



HAL
open science

Impacts de l'épandage agricole de matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sur les organismes terrestres

Olivier Roques

► **To cite this version:**

Olivier Roques. Impacts de l'épandage agricole de matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sur les organismes terrestres. Ingénierie de l'environnement. INSA de Lyon, 2023. Français. NNT : 2023ISAL0003 . tel-04220297

HAL Id: tel-04220297

<https://theses.hal.science/tel-04220297>

Submitted on 27 Sep 2023

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

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



INSA

N° d'ordre NNT : 2023ISAL0003

THÈSE de DOCTORAT de L'INSA LYON, membre de l'Université de Lyon

**École Doctorale N° 206
Chimie, Procédés, Environnement**

Spécialité/discipline de doctorat : Environnement

Soutenue publiquement le 27/01/2023, par :
Olivier Roques

Impacts de l'épandage agricole de matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sur les organismes terrestres

Devant le jury composé de :

Gourdon, Rémy
Garnier, Patricia
Capowiez, Yvan
Pères, Guénola
Lebeau, Thierry
Bayard, Rémy
Bedell, Jean-Philippe
Perceval, Olivier

Professeur/INSA Lyon
Directrice de recherche/INRAE Versailles
Chargé de recherche-HDR/INRAE Avignon
MCF/Institut Agro Rennes-Angers
Professeur/Université de Nantes
MCF-HDR/INSA Lyon
Directeur de recherche/ENTPE
Docteur/OFB

Président
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Invité

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<p><u>CHIMIE DE LYON</u> https://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr</p>	<p>M. Stéphane DANIELE C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69616 Villeurbanne directeur@edchimie-lyon.fr</p>
E.E.A.	<p><u>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u> https://edeea.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Bâtiment Direction INSA Lyon Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr</p>	<p>M. Philippe DELACHARTRE INSA LYON Laboratoire CREATIS Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 philippe.delachartre@insa-lyon.fr</p>
E2M2	<p><u>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</u> http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Bénédicte LANZA Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr</p>	<p>Mme Sandrine CHARLES Université Claude Bernard Lyon 1 UFR Biosciences Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69622 Villeurbanne CEDEX sandrine.charles@univ-lyon1.fr</p>
EDISS	<p><u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</u> http://ediss.universite-lyon.fr Sec. : Bénédicte LANZA Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr</p>	<p>Mme Sylvie RICARD-BLUM Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Raulin - 2ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tél : +33(0)4 72 44 82 32 sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr</p>
INFOMATHS	<p><u>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</u> http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr</p>	<p>M. Hamamache KHEDDOUCI Université Claude Bernard Lyon 1 Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tél : 04.72.44.83.69 hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr</p>
Matériaux	<p><u>MATÉRIAUX DE LYON</u> http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.44 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr</p>	<p>M. Stéphane BENAYOUN Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 avenue Guy de Collongue 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 stephane.benayoun@ec-lyon.fr</p>
MEGA	<p><u>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u> http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Direction INSA Lyon mega@insa-lyon.fr</p>	<p>M. Jocelyn BONJOUR INSA Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr</p>
ScSo	<p><u>ScSo*</u> https://edsciencessociales.universite-lyon.fr Sec. : Mélina FAVETON INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.77.79 melina.faveton@univ-lyon2.fr</p>	<p>M. Bruno MILLY Université Lumière Lyon 2 86 Rue Pasteur 69365 Lyon CEDEX 07 bruno.milly@univ-lyon2.fr</p>

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de ce travail de doctorat et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce mémoire.

Je souhaite avant tout remercier mes deux directeurs de thèse, Jean-Philippe Bedell et Rémy Bayard. Merci à tous les deux pour votre disponibilité, l'encadrement, les conseils et les connaissances scientifiques partagées durant ces trois années de thèse. Je tiens à remercier Jean-Philippe de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ces travaux de recherche et pour la confiance qu'il m'a accordée. Je remercie également Rémy pour sa capacité à recadrer ce travail lorsque c'était nécessaire et sa contribution dans les travaux de rédaction.

Je souhaite remercier tous les membres de mon jury de thèse, en particulier Patricia Garnier et Yvan Capowiez qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également à tous les autres membres du jury, Guénola Pérès, Rémy Gourdon, Olivier Perceval et Thierry Lebeau, d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

J'aimerais également remercier les personnes ayant participé à mon comité de pilotage : Christine Bazin, Jean-Luc Bertrand-Krajewski, Antoine Gosset, Sylvie Néliu, Annette de Vaufleury, et Laure Wiest.

Je remercie tous les partenaires scientifiques du projet de recherche :

- L'ensemble des partenaires du programme RISMEAU pour la bonne ambiance et les échanges que nous avons pu avoir au cours des différentes rencontres. Un merci au Syndicat des Eaux des Rocailles et de Bellecombe et aux éleveurs Patrick Condevaux et Yves Besson pour leur participation au projet. Un merci également au GRAIE et particulièrement à Vivien Lecomte et Élodie Grelot pour leur disponibilité et leur gestion du programme.
- PROVADEMSE : Christine Bazin, Emmanuel Vernus et Olivier Santini pour l'accueil au sein de leur laboratoire et les échanges sur la mise en place des bioessais.
- L'équipe LBE de l'INRAE de Narbonne : Dominique Patureau pour son aide sur les analyses complémentaires faites sur les matrices.
- L'équipe ECOSYS de l'INRAE de Versailles : Sylvie Néliu pour l'aide apportée dans la rédaction et les échanges scientifiques très constructifs et Nathalie Cheviron pour l'apport technique.
- L'équipe ISA : Laure Wiest et Alexandre Guironnet pour les analyses en résidus de médicaments dans les différents échantillons et la mise en place de nouveaux protocoles, sans qui une partie du projet n'aurait pas été possible.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à l'ENTPE et particulièrement l'équipe IAPHY du LEHNA : Alain, Alicia, André-Marie, Anne, Bernard, Brice, Diane, Gersendes, Jean, Nicolas, Thierry, Yohan, Yves. Merci de m'avoir accueilli dans l'équipe et pour vos conseils tout au long de ma thèse. Un remerciement spécial à Laurent Lassabatère pour sa bienveillance, à Julia Le Maux pour son aide dans ce travail et à l'équipe technique : Daniel, Myriam et Thérèse.

Table des matières

Résumé	11
Abstract.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux	17
Liste des abréviations.....	19
Introduction	21
Partie 1. Étude bibliographique	27
Chapitre 1. Les épandages agricoles de matières fertilisantes d'origine résiduaire en France.....	28
1.1 Mafors	28
1.2 Gestion des Mafors.....	28
1.3 Typologie des Mafors épandues	30
1.3.1 Effluents d'élevage	31
1.3.2 Boues de station d'épuration des eaux usées	31
1.3.3 Composts de fractions fermentescibles de déchets ménagers assimilés	33
1.4 Intérêts agronomiques	33
1.5 Risques liés aux épandages agricoles	35
1.5.1 Contaminant biologique.....	35
1.5.2 Contaminant chimique	37
1.6 Réglementation des épandages de Mafors sur les sols.....	38
Chapitre 2. Les polluants présents dans les Mafors.....	42
2.1 Les résidus de médicaments dans les Mafors	42
2.1.1 Définition.....	42
2.1.2 Sources des résidus de médicaments dans les sols	42
2.1.3 Origines des résidus de médicaments dans les Mafors.....	44
2.1.4 Inventaire des résidus de médicaments dans les Mafors.....	45
2.1.4.1 Dans les boues d'épuration	45
2.1.4.2 Dans les effluents d'élevage	46
2.1.5 Présence des résidus de médicaments dans les sols agricoles.....	47
2.2 Les éléments traces métalliques dans les Mafors.....	48
2.2.1 Définition.....	48
2.2.2 Sources anthropiques en ETMs dans les sols	49
2.2.3 Origines des ETMs dans les Mafors	49
2.2.4 Inventaire des ETMs dans les Mafors	51
2.3 Mécanismes d'interaction et de mobilité des polluants dans les sols.....	52
2.3.1 Propriétés des polluants responsables de leur comportement.....	52
2.3.1.1 La solubilité.....	53
2.3.1.2 La complexation.....	53
2.3.1.3 L'adsorption.....	53
2.3.2 Processus influençant la mobilité et le devenir des polluants dans le sol.....	54
2.3.2.1 Rétention des polluants	55
2.3.2.2 Dégradation des polluants	56
2.3.2.3 Mobilité des polluants vers les autres compartiments	56
2.3.2.4 Facteurs environnementaux	57
2.4 Écotoxicité des Mafors sur les organismes vivants	57
2.4.1 Microorganismes.....	58
2.4.2 Plantes.....	58
2.4.3 Macroorganismes.....	60

Chapitre 3. Le ver de terre comme modèle d'étude	62
3.1 Généralités.....	62
3.2 Groupes fonctionnels des vers de terre	65
3.3 Rôles dans les écosystèmes terrestres.....	67
3.4 Interaction avec les polluants.....	69
3.5 Évaluation de l'écotoxicité des Mafors sur les vers de terre.....	71
3.5.1 Essais biologiques sur les vers de terre en laboratoire.....	71
3.5.1.1 Évaluation de l'écotoxicité d'une substance sur les vers de terre.....	72
3.5.1.2 Évaluation de l'écotoxicité d'un mélange sol-Mafors sur les vers de terre.....	76
3.5.2 Biosurveillance sur site	80
Objectifs de la thèse.....	83
Partie 2. Étude expérimentale	85
Chapitre 4. Matériels et Méthodes.....	86
4.1 Historique du territoire d'étude	88
4.2 Prélèvement et conservation des matrices d'essai	89
4.2.1 Sol de référence	89
4.2.2 Sol artificiel ISO.....	90
4.2.3 Choix des Mafors.....	90
4.2.3.1 Boue d'épuration	90
4.2.3.2 Les effluents d'élevage	92
4.2.4 Crottin de cheval biologique.....	94
4.3 Choix des organismes d'essai.....	95
4.3.1 Le ver de terre	95
4.3.2 Les plantes.....	96
4.4 Doses d'épandage expérimentales retenues	97
4.4.1 Doses d'épandage des Mafors appliquées à l'échelle du territoire d'étude	97
4.4.2 Dose d'épandage moyenne calculée à l'échelle nationale	98
4.4.3 Gamme de teneurs testées en Mafors	99
4.5 Méthodes d'analyse des différentes matrices	99
4.5.1 Caractérisations physicochimiques	99
4.5.2 Valeurs agronomiques.....	101
4.5.3 Fractionnement chimique de la matière organique des Mafors et analyse des extraits organiques	102
4.5.4 Concentrations en polluants	105
4.5.4.1 Éléments traces métalliques	105
4.5.4.2 Résidus de médicaments	105
4.5.4.3 Hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	106
4.5.4.4 Composés aromatiques et retardateurs de flammes bromés.....	106
4.6 Tests de toxicité aiguë	111
4.6.1 Les levures : activité œstrogénique et androgénique	111
4.6.2 Sur les microorganismes : activités enzymatiques	112
4.6.3 Sur les plantes : Test de germination et croissance racinaire.....	114
4.6.4 Sur les vers de terre : létalité, croissance et évitement.....	115
4.6.4.1 Test de létalité	116
4.6.4.2 Test d'évitement.....	117
4.7 Tests de toxicité chronique	118
4.7.1 Sur les plantes : émergence et croissance des plantes.....	118
4.7.2 Sur les vers de terre en laboratoire : test de reproduction	120
4.7.2.1 Bioessai préliminaire – Effet de la matière organique	120
4.7.2.2 Bioessais sur les Mafors	123
4.7.3 Sur les vers de terre <i>in situ</i> : test de reproduction	125
4.8 Extractions et analyses des plantes et des vers de terre	127
4.8.1 Dans les plantes.....	127

4.8.2	Dans les vers de terre	128
4.8.2.1	Réserves énergétiques des vers de terre	128
4.8.2.2	Concentration en ETMs	130
4.8.2.3	Concentration en résidus de médicaments	130
4.8.3	Facteur de bioaccumulation (BAF)	130
4.9	Analyses statistiques.....	131
Chapitre 5. Caractérisation physicochimique et écotoxicologique à court terme des trois Mafors étudiées.....		132
5.1	Contexte et enjeux	132
5.2	Article 1 - Assessing the potential ecotoxicological risk of different organic amendments used in agriculture: approach using acute toxicity tests on plants and earthworms.....	133
5.3	Synthèse et conclusion des caractéristiques et des effets d'écotoxicité aiguë des trois Mafors étudiées.....	159
Chapitre 6. Effets à long terme des épandages agricoles sur les organismes terrestres (vers de terre et plantes).....		160
6.1	Étude/Validation du bioessai en laboratoire	160
6.1.1	Contexte et objectifs	160
6.1.2	Résultats et discussion	160
6.1.2.1	Effets de la teneur en matière organique et des conditions d'apport sur la reproduction des vers de terre <i>Eisenia fetida</i>	160
6.1.2.2	Test de l'acide borique sur la reproduction des vers de terre issus de l'élevage « contrôle positif selon la norme »	162
6.1.3	Conclusion	163
6.2	Bioessais en laboratoire – Tests de toxicité chronique	164
6.2.1	Contexte et enjeux	164
6.2.2	Article 2 – Évaluation de l'écotoxicité chronique par des tests sur les vers de terre et les plantes de différents amendements organiques épandus sur les sols agricoles.....	165
6.2.3	Vérification des données écotoxiques obtenues.....	188
6.2.4	Synthèse et conclusion des effets écotoxicologiques des Mafors sur le long terme.....	189
6.3	Bioessais <i>in situ</i> – Impact des Mafors sur la reproduction des vers de terre.....	190
6.3.1	Contexte et objectifs	190
6.3.2	Résultats et discussions.....	191
6.3.3	Conclusion et perspectives.....	192
Chapitre 7. Transfert et bioaccumulation de polluants présents dans les sols amendés en Mafors vers les plantes et les vers de terre.....		193
7.1	Contexte et enjeux	193
7.2	Les résidus de médicaments	194
7.2.1	Concentrations calculées dans les sols amendés en Mafors	194
7.2.2	Concentrations dans les vers de terre	195
7.3	Les éléments traces métalliques	201
7.3.1	Concentrations calculées et mesurées dans les sols amendés en Mafors	201
7.3.2	Concentrations dans les organismes	204
7.3.2.1	Vers de terre.....	204
7.3.2.2	Plantes	209
7.4	Synthèse et conclusion	215
Conclusion générale de la thèse et perspectives		217
Bibliographie		221
ANNEXES.....		247

Résumé

Les matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sont utilisées dans l'agriculture comme amendement organique pour améliorer les propriétés du sol au niveau de sa structure, sa fertilité et son activité biologique. En France, les effluents d'élevage représentent la très grande majorité des Mafors épandues sur les sols agricoles, suivis des boues urbaines et industrielles ainsi que des composts. Toutefois, l'épandage des Mafors peut présenter un risque de contaminations biologiques et chimiques des sols agricoles amendés. Les analyses chimiques de ces Mafors révèlent la présence de diverses familles de contaminants, telles que les résidus de médicaments et les éléments traces métalliques, connues dans la littérature pour être écotoxiques et susceptibles d'inhiber l'activité biologique du sol. La valorisation des Mafors par épandage nécessite donc de maîtriser les risques environnementaux qu'elle génère, et plus particulièrement les risques écotoxiques. Mais l'évaluation de l'impact écotoxique des Mafors dans les sols peut s'avérer complexe en raison de leurs fortes teneurs en matière organique, favorables notamment à l'activité biologique du sol. Cette étude a pour objectif de développer une démarche expérimentale pour évaluer les potentiels d'effets écotoxiques de ces Mafors. Pour cela, une batterie de bioessais en laboratoire a été mise en place pour évaluer l'écotoxicité de trois Mafors : une boue d'épuration urbaine, un fumier et un lisier de vache laitière. En écotoxicologie, les vers de terre sont des bioindicateurs intéressants pour évaluer les effets écotoxiques des sols contaminés. Ainsi, les effets écotoxiques des Mafors sont évalués grâce à des tests de toxicité aiguë et chronique adaptés aux normes préexistantes sur le ver *Eisenia fetida*, et complétés par des mesures d'effets sur les microorganismes et les plantes.

