

## RAPPORT DE FIN D'ETUDE

METHODE D'ESSAI POUR EVALUER LA BIODISPONIBILITE EN FONCTION DE LA  
RELATION MICROPOLLUANT/SOL : CAS DES METAUX LOURDS. PHASE II

par

Marcel B. BOUCHE et Abdul M. ABDUL RIDA

Laboratoire de zoécologie du sol INRA/CNRS, CEFE, BP 5051,  
F-34033 MONTPELLIER Cedex 1

Subvention Environnement n° 92029 (Réf. CNRS CDP 520015)

## I. Objectifs de la recherche

La deuxième phase de ce programme de recherche fait suite à une importante étude décrivant les relations sols/lombriciens/métaux lourds dans les équilibres dynamiques d'écosystèmes réels (Abdul Rida, 1992). Ce travail a été conduit vis-à-vis de cinq éléments tous considérés comme potentiellement toxiques (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) et a montré l'importance qu'il fallait attacher à l'observation de ces métaux dans les organismes - et non pas à une référence analytique rapportée au sol pour la simple raison que la toxicité concerne les êtres vivants et non pas l'abios. Il a également montré que les analyses de sols avec extraction partielle (= "biodisponible", "assimilable", etc.) avaient un pouvoir prédictif global encore plus faible que les analyses totales vis-à-vis des concentrations observées dans le seul organisme de référence dont pratiquement 1°) l'échantillonnage est aisément possible, 2°) l'omniprésence permet la comparaison des sols et 3°) la situation écosystémique est centrale notamment du fait que les lombriciens ingèrent du sol "minéral" et du sol "organique" (vivants : microorganismes, racines et morts : issus surtout de plantes) et ainsi "échantillonnent" l'essentiel des écosystèmes où ils agissent.

Cette étude, conduite sur 186 sites, a en outre mis en évidence :

1°) l'éradication d'un genre entier de lombriciens lorsque celui-ci était en présence de concentration élevée (analyse totale) de Pb et Cu ;

2°) les concentrations souvent plus élevées de Cu, Zn et surtout le Cd dans les lombriciens que dans le sol (en fait ces concentrations ne sont pas comparables). Ces concentrations biologiques atteignent des valeurs usuellement 10, 100 et parfois plus de 1000 fois supérieures à ce qui serait accepté dans l'hygiène alimentaire publique... Rappelons que les lombriciens sont dans nos milieux, la principale source de protéines animales exploitées par environ 200 mammifères et oiseaux, dont les gibiers ;

3°) il y a globalement une corrélation entre concentration totale de métaux dans les sols et celle des lombriciens. Toutefois, en aucun cas la concentration du sol ne peut "prédire" la concentration dans le compartiment biologique tant chaque situation pédologique est particulière. Ceci souligne que les risques biologiques dépendent de la biodisponibilité effective et n'est pas mesurable par des extractions totales et encore moins par des extractions partielles (dites souvent de façon abusive de "biodisponibilité").

La phase II s'est donc efforcée de mettre en place un protocole d'étude de laboratoire sur modèles reproductibles susceptibles de permettre de comprendre les mécanismes de mise en biodisponibilité effective des métaux (et d'une façon plus générale

des toxiques), des concentrations totales faibles pouvant entraîner des bioconcentrations élevés et des doses fortes des bioconcentrations faibles.

Un tel outil de recherche implique la mise en oeuvre d'une approche reproductible qui permet de comprendre les mécanismes. Ceci est impossible dans un sol "naturel" car il varie dans le temps et l'espace à toutes échelles et est un descriptible sauf par quelques variables. Il faut élaborer un modèle physique (= microcosme) de laboratoire totalement synthétique à trois compartiments connus et reproductibles :

- 1°) un "sol"
- 2°) un toxique "pur" (métal lourd)
- 3°) un lombricien bien identifié.

Sur ce modèle, il sera possible d'étudier les mécanismes de "biodisponibilité" et ses conséquences toxicologiques.

Un tel dispositif, à trois compartiments, pré-existait : 1°) depuis la mise au point d'un sol entièrement synthétique - l'artisol - (Ferrière *et al*, 1981), 2°) on connaît le degré de pureté chimique des produits mis en jeu et 3°) l'identification de lombriciens de référence est possible sous certaines réserves (absence de biotaxonomie limitant le contrôle).

