioassays, which represent a total of thirteen endpoints, were then used to perform multivariate analyzes in order to select the most relevant and informative endpoints to characterize the hazard of the organic wastes studied.

2. Materials and methods

2.1. Origin, treatment and preparation of the organic wastes

Nine different organic wastes were considered, i.e. six industrial and urban wastes, two composted materials and one animal feces (photos in [Supplementary data 1](#)). These materials are representative of commonly used organic wastes in Europe and some were already approved for land spreading. Their origin, treatment and application rate are summarized in [Table 1](#). After reception, these organic wastes were stored at 4 °C. Most of them were used without any pre-treatment, excluding the manure which was grinded and sieved (< 4 mm), and the two composted materials which were only sieved (< 4 mm) before testing.

2.2. Characterization of the organic wastes

The fertilizing and physico-chemical characteristics of the organic wastes are listed in [Supplementary data 2](#). Among the organic wastes, only the physico-chemical characteristics of the composted sewage sludge (CSS) were not provided and thus determined by an accredited laboratory (Laboratory of Soil Analyzes of the French National Institute for Agricultural Research (INRA), Arras, France). The water holding capacity and the dry matter content of the organic wastes were determined before testing, to be more accurate in the preparation of mixtures with artificial and natural soils.

2.3. Experimental plan and samples preparation

Terrestrial bioassays were performed on mixtures of organic

Table 1

Origin, treatments and application rates of the organic wastes.

Organic wastes	Origin	Treatment	Abbreviation	Application rate (t/ha)
Cow manure	Animal feces	No treatment	M	10 ^a
Ashes	Industrial waste	Ashes from the burning of sewage sludge, wood wastes and paper production wastes	A	3 ^b
Deinking sludge	Industrial sludge	Deinking sludge from paper mill	DS	5 ^b
Composted wastes	Composted material	Compost of household wastes	CW	5 ^b
Composted sewage sludge	Composted material	Compost of materials of agricultural interest from water treatment and of wood shreds with fertilizer	CSS	8 ^a
Dried and digested sewage sludge	Urban sewage sludge	Digested sewage sludge, thickened, thermally conditioned and dewatered by filter press	DDSS	8 ^a
Digested sewage sludge	Urban sewage sludge	Digested sewage sludge, thickened and thermally conditioned	DSS	12 ^a
Limed sewage sludge	Urban sewage sludge	Urban sewage sludge limed with ferric chloride and dewatered by filter press	LSS	3 ^b
Pelleted sewage sludge	Urban sewage sludge	Limed sewage sludge, dried and pelleted	PSS	4 ^a

^a Raw material^b Dry material

wastes with OECD artificial soil, which contains a reduced peat amount (5% sphagnum peat, 20% kaolin clay, 75% fine quartz sand < 0.2 mm, pH adjusted to 6.0 ± 0.5 with calcium carbonate). Natural soil (LUFA 2.2) was used only for nematode terrestrial tests. Aquatic bioassays were performed on eluates of each mixture with artificial soil.

Mixtures of soil and organic wastes were prepared with a mechanic mixer, in order to achieve one time, five times, ten times, fifty times and one hundred times the respective recommended application rate of each material. The following relationship was used to convert into g/kg the different application rates provided in t/ha: 1ha of soil = 3×10^6 kg of soil (dry weight). For terrestrial tests, mixtures were hydrated according to the requirement of each standardized protocol. In parallel, a portion of each mixture was moistened up to 20% (dry weight) with distilled water, and allowed to equilibrate for four days prior to the leaching procedure.

Eluates were prepared following the ISO/TS 21268-2 (ISO 2007 [b]). The principle of this protocol is to perform a water extraction by adding distilled water to the mixtures of soil and organic waste (90 g, d.w.) to obtain a ratio of 10 L/kg. This preparation was then agitated on a roller table (10 rpm) for 24 h and was finally centrifuged (e.g. 2500 g, 30 min), to separate the liquid phase from the solid phase. All of the obtained eluates were stored at 4 °C and used within 48 h. Prior to run the aquatic bioassays, pH and dissolved oxygen were measured at room temperature (Supplementary data 3). Eluates were filtered at 100 µm for crustacean and rotifer tests, and filtered at 0.45 µm for bacterial and algal tests.

Table 2

List of the bioassays used.

	Group	Organism	Endpoint	Effect	Duration	Abbreviation	Reference
Aquatic bioassays	Bacteria	<i>Vibrio fischeri</i>	Luminescence	Acute	30 min	VL	ISO, 2007[a]
	Algae	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Growth	Chronic	72 h	PG	ISO, 2012[b]
	Rotifer	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Reproduction	Chronic	48 h	BR	ISO, 2008[b]
	Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	Mobility	Acute	48 h	DM	ISO, 2012[a]
	Nematode	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Growth	Chronic	96 h	CGLI	ISO, 2010
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	Reproduction	Chronic	96 h	CRLI	ISO, 2010
Terrestrial bioassays	Plant	<i>Avena sativa</i>	Root growth	Acute	96 h	AR	ISO, 2012[d]
		<i>Avena sativa</i>	Biomass	Acute	14 d	AG	ISO, 2012[e]
		<i>Brassica rapa</i>	Biomass	Acute	14 d	BG	ISO, 2012[e]
	Earthworm	<i>Eisenia fetida</i>	Avoidance	Behavioral	48 h	EA	ISO, 2008[a]
		<i>Eisenia fetida</i>	Reproduction	Chronic	56 d	ER	ISO, 2012[c]
	Nematode	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Growth	Chronic	96 h	CGS	Improvement of ISO (2010) (Huguier et al., 2013)
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	Reproduction	Chronic	96 h	CRS	

2.4. Bioassays

The selected bioassays are presented in Table 2. Most of them were performed following their respective standardized protocol. However, solid-phase tests with the nematode *Caenorhabditis elegans* were carried out according to an adapted protocol of the current ISO 10872 standard (ISO, 2010), which was previously proposed for the assessment of complex matrices with this organism (Huguier et al., 2013). Moreover, during the emergence and early growth of higher plants tests (ISO, 2012[e]), test vessels were supplemented with liquid fertilizer (three times during exposure) in order to limit positive effects of fertilizing compounds potentially brought by the organic wastes, which allowed focusing on inhibitory effects.

2.5. Statistical analyzes

Recorded data from the bioassays were expressed as mean percentages of effect relatively to the control for each mixture of organic wastes (matrix 13×45 , bioassays \times organic wastes). Positive values are representative of toxic effects, and negative values of hormetic effects. Significant differences among the application rates within organic wastes for each bioassay were determined using non-parametric tests (Kruskal–Wallis and Dunn post-hoc tests, $\alpha=0.05$) (OECD, 2006). For further statistical analyzes, only the mean percentages of toxic effects were considered. Hormetic effects were then shifted to “no toxic effect” and represented by zero in the data matrix.

To identify hidden patterns in the bioassays data and classify them according to how much of the information they account for, principal component analyzes (PCA) were performed on raw data to provide a graphical display of these patterns. In order to determine the most relevant spreading scheme to assess organic wastes, the spreading scheme used (i.e. from $\times 1$ to $\times 100$ the recommended application rates) was also emphasized with this statistical treatment, using the space of the objects of PCA.

Statistical analyzes were performed with R software (R Development Core Team, 2008), using "Rcmdr" package for Kruskal–Wallis and Dunn post-hoc tests and "ade4" package for PCA.

3. Results and discussion

3.1. Assessment of the organic wastes with terrestrial and aquatic bioassays

Results of terrestrial and aquatic bioassays are summarized by the bubble chart in Fig. 1. In this figure, the larger are the circles, the higher are the recorded effects. Filled circles represent adverse (toxic) effects, while unfilled circles represent positive (hormetic) effects. It can be noted that the *Daphnia magna* mobility test cannot display hormetic effects. The analyze of this graphical representation yields suitable information concerning both the sensitivity of the bioassays performed and endpoint followed, as well as the overall toxicity of the organic wastes studied.

At first sight, focusing on the organic waste tested, the recommended application rate ($\times 1$) of each material had no significant toxic effect considering any of the terrestrial or aquatic

bioassay. The only exception was for the pelleted sewage sludge (PSS) which induced 49.3% of deleterious effect on the earthworm reproduction endpoint (ER). Most of the significant deleterious effects for both direct and indirect approaches were observed at the highest application rates studied (i.e. $\times 50$ and $\times 100$). However, the overall toxic effects recorded for each organic waste demonstrated that the cow manure (M) and the deinking sludge (DS) were the less toxic wastes on both aquatic and terrestrial organisms, showing nearly no significant effect up to ten times their respective recommended application rates, and generally low toxicities ($< 50\%$ of effect) for the two highest multiples tested (i.e. $\times 50$ and $\times 100$). The most toxic organic wastes were the digested sewage sludge (DSS) and the limed sewage sludge (LSS), with significant toxicities determined from five times their respective recommended application rates in solid-phase. For the latter materials, it should be noted that these effects were not related to an increase of pH outside the acceptable range of the studied organisms.

Considering bioassays responses, the organic wastes assessed induced more deleterious effects on terrestrial organisms by comparison with the aquatic ones. Among terrestrial bioassays, plants and earthworms appeared to be the most sensitive species towards the selected organic wastes, whatever the endpoint considered. Indeed, significant toxic effects were recorded with these organisms for at least seven out of the nine organic wastes with a dose–response trend, from five times the recommended application rates of some organic waste (i.e. the limed sewage sludge (LSS) on the earthworm reproduction (ER); the digested sewage sludge (DSS) on the earthworm reproduction (ER) and the plant root elongation (AR); the dried and digested sewage sludge (DDSS)

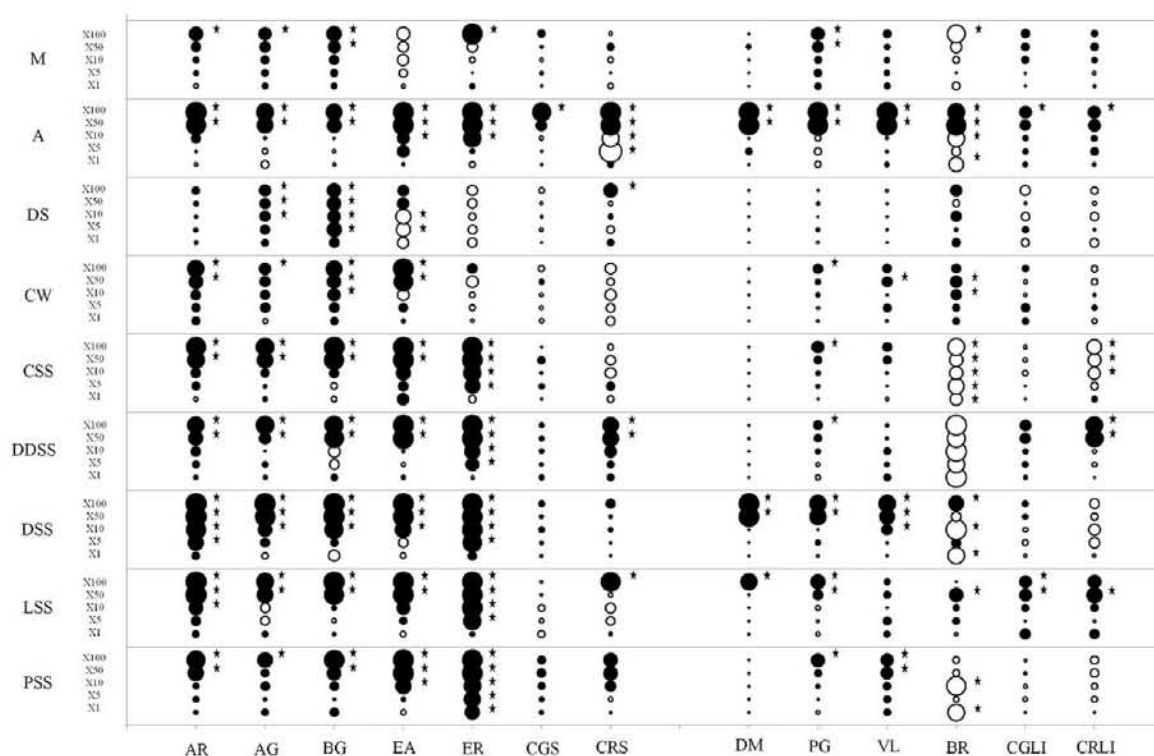


Fig. 1. Bubble chart of the effects of the organic wastes on terrestrial and aquatic bioassays. Effects between 0% and 0.9% were replaced by 1% and effects between -0.9% and 0% were replaced by -1% . The dot sizes range from 1 to 100% effect and are proportional to the observed effect. Filled bubbles: toxic effects; unfilled bubbles: hormetic effects. *: Significant difference with the control after Kruskal–Wallis and Dunn tests ($\alpha=0.05$). For the meaning of the abbreviations, see Table 1 and Table 2.

on the earthworm reproduction (ER); the deinking sludge (DS) on plant biomass (BG)). These organisms are also among the most relevant to assess the effects of materials spread on soil, as textural and qualitative modifications of this substrate directly affects its habitat function.