Dans un premier temps, leurs potentiels d'effets écotoxiques sont déterminés sur la base de leurs analyses chimiques et par la réalisation de tests de toxicité aiguë (activité enzymatique, germination, létalité) sur trois organismes terrestres (microorganismes, plantes et ver de terre). Les analyses chimiques révèlent des concentrations élevées en polluants organiques et inorganiques dans la boue d'épuration qui se distingue également des Mafors agricoles par la grande diversité des polluants présents. L'évaluation de leur écotoxicité à court terme montre un effet écotoxique dose-dépendant sur ces organismes, avec un risque écotoxique plus élevé lors des expositions à des sols amendés avec des Mafors agricoles. Mais à des doses d'épandage agronomiques/réalistes ($< 50 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MS}$), les différents tests de toxicité aiguë tendent à affirmer l'absence d'écotoxicité sur les organismes exposés à ces trois Mafors. L'amendement en Mafors à ces doses d'épandage réalistes contribue à favoriser l'activité biologique du sol. Cet effet positif s'explique par l'apport de matières organiques et de nutriments, bénéfiques à la croissance et à l'activité des organismes terrestres. Ces effets bénéfiques masquent les effets écotoxiques à court terme, d'où la nécessité de développer des tests de toxicité chronique sur ces sols amendés.

Dans un second temps, les effets à long terme de l'épandage des Mafors à des doses d'épandage réalistes sont mesurés sur la reproduction des vers de terre et la croissance des plantes. Les résultats obtenus lors des bioessais sur les plantes mettent en évidence une absence d'effet phytotoxique. De plus, la boue d'épuration se distingue des Mafors agricoles par un effet agronomique positif sur la croissance végétale. À l'inverse, un effet reprotoxique de la boue d'épuration et du lisier de vache est observé sur les vers de terre à partir d'une dose d'épandage de $20 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MS}$. L'inhibition de la reproduction des vers de terre atteint

plus de 70 % pour ces deux Mafors contrairement à l'épandage de fumier qui n'a pas eu d'effet écotoxique. De plus, les réserves énergétiques des vers de terre exposés sont perturbées : une diminution des réserves en protéines et glycogènes est détectée dans les sols amendés en boue d'épuration tandis qu'une augmentation des réserves en protéines et en lipides est mesurée dans les sols amendés en lisier de vache. En complément des analyses chimiques et écotoxicologiques, la présence de résidus de médicaments et d'éléments traces métalliques dans les organismes terrestres a été évaluée. Les faibles concentrations observées dans les vers de terre et les problèmes analytiques survenus ne permettent pas de conclure sur une bioaccumulation effective des résidus de médicaments présents dans les Mafors. Les résultats mettent en évidence une absence de bioaccumulation des éléments traces métalliques dans les vers de terre contrairement aux plantes qui accumulent, à une plus grande concentration, le zinc (oligoéléments essentiels à leur croissance) provenant des sols amendés en boue d'épuration.

Ce travail de thèse contribue à l'évaluation du risque associé à l'épandage de Mafors et propose une démarche expérimentale pour étudier leurs effets écotoxiques sur les organismes terrestres. Elle confirme également l'intérêt d'appliquer des tests de toxicité chronique et d'utiliser plusieurs modèles biologiques pour s'assurer de leur innocuité à long terme. Enfin, à travers les différents tests écotoxiques, cette thèse préconise une dose limite d'épandage de 10 g.kg^{-1} MS pour les boues d'épuration et les lisiers et de 50 g.kg^{-1} MS pour les fumiers afin de garantir un effet agronomique bénéfique sans causer d'effet écotoxique sur les organismes terrestres.

Mots-clés : Amendement organique, bioaccumulation, bioessais, écotoxicologie, *Eisenia fetida*, éléments traces métalliques, *Medicago sativa*, microorganismes, plantes, résidus de médicaments, *Sinapis alba*, tests de toxicité aiguë et chronique.

Abstract

Organic wastes are used in agriculture as an organic amendment to improve the properties of the soil in terms of its structure, fertility and biological activity. In France, livestock effluents are considered as the most organic wastes applied to agricultural soils, followed by urban and industrial sludge and compost. However, the application of organic amendments can cause the risk of biological and chemical pollution of the amended agricultural soils. These organic amendments can contain various chemical pollutants such as drug residues and metallic trace elements, which are known in the literature to be ecotoxic and to affect soil biological activity. Enhancement through the application of these organic amendments requires control of the environmental risks associated with this enhancement and, in particular, the ecotoxicological risks. However, the ecotoxicological effects of organic amendments are difficult to measure because of the high content of organic matter that promotes soil biological activity. The current study aimed to develop an experimental approach to evaluate the potential ecotoxicological effects of these organic amendments. For this purpose, a series of laboratory bioassays was performed to evaluate the ecotoxicity of three organic amendments: urban sewage sludge, dairy cow manure, and dairy cow slurry. In ecotoxicology, the earthworm is an effective bioindicator for assessing the ecotoxicological effects of contaminated soils. Therefore, the impact measurements were carried out on the worm *Eisenia fetida*, supplemented with microorganisms and plants, thanks to acute and chronic toxicity tests adapted to the already existing standards for these organisms.

First, the toxicity potential of the three organic amendments is determined by their chemical analysis and acute toxicity tests (enzymatic activity, germination, lethality) on three terrestrial organisms (microorganisms, plants, and earthworm). The chemical analyses reveal a higher content of organic and inorganic pollutants in sewage sludge, which also differs from agricultural organic amendments due to the great diversity of pollutants present. The evaluation of their short-term ecotoxicity shows a dose-dependent effect with a higher ecotoxic risk in bioassays with soils amended with agricultural organic amendments. Nevertheless, the different acute toxicity tests at realistic/agronomic application rates ($< 50 \text{ g.kg}^{-1} \text{ DW}$) tend to confirm the absence of ecotoxicity in organisms exposed to these three organic amendments. Spreading organic amendments at realistic application rates contributes to the improvement of the biological activity of soil organisms. This positive effect is explained by the contribution of organic matter and nutrients useful for the growth of terrestrial organisms. These positive effects mask the short-term ecotoxic effects, so it is necessary to develop chronic toxicity tests for these amended soils.

Second, the long-term effects of applying organic amendments at realistic application rates are measured on earthworm reproduction and plant growth. Plant bioassay results do not indicate any phytotoxic effect. Additionally, sewage sludge differs from agricultural organic amendments in having a positive agronomic effect on plant growth. In contrast, a reproductive toxic effect of sewage sludge and cow slurry was observed on earthworms at an application dose of $20 \text{ g.kg}^{-1} \text{ DW}$. The inhibition of earthworm reproduction reached more

than 70% in these two organic amendments. The energy reserves of the exposed earthworms are disturbed: a decrease in protein and glycogen reserves is observed in the soil amended with sewage sludge, while an increase in protein and lipid reserves is measured in the soil amended with cow slurry. Cow manure application has no toxic effect in chronic toxicity tests. In addition to chemical and ecotoxicological analyses, the presence of drug residues and metallic trace elements in organisms was evaluated. The low concentrations observed in earthworms and the analytical problems encountered in earthworms do not allow effective bioaccumulation of drug residues in organic amendments. The results show that there is no bioaccumulation of metallic trace elements in earthworms, in contrast to plants, which accumulate zinc at higher concentrations from soils amended with sewage sludge.

This thesis contributes to the risk assessment related to the application of organic amendments and proposes an experimental approach to study their ecotoxic effects on terrestrial organisms. It also confirms the interest of using chronic toxicity tests and different biological models to ensure their long-term safety. Finally, based on the various ecotoxicological tests, this work recommends a limit dose of 10 g.kg⁻¹ DW for sewage sludge and slurry cow and 50 g.kg⁻¹ DW for cow manure to ensure a positive agronomic effect without ecotoxic effects on terrestrial organisms.

Keywords: Acute and chronic toxicity tests, bioaccumulation, bioassay, drug residues, ecotoxicology, *Eisenia fetida*, *Medicago sativa*, metallic trace elements, microorganisms, organic amendment, plants, *Sinapis alba*.

Liste des figures

Cette liste ne tient pas compte des figures présentées dans les articles scientifiques.

Figure 1. Description du programme RISMEAU et synergie entre les différents projets le composant.....	23
Figure 2. Typologie des Mafors épandues en France en 2011 (Agreste, 2014).	30
Figure 3. Fonctionnement d'une station de traitement des eaux usées (Aydın et al., 2022). 32	
Figure 4. Représentation des effets de l'épandage d'amendements organiques sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques d'un sol amendé (Scotti et al., 2015).....	33
Figure 5. Sources de contamination dans l'environnement des antibiotiques dans la médecine humaine et à usage vétérinaire (Pico et Andreu, 2007).	43
Figure 6. Processus déterminant la mobilité et le comportement des contaminants au niveau du sol (Lemière et al., 2001 ; Sims et al., 1984).	55
Figure 7. Morphologie externe et interne d'un ver de terre appartenant au sous-ordre des <i>Lumbricina</i> (Benckiser, 1997).	62
Figure 8. Reproduction du ver de terre du genre <i>Spenceriella</i> , famille <i>Megascolecidae</i> (Jamieson and Ferraguti, 2006).....	63
Figure 9. Cycle de vie dans des conditions optimales (température 25 °C et humidité 80 %) d'un ver de terre épigé <i>Eisenia fetida</i> (Dominguez and Edwards, 2010).....	64
Figure 10. Représentation des trois principaux groupes fonctionnels des vers de terre (Lavelle et al., 2000).	65
Figure 11. Photographie de différentes espèces de vers de terre classées dans les trois principaux groupes fonctionnels (Pelosi et al., 2014 ; Bouché, 1972). « a » correspond au groupe fonctionnel épigé, « b » au groupe fonctionnel endogé et « c » au groupe fonctionnel anécique.	66
Figure 12. Effets écotoxicologiques en fonction de la fraction biodisponible en polluant (Fent, 2004).....	73
Figure 13. Schéma général de l'organisation expérimentale de la thèse.....	86
Figure 14. Zone d'étude du projet RISMEAU - Bassin versant de l'Arve situé en Haute-Savoie, France. L'encadré en pointillés noirs représente les zones de prélèvement du sol et des Mafors (Source GEOFLA Département).	88
Figure 15. Site de prélèvement du sol de référence et homogénéisation manuelle dans une cuve en inox (© Roques Olivier).....	90
Figure 16. Serre de séchage (A) et boue d'épuration prélevée et tamisée à 2 mm (B) avant conservation à -20 °C (© Roques Olivier).....	91
Figure 17. Tas du fumier prélevé (A), broyage du fumier dans un broyeur à cisaillement (B) et homogénéisation dans une cuve en inox (C) (© Roques Olivier).	93

Figure 18. Trappe de la fosse à lisier et bras mécanique permettant le mélange du lisier (A) séchages du lisier dans une étuve (B) et différents stades de séchage du lisier (de gauche à droite, la siccité du lisier augmente) (C) (© Roques Olivier).....	94
Figure 19. Ver de terre <i>Eisenia fetida</i> utilisé comme organisme d'essai dans les tests d'écotoxicité (© Roques Olivier)	95
Figure 20. Plantes utilisées dans les bioessais d'écotoxicologie (A. <i>Medicago sativa</i> ; B. <i>Sinapis alba</i> ; C. <i>Cucurbita pepo</i>).....	96
Figure 21. Système d'extraction accélérée par solvants Dionex™ ASE™ 350 automatique des composés organiques à partir d'échantillons solides.	102
Figure 22. Photographie du Phytotoxkit© utilisé lors des tests de germination (© Roques Olivier).	115
Figure 23. Dispositif expérimental utilisé lors des tests de létalité et de reproduction sur les vers de terre <i>Eisenia fetida</i> exposés à des sols amendés en Mafors (© Roques Olivier).....	117
Figure 24. Dispositif expérimental utilisé lors des tests d'évitement sur les vers de terre <i>Eisenia fetida</i> avec un sol artificiel ISO amendé à 1 % en Mafors et T = sol artificiel ISO non amendé (© Roques Olivier).....	118
Figure 25. Dispositif expérimental des bioessais en laboratoire sur l'émergence et la croissance des plantes (© Roques Olivier).....	119
Figure 26. Séchage des parties aériennes et récupération des parties racinaires (© Roques Olivier).	120
Figure 27. Dispositif expérimental recommandé par la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a) et utilisé lors de l'essai préliminaire sur le test de reproduction des vers de terre <i>Eisenia fetida</i> exposés à différentes conditions d'exposition (© Roques Olivier).	121
Figure 28. Gradient inverse appliqué sur le carbone organique (C_{orga}) pour équilibrer toutes les conditions avec la teneur en C_{orga} obtenue à la plus forte concentration en boue d'épuration testée lors du test de reproduction.	124
Figure 29. Dispositif de récupération des juvéniles (© Roques Olivier).....	125
Figure 30. Dispositif expérimental du test <i>in situ</i> de reproduction des vers de terre <i>Eisenia fetida</i> (© Roques Olivier).....	126
Figure 31. Croissance (en %) (α) et reproduction (mesurée en nombre de juvéniles éclos) (β) des vers de terre <i>Eisenia fetida</i> exposés à un sol artificiel ISO et différentes conditions de nutrition.....	161
Figure 32. Croissance (A) et reproduction (mesurée en nombre de juvéniles éclos) (B) des vers de terre <i>Eisenia fetida</i> exposés à différentes Mafors à une teneur de 20 g.kg ⁻¹ MS.....	188

Liste des tableaux

Cette liste ne tient pas compte des tableaux présents dans les articles scientifiques.