Ce dispositif était toutefois totalement inadapté pour une raison simple, l'artisol (eau + une silice spéciale + verre) ne contient aucun aliment et les études ne peuvent être que de très courtes durées (toxicologie aiguë, par exemple). Un tel milieu est incompatible avec l'étude des mécanismes de biodisponibilité des toxiques qui impliquent une étude en fonction du temps (= études chroniques) et obligent donc à l'élaboration d'une alimentation synthétique. Il existe beaucoup d'aliments organiques naturels consommables par les lombriciens... mais ils ne sont pas reproductibles. Nous avons donc proposé en phase II de faire :

- 1) La mise au point d'une alimentation du dispositif Artisol.
- 2) L'ajout de métaux lourds sous forme initialement hydrosoluble.
- 3) Le test d'effets léthaux et subléthaux (croissance pondérale, date d'apparition des caractères sexuels, dépôts de cocons) sur *Eisenia fetida* (souche *Eisenia andrei*) (10 individus par variante).
- 4) La substitution de la lévilite par un sol étudié dans le protocole de la phase I, contaminé en Cu et Cd et l'étude des effets subléthaux sur *Eisenia andrei*.
- 5) L'étude statistique de l'hétérogénéité des réponses.
- 6) La comparaison des effets observés sur *L. terrestris* (protocole A, phase I) et *Eisenia andrei* (protocole de la phase II).

Ces choix étaient largement justifiés pour leurs différents usages et s'inscrivent en outre comme une extension des protocoles normalisés de l'artisol AFNOR, CEE, ISO.

## II. Développement des Recherches

Nous nous sommes très vite heurtés pour réaliser le point 1) ci-dessus à deux difficultés qui avaient été sous-estimées pour l'une et était passée inaperçue pour l'autre.

- A) Il "suffisait" de mettre au point un aliment artificiel, ce qui s'est avéré très délicat.
- B) L'aliment dans un sol réagit avec le produit chimique... et n'est plus lui-même face aux lombriciens. C'est un ménage à trois et l'étude de la biodisponibilité d'un composé chimique... dépend ainsi du "sol avec aliment".

Nous allons reprendre successivement ces deux points.

## 2.1 Mise au point d'un aliment artificiel

On pouvait procéder de deux façons :

1°) produire cet aliment séparément et l'incorporer ou l'apporter à dose journalière au milieu,

2°) introduire des éléments additionnels dans le sol pouvant constituer directement ou indirectement un aliment.

A ce stade, il faut signaler une difficulté entraînant un choix méthodologique. Usuellement les lombriciens transportent avec eux une microflore abondante et diversifiée. On pouvait évidemment - cela a été amorcé notamment par les travaux de Rouelle (non publiés) à Dijon - créer des populations de laboratoires gnotobiotiques, voire axéniques, mais cela supposerait des moyens qui n'existent nulle part. Il faut donc travailler avec des lombriciens véhiculant leur microflore qui est celle du sol. Dès lors nous travaillons en milieu non aseptisé.

### 2.1.1. *L'option : production d'un aliment séparé*

L'apport d'aliment produit indépendamment du sol (ajouter sur celui-ci) a été effectué par Ferrière (1986) avec une algue... Sa production en condition standardisée est possible, mais lourde et additionnelle au modèle. Sa reproductibilité, avec des moyens ordinaires est difficile car elle dépend de l'éclaircissement, variable contrôlable à un coût très élevé. Cet aliment même "standardisé" présente comme les aliments "du commerce-non-standard" le même défaut, il s'agit d'un ajout "non contaminé" au sol. Dès lors le lombricien vit dans un milieu à double entrée, la partie minérale de l'artisol contaminé et l'aliment non contaminé. On peut certes par ajout contaminer l'aliment mais ceci est arbitraire :

a) cet ajout n'est qu'un additif sans lien avec l'aliment,

b) si l'aliment est labile (= taux de renouvellement rapide) le toxique persiste et s'accumule dans le milieu. En clair l'aliment devient  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  et le toxique reste dans le milieu accroissant sa concentration,

c) l'ajout d'une préparation chimique modifie la sapidité des aliments qui sont usuellement délaissés (Bouché et Fayolle, 1980).