Eluates have induced in general a low toxicity towards aquatic organisms, and significant deleterious effects were mostly recorded at the highest application rates tested (i.e. $\times 50$ and $\times 100$). The most sensitive aquatic bioassays were those using the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (i.e. significant toxic effects recorded for eight organic wastes) and the bacteria *Vibrio fischeri* (i.e. significant toxic effects recorded for four organic wastes), while the crustacean *D. magna* mobility test and the nematode *C. elegans* growth test were the less sensitive ones (i.e. respectively six and seven organic wastes induced no effect even at the highest application rate tested).

In a similar work, Domene et al. (2008) studied and compared the direct and indirect ecotoxicity of seven organic wastes with terrestrial (i.e. collembolan *Folsomia candida* mortality and reproduction) and aquatic bioassays (bacteria *V. fischeri* luminescence and crustacean *D. magna* mobility). Water and solvent (methanol and dichloromethane) eluates were prepared directly from the organic wastes. In their study, terrestrial organisms showed generally lower sensitivities than aquatic ones, and the bacteria luminescence endpoint was the most sensitive considering water extracts. These results are in contradiction with those of this study (i.e. terrestrial bioassays are more sensitive than aquatic ones). This discrepancy can be explained by a different procedure used to prepare water eluates (i.e. directly from the organic wastes, while from mixtures with soil in the present study) and the difference of bioassays used for the direct approach (i.e. only collembolan). However, results from corroborates the fact that *V. fischeri* luminescence is more sensitive than *D. magna* mobility for

the testing of water eluates from organic wastes.

In addition to the deleterious effects recorded in the present study, some endpoints were highly stimulated after exposure to organic wastes in both direct and indirect approaches. That was especially the case for the reproduction of the rotifer *Brachionus calyciflorus* and of the nematode *C. elegans* in liquid-phase. Indeed for the rotifer, its reproduction was significantly stimulated (from 40.6% to 106% compared to the control) for all of the doses tested of the dried and digested sewage sludge (DDSS) and for the composted sewage sludge (CSS). Sporadic significant hormetic effects were also recorded with this organism for the pelleted sewage sludge (PSS), the digested sewage sludge (DSS), the ashes (A) and the cow manure (M). Concerning the reproduction of the nematode in liquid-phase, significant hormetic effects (from 38.5% to 53.8%) were recorded only for the three highest doses tested ($\times 10$, $\times 50$ and $\times 100$) of the composted sewage sludge (CSS). Positive effects were also recorded for the reproduction of nematodes (up to 34%), for all of the tested doses of the pelleted sewage sludge (PSS), the dried sewage sludge (DSS) and the deinking sludge (DS). Moreover, it can be noted that for terrestrial bioassays, the reproduction of *C. elegans* and *Eisenia fetida* were respectively stimulated for all of the doses tested of the composted wastes (CW, from 13.6% to 31.8%) and the deinking sludge (DS, from 12.1% to 27.4%). Regarding the behavioral test on *E. fetida*, worms were attracted by mixtures of artificial soil with deinking sludge at the lower doses and with cow manure for all the tested doses.

3.2. Selection of a suitable test battery

The selection of a minimal set of relevant bioassays for the hazard characterization of organic waste was considered by the use of PCA. These multivariate analyzes were performed including only the mean percentages of deleterious effects (hormetic effects

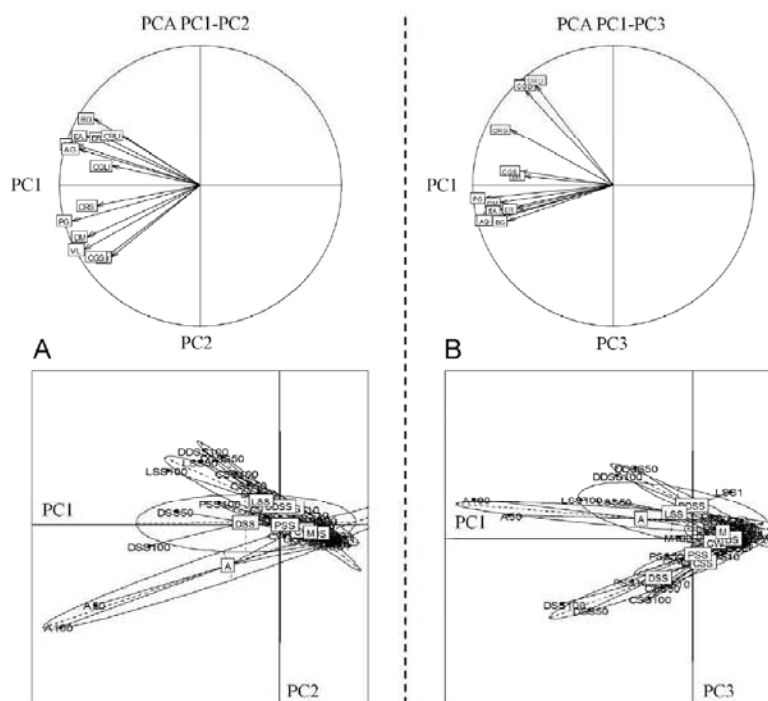


Fig. 2. PC1–PC2 (A); PC1–PC3 (B) of the Principal Component Analysis displaying the distribution of the bioassays (matrix 13 \times 45). Eigen values: PC1: 57.1%; PC2: 13.1%; PC3: 11.3%; PC4: 5.6%; PC5: 3.3%; PC6: 3%; PC7: 2.3%; PC8: 1.5%; PC9: 0.9%; PC10: 0.6%.

represented by zero in the data matrix).

A first PCA (Fig. 2) was performed taking into account all the data obtained for all of the organic wastes and for the entire application rates tested (matrix 13×45 , bioassays \times organic wastes). This PCA demonstrated that all of the bioassays were highly correlated to the first principal component (PC1), which explains 57% of the total variance, and were mostly drawn by the highest application rates of the ashes (A100 and A50), the digested sewage sludge (DSS100 and DSS50), the limed sewage sludge (LSS100 and LSS50), the pelleted sewage sludge (PSS100) and the dried and digested sewage sludge (DDSS100 and DDSS50). The second axis (PC2), explaining 13.1% of the total variance, allowed to determine two distinct groups of bioassays: one clustering together terrestrial organisms (AR/AG/BG/EA and ER) with the nematode responses in aquatic phase (CGLI and CRLI), and a second clustering together the aquatic organisms (PG/VL/DM and BR) with the nematode responses in terrestrial phase (CGS and CRS). This axis (PC2) was considered as representative of differences between the sensitivities of aquatic and terrestrial bioassays, which is consistent with the above-mentioned observations. Any other clear discrimination or grouping of bioassays and/or endpoints can be observed at this stage, as this factorial plan (PC1–PC2=70.1% of the total inertia) was mainly driven by the constant high toxicities observed for most of the high multiples of the application rates.

It should be underlined that the assessment of the organic wastes studied, i.e. via multiples of their respective recommended application rates in t/ha, was specific in comparison with other studies assessing the ecotoxicity of organic wastes (Alvarenga et al., 2007; Domene et al., 2008; Oleszczuk, 2008; Ramirez et al., 2008; Natal-da-Luz et al., 2011). Indeed, experimental designs used in other studies were set up for the determination of EC50/LC50. Their aim was to give a classification of the organic wastes before their spreading. In this study, our objective was to assess

organic materials under conditions of use. Thus, the assessment of doses based on the respective recommended application rate of each organic waste seems more relevant considering their use in land. However, among the multiples of the application rates tested, doses over ten times the recommended application rate (i.e. $\times 50$ and $\times 100$) were found not to be discriminant.

The data obtained for both fifty and one hundred times the recommended application rates were thus excluded from the data matrix, and a second PCA (Fig. 3) was performed on the subsequent data matrix (13×27 , bioassays \times organic wastes). Despite a low explanation of the first PCs (PC1: 27.3%, PC2: 17%, PC3: 15.7%), this analysis allowed a better discrimination of the bioassays in comparison with the first PCA. The space of the variables of the first factorial plan (PC1–PC2, Fig. 3A) clearly shows three clusters: *C. elegans* endpoints in liquid phase (CGLI and CRLI)/*D. magna* mobility (DM); *V. fischeri* luminescence (VL)/*E. fetida* endpoints (ER, EA)/*C. elegans* endpoints in solid phase (CGS, CRS); and *Avena sativa* growth (AG)/*Brassica rapa* growth (BG). The root elongation of *A. sativa* (AR), the algal growth (PG) and the rotifer reproduction endpoints (BR) cannot be gathered with other tests. In the second factorial plan (PC1–PC3; Fig. 3B), the distribution of the different bioassays and endpoints appears quite similar by comparison with the first factorial plan (PC1–PC2). Once again, *D. magna* mobility endpoint (DM) was close to *C. elegans* growth and reproduction endpoints in liquid phase (CGLI and CRLI), and distinct from the other bioassays endpoints. Moreover, plants endpoints for both *A. sativa* (AG and AR) and *B. rapa* (BG) were grouped with earthworms endpoints (ER and EA) and the bacteria endpoint (VL). Algae (PG) and rotifer (BR) bioassays represented a separate group, as well as the nematode growth and reproduction in solid phase (CGS and CRS).

The analysis of this second PCA showed (i) that there is a general opposition between terrestrial and aquatic bioassays on

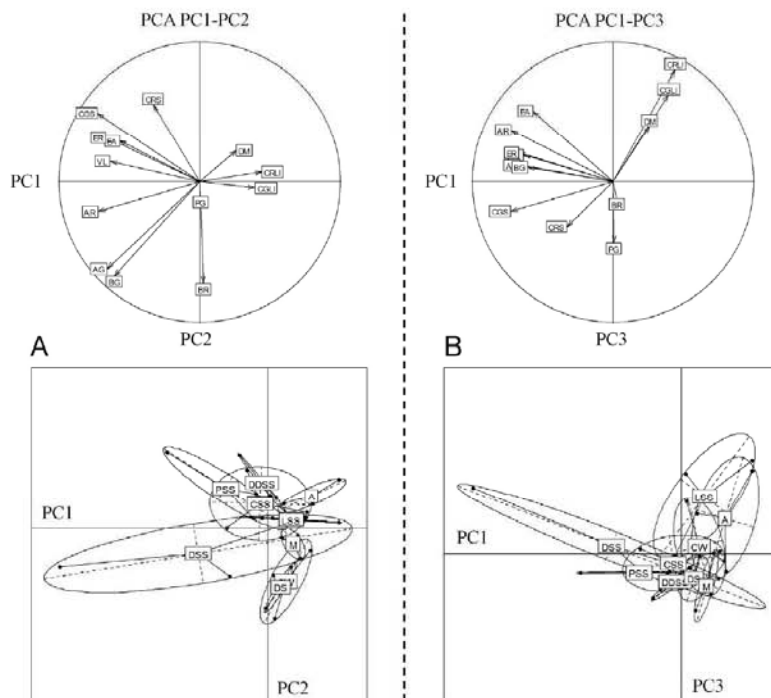


Fig. 3. PC1–PC2 (A); PC1–PC3 (B) of the Principal Component Analysis displaying the distribution of the bioassays (matrix 13×27). Eigen values: PC1: 27.3%; PC2: 17%; PC3: 15.7%; PC4: 9.6%; PC5: 7.9%; PC6: 7.4%; PC7: 5.5%; PC8: 3.8%; PC9: 1.9%; PC10: 1.5%.