Tableau 1. Valeurs limites et flux cumulés en éléments traces métalliques et en composés traces organiques dans les boues d'épuration, déchets et effluents ICPE en France et en Europe (arrêté du 2 février 1998) et du sol recevant l'épandage (arrêté du 3 avril 2000).	40
Tableau 2. Concentrations en ETMs (mg.kg^{-1} MS) mesurées dans 815 échantillons de sols issus du territoire français (Baize, 2000).....	48
Tableau 3. Contribution moyenne des différentes activités urbaines et industrielles en ETMs dans les eaux usées en % du total mesuré dans les effluents urbains (Juste et al., 1995).....	50
Tableau 4. Propriétés physicochimiques des polluants influençant leur comportement dans le sol (Lemièrre et al., 2001).	52
Tableau 5. Test d'écotoxicité en laboratoire des résidus de médicaments sur les vers de terre.....	75
Tableau 6. Évaluation de l'impact de l'amendement de sol par des Mafors à travers des bioessais en laboratoire sur les vers de terre.	78
Tableau 7. Doses d'épandage appliquées aux boues d'épuration issues de la station d'épuration de Bellecombe et aux effluents d'élevage de type lisier/fumier issus des établissements de la région Savoie et Haute-Savoie en fonction du type de culture sur le site du bassin versant de l'Arve.	97
Tableau 8. Estimation de la dose d'épandage moyenne et réaliste appliquée aux boues d'épuration sur le sol agricole (g.kg^{-1} MS) en fonction des paramètres de profondeur de labourage, de la densité du sol et de la dose d'épandage appliquée (t.ha^{-1} MS).....	99
Tableau 9. Récapitulatif des paramètres d'extractions sur l'ASE™ 350.....	103
Tableau 10. Polluants suivis dans cette étude et limite de quantification (LOQ MS) des méthodes d'analyses des ETMs et des POPs dans les Mafors, les sols et les organismes terrestres.....	108
Tableau 11. Résidus de médicaments suivis dans cette étude et limite de détection (LD) et de quantification (LOQ) des méthodes d'analyse dans les Mafors et les sols (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS). .	110
Tableau 12. Conditions d'essais lors du test préliminaire évaluant l'effet de la teneur en carbone organique sur la reproduction des vers de terre <i>Eisenia fetida</i>	122
Tableau 13. Paramètres suivis durant le test de reproduction <i>in situ</i> des vers de terre <i>Eisenia fetida</i> exposés à une teneur de 10 g.kg^{-1} MS de deux Mafors (boue d'épuration et lisier de vache).	191
Tableau 14. Analyse de la bioaccumulation des éléments traces métalliques et des résidus de médicaments en fonction des différents tests réalisés et organismes étudiés.....	193
Tableau 15. Concentrations calculées en résidus de médicaments ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) dans les sols amendés à différentes teneurs en Mafors lors du test de reproduction n° 1 des vers de terre.	195

Tableau 16. Concentrations moyennes en résidus de médicaments ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) dans les vers de terre adultes et juvéniles exposés à différentes teneurs en Mafors lors du test de reproduction n° 1.	196
Tableau 17. Concentrations moyennes calculées et mesurées en ETMs (mg.kg^{-1} MS) dans les sols amendés à différentes teneurs en Mafors lors du test de reproduction n° 1 des vers de terre.....	203
Tableau 18. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg^{-1} MS) dans les vers de terre exposés à différentes teneurs en Mafors pendant 28 jours lors du test de reproduction n° 1 et facteur de bioaccumulation.....	206
Tableau 19. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg^{-1} MS) dans les parties aériennes et racinaires de la luzerne cultivée <i>Medicago sativa</i> exposée pendant 28 jours lors du test d'émergence et de croissance des plantes à différentes teneurs en Mafors.....	210
Tableau 20. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg^{-1} MS) dans les parties aériennes de la moutarde <i>Sinapis alba</i> exposée pendant 21 jours lors du test d'émergence et de croissance des plantes à différentes teneurs en Mafors.	211

Liste des abréviations

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

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

ASE : Extraction accélérée par solvant

FBA : Facteur de bioaccumulation

CTO : Composés traces organiques

CRE : Capacité de rétention en eau

DCO : Demande chimique en oxygène

DEEP : Déchets, Eaux, Environnements, Pollutions (Laboratoire)

ECOSYS : Écologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes (Laboratoire)

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

ENTPE : Ecole Nationale des Travaux Publics de l'État

ETMs : Éléments traces métalliques

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique

IAPHY : Impact des aménagements et des polluants sur les hydrosystèmes (Laboratoire)

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agronomie, l'Alimentation et l'Environnement

INSA : Institut National des Sciences Appliquées

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

LEHNA : Laboratoire d'écologie des hydrosystèmes naturels et anthropisés

Mafors : Matières fertilisantes d'origines résiduares

MB : Matière brute

MS : Matière sèche

NEOM : Matière organique non extraite

OFB : Office Français de la Biodiversité

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

PCBs : Polychlorobiphényles

PEOM : Matière organique particulaire peu extractible

POPs : Polluants organiques persistants

REOM : Matière organique particulaire très facilement extractible

RFBs : Retardateurs de flamme bromés

RISMEAU : Risques liés aux résidus de médicaments, biocides et antibiorésistance d'origines humaine et vétérinaire sur les ressources en eau du bassin versant de l'Arve

SEOM : Matière organique particulaire lentement extractible

SIPIBEL : Site pilote de Bellecombe

SPOM : Matière organique particulaire très facilement extractible

STEU : Station de traitement des eaux usées

Introduction

Les matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sont des matières organiques provenant principalement des effluents d'élevage, des boues d'épuration d'origines urbaine ou industrielle et des composts. Ces Mafors sont caractérisées par un taux élevé en matière organique et de fortes teneurs en azote, phosphore et potassium. Avec leurs caractéristiques agronomiques intéressantes, les Mafors sont principalement valorisées par épandage agricole pour améliorer la fertilisation des sols. L'apport de Mafors dans les sols améliore également la structure du sol, stimule l'activité biologique et optimise les rendements des cultures. Cependant, la valorisation des Mafors par épandage a pour conséquence la dissémination de polluants organiques et inorganiques dans les sols agricoles avec des risques environnementaux et sanitaires encore mal identifiés. De ce fait, il est nécessaire d'évaluer les risques écotoxiques sur les organismes présents dans les sols associés à l'épandage de Mafors.

L'objectif de la thèse est de développer une approche expérimentale visant à évaluer l'écotoxicité de Mafors épandues sur un sol agricole. Basée sur la caractérisation des Mafors et du sol récepteur et la réalisation de tests d'écotoxicités aiguë et chronique, la méthodologie doit fournir un « profil » écotoxicologique de chacune des Mafors testées, identifier les paramètres biologiques impactés et définir les doses d'épandage bénéfiques et/ou écotoxiques. Dans cette finalité, la méthodologie a été développée pour tester une sélection de Mafors couramment épandues en France.

Cette thèse cherche à mettre en place des méthodes écotoxicologiques pour étudier trois Mafors : une boue d'épuration issue du traitement des eaux urbaines, un fumier et un lisier issus de l'élevage de bovins. Elles représentent des typologies différentes en termes d'origines et de compositions physicochimiques. Les effluents d'élevage représentent plus de 94 % des Mafors épandues (ADEME, 2018).

L'évaluation écotoxicologique s'est portée sur les organismes terrestres qui sont directement concernés par les épandages agricoles. Parmi ces organismes, les vers de terre représentent le bioindicateur principale, pour leur place prépondérante au sein des invertébrés et pour leur contribution dans la décomposition de la matière organique du sol

et dans sa bioturbation. En complément, les plantes et les microorganismes ont également été étudiés pour représenter deux autres maillons de la chaîne trophique susceptible d'être directement impactés par les apports en Mafors.

Le suivi des contaminants dans les Mafors a porté sur les résidus de médicaments et les éléments traces métalliques. Les éléments traces métalliques sont étudiés depuis longtemps et leurs effets sur les organismes sont bien documentés. En revanche, le devenir des résidus de médicaments dans les sols et les mécanismes en jeu dans leur séquestration sont encore mal connus.

Contexte scientifique et financier de la thèse

Cette thèse s'intègre dans le programme RISMEAU (Risques liés aux résidus de médicaments, biocides et antibiorésistances d'origines humaine et vétérinaire sur les ressources en eau du bassin versant de l'Arve), piloté par le GRAIE (Groupe de recherche, animation technique et information sur l'eau). Ce programme de recherche a été initié par l'observatoire SIPIBEL (Site pilote de Bellecombe) et par les différents projets sur le bassin versant de l'Arve. Il a pour objectif de caractériser les différentes Mafors épandues sur le bassin versant de l'Arve, et d'évaluer leur impact dans les différents compartiments environnementaux. Ce programme comprend trois grands projets (**Figure 1**) :

- Un diagnostic sur la présence et l'identification de médicaments d'origines humaine et vétérinaire dans les eaux de surface,
- Le projet Télésphère : ce projet cherche à évaluer le transfert de résidus de médicaments et de biocides lié aux épandages de Mafors sur les sols agricoles,
- Le projet Perséphone : ce projet vise à évaluer l'impact à court et long terme des résidus de médicaments, de biocides, des éléments traces métalliques et de l'antibiorésistance liés aux épandages agricoles de ces Mafors sur les organismes terrestres.

La thèse s'intègre dans le projet Perséphone et s'est déroulée dans le cadre scientifique de l'équipe IAPHY (Impact des aménagements et des polluants sur les hydrosystèmes) du laboratoire LEHNA (Laboratoire d'écologie des hydrosystèmes naturels et anthropisés). L'objectif scientifique de cette équipe est de caractériser et d'évaluer l'impact sur les écosystèmes receveurs des polluants organiques et inorganiques issus des activités anthropiques. Dans le cadre de ce projet, l'équipe IAPHY est intervenue pour évaluer les impacts environnementaux liés à l'épandage, avec la mise en place des batteries d'essais sur les vers de terre, les plantes et les microorganismes terrestres et l'étude de la bioaccumulation des micropolluants dans les organismes terrestres.

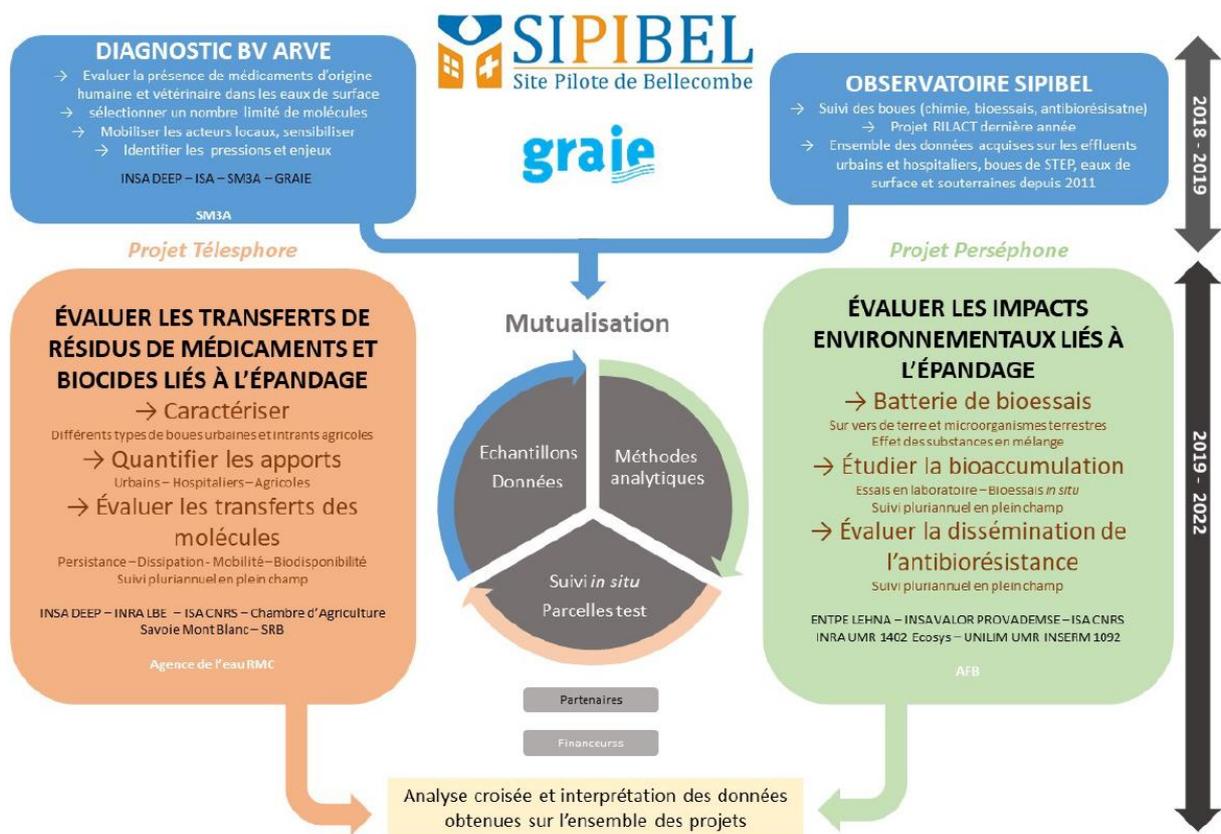


Figure 1. Description du programme RISMEAU et synergie entre les différents projets le composant¹.

Les expérimentations ont été réalisées à l'École Nationale des Travaux Publics de l'État située à Vaulx-en-Verin (69120, France), accueillant l'équipe IAPHY du LEHNA, et à PROVADEMSE (Plateforme technologique d'INSAVALOR) situé à Villeurbanne (69100,

¹ <http://www.graie.org/Sipibel/projets.html>

France). Cette recherche a été financée par l'Office Français de la Biodiversité (OFB) et la bourse de thèse a été obtenue auprès de l'École doctorale de Chimie / INSA de Lyon.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec :

- École Nationale des Travaux Publics de l'État (ENTPE)
- Laboratoire d'écologie des hydrosystèmes naturels et anthropisés (LEHNA), CNRS (UMR 5023) ;
- Laboratoire Déchets, Eaux, Environnements, Pollutions (DEEP), INSA Lyon ;
- Plateforme technologique d'INSAVALOR PROVADEMSE ;
- Institut des sciences analytiques (ISA), CNRS (UMR 5280) ;
- Unité Écologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes (ECOSYS), INRAE (UMR 1402).

Ce mémoire est organisé en deux grandes parties.

La première partie présente l'état de l'art des connaissances sur les matières fertilisantes d'origine résiduaire, leurs caractéristiques ainsi que leurs potentiels d'effets écotoxiques sur les vers de terre. Elle s'organise en trois chapitres :

Le **chapitre 1** présente la gestion des Mafors en France, les différentes typologies et leurs intérêts agronomiques et environnementaux, les risques potentiels sur les organismes terrestres ainsi que la réglementation mise en place pour garantir leur innocuité.

Le **chapitre 2** précise les différents résidus de médicaments et les éléments traces métalliques présents dans les Mafors et dans les sols, leur mécanisme de rétention ou de mobilité dans les sols. Ce chapitre présente également les impacts des Mafors sur les plantes et les microorganismes.

Le **chapitre 3** décrit le ver de terre utilisé comme bioindicateur pour évaluer les risques écotoxiques de l'épandage des Mafors. Leur rôle dans les écosystèmes et leur interaction avec les contaminants sont précisés. Les connaissances actuelles des impacts des Mafors sur les vers de terre y sont détaillées.

La seconde partie est dédiée à la présentation de la procédure expérimentale, la présentation et la discussion des résultats sur l'évaluation écotoxicologique des Mafors. Elle est organisée en quatre chapitres :

Le **chapitre 4** détaille les organismes, les Mafors à étudier ainsi que les **méthodes** pour évaluer leurs caractéristiques physicochimiques et leurs écotoxicités à travers les bioessais en laboratoire et *in situ*.

Le **chapitre 5** porte sur la caractérisation physicochimique des Mafors et l'évaluation du risque écotoxicologique à travers les tests de **toxicité aiguë** sur les vers de terre, les plantes et les microorganismes.

Le **chapitre 6** concerne la présentation des résultats sur l'évaluation de la **toxicité chronique** des Mafors sur les vers de terre et les plantes.

Le **chapitre 7** est dédié à la présentation des résultats sur la **bioaccumulation** des résidus de médicaments et des éléments traces métalliques issus des sols amendés en Mafors dans les vers de terre et les plantes.

Ce mémoire se termine par une conclusion générale de l'étude et propose des recommandations sur la démarche expérimentale et la réalisation des tests écotoxicologiques sur des échantillons environnementaux (sols et Mafors).