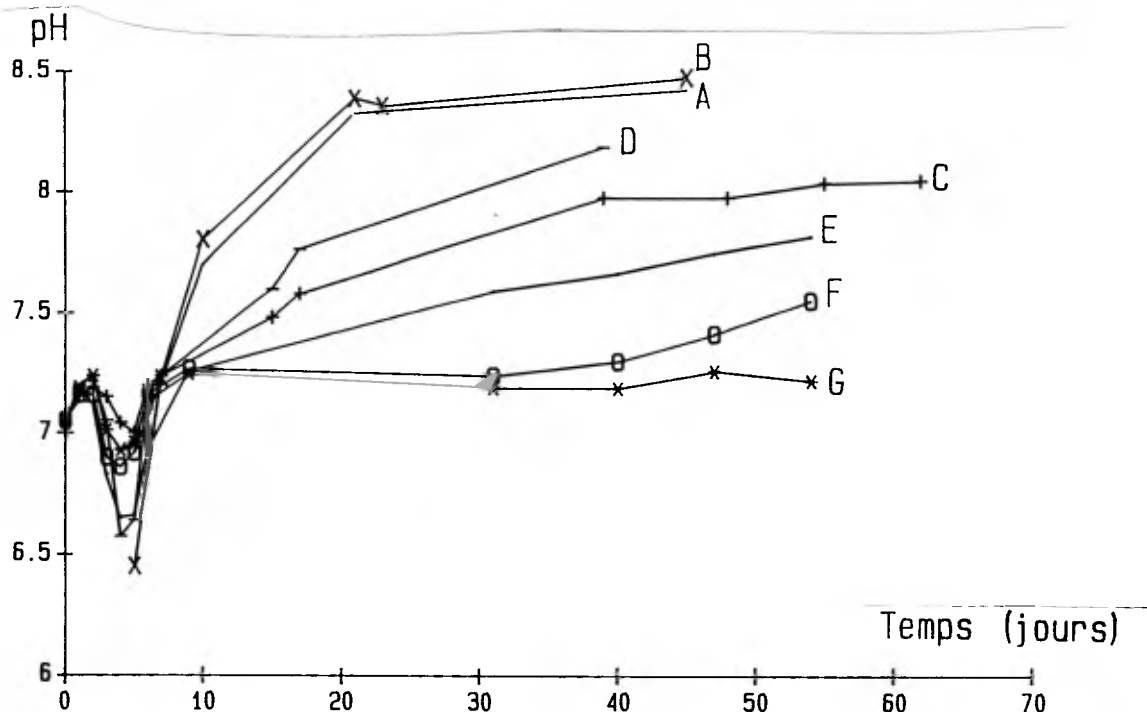
Cette voie, quoique maîtrisée techniquement au laboratoire, n'a donc pas été retenue.

### 2.1.2. *L'option : constitution d'un aliment dans l'artisol*

La création, en même temps que la constitution de l'artisol (eau distillée + verre + silice) d'un complexe nutritionnel (glucose, cellules, azote minéral, ...) permettant de reconstituer une activité microbienne - de toute façon inévitable en milieu non aseptisé - a finalement été adoptée pour fabriquer in situ l'aliment organique des lombriciens. Ceci s'est fait après une longue série de tâtonnements, d'autant plus longue que nous avons fait plusieurs mauvais choix simultanément et que la modification d'une variable - toute chose étant égale par ailleurs - conduisait au même résultat : la mortalité des lombriciens. Dans la période impartie à l'étude, nous n'avons d'ailleurs même pas réussi un véritable élevage quoique à la fin nous maîtrisons mieux les variables "élémentaires" (pH et aération par exemple) et que les animaux survivaient.

Depuis cet acharnement s'est avéré finalement payant : aujourd'hui nous savons créer un milieu totalement synthétique (c'est-à-dire reproductible) et permettant la croissance, le développement et la reproduction des lombriciens. Nous avons, dans ce tâtonnement difficile, finalement retenu le pH comme indicateur "économique" de la dérive des systèmes. Cette dérive est créée à la fois au plan biologique et chimique, notamment

par l'instabilité du système d'oxydo-réduction dont les variations modifient à la fois les possibilités de survie des lombriciens et la spéciation des métaux lourds (fig. 1). Nous venons, avec beaucoup de retard d'acquiescer ce résultat qui, remis dans son contexte, est essentiel. Le manque de recul ne nous a pas permis de comparer les "performances démographiques" de ces populations à celle en milieu naturel. Ceci a été acquis en adoptant notamment une chronologie opérationnelle séparant la phase de constitution du biosynthésol (artisol + aliment = biosynthésol) de celle son usage.