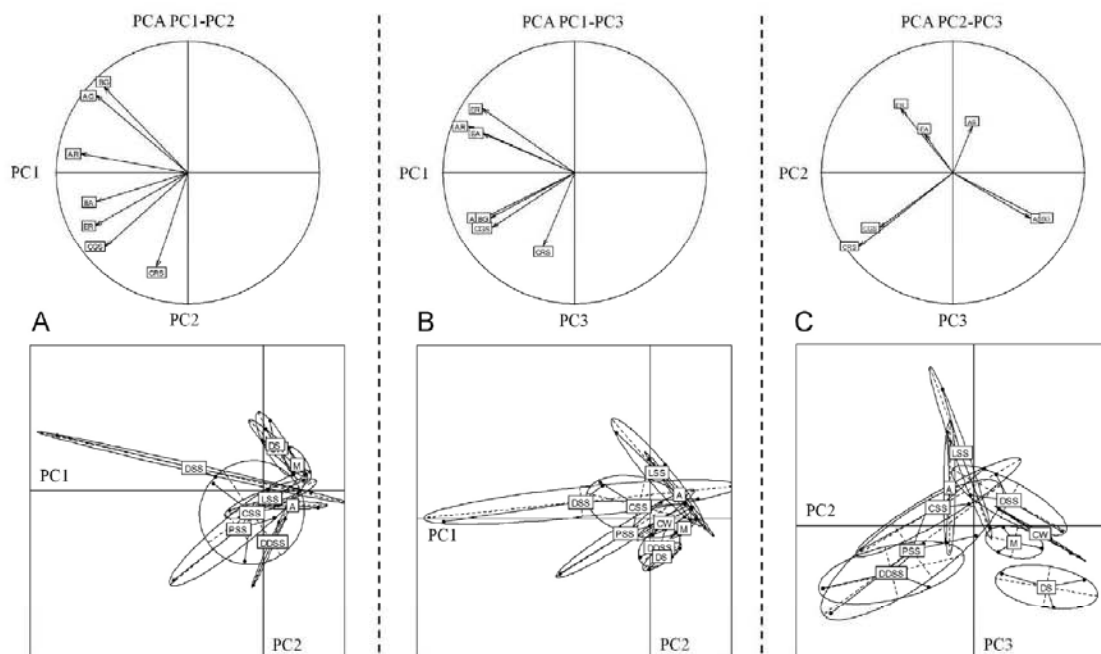


Fig. 4. PC1–PC2 (A); PC1–PC3 (B); PC2–PC3 (C) of the Principal Component Analysis displaying the distribution of the bioassays (matrix 7×27). Eigen values: PC1=42.5%; PC2=26.1%; PC3=16.7%; PC4: 7.7%; PC5: 3.8%; PC6: 1.9%; PC7: 1.2%.

PC1, which was representative of the sensitivities of the bioassays (AR/AG/BG/EA/ER/CGS/CRS/VL vs DM/PG/BR/CGLI/CRLI); and (ii) that both growth and reproduction tests on *C. elegans* in liquid-phase (CGLI and CRLI) brought the same level of information, as well as for both endpoints used in terrestrial tests with this nematode (CGS and CRS). In addition, this fact was also stated for the avoidance and the reproduction of *E. fetida* (EA and ER), and for the growth endpoint of the two plants *A. sativa* and *B. rapa* (AG and BG).

A third PCA (Fig. 4) was finally performed on terrestrial bioassays results for one time to ten times the recommended application rates of each organic waste (matrix 7×27 , bioassays \times organic wastes), in order to hone the classification of terrestrial bioassays responses. In the first factorial plan (PC1–PC2, Fig. 4A), explaining 68.6% of the total inertia, two groups can be distinguished: the two plants growth endpoint (AG/BG), and the earthworm endpoints (EA/ER) with the nematode growth (CGS). The root elongation of *A. sativa* (AR) and the reproduction of *C. elegans* (CRS) cannot be gathered with other tests. In the second factorial plan (PC1–PC3, Fig. 4B), explaining 59.2% of the total inertia, also two groups can be identified: a first one including the two plants growth (AG/BG) with the nematode growth (CGS), and a second one including *E. fetida* endpoints (EA/ER) with the root elongation of *A. sativa* (AR). These findings were in accordance with those obtained by Hund-Rinke et al. (2003) who showed that the avoidance endpoint was at least as sensitive as the reproduction one. Finally, the third factorial plan (PC2–PC3, Fig. 4C) revealed 3 groups and clearly separates the *C. elegans* growth and reproduction endpoints from the plants and the earthworm endpoints.

This last PCA confirmed thus that (i) both *A. sativa* and *B. rapa* early growth provided the same level of information, as well as the avoidance and reproduction endpoints of *E. fetida*; (ii) plants and earthworm bioassays were not redundant, and (iii) the

reproduction of the nematode *C. elegans* and of the root elongation of *A. sativa* showed specific responses in comparison with the other terrestrial bioassays.

From these statistical analyzes and previous statements on the graphical display of the endpoints responses, bioassays using plants (AR, AG and BG) and earthworm (EA and ER) were found to be the most sensitive and discriminating ones. A minimum test strategy can be thus proposed, i.e. in which the organic wastes are assessed with plants and earthworms endpoints only, between one time and ten times their respective recommended application rates. Among these bioassays, prioritization of tests for a tiered approach could be guided by considering additional criteria, such as ease of implementation, rapidity of response and cost-effectiveness.

4. Conclusion

The aim of this study was to provide a first draft of evaluation scheme for the hazard assessment of organic wastes spread on agricultural land. For that purpose, complementary terrestrial bioassays (i.e. plants, earthworms and nematodes) and aquatic bioassays (i.e. bacteria, algae, rotifers, crustaceans and nematodes) were selected and used to test different kind of organic wastes.

From the results obtained, we can conclude that the terrestrial organisms (mainly plants and earthworms bioassays) through a direct approach, were the most sensitive, discriminant and relevant to assess the hazard of organic wastes used in agriculture by comparison to the aquatic bioassays using an indirect approach. A minimum test strategy can be proposed which includes a root growth inhibition test, an early growth inhibition test on higher plants (*A. sativa* and *B. rapa*) and a worms test (either avoidance test or reproduction test). Considering the concentration range used, it was also demonstrated that doses from one to ten times

the respective recommended application rates of the organic wastes studied were sufficient to determine possible adverse effects, under realistic spreading conditions.

Acknowledgements

The financial support from the French Ministry of Ecology, Sustainable Development, and Energy and French Environment and Energy Management Agency (Contracts 0975C0061 and 1006C0122) is gratefully acknowledged. We also especially thank our technical team (Agnès Gaudillot, Jacques Giacalone, Franck Gondelle, Anne Guillemette, Camille Méline and Manon Thévenin) for their contribution to this project.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.017>.

References

- Achazi, R.K., 2002. Invertebrates in risk assessment: development of a test battery and of short term biotests for ecological risk assessment of soil. *J. Soils Sediments* 2, 174–178.
- Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Ricking, M., 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality: a German approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *J. Soils Sediments* 2, 37–42.
- Ahlf, W., Heise, S., 2005. Sediment toxicity assessment: Rationale for effect classes. *J. Soils Sediments* 5, 16–20.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., Vallini, G., 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ. Int.* 33, 505–513.
- Andrés, P., Domene, X., 2005. Ecotoxicological and fertilizing effects of dewatered, composted and dry sewage sludge on soil mesofauna: a TME experiment. *Ecotoxicology* 14, 545–557.
- Axelsen, J.A., Kristensen, K.T., 2000. Collembola and mites in plots fertilized with different types of green manure. *Pedobiologia* 44, 556–566.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., Schoeters, G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* 37, 2935–2947.
- Bostan, V., McCarthy, L.H., Liss, S.N., 2005. Assessing the impact of land-applied biosolids from a thermomechanical (TMP) pulp mill to a suite of terrestrial and aquatic bioassay organisms under laboratory conditions. *Waste Manag.* 25, 89–100.
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1309–1319.
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37, 226–247.
- CEN, 2002. Characterisation of waste – Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges – Part 2: One stage batch test at a liquid ratio of 10 L/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction). EN 12457-2. European Committee for Standardization.
- Chiochetta, C.G., Goetten, L.C., Almeida, S.M., Quaranta, G., Cotellet, S., Radetski, C.M., 2014. Leachates from solid wastes: Chemical and eco(geno)toxicological differences between leachates obtained from fresh and stabilized industrial organic sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 1090–1098.
- Cole, L.J., McCracken, D.L., Foster, G.N., Aitken, M.N., 2001. Using Collembola to assess the risks of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land in western Scotland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 83, 177–189.
- Delgado, M., Rodríguez, C., Martín, J.V., Miralles de Imperial, R., Alonso, F., 2012. Environmental assay on the effect of poultry manure application on soil organisms in agroecosystems. *Sci. Total Environ.* 416, 532–535.
- Delgado, M., Imperial, R.M. de, Alonso, F., Rodríguez, C., Martín, J.V., 2013. Ecotoxicity bioassays on leachates from poultry manure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 401–404.
- DIN, 1984. Determination of leachability by water (S4). German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge. DIN 38414-S4. Sludge and Sediments (Group S).
- Domene, X., Alcañiz, J.M., Andrés, P., 2008. Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environ. Pollut.* 151, 549–558.
- Düring, R.-A., Gath, S., 2002. Utilization of municipal organic wastes in agriculture: where do we stand, where will we go? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 544–556.
- Eisentraeger, A., Rila, Jean-P., Hund-Rinke, K., Roembke, J., 2004. Proposal of a testing strategy and assessment criteria for the ecotoxicological assessment of soil or soil materials. *J. Soils Sediments* 4, 123–128.
- Eriksson, E., Christensen, N., Ejbye Schmidt, J., Ledin, A., 2008. Potential priority pollutants in sewage sludge. *Desalination* 226, 371–388.
- [EC] European Commission 1986, Directive 86/278/EEC: Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Official Journal of the European Communities 181, p. 6–12.
- [EC] European Commission 1991a. Directive 91/271/EEC: Council Directive of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment. Official Journal of the European Communities 135, pp. 40–52.
- [EC] European Commission 1991b. Directive 91/689/EEC. Council Directive of 12 December 1991 on hazardous wastes. Official Journal of the European Communities 377, pp. 20–27.
- [EC] European Commission 2002. Communication 179 from the Commission to the Council and the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Towards a thematic strategy for soil protection.
- [EC] European Commission 2008. Directive 2008/98/EC: Directive of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. Official Journal of the European Union 312, pp. 3–30.
- Gunadi, B., Edwards, C.A., 2003. The effects of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) (Lumbricidae). *Pedobiologia* 47, 321–329.
- Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358–366.
- Höss, S., Ahlf, W., Fahrenstich, C., Gilberg, D., Hollert, H., Melbye, K., Meller, M., Hammers-Wirtz, M., Heininger, P., Neumann-Hensel, H., Ottermanns, R., Ratte, H.-T., Seiler, T.-B., Spira, D., Weber, J., Feiler, U., 2010. Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination-Determination of toxicity thresholds. *Environ. Pollut.* 158, 2999–3010.
- Huguier, P., Manier, N., Méline, C., Bauda, P., Pandard, P., 2013. Improvement of the *Caenorhabditis elegans* growth and reproduction test to assess the ecotoxicity of soils and complex matrices. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2100–2108.
- Hund-Rinke, K., Achazi, R., Römbke, J., Warnecke, D., 2003. Earthworm avoidance test: results of a laboratory comparison test. *J. Soils Sediments* 3, 7–12.
- ISO, 2007[a]. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO 11348-3. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2007[b]. Soil quality – Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials – Part 2: Batch test using a liquid to solid ratio of 10 L/kg dry matter. ISO/TS 21268-2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008[a]. Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008[b]. Water quality – Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48h. ISO 20666. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2010. Water quality – Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO 10872. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2012[a]. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. ISO 6341. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2012[b]. Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2012[c]. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. ISO 11268-2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2012[d]. Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Method for the measurement of inhibition of root elongation. ISO 11269-1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2012[e]. Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants. ISO 11269-2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kapanen, A., Itävaara, M., 2001. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 1–16.
- Kim, B., Park, C.-S., Murayama, M., Hochella, M.F., 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7509–7514.
- Lapa, N., Barbosa, R., Lopes, M.H., Mendes, B., Abella, P., Gulyurtlu, I., Santos Oliveira, J., 2007. Chemical and ecotoxicological characterization of ashes obtained from sewage sludge combustion in a fluidised-bed reactor. *J. Hazard. Mater.* 147, 175–183.
- Lombi, E., Donner, E., Tavakkoli, E., Turney, T.W., Naidu, R., Miller, B.W., Scheckel, K. G., 2012. Fate of zinc oxide nanoparticles during anaerobic digestion of