Partie 1. Étude bibliographique

Chapitre 1. Les épandages agricoles de matières fertilisantes d'origine résiduaire en France

1.1 Mafors

Avec l'accroissement de la population mondiale, la quantité de résidus organiques produits s'est fortement accrue. En France, le gisement de résidus organiques représente plus de 729 millions de tonnes brutes par an à traiter (ADEME, 2018). Dans ce gisement, les effluents d'élevage représentent à eux seuls plus de 274 millions de tonnes brutes et la sylviculture plus de 100 millions de tonnes brutes (Foged et al., 2012 ; Gaillot and Lavarde, 2015).

Les matières fertilisantes d'origine résiduaire, les Mafors, représentent les résidus organiques issus des différentes filières de traitement. Elles sont définies dans le code rural et de la pêche maritime comme « *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* » (Article L.255-1). Les Mafors sont très diversifiées et peuvent être classées en deux catégories selon leur origine (ADEME, 2018 ; Houot et al., 2014) :

- Les Mafors d'origine agricole. Elles se composent principalement d'effluents d'élevages récupérables comprenant les fèces, les urines et les litières d'animaux prétraités ou avant épandage ;
- Les Mafors d'origines industrielle et urbaine. Cette catégorie est représentée par les déchets organiques municipaux dont les boues d'épuration et les biodéchets, les effluents et déchets organiques industriels dont les déchets issus de l'agroalimentaire et de la papeterie, les composts d'origines urbaine et industrielle comprenant les fractions fermentescibles d'ordures ménagères résiduelles et les déchets verts.

1.2 Gestion des Mafors

En France, la gestion des déchets est régie par le code de l'environnement. Le traitement des déchets est réalisé en suivant la hiérarchie définie par la réglementation, et dépend à la fois de leurs caractéristiques et de leurs origines. Dans un contexte de développement du principe d'une économie circulaire, la valorisation de la matière organique est un enjeu majeur. Malgré tout, une partie de ces déchets organiques reste encore non valorisée et suit les voies d'élimination telles que l'incinération ou encore la mise en décharge.

La valorisation des résidus organiques passe par (1) le compostage, (2) la méthanisation, (3) l'épandage agricole, (4) la combustion de biomasse en centrales thermiques dédiées.

- (1) Le compostage est un procédé de transformation de matières fermentescibles (ADEME, 2015a). Il consiste à produire un résidu organique stable, le compost, par fermentation aérobie de déchets organiques par les microorganismes. Le compostage concerne principalement les déchets verts, les biodéchets, les boues d'épuration, la fraction fermentescible des ordures ménagères résiduelles et les effluents d'élevage (ADEME, 2015a). Le compostage est mis en œuvre à plusieurs échelles telles que le compostage domestique, le compostage partagé et le compostage industriel. Le compost est utilisé comme amendement organique principalement dans l'objectif d'améliorer les caractéristiques chimiques et physiques des sols. L'avantage du compostage est également de réduire les quantités à épandre, de stabiliser la matière organique et de réduire les nuisances olfactives.
- (2) La méthanisation est un processus biologique naturel qui consiste à mettre en œuvre l'activité microbienne méthanogène en absence d'oxygène (ADEME, 2021, 2015b). Les microorganismes, impliqués dans la méthanogenèse, convertissent la matière organique en deux produits : le biogaz riche en méthane, énergie verte qui va servir de combustible, et le digestat qui sera valorisé par épandage agricole, avec ou sans post-traitement de déshydratation ou de compostage. Malgré son fort développement en France depuis une quinzaine d'années, la méthanisation de boues d'épuration est encore peu pratiquée. Par ailleurs, les biodéchets et les déchets agro-alimentaires (Mafors d'origines urbaine et industrielle) représentent un fort potentiel de production de biométhane (ADEME, 2021, 2015b). En effet, cette technique présente plusieurs avantages pour la filière de traitement des eaux usées, génératrice de boues d'épuration dont les conditions de retour au sol sont susceptibles de changer avec l'évolution de la réglementation (AMORCE, 2019). La méthanisation diminuerait l'odeur des boues lors de leur stabilisation, améliorerait leur valeur fertilisante et réduirait leur volume entre 5 et 15 %. Par ailleurs, elle génère un gain financier par la vente de biogaz et permet d'épandre les digestats sur les champs.

(3) L'épandage agricole est défini comme étant l'action d'épandre au champ des matières présentant un intérêt agronomique, et dont le but consiste à améliorer le rendement d'une culture. Ces matières possèdent une valeur fertilisante et une valeur amendante organique élevée (Houot et al., 2014). Ces matières organiques peuvent être un engrais, un amendement ou tout autre produit destiné « à assurer ou à améliorer la nutrition des végétaux ou les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols » (Code rural et de la pêche maritime, L255-1, 4 juin 2015).

L'épandage agricole est la voie de valorisation des Mafors la plus développée sur le territoire français avec environ 300 millions de tonnes de matières brutes épandues annuellement (ADEME, 2018). Par la suite, l'étude bibliographique se focalise sur l'épandage agricole des Mafors.

1.3 Typologie des Mafors épandues

La typologie de Mafors épandues dépend de la surface agricole concernée, grande culture ou prairie, et également de la culture réalisée (Houot et al., 2014). L'épandage concerne l'ensemble de la surface agricole du territoire français. Les principales Mafors épandues sont les effluents d'élevages, les composts de déchets verts, la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM), les boues de stations de traitement des eaux usées (STEU) et industrielles (STEI) et, de façon moins importante, les effluents issus de l'agro-alimentaire (Figure 2).

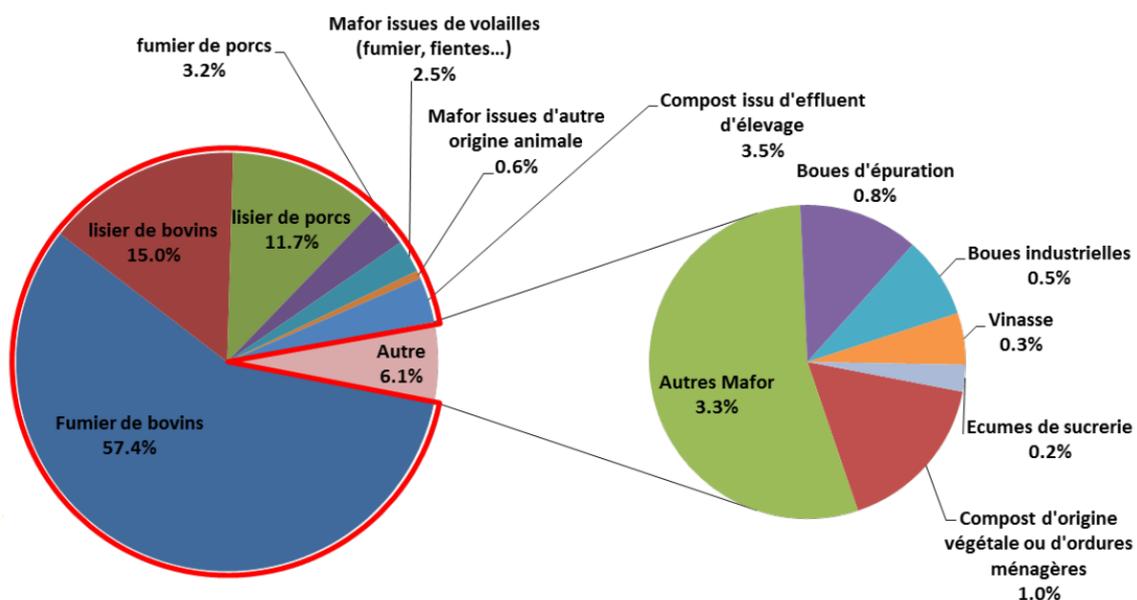


Figure 2. Typologie des Mafors épandues en France en 2011 (Agreste, 2014).

1.3.1 Effluents d'élevage

La quantité des effluents d'élevage produits atteint environ 274 millions de tonnes brutes en France, comprenant les déjections émises en bâtiment et les déjections émises en pâture. Cependant, seules les déjections émises en bâtiments sont récupérables pour être épandues (ADEME, 2018 ; Houot et al., 2014). Ces déjections représentent environ 40 % de ce gisement, soit une quantité de 109 millions de tonnes brutes (soit environ 29 millions de tonnes sèches).

Les effluents d'élevage sont en quasi-totalité épandus sous forme brute, sans traitement préalable, et représentent la majeure partie des Mafors épandues. En effet, les effluents d'élevage représentaient 93,9 % de la totalité des Mafors épandues sur les sols agricoles en 2011 (**Figure 2**). Les effluents d'élevage épandus sont principalement des effluents d'origine bovine, puis viennent les effluents porcins et avicoles. L'élevage bovin représentait environ 77 % de la part des effluents d'élevage produits et épandus, et 72 % de la part des Mafors épandus en France en 2011 (**Figure 2**). L'amendement d'effluents d'élevage concernait une surface de 6 millions d'hectares, exerçant une pression sur les champs de 20 t.ha⁻¹ MB, soit 3,50 t.ha⁻¹ MS (Gaillot and Lavarde, 2015).

1.3.2 Boues de station d'épuration des eaux usées

Les stations d'épuration reçoivent, à travers les réseaux de collecte des effluents, des eaux usées issues des activités humaines. Les traitements réalisés dans les stations d'épuration consistent à biodégrader la charge organique contenue dans les eaux usées et à concentrer les produits résiduels dans les boues d'épuration et l'atmosphère (CO₂, N₂, ...) (**Figure 3**).

1) Traitement primaire

La première étape du traitement des eaux usées est le dégrillage qui permettra à l'aide de tamis, de maillages plus ou moins fins, d'éliminer les macrodéchets (végétaux, objets, etc.). L'eau usée est ensuite orientée vers un premier bassin de décantation où les sables sur la couche inférieure et les huiles sur la couche supérieure seront retirés par une étape de décantation laminaire. Lors de ce traitement, des boues sont produites et contiennent principalement de la matière inorganique (= boue primaire).

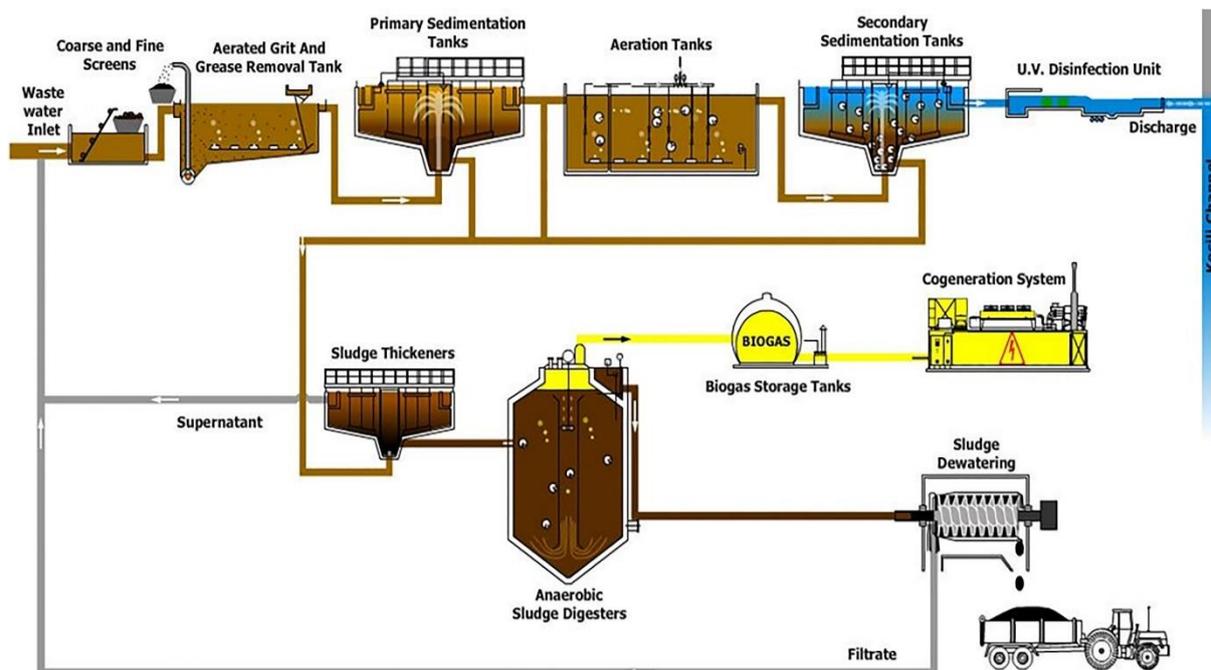


Figure 3. Fonctionnement d'une station de traitement des eaux usées (Aydın et al., 2022).

2) Traitement secondaire

Le traitement secondaire le plus répandu en France est le procédé biologique de « boues activées » : un bassin aéré où les microorganismes vont dégrader la matière organique et les polluants présents dans l'effluent. Un procédé physicochimique peut également être pratiqué sur les eaux en complément ou en remplacement du procédé biologique. Ce traitement physicochimique consiste à utiliser un coagulant (sels de fer ou d'aluminium) pour agglomérer les matières organiques particulaires ou colloïdales contenues dans les eaux usées. À cette étape, les boues produites sont constituées principalement de bactéries épuratrices et de matières organiques (= boue secondaire).

L'eau sera ensuite clarifiée/décantée avant d'être libérée dans l'environnement. Les boues sont collectées, parfois mélangées entre les différents traitements, puis subissent des traitements spécifiques. Ces traitements consistent à réduire le volume des boues par déshydratation et les stabiliser par chaulage, ou compostage ou méthanisation. Les stations d'épuration en France produisent environ un million de tonnes de matières sèches de boues d'épuration (AMORCE, 2019 ; ADEME, 2014). L'épandage agricole concerne 73 % de ces quantités de boues produites en France, dont 42 % sont épandues sans traitement préalable (ADEME, 2018). En 2011, les boues d'épuration ont représenté 0,8 % des Mafors épandues

sur les sols agricoles et concernait environ 0,8 millions d'hectares de surface agricole (Figure 2).

1.3.3 Composts de fractions fermentescibles de déchets ménagers assimilés

Les déchets ménagers assimilés (DMA) représentaient une quantité traitée de 38,9 millions de tonnes en 2017 (ADEME, 2020). Ces DMA comprennent les ordures ménagères résiduelles et les fractions collectées séparément soit par apport volontaire, soit en porte-à-porte. D'après l'ADEME, la valorisation de ces DMA concerne 76 % du stock total, dont 29 % sont orientés vers une filière de tri, 16 % vers une filière de valorisation organique et 31 % vers la production d'énergie après incinération. Le compostage et la méthanisation de ces DMA représentaient 8,7 millions de tonnes avec une production de compost, atteignant 3 millions de tonnes en 2016 (ADEME, 2020). Toutefois, la quantité de compost destinée à l'épandage ne représentait que 7,5 % en 2011 (Gaillot and Lavarde, 2015).

1.4 Intérêts agronomiques

L'épandage des Mafors contribue à l'amélioration de la qualité des sols (Figure 4). En effet, l'apport de Mafors améliore les propriétés physiques du sol, mais aussi la composition chimique et la fertilité biologique du sol (Eden et al., 2017 ; Scotti et al., 2015).