**Figure 1.** Présentation des variations de pH en fonction du temps. Les variantes A B C et D sont sélectionnées pour illustrer l'instabilité des milieux et les variantes E F G montrent la réalisation de microcosme aux caractéristiques convenables (particulièrement F et G) (voir aussi figure 2 et 3)

### 2.1.3. Les étapes de la réalisation du biosynthésol

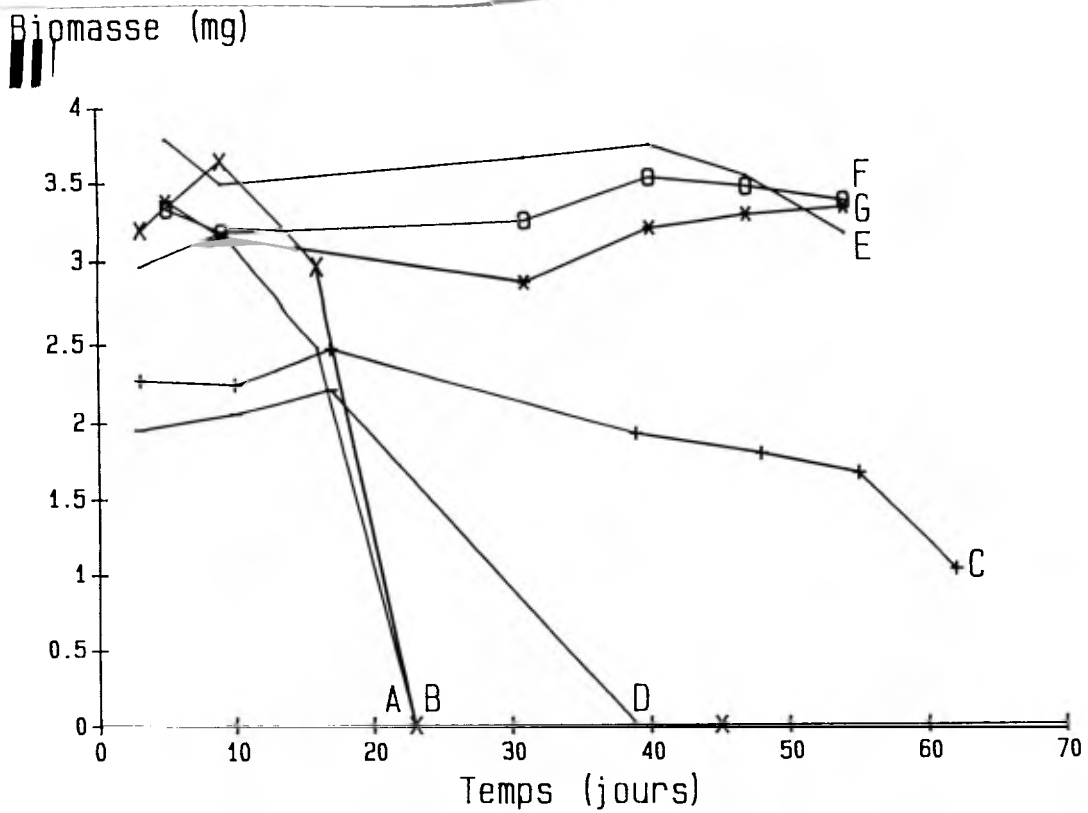
Pour réaliser un sol synthétique permettant le développement biologique - le "biosynthésol" - nous sommes partis du milieu physique ARTISOL, le seul milieu synthétique et donc totalement reproductible convenant aux lombriciens et de solutions classiques de culture des micro-organismes. Finalement nous nous sommes appuyés sur les solutions de Winogradsky (solution mère + solution d'oligo-éléments). A ces milieux, nous ajoutons classiquement une solution de sol pour apporter une microflore totale.

Après de nombreux essais, il s'est avéré que l'apport de solution de sol était inutile, la contamination spontanée étant suffisante cet apport, peu standard, a donc été éliminé.