- wastewater and post-treatment processing of sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9089–9096.
- Malara, A., Oleszczuk, P., 2013. Application of a battery of biotests for the determination of leachate toxicity to bacteria and invertebrates from sewage sludge-amended soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3435–3446.
- Mantis, I., Voutsas, D., Samara, C., 2005. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 397–407.
- Manusadzianas, L., Balkešytė, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Pöllumaa, L., Kahru, A., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat. Toxicol.* 63, 27–41.
- Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S.M., Silva, L., Cunha, M.A., Leitão, S., Moura, I., Cortez, C., Brito, F., 2009. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: case study in Portugal. *J. Hazard. Mater.* 163, 665–670.
- Moreira, R., Sousa, J.P., Canhoto, C., 2008. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. *Bioresour. Technol.* 99, 8382–8389.
- Natal-da-Luz, T., Tidona, S., Jesus, B., Morais, P.V., Sousa, J.P., 2009. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. *J. Soils Sediments* 9, 246–260.
- Natal-da-Luz, T., Ojeda, G., Pratas, J., Van Gestel, C.A.M., Sousa, J.P., 2011. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1715–1720.
- Oleszczuk, P., 2008. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 496–505.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Paris, France.
- Pablos, M.V., Fernández, C., del Mar Babín, M., María Navas, J., Carbonell, G., Martini, F., García-Hortigüela, P., Vicente Tarazona, J., 2009. Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1594–1600.
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A.-M., Poulsen, V., Jourdain, M.-J., Férard, J.-F., Grand, C., Bispo, A., 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.* 363, 114–125.
- Pandard, P., Römbke, J., 2013. Proposal for a “Harmonized” strategy for the assessment of the HP 14 property. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 9, 665–672.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria.
- Ramírez, W.A., Domene, X., Ortiz, O., Alcañiz, J.M., 2008. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. *Bioresour. Technol.* 99, 7168–7175.
- Selivanovskaya, S.Y., Latypova, V.Z., 2003. The use of bioassays for evaluating the toxicity of sewage sludge and sewage sludge-amended soil. *J. Soils Sediments* 3, 85–92.
- SOER (State and Outlook of European Environment), 2010. Europe’s Environment – The Dobbris Assessment. Chapter 36: Waste production and management – The problem. (<http://www.eea.europa.eu/publications/92-826-5409-5/page036new.html>).
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 100, 179–196.
- Stierstroem, S., Hemstroem, K., Wik, O., Carlsson, G., Breitholtz, M., 2009. Methodology for classification of the H14 criterion according to the directive 2008/98/EC on waste. Proposal of a biotest battery for the classification of hazardous waste. Ecotoxicological testing with bacterium, algae, crustacean and fish embryo. Report reference VARMEFORSK-1092, p. 93.
- Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., Varese, G.C., 2011. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 866–873.
- Tuikka, A.L., Schmitt, C., Höss, S., Bandow, N., von der Ohe, P.C., de Zwart, D., de Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A., Brix, R., Brack, W., Barceló, D., Sormunen, A.J., Kukkonen, J.V.K., 2011. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 123–131.
- Van Gestel, C.A.M., van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M. (Anja), van der Hoek, E.E., Veul, M.F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G.N.M., 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1438–1449.
- Weltens, R., Vanermen, G., Tirez, K., Robbens, J., Deprez, K., Michiels, L., 2012. Screening tests for hazard classification of complex waste materials – selection of methods. *Waste Manag.* 32, 2208–2217.
- Wilke, B.-M., Riepert, F., Koch, C., Kühne, T., 2008. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 283–293.

III.2. Réponse de *H. aculeifer* aux MF comparée aux organismes composant les batteries de bio-essais

La Figure 40 présente les pourcentages d'inhibition obtenus sur la reproduction de *H. aculeifer* pour les essais réalisés avec du sol artificiel ISO ainsi que du sol naturel LUFA 2.2, comparés aux données obtenues avec les organismes terrestres composant la batterie d'essai (*C. elegans*, *E. fetida*, *A. sativa* et *B. rapa*).

En ce qui concerne la boue digérée et séchée ainsi que la boue pelletée, la toxicité évaluée avec l'acarien prédateur *H. aculeifer* suit les mêmes tendances que pour les vers de terre et les végétaux supérieurs. Pour ces MF, la sensibilité du paramètre de reproduction de l'acarien prédateur est équivalente à celles des vers de terre et des végétaux. Par contre, la boue digérée a entraîné des effets dose-dépendants « positifs » (*i.e.* effets d'hormèse) sur la reproduction de *H. aculeifer*, ce qui fut également le cas pour la reproduction du nématode *C. elegans*. Pour cette MF, la réponse de l'acarien prédateur a donc été en contradiction avec les réponses des vers de terre et des végétaux (*e.g.* effets toxiques à partir de 5X la dose d'épandage recommandée). Le compost de boue n'a eu que peu d'effet sur la reproduction de l'acarien prédateur, avec un maximum de 22,7 % d'inhibition, alors que cette MF a eu des effets toxiques plus importants sur les trois autres organismes utilisés (*i.e.* jusque 100 % d'inhibition pour les paramètres évalués avec *E. fetida*).

A la lumière de ces résultats, la possibilité d'intégrer l'acarien prédateur aux batteries de bio-essais terrestre pour l'évaluation écotoxicologique des MF n'est pas encore évidente. En effet, deux des MF évaluées ont eu des effets toxiques sur cet invertébré, de façon similaire aux organismes les plus sensibles. En revanche, les deux autres MF n'ont eu que peu voire aucun effet toxique sur *H. aculeifer* aux doses évaluées, contrairement aux autres organismes. L'acarien prédateur pourrait par conséquent être potentiellement discriminant par rapport aux plantes et aux vers de terre. Il serait cependant nécessaire de conduire davantage d'expérimentations sur les MF, afin de juger de l'acceptabilité d'intégrer l'acarien prédateur à la batterie de bio-essais.

DISCUSSION

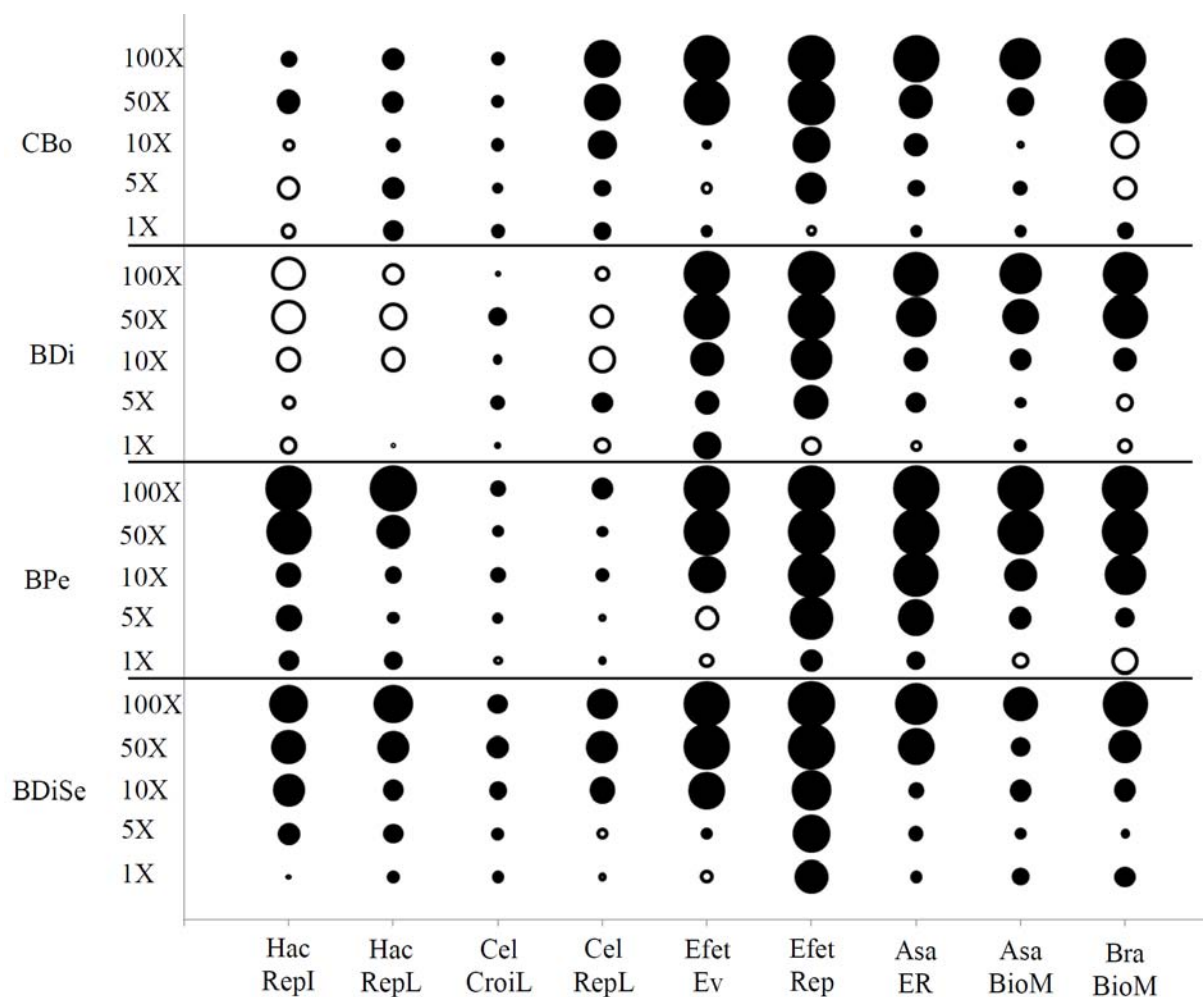


Figure 40 : Comparatif de la toxicité de la seconde série de MF pour les organismes terrestres
 BDiSe : Boue digérée et séchée ; BPe : Boue pelletée ; BDi : Boue digérée ; CBo : Compost de boue

● : 100 % d'effet ; ○ : 1 % d'effet

Cercles pleins: effet toxique; cercles vides: effet d'hormèse

HacRepI: Reproduction de *H. aculeifer* en utilisant le sol ISO; HacRepL : Reproduction de *H. aculeifer* en utilisant le sol LUFA 2.2 ; CelCroiL : Croissance de *C. elegans* ; CelRepL : Reproduction de *C. elegans* ; EfetEv : Evitement d'*E. fetida* ; EfetRep : Reproduction d'*E. fetida* ; AsaER : Elongation racinaire d'*A. sativa* ; AsaBioM ; Biomasse d'*A. sativa* ; BraBioM : Biomasse de *B. rapa*.