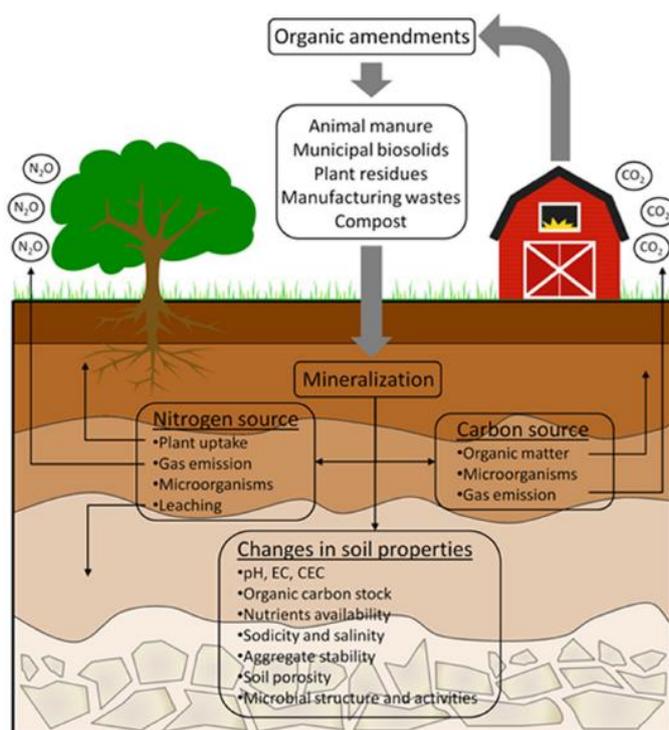


Figure 4. Représentation des effets de l'épandage d'amendements organiques sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques d'un sol amendé (Scotti et al., 2015).

L'épandage agricole de Mafors augmente la quantité de matières organiques dans les sols, ce qui génère une restructuration et une stabilisation du sol (Khaliq and Abbasi, 2015). Les propriétés physiques du sol sont alors améliorées ; la capacité de rétention en eau, la porosité et la conductivité hydrique sont meilleures. Ces améliorations entraînent une circulation facilitée de l'eau et de l'air (Głąb et al., 2018). Les améliorations du sol dépendent aussi des caractéristiques chimiques des Mafors épandues, de leur dose, de leur fréquence d'épandages et du traitement appliqué (compostage, digestat de méthanisation, etc.).

La mauvaise gestion de la matière organique dans les sols agricoles, liée à l'agriculture intensive et à l'utilisation d'engrais chimiques, a pour conséquence un appauvrissement des stocks de carbone dans les sols agricoles (Kopittke et al., 2019). La pratique d'épandage de Mafors dans les sols permet de rapidement recouvrer ces stocks de carbones et apporte de nombreux nutriments N, P et K nécessaires au développement des plantes de culture (Cucina et al., 2021 ; Cucina et al., 2019 ; Park et al., 2019 ; Khaliq and Abbasi, 2015 ; H. Zhang et al., 2015 ; Bonanomi et al., 2014). L'ADEME a estimé que 46,6 % de l'apport en azote sur les sols agricoles en France proviendrait de l'épandage d'amendements organiques (données 2012 ; ADEME, 2018). Cet apport en nutriments conduit à un meilleur rendement des cultures (Zuo et al., 2019 ; Jamil et al., 2006). Cependant, les ratios N, P, K varient selon l'origine des amendements organiques (Goss et al., 2013). Ces différences de teneurs en N, P et K nécessitent un suivi important de la part des gestionnaires pour pallier des déficits ou des apports excessifs. L'utilisation des engrais chimiques sur les sols agricoles est alors minimisée, et sert, à présent, à compléter les apports en N, P et K après épandage de Mafors.

L'utilisation des Mafors stimule l'activité biologique du sol, de la microflore terrestre jusqu'aux vers de terre (ADEME, 2018). Les microorganismes jouent un rôle clé dans la décomposition de la matière organique (Thangarajan et al., 2013 ; Lavelle and Spain, 2001). L'amendement organique favorise la croissance des microorganismes et la diversité des communautés microbiennes. Cette influence dépend de l'origine de la Mafor et des conditions de préparation avant épandage, des fractions organiques facilement assimilables et de la dose d'épandage (Chakraborty et al., 2011).

1.5 Risques liés aux épandages agricoles

Les Mafors peuvent contenir des constituants nocifs pour l'environnement. Les contaminations biologiques et chimiques des sols, qui seront traitées dans les paragraphes suivants, représentent le risque principal de l'épandage des Mafors (Houot et al., 2014 ; Goss et al., 2013).

L'épandage répété de Mafors sur les sols, parfois inapproprié, peut générer des risques secondaires. Parmi les risques secondaires, les quantités de N, P, K déposées sur les sols agricoles peuvent provoquer une contamination des eaux de surface et des eaux souterraines provoquant des phénomènes d'eutrophisation (Urrea et al., 2019). Les lisiers présentent des fortes concentrations en nitrates qui, lors du lessivage des sols, provoquent une contamination importante des eaux de surface (Alvarenga et al., 2015).

L'acidification et la salinisation des sols peuvent se produire lors de l'épandage de certains types de Mafors (Alvarenga et al., 2015 ; Bonanomi et al., 2014 ; Singh et al., 2012). Ils sont à prendre en compte puisqu'ils peuvent affecter la structure du sol, la disponibilité des nutriments et favoriser la mobilité et la disponibilité des polluants. Les travaux d'Alvarenga et al. (2015) montrent, par la mesure de la conductivité électrique, que l'apport de Mafors issues de composts de boues de papeteries et de lisiers contribue à l'augmentation de la salinité, pouvant avoir des effets écotoxiques sur les organismes terrestres. L'apport de Mafors acides conduit à l'acidification du sol amendé, avec pour conséquence de modifier le comportement des polluants dans le milieu et de favoriser une écotoxicité (Singh et al., 2012).

Parmi les autres risques secondaires, l'épandage de Mafors augmente les quantités de carbone et d'azote dans les sols et contribue ainsi à la libération de gaz à effet de serre (CO₂, CH₄ et N₂O) issus de la dégradation de la matière organique (Alvarenga et al., 2015 ; Thangarajan et al., 2013).

1.5.1 Contaminant biologique

Lors d'un épandage de Mafors sur les sols agricoles, le risque de contamination biologique est possible et doit donc être pris en considération. En effet, l'analyse biologique des Mafors révèle la présence de nombreux agents pathogènes (Fijalkowski et al., 2017 ; Goss et al., 2013). La littérature scientifique a permis d'identifier de nombreux pathogènes comme les

virus, les bactéries, les protozoaires, les helminthes, les champignons dont les levures dans une large gamme de Mafors (Fijalkowski et al., 2017 ; Goss et al., 2013 ; INERIS, 2007). Les matières fécales comme les fumiers et les boues d'épuration sont susceptibles de contenir les teneurs les plus élevées en agents pathogènes (Strauch, 1987). Dans ces deux types de Mafors, les pathogènes régulièrement retrouvés en France sont les bactéries (*Salmonella* spp., *Cambylobacter* spp., *Yersinia* spp., *E. coli*, *listeria* spp.), les entérovirus, les helminthes (*Ascaris* spp.) et les protozoaires (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.) (INERIS, 2007).

Après épandage, les agents pathogènes présents dans les Mafors ont une viabilité qui dépend de nombreux paramètres environnementaux : le taux d'humidité, la capacité de rétention en eau, la température, le pH, la luminosité, l'aération du sol, la matière organique et la microflore endogène. Un risque est avéré lorsque ces agents pathogènes survivent dans les sols amendés et que le transfert vers les plantes et vers les humains devient possible (INERIS, 2007).

Pour réduire les risques de contamination biologique, la réglementation encadre l'épandage des boues d'épuration avec des seuils de concentration pour certains pathogènes. Des traitements d'hygiénisation sont appliqués sur les boues d'épuration pour garantir leur innocuité. Ces traitements consistent en (1) une élévation de la température sur un temps suffisamment long comme le compostage, la méthanisation thermophile, le séchage solaire ou thermique ; (2) une augmentation du pH avec l'ajout d'un produit alcalin notamment par chaulage. Toutefois, certains agents pathogènes résistent au traitement. La reprise de l'activité et la croissance de ces pathogènes durant la période de stockage post-traitement peuvent être observées. Une double mesure consiste à définir un délai entre l'épandage de boues d'épuration (haut potentiel de teneur en agents pathogènes) et la semence des graines ou des plantations. En effet, le transfert de ces pathogènes vers les plantes se déroule principalement au niveau des tissus aériens, durant la phase d'épandage ou en cas de fortes pluies. La consommation des récoltes ou le pâturage des animaux sur des prairies amendées en Mafors peuvent entraîner un risque pour les animaux et les humains.

Par ailleurs, l'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé humaine et vétérinaire favorise également la présence de souches bactériennes antibiorésistantes. Les Mafors, par leurs caractéristiques physicochimiques, présentent un milieu favorable au maintien et à la multiplication de ces souches antibiorésistantes. Elles peuvent donc devenir un vecteur de

dissémination de l'antibiorésistance par la pratique de l'épandage agricole. Le développement de l'antibiorésistance réduit les moyens d'action contre les pathogènes humains et animaux (Gothwal and Shashidhar, 2015).

1.5.2 Contaminant chimique

L'épandage des Mafors est considéré comme une source importante de contamination chimique des sols (Fijalkowski et al., 2017 ; Goss et al., 2013 ; Houot et al., 2009). Les Mafors présentent divers contaminants, tels que les polluants inorganiques dont les éléments traces métalliques ou ETMs (Fijalkowski et al., 2017 ; Smith, 2009 ; Chang et al., 1984) et les polluants organiques. Parmi les polluants organiques, les résidus de médicaments représentent les concentrations les plus élevées (Bloem et al., 2017 ; Bourdat-Deschamps et al., 2017). Les ETMs et les résidus de médicaments seront traités dans le chapitre suivant.

De nombreuses autres familles de polluants organiques sont identifiées dans les Mafors et dépendent fortement de leurs origines. Les analyses chimiques des Mafors révèlent la présence de pesticides (Clarke et al., 2010), d'hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP (Fijalkowski et al., 2017 ; Contreras-Ramos et al., 2009), des polychlorobiphényles ou PCB (Mailler et al., 2017), des hormones (Mailler et al., 2017 ; Martín et al., 2012 ; Fan et al., 2011), des retardateurs de flamme bromés ou RFB (Navarro et al., 2016 ; Kinney et al., 2008) et des plastiques (Rolsky et al., 2020 ; van den Berg et al., 2020). Ces polluants organiques ont tous été décrits comme étant écotoxiques pour les organismes du sol (Coelho, 2019 ; W. Zhang et al., 2015 ; Pelosi et al., 2014 ; Biondi et al., 2012 ; Nannipieri et al., 2003).

La présence de polluants est liée à l'origine de la Mafor. Les boues d'épuration urbaines présentent la plus grande diversité de polluants parmi les Mafors épandues. Ces boues d'épuration sont issues des STEU qui reçoivent des eaux usées des ménages, des hôpitaux et des industries. Malgré les traitements mis en place pour dégrader la matière et les polluants organiques, l'efficacité des STEU est partielle car les traitements ne sont pas toujours efficaces sur certains composés ou trop onéreux pour être appliqués. La présence de polluants dans les eaux usées, cumulée à de faibles taux d'abattement, induit une accumulation dans les boues d'épuration, et un risque accru de contamination des sols amendés.

Les pratiques d'élevage génèrent également une diversité de polluants dans les effluents agricoles. L'utilisation de stimulateurs de croissance dans l'alimentation (hormones, métaux lourds, etc.) et l'utilisation d'antibiotiques à usage vétérinaire sont responsables de leur présence dans les Mafors agricoles.

1.6 Réglementation des épandages de Mafors sur les sols

Pour limiter les risques, l'épandage de Mafors sur les sols est réglementé par des lois qui permettent d'assurer de bonnes pratiques et de limiter l'impact environnemental et sanitaire (ADEME, 2018). Trois statuts juridiques catégorisent les Mafors :

- Les déchets comme les boues d'épuration ([Code de l'environnement, Article L541-1, 31 juillet 2020](#)) ;
- Les sous-produits tels que les effluents d'élevage ;
- Les produits qui répondent à une autorisation de mise sur le marché² ou conformes à des normes d'application obligatoires.

En fonction du statut, des contraintes plus ou moins fortes sont imposées à leur épandage. Des demandes d'homologation ou d'autorisation provisoire à la vente permettent de modifier les statuts, après une évaluation approfondie de l'intérêt agronomique et de l'innocuité des Mafors. Les traitements de certaines Mafors peuvent également modifier le statut de ces dernières. La réglementation des épandages agricoles concerne également les producteurs de Mafors et les exploitants agricoles qui les réceptionnent sur leurs sols.

L'épandage des Mafors déchets et sous-produits est encadré par trois textes législatifs. L'épandage des boues de station d'épuration et les effluents d'élevage, issus d'installations classées, suivent les lois sur l'eau (du 16 décembre 1964 et 3 janvier 1992) tandis que l'épandage des effluents industriels, des effluents d'élevage issus d'installations classées et des digestats de méthanisation est légiféré par le régime des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) du 19 juillet 1976. Les lois concernant l'épandage des Mafors précisent les conditions d'apport au sol, avec l'obligation de la mise en place d'un

² <https://www.anses.fr/fr/content/autorisation-de-mise-sur-le-marche-des-matieres-fertilisantes-des-adjuvants-pour-matieres>

plan d'épandage et de gestion (période d'épandage, mode d'épandage, distance d'épandage, quantités définies en fonction des besoins agronomiques, doses d'épandage).

Parmi les Mafors, les boues d'épuration urbaines et industrielles, et les déchets et effluents ICPE, sont soumis à une réglementation plus stricte afin de garantir l'innocuité de leur épandage sur les sols agricoles. En raison de leurs sources, les boues d'épuration présentent un risque de contamination élevé. Leur épandage sur les sols agricoles est légiféré par l'arrêté du 15 septembre 2020, fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles, en application du décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées³. Ce décret fait suite à la directive européenne 86/278/CEE (EC, 1986). Parmi ces contraintes, des seuils en éléments traces métalliques (ETMs) et en certains composés traces organiques ne doivent pas être dépassés. Les sols agricoles doivent également être en dessous de ces seuils fixés par l'arrêté pour recevoir des épandages de boues d'épuration. L'article 11 de l'arrêté mentionne ces quantités seuils en certains contaminants dans les boues d'épuration et dans les sols agricoles (**Tableau 1**). Une autre mesure dans le même arrêté permet également de limiter la concentration en contaminants dans les sols agricoles en régulant la dose d'épandage des boues d'épuration. Par ailleurs, l'article 7 de l'arrêté mentionne que « *La quantité d'application de boues, sur ou dans les sols, doit [...] au plus égale à 3 kilogrammes de matière sèche par mètre carré, sur une période de dix ans.* ».

L'épandage des Mafors est également contraint par la directive nitrate lorsque les épandages ont lieu dans des zones vulnérables préalablement identifiées. Ces zones vulnérables sont caractérisées par des zones pouvant alimenter des eaux susceptibles d'être polluées par une teneur élevée en nitrates et entraîner une eutrophisation du milieu. Cette directive mentionne un seuil maximal de 170 kg d'azote/ha/an, provenant de Mafors à ne pas dépasser lors d'un amendement sur un sol agricole. En France, 55 % de la surface agricole est classée en zones vulnérables et concernée par cette directive nitrate (Houot et al., 2014).