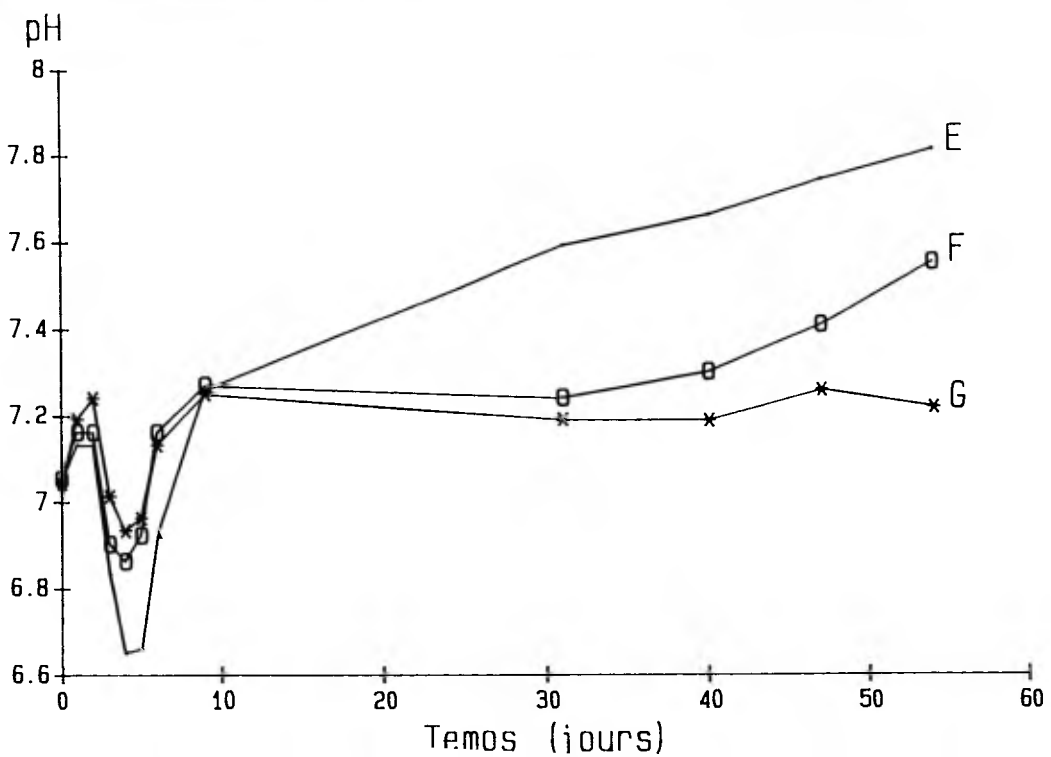
De même il s'est avéré que la solution d'oligo-éléments pouvait être éliminée soit par incorporation de quelques oligo-éléments dans la solution mère, soit par leur élimination pure et simple.

Ces simplifications non seulement allègent le travail mais réduisent les interférences chimiques du système mis en place dans les microcosmes.

L'apport énergétique a longtemps été, dans nos essais initiaux, effectué avec du glucose. Il s'est avéré que ceci créait une microflore très instable ainsi qu'une variation permanente du pH, d'ailleurs incompatible avec la survie des lombriciens (Fig. 1 et 3, essais A à C).



**Figure 2.** Présentation des variations de biomasse en fonction du temps dans la même sélection d'essais que celle présentée en figure 1. Noter que l'annulation des biomasses, établie sur la moyenne de 10 individus, traduit en fait une mortalité liée à la toxicité du milieu en A, B et D. Il n'y a pas de mortalité en C, E, F et G



Nous avons varié les essais en introduisant une source organique azotée (levure de mélasse ou levure de bière) et une source énergétique "retard" : la cellulose.

Finalement nous sommes arrivés à des conditions satisfaisante de pH peu variable ( $\pm 1/10^{\text{e}}$  d'unité pH) (Fig. 2) après le 8<sup>e</sup> jour et nous avons donc retenu de pratiquer les introductions après cette période dans un milieu équilibré permettant le maintien de la masse pondérale des adultes (le poids des adultes ne change généralement pas ou peu (Fig. 3). La période stable est très largement supérieure à celle nécessaire pour observer des perturbations physiologiques et cela d'autant plus qu'il n'est pas possible d'utiliser ces milieux pour l'élevage au delà d'une semaine en raison des interférences avec les produits chimiques comme nous allons le voir paragraphe 2.1.4.