Partie V. CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse avait pour objectif d'apporter des informations nouvelles au sujet de la toxicité des MF, et de renseigner sur la pertinence d'intégrer le nématode *Caenorhabditis elegans* et l'acarien prédateur *Hypoaspis aculeifer* dans une stratégie d'essai à visée réglementaire. Pour commencer, nous nous sommes intéressés à déterminer l'applicabilité des protocoles normatifs existants, relatifs à chaque espèce, pour l'étude des MF. Par la suite, nous avons focalisé nos travaux sur l'étude des effets sur ces organismes de certains polluants recherchés dans le cadre de l'homologation des MF (*i.e.* ETM). Enfin, plusieurs matières représentatives de différentes catégories ont été étudiées. Les essais ont été menés à la fois sur les deux organismes d'étude, mais aussi sur une batterie d'essais terrestres et aquatiques. Les réponses obtenues pour chacun des essais réalisés ont été comparés afin de déterminer une batterie d'essai optimale pouvant être proposée.

Ces travaux se sont déroulés en plusieurs étapes qui avaient pour objectifs de :

(i) S'assurer de l'adéquation des protocoles existants à la problématique des MF. Cela a permis de développer un protocole d'essai adapté pour la réalisation d'essai de mortalité, d'inhibition de la croissance et de la reproduction chez le nématode, appliqué à l'étude des MF. L'appareillage d'extraction ainsi que de récupération des acariens *H. aculeifer* a également été adapté, en tenant compte des préconisations normatives.

(ii) Définir la sensibilité de *C. elegans* et *H. aculeifer* vis-à-vis de différentes substances chimiques. Plus particulièrement, nous avons testé des substances de référence ainsi que des ETM (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn). La toxicité de ces derniers a été déterminée, dans un premier temps, substance par substance. Puis des mélanges d'ETM ont été testés avec *C. elegans* et *H. aculeifer*, en utilisant des concentrations issues de la réglementation.

(iii) Caractériser la toxicité de différentes catégories de MF avec *C. elegans* et *H. aculeifer*.

(iv) D'évaluer l'intérêt d'intégrer le nématode et l'acarien prédateur dans une batterie de bio-essais, dans le but de proposer une stratégie d'essai permettant d'évaluer l'écotoxicité des MF.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail permet de conclure sur les points suivants :

(i) les essais nématodes et acariens sont applicables à la caractérisation de l'écotoxicité des MF, dans les conditions décrites au cours de ce travail ;

(ii) le nématode *C. elegans* est relativement plus sensible aux ETM en comparaison avec l'acarien *H. aculeifer*. D'autre part, les mélanges en ETM à des concentrations représentatives des quantités limites admissibles dans les sols lors de l'épandage de MF n'ont pas entraîné d'effet, quels que soient les organismes et les critères suivis ;

(iii) les taux d'application utilisés pour les MF (*i.e.* de 1X à 100X la dose d'épandage recommandée) ont permis de mettre en évidence la toxicité de certaines MF, par approche directe (*i.e.* mélanges de sol et de MF) avec les deux organismes, ainsi qu'indirecte (*i.e.* éluats des mélanges de sol et de MF) avec le nématode ;

(iv) les essais terrestres chez le ver de terre (*i.e.* évitement et inhibition de la reproduction) et chez les végétaux supérieurs (*i.e.* émergence et croissance) étaient les plus sensibles et les plus pertinents pour la caractérisation *a priori* de l'écotoxicité des MF. D'autre part, les essais sur le nématode ont été faiblement discriminants, et montrent par conséquent un faible intérêt pour la caractérisation des dangers des MF. Enfin, il pourrait être intéressant de conserver l'essai d'inhibition de la reproduction de l'acarien *H. aculeifer*, celui-ci ayant été plus discriminant que l'essai sur nématode. Cependant, les données générées ne permettent pas à ce jour de conclure définitivement quant à son intégration dans la batterie de bio-essais pour la caractérisation de l'écotoxicité des MF.

Ces travaux ouvrent par ailleurs de nombreuses perspectives :

A court terme, il semble indispensable de poursuivre les travaux concernant *H. aculeifer* afin de conclure sur l'intérêt d'intégrer de type d'organisme dans une batterie d'essais pour la caractérisation des dangers des MF.

Dans un contexte normatif, l'optimisation du protocole d'essai en milieu terrestre avec *C. elegans* pourrait également être proposée afin de modifier le protocole d'essai normatif défini pour ce type de substrat. Une condition supplémentaire pourrait éventuellement être définie, en ce qui concerne le rendement d'extraction des nématodes et des acariens juvéniles.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A moyen terme, la réflexion menée sur les mélanges d'ETM à des concentrations représentatives d'apport au sol lors de l'utilisation de MF pourrait être étendue à d'autres éléments toxiques, tels que des composés organiques ou des substances à caractère prioritaire.

D'autre part, l'influence des facteurs confondants, tels que les apports nutritifs liés aux MF (*e.g.* N/P/K, matière organique,...), sur les paramètres biologiques suivis chez le nématode et l'acarien prédateur pourrait être étudiée afin de définir plus précisément la robustesse de ces essais.

Enfin, il serait intéressant de poursuivre ces travaux et de réfléchir sur une stratégie à visée réglementaire qui intégrerait la batterie d'essais identifiée comme potentiellement pertinente pour la caractérisation des dangers des MF.

REFERENCES

Références

- Achazi KR (2002). Invertebrates in risk assessment development of a test battery and of short term biotests for ecological risk assessment of soil. *Journal of Soils and Sediments* 2:174–178
- Altun, ZF and Hall DH (2012). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In WormAtlas. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>
- Alvarenga P, Palma P, Gonçalves AP, et al (2007). Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environment International* 33:505–513.
- Amorim M, Natal-da-Luz T, Sousa J, et al (2011) Boric acid as reference substance: pros, cons and standardization. *Ecotoxicology*. doi: 10.1007/s10646-011-0832-9
- Baize D (2000). Teneurs totales en «métaux lourds» dans les sols français. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA* 39, 39-54.
- Arrêté du 21 décembre 1998 relatif à l'homologation des matières fertilisantes et des supports de culture
- Arrêté du 7 mars 2002 relatif au projet d'amélioration des pratiques agronomiques
- Arrêté du 16 septembre 2005 modifiant l'arrêté du 7 mars 2002 relatif au projet d'amélioration des pratiques agronomiques
- ASTM E2172, 2008. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*.
- Axelsen JA, Holst N, Hamers T, Krogh PH (1997). Simulations of the predator-prey interactions in a two species ecotoxicological test system. *Ecological Modelling* 101:15–25
- Becker L, Scheffczyk A, Förster B, et al (2011) Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. *Journal of Soils and Sediments* 11:238–248.
- Berndt O, Poehling HM, Meyhöfer R (2004) (a). Predation capacity of two predatory laelapid mites on soil-dwelling thrips stages. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 112:107-115.

REFERENCES

- Berndt O, Meyhöfer R, Poehling HM (2004) (b). The edaphic phase in the ontogenesis of *Frankliniella occidentalis* and comparison of *Hypoaspis miles* and *Hypoaspis aculeifer* as predators of soil-dwelling thrips stages. *Biological Control* 30:17-24.
- Bezhlebova J, Cernohlavkova J, Kobeticova K, et al (2007). Effects of short-chain chlorinated paraffins on soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67:206–211.
- Bierkens J, Klein G, Corbisier P, et al (1998). Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* 37:2935–2947.
- Boyd WA, Williams PL (2003) Availability of metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*: Toxicity based on total concentrations in soil and extracted fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:1100–1106.
- Brenner S (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94.
- Byerly, L., Cassada, R.C., Russell, R.L., 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology* 51:23–33.
- Cabrera AR, Donohue KV, Roe RM (2009). Regulation of female reproduction in mites: A unifying model for the Acari. *Journal of Insect Physiology* 55:1079–1090.
- Calabrese EJ and Baldwin LA (2003) HORMESIS: The Dose-Response Revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43:175–197.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.
- Clarke BO and Smith SR (2011). Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* 37:226–247.
- Chaney RL, Ryan JA, O'Connor GA (1996). Organic contaminants in municipal biosolids: risk assessment, quantitative pathways analysis, and current research priorities. *Science of the Total Environment* 185:187–216.
- Code rural et de la Pêche maritime. Partie législative. Livre II, Titre V, Chapitre V : La mise sur le marché des matières fertilisantes et des supports de culture. Section 1 : Dispositions générales. Articles L255-1 à L255-11.

REFERENCES

- Crommentuijn T, Doornekamp A, Van Gestel CAM (1997) Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Applied Soil Ecology* 5:261–271.
- Dean RB and Suess MJ (1985). The risk To health of chemicals in sewage sludge applied to land. *Waste Management and Research* 3:251–278.
- Delgado M, Imperial RM de, Alonso F, et al (2013). Ecotoxicity bioassays on leachates from poultry manure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90:401–404.
- Directive 75/442/CEE du Conseil, du 15 juillet 1975, relative aux déchets
- Directive 86/278/CEE du Conseil du 12 juin 1986 relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisadion des boues d'épuration en agriculture
- Directive 91/676/CEE du Conseil, du 12 décembre 1991, concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles
- Directive 91/692/CEE du Conseil, du 23 décembre 1991, visant à la standardisation et à la rationalisation des rapports relatifs à la mise en œuvre de certaines directives concernant l'environnement
- Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau
- Directive 2006/12/CE du Parlement européen et du Conseil du 5 avril 2006 relative aux déchets (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- Directive 2008/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 19 novembre 2008 relative aux déchets et abrogeant certaines directives (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- Domene X, Alcaniz JM, Andrès P (2008). Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environmental Pollution* 151:549–558.
- Donkin SG and Dusenbery DB (1993). A soil toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* and an effective method of recovery. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 25:145-151.