³ <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGIARTI000042419117/2020-10-11/>

Tableau 1. Valeurs limites et flux cumulés en éléments traces métalliques et en composés traces organiques dans les boues d'épuration, déchets et effluents ICPE en France et en Europe (arrêté du 2 février 1998) et du sol recevant l'épandage (arrêté du 3 avril 2000).

Polluants	Teneur dans les boues		Teneur dans les déchets et effluents ICPE		Teneur dans les sols
	Valeur limite (mg.kg ⁻¹ MS)	Flux cumulé maximum sur 10 ans (g/m ² sur sol à pH > 6)	Valeur limite (mg.kg ⁻¹ MS)	Flux cumulé maximum sur 10 ans (g/m ² sur sol à pH > 6)	Valeur limite (mg.kg ⁻¹ MS)
ETM					
Cadmium (Cd)	10	0,015	10	0,015	2
Chrome (Cr)	1000	1,5	1000	1,5	150
Cuivre (Cu)	1000	1,5	1000	1,5	100
Mercure (Hg)	10	0,015	10	0,015	1
Nickel (Ni)	200	0,3	200	0,3	50
Plomb (Pb)	800	1,5	800	1,5	100
Zinc (Zn)	3000	4,5	3000	4,5	300
CTO					
Total des 7 PCBs	0,8	1,2	1,2	1,2	
Fluoranthène	4-5	6 – 7,5	6 – 7,5	6 – 7,5	
Benzo(b)fluoranthène	2,5	4	4	4	
Benzo(a)pyrène	1,5 – 2	2 – 3	2 – 3	2 – 3	

En 2021, L'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a soumis, à la demande de la Direction Générale de l'Alimentation, un avis sur un projet de décret relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité des matières fertilisantes et des supports de cultures⁴. Dans ce projet de loi, l'ANSES recommande la réalisation de tests écotoxicologiques et de mesures des effets de perturbateurs endocriniens dans le but de tracer les effets écotoxiques potentiels des médicaments et de leurs résidus, des micropolluants aux effets perturbateurs endocriniens, des bactéries antibiorésistantes, etc. En effet, ces composés organiques ne sont soumis à aucun seuil et à aucune restriction dans le cadre des matières fertilisantes et des supports de cultures actuellement. Les tests écotoxicologiques proposés concernent l'inhibition de la reproduction des vers de terre selon la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a), l'émergence et la croissance des plantes terrestres selon la norme ISO 11269-2 : 2013 (ISO, 2013) et une évaluation des effets perturbateurs endocriniens. Les seuils d'effet biologique seraient fixés

⁴ <https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-lanses-sur-un-projet-de-d%C3%A9cret-relatif-aux-crit%C3%A8res-de-qualit%C3%A9-agronomique-et>

à 40 % pour les vers de terre et 25 % pour les plantes. Ces seuils seraient définis comme critère décisionnel à trois fois la dose d'épandage moyenne revendiquée.

Points clés à retenir

- ✓ Les Mafors peuvent être classées en deux catégories : les Mafors d'origine agricole telles que les effluents d'élevage et les Mafors d'origines industrielle et urbaine comme les boues d'épuration. Elles représentent un gisement de plus de 729 millions de tonnes brutes par an en France.
- ✓ La valorisation des Mafors comprend le compostage, la méthanisation et l'épandage agricole. Ce dernier est la revalorisation de la matière organique la plus pratiquée en France avec plus de 300 millions de tonnes épandues annuellement.
- ✓ 94 % des Mafors épandues sont des effluents d'élevage comprenant les lisiers et les fumiers.
- ✓ Les Mafors améliorent la structure physique, apportent une fertilisation chimique et stimulent l'activité biologique du sol. De plus, l'épandage des Mafors présente un intérêt économique par une substitution aux engrais et une élimination de la matière organique à moindre coût.
- ✓ Les Mafors peuvent modifier les paramètres physico-chimiques du sol. Ces modifications peuvent parfois présenter un risque environnemental. Les Mafors sont également vectrices de contaminants biologiques et chimiques (résidus de médicaments, HAPs, PCBs, ETMs) identifiés comme étant écotoxiques pour les organismes du sol.
- ✓ La réglementation sur les épandages agricoles de Mafors et sur les sols récepteurs fixe des seuils à ne pas dépasser seulement pour les boues d'épuration et pour certains contaminants chimiques tels que les ETMs (7), les HAPs (3) et les PCBs (7). Des doses d'épandage sont également mentionnées pour réguler l'épandage des boues d'épuration et des effluents d'élevage.
- ✓ Un projet de loi propose des tests écotoxicologiques sur les Mafors pour garantir l'innocuité des Mafors avant d'être épandues.

Chapitre 2. Les polluants présents dans les Mafors

2.1 Les résidus de médicaments dans les Mafors

2.1.1 Définition

Définir les médicaments d'une manière générale est complexe car les médicaments se distinguent par de multiples caractéristiques. En France, les médicaments sont définis par l'article L5111-1 du code de la santé publique comme étant « *toute substance ou composition possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animale* » ou encore comme étant « *toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique* ». Ils se caractérisent par leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques liées à la structure chimique de leurs molécules. Les médicaments sont constitués d'un ou de plusieurs principes actifs, et d'un ou de plusieurs excipients. Le principe actif signifie que le produit présente un effet pharmacologique prouvé cliniquement. L'excipient est un additif non-actif qui facilite son administration et peut aussi servir à améliorer son assimilation.

Dans cette synthèse, le terme « médicament » définit le produit administré au patient. Le terme « résidus de médicaments » correspond à une dégradation partielle des médicaments par des facteurs physicochimiques environnants, ou ayant été excrétés par des organismes.

2.1.2 Sources des résidus de médicaments dans les sols

De la chaîne de production du médicament jusqu'à sa consommation et son élimination, plusieurs routes conduisent à une contamination des milieux terrestres par les résidus de médicaments (Picó and Andreu, 2007 ; Díaz-Cruz et al., 2003). À titre d'illustration, la **Figure 5** présente les principales voies de transfert des antibiotiques dans les différents compartiments de l'environnement.

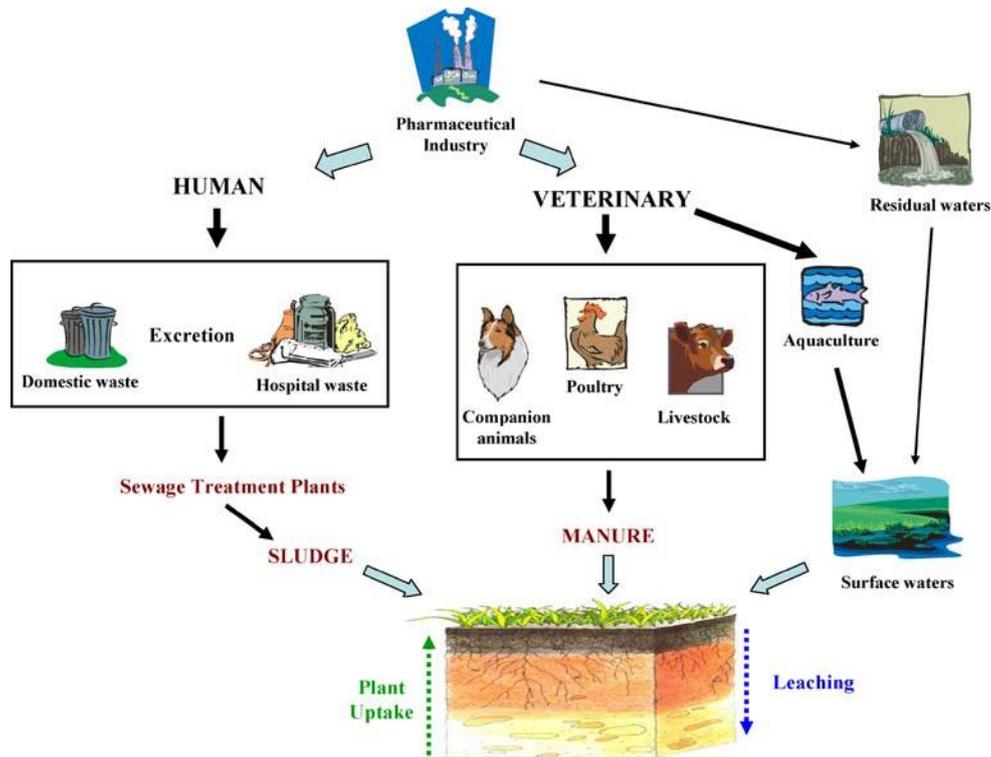


Figure 5. Sources de contamination dans l'environnement des antibiotiques dans la médecine humaine et à usage vétérinaire (Pico et Andreu, 2007).

La contamination des sols agricoles par les résidus de médicaments est principalement induite par l'épandage, en tant que produits fertilisants, des boues d'épuration et des effluents d'élevage (Gothwal and Shashidhar, 2015 ; Hou et al., 2015 ; Van Doorslaer et al., 2014 ; Picó and Andreu, 2007). D'autres sources de contamination des sols existent. Les champs recevant en pâturage des animaux domestiques ou d'élevage sont également concernés par la contamination en résidus de médicaments. La plupart des animaux domestiques ou d'élevage sont traités avec des produits à usage vétérinaire dont les résidus sont présents dans leurs excréments. Indirectement, les sols peuvent également être contaminés avec les eaux de surfaces par les phénomènes de ruissellement de l'eau, de lessivage des sols et d'infiltration naturelle des berges (Gothwal and Shashidhar, 2015 ; Picó and Andreu, 2007). En effet, les eaux de surfaces peuvent être principalement contaminées par :

- (1) Les eaux de déversoirs d'orage, collectant par temps de pluie les eaux de lessivage de surface, mélangées avec des eaux usées déviées des stations d'épuration ;

- (2) Les eaux traitées et relarguées par les stations d'épuration. Les eaux traitées peuvent contenir des résidus de médicaments non abattus malgré les traitements mis en place par les STEU ;
- (3) Les eaux usées issues de l'aquaculture (Justino et al., 2016). L'utilisation d'antibiotiques et la présence de résidus de médicaments dans l'alimentation des poissons engendrent une quantité importante de résidus de médicaments dans leurs fèces, et dans les eaux des bassins piscicoles, qui sont ensuite rejetées dans le milieu aquatique (Romero et al., 2012 ; Tacon and Metian, 2008).

2.1.3 Origines des résidus de médicaments dans les Mafors

Les résidus de médicaments se retrouvent principalement dans les boues d'épuration et les effluents d'élevage. Ces deux Mafors représenteront les deux typologies de Mafors étudiées dans cette bibliographie.

Dans les STEU, les eaux usées à traiter et contenant des résidus de médicaments sont issues des industries pharmaceutiques, des établissements hospitaliers et des activités domestiques (Pan and Chu, 2017 ; Daghri and Drogui, 2013 ; Verlicchi et al., 2010). Cette triple origine est source d'une grande diversité de résidus de médicaments avec des concentrations qui peuvent être très élevées. Pour dépolluer ces eaux usées, les STEU ont mis en place des traitements transférant la pollution organique vers les boues d'épuration (**Figure 3**). Ces boues d'épuration sont alors le récepteur final de ces résidus de médicaments (Gothwal and Shashidhar, 2015 ; W. Li et al., 2013). Des traitements pour réduire la concentration en résidus de médicaments dans les boues d'épuration ont également été mis en place par les STEU. Parmi les différents traitements, la digestion anaérobie réduit une large gamme de polluants organiques dans les boues d'épuration et présente des taux abattements les plus élevés (Malmborg and Magnér, 2015). Toutefois, certains polluants sont récalcitrants et se retrouvent à des concentrations très élevées dans les boues d'épuration.

Les produits vétérinaires sont utilisés pour protéger les élevages contre les agents pathogènes. Cependant, certains médicaments ne sont pas totalement métabolisés. Par exemple, 70 % des antibiotiques de la famille des tétracyclines sont excrétés et libérés sous une forme active non dégradée (Daghri and Drogui, 2013). Ainsi, les résidus de

médicaments sont détectés dans les effluents d'élevage qui sont épandus directement sur les sols agricoles (Hou et al., 2015 ; Li et al., 2012 ; Kim et al., 2011). Le compostage de ces effluents avant de les épandre peut participer à une réduction de la concentration en résidus de médicaments de manière indirecte (Ho et al., 2013).

2.1.4 Inventaire des résidus de médicaments dans les Mafors

De leur consommation jusqu'à leur identification dans les Mafors épandues, les médicaments et les résidus de médicaments sont transformés par des mécanismes abiotiques ou biotiques. Leur dégradation dépend des propriétés des molécules et des facteurs physicochimiques associés aux conditions de traitement des effluents liquides et solides. Par conséquent, leur persistance dans les Mafors est d'une grande variabilité. Aujourd'hui, avec les récents développements des techniques analytiques, les résidus de médicaments sont plus facilement identifiés dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Les données, disponibles dans la littérature scientifique, permettent de dresser un bilan sur les résidus de médicaments présents dans les Mafors et susceptibles d'atteindre le compartiment eau et sol (Pan and Chu, 2017 ; Carvalho and Santos, 2016). Les tableaux A.1 et A.2 (cf. ANNEXE A, page 248) illustrent la diversité des résidus de médicaments identifiés et quantifiés dans les boues d'épuration et dans les effluents d'élevage.

2.1.4.1 Dans les boues d'épuration

Plusieurs classes de résidus de médicaments sont identifiées dans les boues d'épuration, comme des antibiotiques, des antiépileptiques, des anti-inflammatoires, des analgésiques et des bêtabloquants (cf. tableau A.1 de l'ANNEXE A, page 248).

Une large gamme d'antibiotiques sont présents dans les boues d'épuration avec les fluoroquinolones, les sulfonamides, les tétracyclines, les macrolides et les diaminopyridines. Les fluoroquinolones sont fréquemment identifiées, principalement dans les boues d'épuration, avec des concentrations moyennes qui varient de 110 à 19 215 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS pour la ciprofloxacine, de 289 à 6 639 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS pour la norfloxacine et de 455 à 8 743 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS pour l'ofloxacine. D'autres familles d'antibiotiques sont également identifiées, mais à de plus faibles concentrations. C'est le cas des macrolides dont les concentrations sont comprises entre 7 et 1 958 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS, des tétracyclines avec des concentrations moyennes comprises entre 43,5 et 2 376 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS et des sulfonamides avec des concentrations moyennes

comprises entre 16,4 et 106,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS. Des biocides sont également présents, tels que le triclosan, le triclocarban, le thiabendazole et le miconazole dans des gammes de concentrations proches de celles des fluoroquinolones et comprises entre 110 et 36 060 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS.

Parmi les autres classes de médicaments, les anti-inflammatoires sont également présents, avec une diversité élevée. L'ibuprofène, le fénoprofène, le naproxène, le kétoprofène, le diclofénac et l'acide salicylique se retrouvent à des gammes de concentrations comprises entre 12,8 et 1 274 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS dans les boues d'épuration. Les antiépileptiques (carbamazépine et fluoxétine), les analgésiques (paracétamol et tramadol) et les bêtabloquants avec le propranolol sont quantifiés également dans des gammes de concentrations proches de celles des anti-inflammatoires, avec des concentrations comprises entre 3,1 et 4 700 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS. D'autres classes de médicaments sont également identifiées telles que les antidépresseurs (amitriptyline), les antihypertensifs (allopurinol), les hypolipémiantes (fénofibrate et gemfibrozil), les antihistaminiques (diphenhydramine) et les antiarythmiques (vérapamil).