Nous avons pu par ailleurs standardiser les conditions d'environnement (ventilation continue pour évacuer le CO<sub>2</sub> et maintenir ainsi le pH, température 20°C, air saturé d'eau).

## 2.2. Effet du toxique sur le biosynthésol

Beaucoup moins évidente, parce qu'en fait éludée, est apparue la difficulté d'introduire le "toxique" (= molécule étudiée) dans le système. Ou bien nous l'introduisons dès la constitution de l'ensemble sol-aliment et de toute évidence cet élément peut modifier sensiblement la formation biologique de l'aliment dans le sol (cf. ci-dessus "phase de constitution du sol") ou bien, on l'ajoute au moment de tester les animaux (biosynthésol + produit chimique) ; le toxique est alors dans son état initial.

En fait une réflexion approfondie sur la mise en oeuvre de ce type de microcosmes montre qu'ils sont effectivement utilisables par un jeu combinatoire de séries 1°) avec apport initial de toxique dans la formation du biosynthésol et, 2°) celle du système biosynthésol + lombricien + toxique.

Remarquons en outre qu'il est possible assez "facilement" de modifier les conditions de présentation-liaison du toxique au milieu en modifiant les conditions d'oxydo-réduction. Une de nos difficultés a justement été de contrôler l'explosion de la microflore dans la phase de constitution du "biosynthésol" qui varie facilement de 3 unités pH, et donc de niveau d'oxydo-réduction, par des phases toutes aussi instables. Il est possible en jouant sur quelques paramètres (aération, élément constitutif du milieu, notamment glucose) d'obtenir une gamme importante de scénarios "mimant" (c'est un modèle !) des situations se produisant *in situ*. Le biosynthésol se prête donc à une standardisation pour des tests de toxicologie chronique d'une part et d'autre part à des modifications pour approfondir les mécanismes de liaison/biodisponibilité.

En définitive, nous sommes arrivés à constituer un milieu totalement synthétique, non stérilisé :

où 1°) une phase initiale permet à une microflore totale de se développer pour atteindre après une période "explosive" un équilibre avec un pH de l'ordre de 7 (modulable) et contenant une microflore permettant la croissance et le développement des lombriciens,

où 2°) nous avons constaté dans une deuxième phase, que ce milieu permet non seulement la survie, mais la croissance et la reproduction des lombriciens (ces paramètres n'étant pas encore quantifiés) et où l'effet direct du composant chimique pourrait être testé...

où 3°) on pourrait entre les étapes 1 et 2 décrites ci-dessus créer des conditions biophysiques (pH, rH...) permettant d'explorer la compréhension des mécanismes de mise en biodisponibilité ou de séquestration des composés chimiques.

## REFERENCES

- ABDUL RIDA, A.M., 1992 - Biosurveillance de la contamination du sol : apport de l'étude des lombriciens à l'évolution des risques liés aux éléments traces. Doc. pédozool., 1, 4, 1-233.
- BOUCHE, M.B., 1992 - Earthworm species and ecotoxicological studies. In P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach "Ecotoxicology of earthworms", Intercept, Andover, Hants, U.K., 20-35.
- BOUCHE, M.B. et L. FAYOLLE, 1980 - Contamination chimique du chaînon trophique lombricien : problèmes méthodologiques et conséquences. In C.R. 3ème Coll. contam. chaînes biol., Paris, Ed. Min. Environnement, Coll. Rech. Environm., 14, 109-113.
- FERRIERE, G., 1986 - Mouvement naturels des éléments dans une prairie : quantification des échanges d'azote entre lombriciens, sol et plantes. Thèse doct. d'Etat ès-Sciences, Univ. Lyon I, 23/06/86, 1-148 + Ann.
- FERRIERE, G., L. FAYOLLE et M.B. BOUCHE, 1981 - Un nouvel outil, essentiel pour l'écophysiologie et l'écotoxicologie, l'élevage des lombriciens en sol artificiel. Pedobiologia, 22, 3, 196-201.
- GREIG-SMITH, P.N., H. BECKER, P.J. EDWARDS & F. HEIMBACH, 1992 - Ecotoxicology of earthworms. Ed. Intercept, Andover, U.K., 1-269.