REFERENCES

- Düring R-A and Gäth S (2002). Utilization of municipal organic wastes in agriculture: where do we stand, where will we go? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165:544–556.
- Edwards CA, Dennis EB, Empson DW (1967). Pesticides and the soil fauna: effects of aldrin and DDT in an arable field. *Annals of Applied Biology* 60:11–22.
- Edwards CA (2004). *Earthworm Ecology*. CRC Press
- Eisentraeger A, Rila J-P, Hund-Rinke K, Roembke J (2004). Proposal of a testing strategy and assessment criteria for the ecotoxicological assessment of soil or soil materials. *Journal of Soils and Sediments* 4:123–128.
- Epstein E (2002). *Land application of sewage sludge and biosolids*. CRC Press
- Eriksson E, Christensen N, Ejbye Schmidt J, Ledin A (2008). Potential priority pollutants in sewage sludge. *Desalination* 226:371–388.
- Ferrari B, Radetski CM, Veber A-M, Ferard J-F (1999). Ecotoxicological assessment of solid wastes: A combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:1195–1202.
- Ferris H, Venette RC, Lau SS (1997) Population energetics of bacterial feeding nematodes: carbon and nitrogen budgets. *Soil Biology and Biochemistry*. 29:1183–1194.
- Freckman DW and Baldwin JG; 1990. Nematoda. In: Dindal DI, editor. *Soil biology guide*. New York John Wiley and Sons.
- Gerson U and Weintraub PG (2007). Mites for the control of pests in protected cultivation. *Pest Management Science* 63:658–676.
- Goldberg S (1997) Reactions of boron with soils. *Plant and Soil* 193:35–48.
- Goussen B, Beaudouin R, Dutilleul M, et al (2015) Energy-based modelling to assess effects of chemicals on *Caenorhabditis elegans*: A case study on uranium. *Chemosphere* 120:507–514.
- Greenslade P and Vaughan G (2003) A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. *Pedobiologia* 47:171–179.
- Grosjean P, Picheral M, Warembourg C, Gorsky G (2004) Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. *ICES Journal of Marine Science* 61:518–525.

REFERENCES

- Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation matières fertilisantes et supports de culture (n°50644#01)
- Harada H, Kurauchi M, Hayashi R, Eki T (2007). Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:378–383.
- Hamers T and Krogh PH (1997). Predator-prey relationships in a two-species toxicity test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37:203–212.
- Heckmann L-H, Ruf A, Nienstedt KM, Krogh PH (2007). Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. *Applied Soil Ecology* 36:130–135.
- Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails : (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press
- Höss S, Bergtold M, Haitzer M, et al (2001) Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Freshwater Biology* 46:1–10.
- Höss S, Jüttner I, Traunspurger W, et al (2002). Enhanced growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in the presence of 4-Nonylphenol. *Environmental Pollution* 120:169–172.
- Höss S, Arndt M, Baumgarte S, et al (2008). Effects of transgenic corn and Cry1Ab protein on the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70:334–340.
- Höss S, Jansch S, Moser T, et al (2009). Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1811–1818.
- Höss S, Ahlf W, Fahnenstich C, et al (2010). Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination - Determination of toxicity thresholds. *Environmental Pollution* 158:2999–3010.
- Hernando MD, Fernández-Alba AR, Tauler R, Barceló D (2005). Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65:358–366.
- ISO 10390 (2005). *Qualité du sol – Détermination du pH*

REFERENCES

- ISO 10872 (2010). Qualité de l'eau – Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans* (nématode)
- ISO 11268-1 (2012). Qualité du sol -- Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre -- Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*
- ISO 11268 – 2 (2012). Qualité du sol -- Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre -- Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*
- ISO 11267 (2012). Qualité du sol -- Inhibition de la reproduction de Collembola (*Folsomia candida*) par des contaminants du sol
- ISO 11269-2 (2012). Qualité du sol – Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 2 : Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.
- ISO 16387 (2012). Qualité du sol -- Effets des contaminants sur les Enchytraeidae (*Enchytraeus sp.*) -- Détermination des effets sur la survie et la reproduction
- Jager T, Alda Álvarez O, Kammenga JE, Kooijman SALM (2005). Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets. *Functional Ecology*. 19:136–144.
- Jonker M, Sweijen R, Kammenga J (2004). Toxicity of simple mixtures to the nematode *Caenorhabditis elegans* in relation to soil sorption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:480–488.
- Kiontke K (2006). Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook*.
- Kim B, Park C-S, Murayama M, Hochella MF (2010). Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science and Technology* 44:7509–7514.
- Kobeticova K, Bezchlebova J, Lana J, et al (2008). Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71:650–660.
- Koehler HH (1992). The use of soil mesofauna for the judgement of chemical impact on ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 40:193–205.
- Krogh PH (1991). Perturbation of the soil microarthropod community with the pesticides benomyl and isofenphos. *Pedobiologia* 35:71–88.

REFERENCES

- Krogh PH and Pedersen MB (1997). Ecological effects assessment of industrial sludge for microarthropods and decomposition in a spruce plantation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36:162–168.
- Krogh PH and Axelsen JA (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the Collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke H, van GestelCAM (Eds): Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester.
- Lapa N, Barbosa R, Lopes MH, et al (2007). Chemical and ecotoxicological characterization of ashes obtained from sewage sludge combustion in a fluidised-bed reactor. *Journal of Hazardous Materials* 147:175–183.
- Laskowski R, Kramarz P, Jepson P (1998). Selection of species for soil ecotoxicity testing. Handbook of soil invertebrate toxicity tests. In: Lokke H, van GestelCAM (Eds): Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester
- Lesna I, Wolfs P, Faraji F, et al (2009). Candidate predators for biological control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology* 48:63–80.
- Lints R and Hall DH (2005). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In WormAtlas. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>
- Lock K and Janssen CR (2001) (a) Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: Taking soil parameters affecting bioavailability into account. *Ecotoxicology* 10:315–322.
- Lock K and Janssen CR (2001) (b) Modeling zinc toxicity for terrestrial invertebrates. *Environnemental Toxicology and Chemistry* 20:1901–1908.
- Lock K and Janssen CR (2001) (c). Test design to assess the influence of soil characteristics on the toxicity of copper and lead to the oligochaete *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicology* 10:137–144.
- Lock K and Janssen CR (2002) (a) Ecotoxicity of nickel to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere* 46:197–200.
- Lock K and Janssen CR (2002) (b) Mixture toxicity of zinc, cadmium, copper, and lead to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52:1–7.
- Lombi E, Donner E, Tavakkoli E, et al (2012). Fate of zinc oxide nanoparticles during anaerobic digestion of wastewater and post-treatment processing of sewage sludge. *Environnemental Science and Technology* 46:9089–9096.

REFERENCES

- Ludwig M, Kratzmann M, Alberti G. (1991) Accumulation of heavy metals in two oribatid mites, in: F. Dusbábek, V. Bukva (Eds.), Modern Acarology, Academia, Prague and SPB Academic Publ., The Hague, pp. 431–437.
- Ludwig M, Kratzmann M, Alberti G (1992) Observations on the proventricular glands (“organes racémiformes”) of the oribatid mite *Chamobates borealis* (Acari, Oribatida): an organ of interest for studies on adaptation of animals to acid soils. *Experimental and Applied Acarology* 15:49–57.
- Malara A and Oleszczuk P (2013). Application of a battery of biotests for the determination of leachate toxicity to bacteria and invertebrates from sewage sludge-amended soil. *Environnemental Science and Pollution Research* 20:3435–3446.
- Manu M (2008). The influence of some abiotical factors on the structural dynamics of the predatory mite populations (Acari: Mesostigmata) from an ecosystem with *Myricaria germanica* from Doftana Valley (Romania). *Travaux du Muséum National d’Histoire Naturelle “Grigore Antipa* 51:463–471.
- Martinez-Finley EJ and Aschner M (2011) Revelations from the Nematode *Caenorhabditis elegans* on the complex interplay of metal toxicological mechanisms. *Journal of Toxicology* 2011. doi: 10.1155/2011/895236
- Mendonça E, Picado A, Paixão SM, et al (2009). Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *Journal of Hazardous Materials* 163:665–670.
- Moreira R, Sousa JP, Canhoto C (2008). Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. *Bioresource Technology* 99:8382–8389.
- Mori T, Morita F, Inokuchi A, et al (2006). Ecotoxicological effect of polycyclic musks on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Science* 52:276–282.
- Mutwakil MHAZ, Steele TJG, Lowe KC, de Pomerai DI (1997) Surfactant stimulation of growth in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Enzyme and Microbial Technology* 20:462–470.
- Nam S-H and An Y-J (2010). Assessing the ecotoxicity of vinyl chloride using green alga *P. subcapitata*, nematode *C. elegans*, and the SOS chromotest in a closed system without headspace. *Science of the Total Environment* 408:3148–3152.

REFERENCES

- Natal-da-Luz T, Tidona S, Jesus B, et al (2009). The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. *Journal of Soils and Sediments* 9:246–260.
- NF EN 14735 (2006). Caractérisation des déchets – Préparation des échantillons de déchets en vue d’essais écotoxicologiques.
- NF ISO 10694 (1995). Qualité du sol – Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire)
- NF EN ISO 17294-2 (2003). Qualité de l’eau – Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) – Partie 2 : Dosage de 62 éléments
- NF ISO 22036 (2008). Qualité du sol – Dosage des éléments traces dans des extraits de sol par spectrométrie d’émission atomique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-AES)
- NF U 42-001 (2014). Engrais – Dénominations et spécifications
- NF U 44-001 (2009). Amendements minéraux basiques – Dénominations et spécifications
- NF U 44-051 (2010). Amendements organiques – Dénominations, spécifications et marquage – Texte compilé de la norme NF U 44-051 d’avril 2006 et de son amendement A1
- NF U 44-095 (2008). Amendements organiques – Composts contenant des matières d’intérêt agronomique, issues du retraitement des eaux
- NF U 44-203 (2012). Matières fertilisantes ayant des caractéristiques mixtes – Amendements minéraux basiques – Engrais – Dénominations et spécifications
- NF X 31-107 (2003). Qualité du sol – Détermination de la distribution granulométrique des particules de sol – Méthode à la pipette
- NF X 31-130 (1999). Qualité des sols – Méthodes chimiques – Détermination de la capacité d’échange cationique (CEC) et des cations extractibles
- NF X 31-147 (1996). Qualité des sols – Sols, sédiments – Mise en solution totale par attaque acide.
- Organisation de Coopération et de Développement Economique Guide 54 (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data : a guidance to application
- Organisation de Coopération et de Développement Economique Test 226 (2008). Essai de reproduction d’un acarien prédateur (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) dans le sol

REFERENCES

- Pablos MV, Fernández C, del Mar Babín M, et al (2009). Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1594–1600.
- Pandard P, Devillers J, Charissou A-M, et al (2006). Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment* 363:114–125.
- Pandard P and Römbke J (2013). Proposal for a “Harmonized” strategy for the assessment of the HP 14 property. *Integrated Environment Assessment and Management* 9:665–672.
- Peredney C (2004) Nematode bioassay protocol for soil toxicity screening. Department of Ecology. Washington State
- Peredney C and Williams P (2000). Comparison of the toxicological effects of nitrate versus chloride metallic salts on *Caenorhabditis elegans* in soil. *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Recent Achievements in Environmental Fate and Transport*. ASTM, West Conshohocken, PA.
- Princz JJ, Behan-Pelletier VM, Scroggins RP, Siciliano SD (2010) Oribatid mites in soil toxicity testing—the use of *Oppia nitens* (C.L. Koch) as a new test species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:971–979.
- Popham JD and Webster JM (1979). Cadmium toxicity in the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environnemental Research* 20:183-191.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rahman T, Broughton S, Spafford H (2011). Effect of spinosad and predatory mites on control of *Frankliniella occidentalis* in three strawberry cultivars. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 138:154–161.
- Ree HI and Lee IY (1997). Development of mass rearing technique of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) found in house dust. *The Korean Journal of Parasitology* 35:149–154.
- Règlement (CE) n° 807/2003 du Conseil, du 14 avril 2003, portant adaptation à la décision 1999/468/CE des dispositions relatives aux comités assistant la Commission

REFERENCES

- dans l'exercice de ses compétences d'exécution prévues dans des actes du Conseil adoptés selon la procédure de consultation (unanimité)
- Règlement (CE) n° 2003/2003 du Parlement européen et du Conseil du 13 octobre 2003 relatif aux engrais (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- Règlement (CE) n° 219/2009 du Parlement européen et du Conseil du 11 mars 2009 portant adaptation à la décision 1999/468/CE du Conseil de certains actes soumis à la procédure visée à l'article 251 du traité, en ce qui concerne la procédure de réglementation avec contrôle — Adaptation à la procédure de réglementation avec contrôle — deuxième partie
- Règlement (UE) n° 286/2011 de la Commission du 10 mars 2011 modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique et scientifique, le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE
- Richer de Forges AC, Feller C, Jamagne M, Arrouays D (2008). Perdus dans le triangle des textures. *Étude et Gestion des sols* 15: 97-111
- Roh J-Y and Choi J (2008) Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 483–489.
- Roh J-Y, Park Y-K, Park K, Choi J (2010). Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29:167–172.
- Sardar MA and Murphy PW (1987). Feeding tests of grassland soil-inhabiting gamasine predators. *Acarologia*, 28:117-121.
- Seniczak A, Seniczak S (2002) The effect of cadmium on *Archegozetes longisetosus* (Acari, Oribatida) in laboratory conditions. *European Journal of Soil Biology* 38:315–317.