2.1.4.2 Dans les effluents d'élevage

L'identification et la quantification des résidus de médicaments dans les effluents d'élevage concernent principalement la classe des antibiotiques. La littérature mentionne six familles : les fluoroquinolones, les sulfonamides, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides et les phénicolés (cf. tableau A.2 de l'ANNEXE A, page 248). En effet, les effluents d'élevage contiennent des produits vétérinaires administrés aux élevages, et donc principalement des antibiotiques destinés à l'usage vétérinaire. Les pratiques d'élevage utilisent principalement les antibiotiques de type tétracyclines et sulfonamides (Chen et al., 2012). Parmi ces deux classes d'antibiotiques, ce sont les tétracyclines qui sont majoritairement présentes avec des gammes de concentration élevées. Toutefois, les concentrations mesurées dépendent du type d'effluents (liquide ou solide), du type d'élevage et du pays. Les concentrations les plus élevées en antibiotiques sont mises en évidence dans les élevages porcins, et plus particulièrement en Chine. En effet, l'usage des antibiotiques comme accélérateurs de croissance est une pratique courante pour faire face aux pandémies fréquentes dans les élevages porcins chinois avec, pour conséquence, des concentrations élevées dans les effluents d'élevage (Barton, 2000). Depuis 2006, l'Union Européenne a interdit cette

pratique pour contrer l'émergence de bactéries et d'autres microbes résistants aux antibiotiques.

La classe des tétracyclines, dont les tétracyclines, les chlortétracyclines, les oxytétracyclines, les métacyclines et les doxycyclines font partie, atteignent des concentrations moyennes comprises entre 11 et 871 700 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS dans les effluents d'élevage. Pour les sulfonamides, une grande diversité de familles est également mise en évidence : les sulfonamides principaux sont les sulfaméthoxazoles avec des concentrations moyennes comprises entre 50 et 2 230 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS, les sulfaméthazines avec des valeurs moyennes de 120 à 10 800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS et les sulfadiazines avec des valeurs moyennes de 150 à 780 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS. Pour les autres antibiotiques tels que les fluoroquinolones, les valeurs sont également très élevées. L'enrofloxacin atteint 1,4 g.kg^{-1} MS dans un fumier de poulets en Chine (Zhao et al., 2010). La tylosine est un antibiotique de la famille des macrolides régulièrement utilisée dans les élevages et révélant des valeurs moyennes comprises entre 250 et 115 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS.

2.1.5 Présence des résidus de médicaments dans les sols agricoles

L'épandage de Mafors conduit à la contamination des sols agricoles en résidus de médicaments (Gothwal and Shashidhar, 2015). D'après le tableau A.3 (cf. ANNEXE A, page 248), la contamination des sols en résidus de médicaments dépend du type de Mafors et des doses d'épandage. Les antibiotiques de la classe des fluoroquinolones et des tétracyclines sont présents à des concentrations élevées, pouvant atteindre une moyenne maximale de 450 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS en ciprofloxacine dans un sol amendé en boue d'épuration, 203 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS en chlortétracycline dans un sol amendé en lisier, et 151,50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS en enrofloxacin dans un sol amendé en fumier. La chlortétracycline a déjà été mesurée à 1 039 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS dans un sol amendé en lisier.

Les valeurs de concentration des résidus de médicaments dépendent non seulement de la profondeur du sol, mais aussi de la durée entre l'épandage et le prélèvement du sol amendé. Les analyses réalisées dans l'étude de Hamscher et al. (2005) sur la tétracycline et la chlortétracycline montrent que les concentrations en résidus de médicaments étaient plus importantes dans la couche 10-20 cm du sol. Au-delà de 30 cm de profondeur, les concentrations de ces résidus de médicaments sont en dessous des limites de détection des

méthodes d'analyse de cette étude. Pour les antibiotiques fluoroquinolones, au-delà de 5 cm de profondeur, la ciprofloxacine et la norfloxacine ne sont plus détectées (Golet et al., 2003). Dans cette même étude, les concentrations mesurées diminuent avec le temps. En effet, la mesure réalisée après les 5 mois qui suivaient le dernier épandage montre une concentration en ciprofloxacine de $450 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS. Pourtant, après 21 mois, cette concentration est réduite à $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS. Toutefois, d'autres études montrent des résultats différents, avec une augmentation de la concentration en tétracycline avec la durée (Hamscher et al., 2005, 2002).

2.2 Les éléments traces métalliques dans les Mafors

2.2.1 Définition

Parmi les ETMs, certains sont indispensables au fonctionnement des processus biologiques et sont qualifiés d'oligoéléments, tels que le cuivre, le zinc et le chrome. D'autres sont qualifiés de contaminants stricts, la nécessité de leur présence dans les processus biologiques n'ayant pas été démontrée. C'est le cas du plomb, mercure et cadmium. Qu'ils soient qualifiés ou non d'oligo-éléments, les ETMs peuvent s'avérer toxiques pour les organismes à des concentrations élevées. Les principaux ETMs connus pour leur écotoxicité sont le plomb, le cadmium, le mercure, le chrome, le cuivre, le nickel et le zinc (Alengebawy et al., 2021 ; Achparaki et al., 2012 ; Valko et al., 2005). Pour déterminer le fond géochimique en ETMs présents dans les sols français, l'étude de Baize (2000) analyse 815 échantillons de sols (**Tableau 2**).

Tableau 2. Concentrations en ETMs (mg.kg^{-1} MS) mesurées dans 815 échantillons de sols issus du territoire français (Baize, 2000).

Valeurs	Cd	Pb	Cr	Cu	Ni	Zn	Hg *
Médiane	0,16	34,1	66,3	12,8	31	80	0,07
Moyenne	0,42	64,8	75	14,9	41,3	149	-
Minimum	<0,02	2,2	<2	<2	<2	<5	0,001
Maximum	6,99	3088	691,0	107,0	478,0	3820	1,7

* Valeurs issues du ministère de la transition écologique, 2021.

2.2.2 Sources anthropiques en ETMs dans les sols

Les activités humaines sont des sources à l'origine de transferts des ETMs présents dans les écosystèmes terrestres (Alengebawy et al., 2021 ; Chassin et al., 1996). En effet, les activités industrielles, de transports, agricoles et minières conduisent à une contamination du sol (Alengebawy et al., 2021 ; Wuana and Okieimen, 2011 ; Chassin et al., 1996).

Les retombés atmosphériques sont le principal vecteur de contamination des zones urbaines (Nicholson et al., 2003). Originaires des émissions des cheminées, des pots d'échappement et des poussières provenant des zones de stockage des déchets, les retombées atmosphériques provoquent la contamination diffuse des zones à proximité de ces activités, dont les compartiments sols et eaux. Ces retombées augmentent en raison du volume et de la diversification des activités humaines (Vodyanitskii, 2013).

L'utilisation de pesticides, d'engrais chimiques et de Mafors pour améliorer ou protéger les cultures constitue également une source importante de contamination en ETMs dans les sols (Alengebawy et al., 2021 ; Wuana and Okieimen, 2011). En effet, certains pesticides contiennent des ETMs pour lutter contre les agents indésirables et polluent de façon localisée des sites spécifiques ou des cultures (McLaughlin et al., 2000). Cette contamination des ETMs sur les sols agricoles provient également de l'utilisation d'engrais chimiques, tels que les fertilisants azotés contenant des ETMs indésirables (Vodyanitskii, 2013 ; Wuana and Okieimen, 2011) et de l'irrigation sur champs des eaux usées issues des stations d'épuration et des industries (Reed et al., 1995). En raison de leurs origines très diverses et de la généralisation de la pratique d'épandage, les Mafors constituent une source de contamination importante des sols agricoles, avec une grande variabilité en termes d'ETMs et de concentration (Alloway, 2012). La contamination des sols agricoles serait principalement liée à la répétition de ces épandages de Mafors (Guo et al., 2018 ; Iglesias et al., 2018 ; Nogueira et al., 2013 ; Smith, 2009).

2.2.3 Origines des ETMs dans les Mafors

De nombreuses Mafors présentent des concentrations en ETMs élevées, comme les boues d'épuration, les sous-produits de déchets industriels, les effluents d'élevage et les composts de mélanges (principalement de déchets municipaux dérivés de déchets verts et d'une quantité limitée de compost de déchets solides domestiques) (Nicholson et al., 2003).

Les activités domestiques, urbaines, commerciales et industrielles sont à l'origine d'une large dispersion d'ETMs *via* le traitement des eaux usées (Bouallegue, 2011 ; Juste et al., 1995). Le **Tableau 3** présente les principales sources de contamination des eaux usées en ETMs potentiellement toxiques et leur proportion (Juste et al., 1995). Les concentrations varient selon l'origine des eaux usées. Ce sont les eaux usées industrielles et le lessivage des sols qui représentent les principales sources en ETMs dans les effluents à traiter dans les STEU, et qui seront majoritairement présents dans les boues d'épuration en fin de traitement (Fijalkowski et al., 2017 ; Juste et al., 1995). Les traitements physicochimiques appliqués sur les eaux usées sont également une source importante en ETMs (Perron and Hébert, 2007). En effet, les traitements physicochimiques consistent à utiliser des produits chimiques comme des sels d'aluminium, des sels de fer, des chlorures ferriques ou des sulfates ferreux pour réduire la teneur en matière organique et en phosphore dans les effluents à traiter. Ces produits ajoutés sont une des causes principales des concentrations élevées en fer et en aluminium dans les boues d'épuration.

Tableau 3. Contribution moyenne des différentes activités urbaines et industrielles en ETMs dans les eaux usées en % du total mesuré dans les effluents urbains (Juste et al., 1995).

Origine de la pollution				
Éléments	Domestique	Pluviale	Industrielles	Non identifiée
Cd	20	3	61	16
Cu	62	6	3	29
Zn	28	10	5	57
Ni	17	9	27	47
Hg	4	1	58	37
Cr	2	2	35	61
Pb	26	29	2	43

Dans les élevages, l'utilisation de compléments alimentaires enrichis en ETMs et leur excrétion naturelle par les organismes conduisent à leur présence dans les effluents d'élevage (Xiong et al., 2010 ; Revy et al., 2003). Certains ETMs sont en effet utilisés soit comme accélérateurs de croissance, soit en prévention de certaines maladies en stimulant le système immunitaire des animaux d'élevage (Revy et al., 2003 ; Zhou et al., 1994 ; Barber et al., 1965).

2.2.4 Inventaire des ETMs dans les Mafors

Le risque de contamination des ETMs dans les sols, et notamment dans les sols agricoles, par les épandages de boues d'épuration, justifie la mise en place du suivi régulier des concentrations en ETMs dans les Mafors épandues et des valeurs seuils en ETMs définies par la loi dans les boues d'épuration. Le tableau A.4 (cf. ANNEXE A, page 248) présente les concentrations mesurées en cuivre, zinc, cadmium, nickel, plomb, chrome, argent et mercure dans les boues d'épuration et les effluents d'élevage.

Dans les boues d'épuration, le zinc et le cuivre présentent les concentrations les plus élevées. Les concentrations moyennes mesurées sont comprises entre 592,8 et 2 510,4 mg.kg⁻¹ MS pour le zinc, et entre 145,4 et 843,8 mg.kg⁻¹ MS pour le cuivre. Les autres ETMs sont également présents, mais à des concentrations plus faibles. En effet, le plomb, le chrome et le nickel ont des concentrations similaires, comprises entre 15,9 et 140,6 mg.kg⁻¹ MS. Si le cadmium et le mercure sont retrouvés à de plus faibles concentrations, avec des moyennes comprises entre 0,8 et 2,1 mg.kg⁻¹ MS, les recherches tendent à affirmer leur toxicité et leur bioaccumulation importante à faible dose sur les organismes terrestre (Rahman and Singh, 2019 ; Carbonell et al., 2009).

Dans les effluents d'élevage, le zinc et le cuivre sont également les ETMs présentant les concentrations les plus élevées, avec des moyennes comprises entre 21 et 1 400 mg.kg⁻¹ MS pour le cuivre et entre 68 et 545 mg.kg⁻¹ MS pour le zinc. Ces valeurs en zinc et cuivre sont particulièrement élevées dans les fumiers de porc issus des élevages chinois (Cang et al., 2004). Les concentrations retrouvées en cuivre peuvent atteindre jusqu'à 1 726 mg.kg⁻¹ MS dans un fumier de porc et 570 mg.kg⁻¹ MS dans un fumier de volaille dans un élevage en Chine. Pour le zinc, les concentrations maximales retrouvées dans un élevage en Chine atteignent jusqu'à 1 505,6 et 964,7 mg.kg⁻¹ MS pour un fumier de porc et de volaille respectivement. L'utilisation des ETMs comme accélérateurs de croissance est une pratique courante dans le monde entier. Cette pratique est très réglementée dans l'UE pour éviter l'apparition d'effets indésirables pour les humaines et les animaux, ainsi que de réduire la contamination en ETMs des Mafors. D'autres ETMs sont mis en évidence, mais à des concentrations plus faibles et sont similaires à celles des boues d'épuration. Le nickel, le plomb et le chrome présentent des concentrations comprises entre 0,6 et 200 mg.kg⁻¹ MS, le

mercure et le cadmium montrent des concentrations comprises entre 0,01 et 1,6 mg.kg⁻¹ MS.

2.3 Mécanismes d'interaction et de mobilité des polluants dans les sols

La migration des polluants vers un milieu récepteur va dépendre de leur comportement dans les différents milieux naturels traversés. Leur propriété intrinsèque, ainsi que celle du milieu cible et de leur interaction, vont constituer les facteurs influençant la migration de ces polluants. Dans le cas des Mafors, les polluants présents vont rejoindre principalement le sol agricole via l'épandage. De ce fait, les propriétés physicochimiques des polluants ainsi que les facteurs physicochimiques et biologiques du sol vont gouverner leur mobilité et leur biodisponibilité dans les sols agricoles.

2.3.1 Propriétés des polluants responsables de leur comportement

Le comportement des polluants dans les sols est influencé par leurs propriétés physicochimiques, telles que la solubilité, la densité, la stabilité biochimique, l'adsorption, la viscosité, la polarité, la volatilité (**Tableau 4**). Parmi ces propriétés, on identifie trois mécanismes majeurs, à la fois pour les ETMs et les résidus de médicament : la solubilité, la complexation et l'adsorption (Lemière et al., 2001 ; Chang et al., 1984).

Tableau 4. Propriétés physicochimiques des polluants influençant leur comportement dans le sol (Lemière et al., 2001).

Critères de comportement	Grandeurs caractéristiques	Polluant organique	Polluant inorganique
Capacité à se solubiliser	Solubilité dans l'eau	X	X
Écoulement vertical du fluide	Densité du liquide par rapport à l'eau Viscosité	X X	X (Hg)
Capacité à se volatiliser	Tension de vapeur Température d'ébullition Constante de Henry	X X X	
Migration verticale des vapeurs	Densité des vapeurs, par rapport à l'air	X	
Affinité avec l'eau (Polarité, hydrophobie)	Coefficient de partage eau/octanol (K _{OW})	X	
Capacité à être adsorbé (adsorption)	Coefficient de partage eau/carbone organique (K _{OC}) Coefficient de partage eau/solide (K _d)	X	X
Stabilité biochimique	Temps de demi-vie	X	X

2.3.1.1 La solubilité

La solubilité correspond à la capacité d'une substance à se dissoudre dans l'eau. La solubilité d'un polluant joue un rôle important sur sa mobilité dans l'environnement (McCray et al., 2001). Un composé faiblement soluble aura une mobilité réduite en comparaison avec un composé soluble, qui sera facilement dispersé dans l'environnement lors d'un lessivage des sols par les pluies ou par ruissellement. De plus, une solubilité avérée du polluant le concentrerait dans la solution du sol et le rendrait facilement biodisponible pour les organismes vivants, entraînant une écotoxicité, une bioaccumulation et/ou une biodégradation accélérée (Jenne and Luoma, 1977).