REFERENCES

- Sese BT, Grant A, Reid BJ (2009). Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans* - Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues. Journal of Toxicology and Environmental Health 72:1168–1180.
- Sheals JG (1956). Soil population studies. I.-The effects of cultivation and treatment with insecticides. Bulletin of Entomological Research 47: 803-822.
- Smit CE, Moser T, Römbke J (2012). A new OECD test guideline for the predatory soil mite *Hypoaspis aculeifer*: Results of an international ring test. Ecotoxicology and Environmental Safety 82:56–62.
- Sochova I, Hofman J, Holoubek I (2006). Using nematodes in soil ecotoxicology. Environment International 32:374–383.
- Sochova I, Hofman J, Holoubek I (2007). Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Environment International 33:798–804.
- Sohlenius B (1980). Abundance, biomass and contribution to energy flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. Journal of Nematology 11:86-196.
- Spurgeon DJ, Hopkin SP, Jones DT (1994) Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. Environmental Pollution 84:123–130.
- Stiernstroem S, Hemstroem K, Wik O, et al (2009). Methodology for classification of the H14 criterion according to the directive 2008/98/EC on waste. Proposal of a biotest battery for the classification of hazardous waste. Ecotoxicological testing with bacterium, algae, crustacean and fish embryo.
- Sulston J and Hodgkin J (1988). The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tigini V, Giansanti P, Mangiavillano A, et al (2011). Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. Ecotoxicology and Environmental Safety 74:866–873.
- Traunspurger W, Haitzer M, Höss S, et al (1997). Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda)—a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. Environmental Toxicology and Chemistry 16:245–250.

REFERENCES

- Traunspurger W (2002). Nematoda. In Rundle, SD, Robertson, A, Schmid-Araya, J, editors. Freshwater meiofauna: Biology and Ecology. Leiden: Blackhuys.
- Tuikka AI, Schmitt C, Höss S, et al (2011). Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:123–131.
- Usher MB (1985). Population and community dynamics in the soil ecosystem, Special publication of the British Ecological Society 4:243-265.
- Van Gestel CAM, van der Waarde JJ, Derksen JGM, et al (2001). The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1438–1449.
- Van Gestel CAM (2008) Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment* 406:385–395.
- van Kessel WHM, Brocades Zaalberg RW, Seinen W (1989). Testing environmental pollutants on soil organisms: A simple assay to investigate the toxicity of environmental pollutants on soil organisms, using CdCl₂ and nematodes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 18:181-190.
- Vänninen I and Koskula H (2004). Biocontrol of the shore fly *Scatella tenuicosta* with *Hypoaspis miles* and *H. aculeifer* in peat pots. *BioControl* 49:137–152.
- Venette R.C. and Ferris H (1998) Influence of bacterial type and density on population growth of bacterial-feeding nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* 30:949–960.
- Wang H, Wick RL, Xing B (2009). Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* 157:1171–1177.
- Wilke B-M, Riepert F, Koch C, Köhne T (2008). Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70:283–293.
- Williams PL and Dusenbery DB (1988). Using the nematode *Caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicology and Industrial Health* 4:469-478.
- Williams PL and Dusenbery DB (1990). Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9:1285–1290.

REFERENCES

- XP CEN ISO/TS 21268-2 (2009). Qualité du sol – Modes opératoires de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux du sol – Partie 2 : essai en bâchée avec un rapport liquide/solide de 10l/kg de matière sèche
- Xing X, Rui Q, Wang D (2009). Lethality toxicities induced by metal exposure during development in nematode *Caenorhabditis elegans*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 83:530–536.
- Yeats GW (1981). Nematode populations in relation to soil environmental factors: A review. Pedobiologia 22:312-338.
- Zhang ZQ (2003). Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control. CAB International, Wallingford, UK.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1: pH, oxygène dissous et conductivité des éluats des mélanges de sol artificiel et de MF

MF	Taux d'application	pH	O ₂ (mg/L)	Conductivité (μS/cm)
Fumier	1X	7	8,2	142,5
	5X	7	8,6	164,8
	10X	7,1	8,8	196,2
	50X	7,2	7	432
	100X	7,3	5,7	730
Cendres	1X	7,2	8,5	178,2
	5X	7,4	9,3	169,5
	10X	7,7	8,7	204
	50X	10,8	9,2	600
	100X	11,3	8,7	1466
Boue de désencrage	1X	7,2	9,9	165,3
	5X	7,2	9,1	181
	10X	7,3	9,8	188,7
	50X	7,3	9,1	207
	100X	7,4	9,7	237
Compost de déchets	1X	6,9	8,8	147,5
	5X	7	9,1	202
	10X	7,1	8,6	239
	50X	6,9	6,8	818
	100X	7,5	6,1	964
Compost de boue	1X	7,3	9	134
	5X	7,3	9	293
	10X	7,3	8	433
	50X	7,5	8	1356
	100X	7,6	7,6	2280
Boue digérée et séchée	1X	7	8,7	114
	5X	7,1	8,6	164
	10X	7,2	8,3	201
	50X	7,3	8,1	322
	100X	7,3	5,2	549
Boue digérée	1X	6,7	8,4	106,5
	5X	6,9	8,4	141,9
	10X	7,1	8,3	178,5
	50X	7,4	8,2	335
	100X	7,3	5,7	605
Boue chaulée	1X	6,7	9,5	154,4
	5X	6,9	9	236
	10X	7,2	9,3	297
	50X	7,4	7,6	1035
	100X	7,5	8,3	1499
Boue pelletée	1X	7,7	9,5	192,4
	5X	7,5	7,6	271
	10X	7,2	1,7	312
	50X	7,6	0,5	1031
	100X	7,9	0,5	1577

ANNEXES

ANNEXE 2 : Présentation des suivis de la réponse des organismes modèles en condition témoin

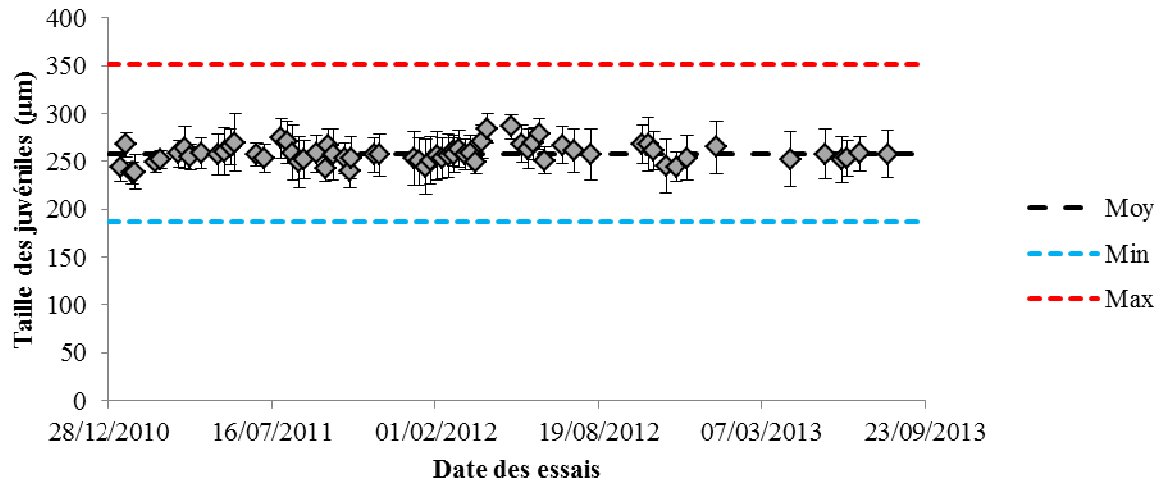


Figure 1 : Suivi de la taille des juvéniles *C. elegans* à l'introduction

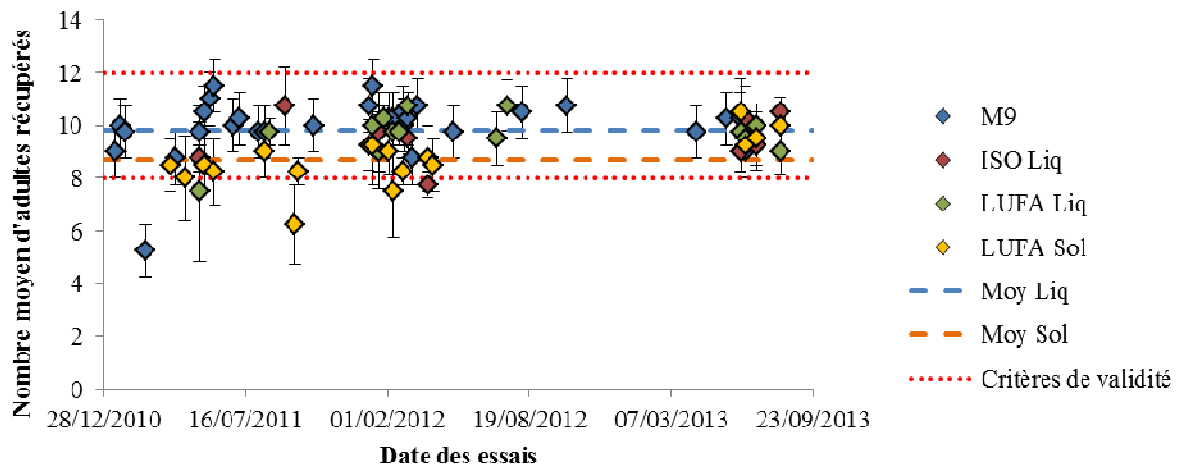


Figure 2 : Suivi de la récupération des nématodes adultes en fin d'essai

ANNEXES

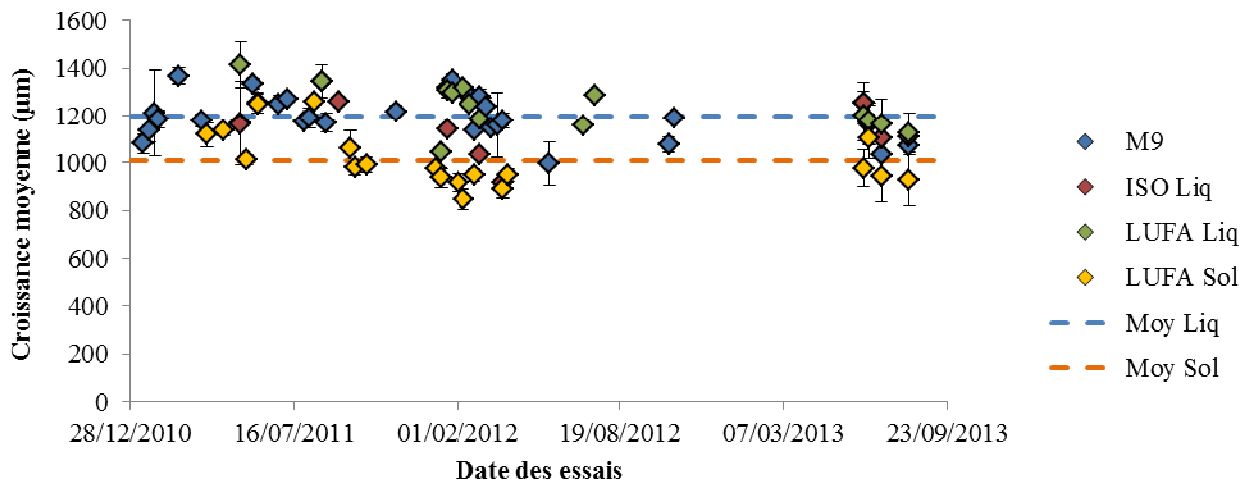


Figure 3 : Suivi de la croissance moyenne des nématodes adultes en fin d'essai

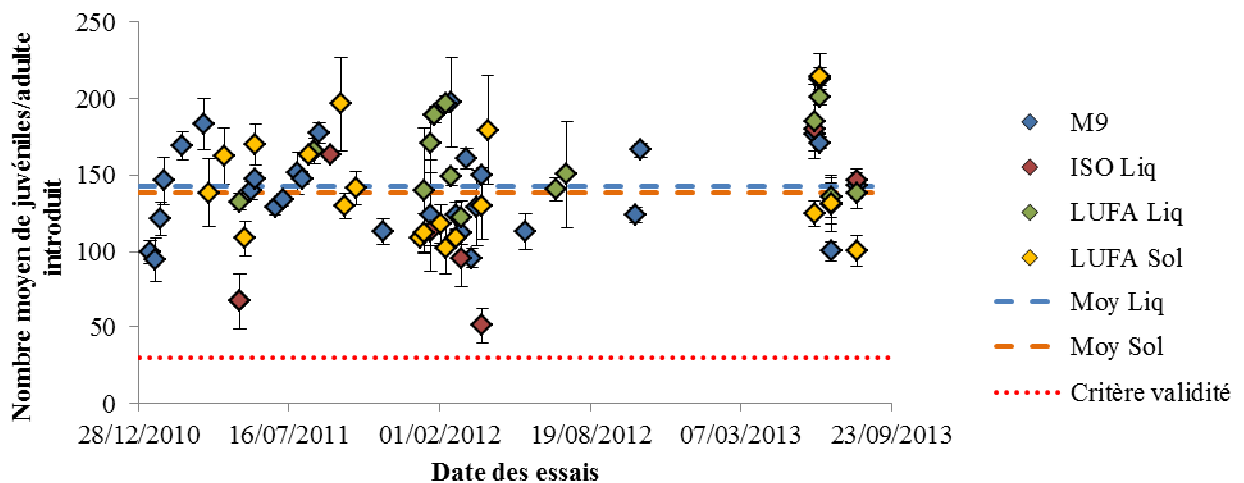


Figure 4 : Suivi du nombre moyen de nématodes juvéniles par adulte introduit en fin d'essai.

D'une manière générale, tous les essais ont satisfaits les critères de validité de reproduction, de fertilité (100 % pour tous les essais, données non présentées) et de présence de mâles (maximum 5 %, données non présentées). Seuls quelques essais n'ont pas satisfaits le critère de validité en ce qui concerne la récupération des adultes.

ANNEXES

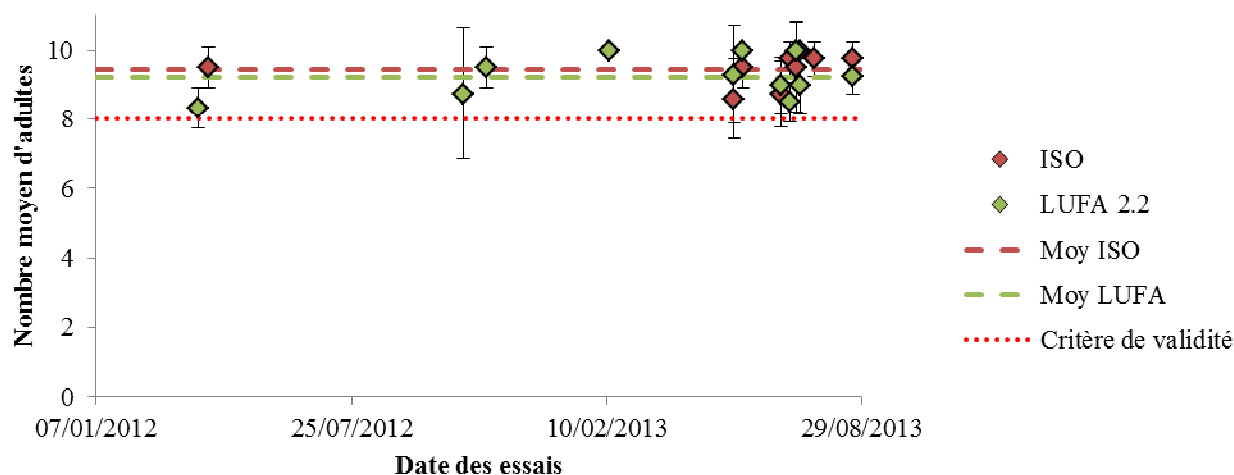


Figure 5 : Suivi de la récupération des acariens adultes en fin d'essai

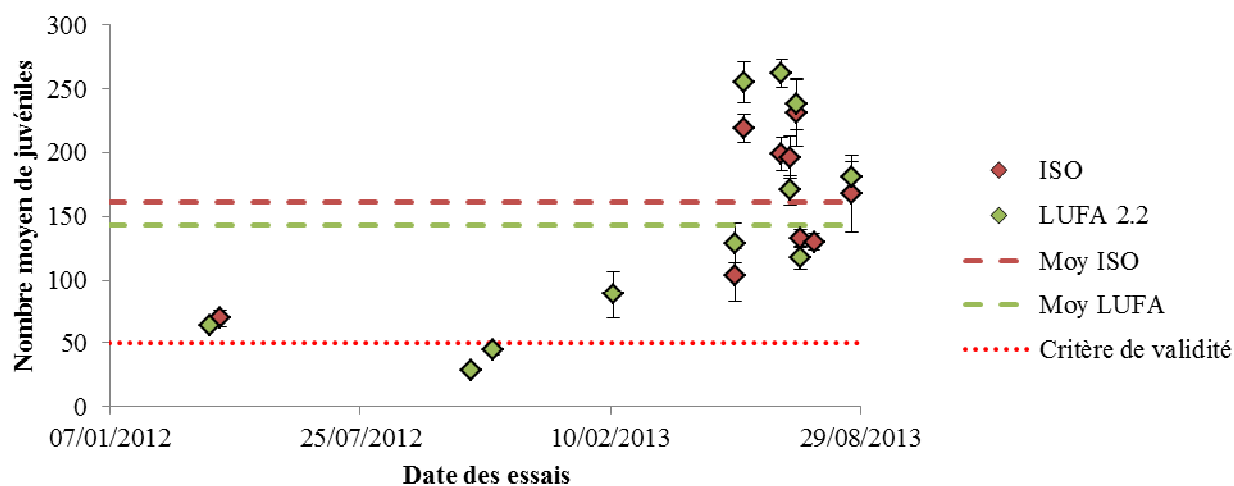


Figure 6 : Suivi du nombre moyen de juvéniles *H. aculeifer* en fin d'essai.

D'une manière générale, tous les essais ont satisfaits les critères de validité concernant la récupération des adultes. Seuls quelques essais n'ont pas satisfaits le critère de validité de reproduction.

ANNEXES

ANNEXE 3 : Dosage des ETM lors des différentes expérimentations

Tableau 1 : Résumé des concentrations en ions métalliques nominales ([C] nom) et mesurées ([C] mes) lors des essais terrestres avec *C. elegans* (sol LUFA 2.2), exprimées en mg/kg (équivalent sec).

Cd ²⁺		Cu ²⁺		Ni ²⁺		Pb ²⁺		Zn ²⁺	
[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes
46	33	59	54,7	24	28,8	103	67,6	63	55,6
82	61	88	82,2	36	45,1	154,2	104	95	105
148	108	131	124	54	61,7	231,7	144	143	136
266	193	197	152	81	81,1	347,2	206	214	226
480	422	296	228	122	121	521,5	316	321	290

Tableau 2 : Résumé des concentrations en ions métalliques nominales ([C] nom) et mesurées ([C] mes) lors de la seconde série d'essais avec *H. aculeifer* (sol artificiel ISO), exprimées en mg/kg (équivalent sec).

Cd ²⁺		Cu ²⁺		Ni ²⁺		Pb ²⁺		Zn ²⁺	
[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes
		125	129	125	140			125	113
		250	263	250	254			250	188
		500	528	500	445			500	441
1000	953	1000	916	1000	992	1000	715	1000	900
2000	1839	2000	1840	2000	1870	2000	1780	2000	1910

ANNEXES

Tableau 3 : Résumé des concentrations en ions métalliques nominales ([C] nom) et mesurées ([C] mes) lors des essais sur les mélanges de métaux avec *H. aculeifer* (sol LUFA 2.2), exprimées en mg/kg (équivalent sec).

Substance	Matière brute (M)		Flux annuel (dilution M/1000)		Flux sur 10ans (dilution M/300)		Epannage de 30T/ha (dilution M/100)		Epannage de 300T/ha (dilution M/10)	
	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes	[C] nom	[C] mes
Cd ²⁺	20	19,8	0,015	0,15	0,05	0,17	0,2	0,3	2	2,3
Cu ²⁺	1000	1050	1	15,3	3,3	8,2	10	6,68	100	115
Ni ²⁺	300	328	0,3	12,6	1	10	3	9,9	30	46,4
Pb ²⁺	750	337	0,9	22,5	3	21,6	7,5	25,2	75	41,8
Zn ²⁺	2500	2630	2	31,3	10	35,2	25	30,8	250	326

Résumé :

Les matières fertilisantes (MF) peuvent présenter un danger pour les écosystèmes lors de leur épandage, de par la présence potentielle de contaminants. Le processus d'homologation de ces matrices implique de démontrer leur innocuité vis-à-vis de l'environnement, mais il n'existe aucune stratégie d'essai écotoxicologique à ce jour.

Dans ce contexte, les essais utilisant le nématode *C. elegans* ainsi que l'acarien prédateur *H. aculeifer* ont été proposés au sein d'une batterie de bio-essais, en tant qu'organismes modèles novateurs dans l'évaluation des MF.

Les résultats obtenus avec *C. elegans* et *H. aculeifer* par approche directe ainsi qu'indirecte ont été comparés et discutés par rapport à ceux obtenus pour d'autres organismes terrestres (plantes et vers de terre) ainsi qu'aquatiques (bactéries, algues, rotifers et crustacés) afin de proposer, *in fine*, une stratégie de bio-essais pertinente pour évaluer les dangers pour l'environnement de l'utilisation agricole des MF.

Abstract :

Fertilizing matters (FM) can be hazardous to the environment during application, due to the potential presence of contaminants. The approval process involves demonstrating the safety of these matrices towards the environment, but there is no ecotoxicological test strategy to date.

In this context, tests using the nematode *C. elegans* and the predatory mite *H. aculeifer* have been proposed in a battery of bioassays, as new model organisms for the ecotoxicological assessment of FM.

The results obtained with *C. elegans* and *H. aculeifer* by direct and indirect approaches were compared and discussed in relation to those obtained for other terrestrial (plants and earthworms) and aquatic organisms (bacteria, algae, rotifers and crustaceans) in order to provide, *in fine*, a relevant test strategy to assess the environmental hazards of the agricultural use of FM.