2.3.1.2 La complexation

La complexation est une association d'ions ou de molécules. Ainsi, le contaminant va s'associer à une molécule ou un ion présent dans l'eau, dans la solution du sol ou dans le sol pour former un complexe. Ce complexe présente alors de nouvelles propriétés qui peuvent être très différentes du contaminant et modifier fortement son comportement et sa mobilité dans le sol (Lemière et al., 2001). La complexation tend à favoriser la mobilité des polluants (Hanna, 2004).

2.3.1.3 L'adsorption

Le mécanisme d'adsorption est le principal mécanisme qui va générer une association des résidus de médicaments et des ETMs avec les matières organiques et inorganiques des différentes matrices sol/Mafors. De ce fait, l'adsorption des polluants réduit leur dispersion et leur biodisponibilité, conduisant ainsi à leur séquestration à plus ou moins long terme dans les matrices sol/Mafors (Xu et al., 2009). Ce mécanisme est basé sur l'interaction entre le polluant et une surface, et fait intervenir des interactions van der Waals, dipolaires et des liaisons covalentes (Gothwal and Shashidhar, 2015).

L'adsorption d'un polluant organique ou inorganique dans une matrice organique, sol et/ou Mafor, peut être déterminée expérimentalement par la réalisation d'essais d'adsorption à différentes concentrations et à température contrôlée. Les résultats permettent de calculer une constante d'équilibre d'adsorption K_{OC} , coefficient d'adsorption au carbone organique des sols, exprimé en $\log K_{OC}$. La constante K_{OC} est le rapport de concentration à l'équilibre

d'un composé entre la matière organique (exprimée en carbone organique contenu dans la matrice solide) et la phase eau. La capacité d'adsorption d'un polluant organique peut également être estimée à partir du coefficient de partage n-octanol/eau, exprimé en général en $\log K_{ow}$. La constante K_{ow} est le rapport de concentration à l'équilibre d'un composé entre une phase n-octanol et une phase eau. Cette constante atteste de la polarité du composé. Un composé avec une K_{oc} élevée aura plus d'affinité à se fixer sur la matière organique : un composé avec un $\log K_{ow} < 2,5$ signifie un composé organique polaire, facilement mobilisé par l'eau de pluie et biodisponible. En revanche, un $\log K_{ow} > 4$ signifie un composé apolaire, favorable à une adsorption sur la matière organique constitutive de la matrice et potentiellement accumulable dans les graisses et les tissus organiques des organismes (Mompelat et al., 2009).

Cas des résidus de médicaments

Parmi les différentes familles d'antibiotiques, les macrolides, les quinolones et les tétracyclines présentent une capacité d'adsorption plus élevée que les autres antibiotiques (Pan and Chu, 2016 ; Rabølle and Spliid, 2000). En revanche, les sulfonamides sont considérés comme la famille d'antibiotiques la plus mobile dans l'environnement et sont facilement transférés vers les eaux de surfaces en raison de leur faible capacité d'adsorption avec la matière organique (K_{oc} de 0,23) (Figueroa-Diva et al., 2010 ; Kay et al., 2004). Les mécanismes sont complexes et peuvent parfois entrer en conflit. Par exemple, le K_{ow} des fluoroquinolones est faible ($< 2,5$), ce qui suppose un composé polaire ayant une forte affinité avec l'eau (Verlicchi et al., 2010). Pourtant, les travaux de W. Li et al. (2013) retrouvent des fluoroquinolones à des concentrations moyennes de $9\ 200\ \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS dans des boues d'épuration. La forte concentration dans les boues d'épuration s'expliquent du fait des propriétés physicochimiques des fluoroquinolones qui présentent également un K_{oc} élevé, ce qui signifie également une forte affinité avec la matière organique (Van Doorslaer et al., 2014 ; Picó and Andreu, 2007).

2.3.2 Processus influençant la mobilité et le devenir des polluants dans le sol

De nombreux facteurs biotiques et abiotiques vont interagir avec les polluants dans le sol (**Figure 6**). Ces interactions gouvernent la mobilité des polluants vers d'autres constituants

du sol ou vers d'autres compartiments, de leur rétention ou encore de leur dégradation (Durães et al., 2018 ; Gothwal and Shashidhar, 2015 ; Lemièrre et al., 2001).

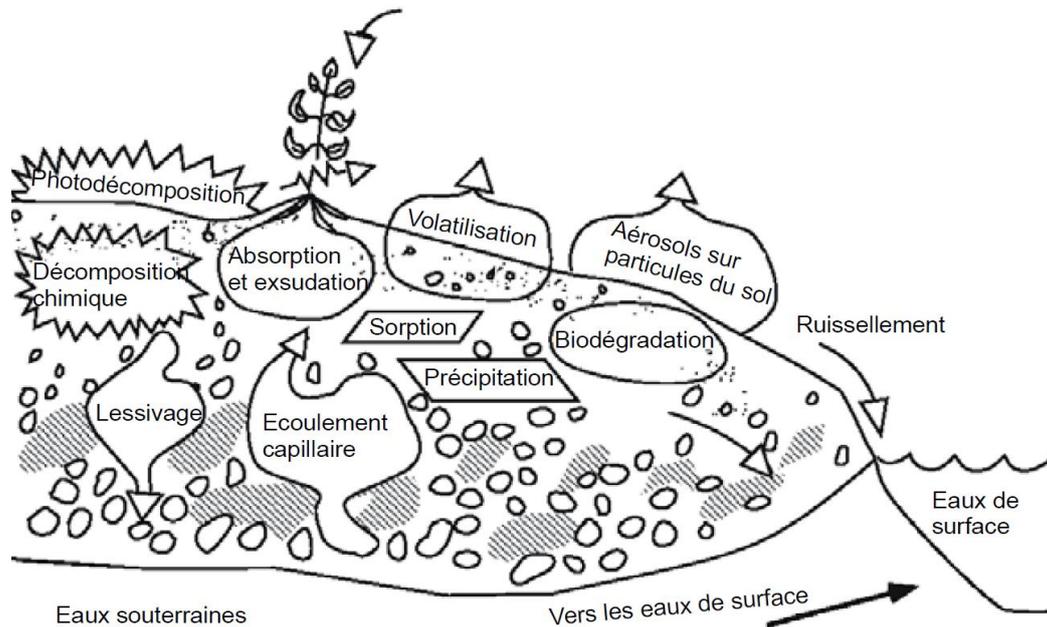


Figure 6. Processus déterminant la mobilité et le comportement des contaminants au niveau du sol (Lemièrre et al., 2001 ; Sims et al., 1984).

2.3.2.1 Rétention des polluants

La teneur en matière organique joue un rôle clé sur l'adsorption et la biodisponibilité des polluants dans le sol (Senesi and Loffredo, 2009 ; Gabriel and Williamson, 2004). Plus précisément, la composition structurale et fonctionnelle de la matière organique régit principalement les processus d'adsorption des polluants organiques et des ETMs dans le sol (Gothwal and Shashidhar, 2015 ; Gabriel and Williamson, 2004). Dans un contexte d'épandage agricole de Mafors, l'apport de matière organique favorise la rétention des polluants présentant un K_{oc} élevé dans les sols agricoles (Monteiro and Boxall, 2009). De plus, la composition minérale du sol, déterminée par la teneur en argile, limon et sable, joue également un rôle majeur dans la rétention des polluants dans les sols (Gabriel and Williamson, 2004 ; Lemièrre et al., 2001). Un sol riche en argile retiendra les ETMs et les résidus de médicaments par le phénomène d'adsorption sur leur surface et diminuera leur mobilité (Leal et al., 2013).

Les processus biotiques ont également un impact majeur sur la rétention et la fixation des polluants. En effet, la bioaccumulation des polluants par les organismes vivants résulte de

l'absorption directe des polluants adsorbés sur un support (bioconcentration) ou indirecte par la chaîne alimentaire (bioamplification) (Mackay and Fraser, 2000). La bioconcentration se produit lorsque le contaminant est stocké à des concentrations plus élevées dans l'organisme que dans le sol. Ainsi, la bioaccumulation s'observe lorsque les flux d'absorption du polluant sont plus élevés que leur excrétion et que la concentration interne du polluant augmente dans l'organisme. Les microorganismes du sol et/ou de la Mafor peuvent également agir indirectement sur les polluants en dégradant les surfaces d'adsorption des argiles ou des matières organiques. De ce fait, les polluants sont à nouveau remobilisés dans les différents compartiments et biodisponibles.

2.3.2.2 **Dégradation des polluants**

Dans les conditions environnementales, les polluants organiques peuvent subir une dégradation due à plusieurs processus telles que la photodégradation, la décomposition chimique et la biodégradation (Thiele-Brun and Peters, 2007). La biodégradation est principalement réalisée par les microorganismes grâce à des transformations enzymatiques (Pan and Chu, 2016 ; Xu et al., 2009). Cette biodégradation joue un rôle majeur dans l'élimination des antibiotiques dans l'environnement (Caracciolo et al., 2015 ; Yang et al., 2012).

La dégradation des polluants organiques peut conduire à la formation de métabolites. Ces métabolites possèdent de nouvelles propriétés physicochimiques, parfois différentes de la molécule initiale, modifiant leur comportement et leur mobilité dans l'environnement. Ainsi, certains métabolites deviennent stables ou plus toxiques par rapport à la molécule mère (Mejias et al., 2021 ; Kümmerer, 2009).

2.3.2.3 **Mobilité des polluants vers les autres compartiments**

Le transport des polluants est majoritairement réalisé par les processus abiotiques qui incluent une mobilité des polluants sous forme dissoute dans l'eau ou la solution du sol, ou sous forme particulaire avec l'action de l'eau, de l'air et des mouvements du sol (Durães et al., 2018). Les processus de lessivage, d'infiltration et de ruissellement peuvent conduire au transfert des polluants présents dans les sols vers d'autres compartiments, tels que les eaux de surface et les eaux souterraines (Durães et al., 2018 ; Lemièrre et al., 2001).

Le processus de lessivage des polluants dans les sols va dépendre de la capacité du polluant à se solubiliser, à s'adsorber et à se complexer ainsi que les propriétés physicochimiques du sol, des conditions météorologiques et de la présence de matières organiques. L'épandage des Mafors réduit le lessivage en surface par l'apport de matières organiques qui favorise l'adsorption des polluants (Jones et al., 2005).

2.3.2.4 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux tels que la température et le pH vont intervenir sur la structure des composés modifiant ainsi leur adsorption, leur dégradation et leur mobilité dans le sol. Parmi ces facteurs environnementaux, le pH et les conditions redox sont les principaux processus qui gouvernent la rétention des polluants (Kümmerer, 2009).

Dans un sol, le pH correspond à un équilibre entre la concentration en protons (H^+) et les particules du sol présentant majoritairement des charges négatives à leur surface. Ces valeurs de pH sont affectées par la composition minérale du sol et par les réactions d'altération des éléments constitutifs du sol. Le pH joue un rôle très important dans les processus de dissolution, d'adsorption et de précipitation. De ce fait, le pH influence fortement la mobilité et la disponibilité des polluants. L'augmentation de la mobilité des polluants sera favorisée dans un sol acide et/ou l'apport de Mafors acides (Leal et al., 2013 ; Bliefert and Perraud, 2007). En revanche, l'augmentation du pH favorisera l'adsorption des polluants aux particules de sol (Nahmani et al., 2007).

2.4 Écotoxicité des Mafors sur les organismes vivants

Les Mafors sont donc des vecteurs de polluants dans les sols. Ces polluants, comme les ETMs et les résidus de médicaments, sont connus pour affecter les organismes terrestres tels que les microorganismes, les plantes et les macro-invertébrés (Alengebawy et al., 2021 ; Gomes et al., 2017). Ainsi, la toxicité des Mafors associées à leur épandage a été étudiée pour évaluer les risques écotoxicologiques vis-à-vis des organismes du sol. L'étude de la contamination des sols nécessite l'utilisation de plusieurs organismes issus de différents niveaux trophiques comme les microorganismes, les plantes et les invertébrés (Žaltauskaitė et al., 2016 ; Huguier et al., 2015 ; Moreira et al., 2008).

2.4.1 Microorganismes

Le suivi des populations microbiennes à la suite d'un épandage est très intéressant en raison de leur action primordiale dans le cycle biogéochimique des nutriments (Lavelle and Spain, 2001). Les microorganismes jouent en effet un rôle important dans la dégradation de la matière organique apportée par les Mafors en composés minéraux assimilables par les plantes. Un effet négatif sur les microorganismes aura pour conséquence de perturber les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore avec le risque de modifier la fertilité du sol.

L'apport de Mafors stimule l'activité microbienne dans les sols agricoles (Lazcano et al., 2021). Cette stimulation se traduit par une augmentation de l'abondance et de la diversité microbiennes avec, pour conséquence positive, l'amélioration des fonctions écosystémiques du sol (Lazcano et al., 2021 ; Treonis et al., 2010 ; Carbonell et al., 2009). Cependant, l'épandage de certaines Mafors impacterait négativement les communautés microbiennes. Les travaux de Markowicz et al. (2021) tendent à montrer une diminution de l'abondance des bactéries, de l'activité enzymatique du sol et de la diversité bactérienne après un épandage sur champ à des doses d'épandage agronomiques de boues d'épuration. La diminution de l'activité microbienne peut être causée par la présence de résidus de médicaments dans les Mafors (Caracciolo et al., 2015).

Pour évaluer les effets des Mafors sur les communautés microbiennes, de nombreux bioindicateurs microbiens existent. Les tests d'inhibition de la multiplication microbienne sont majoritairement utilisés comme le suivi de la respiration du sol et des activités enzymatiques (Ramakrishnan et al., 2011).

2.4.2 Plantes

Les plantes jouent un rôle de purification et de détoxification des différents compartiments environnementaux. Elles impactent directement ou indirectement le sol par leurs racines dans la rhizosphère, zone d'échanges entre le sol et les racines (Lavelle and Spain, 2001 ; Lynch and De Leij, 2001). Dans cette zone, les racines des plantes modifient fortement les paramètres physicochimiques et biologiques (Lavelle and Spain, 2001 ; Stengel and Gelin, 1998). Pour ces raisons, les plantes sont souvent utilisées comme bioindicateurs dans l'étude de l'écotoxicité des sols contaminés, y compris les sols amendés en Mafors.

Les effets bénéfiques de l'épandage de Mafors sur les plantes sont principalement dus à l'amélioration de la fertilité du sol avec pour effet une augmentation de leur croissance (Hossain et al., 2017). Des effets indésirables sont toutefois identifiés selon les conditions d'épandage et les caractéristiques des Mafors utilisées. La phytotoxicité des boues d'épuration dépend en grande partie de ses propriétés intrinsèques, de la dose d'épandage, de l'espèce, du type de substrat, des paramètres biologiques mesurés et de la durée d'exposition (Žaltauskaitė et al., 2016). Les effets phytotoxiques observés sont les impacts sur la germination, sur la croissance et sur le développement des plantes. En effet, l'amendement de sols agricoles par des boues d'épuration et des composts peut induire une inhibition de la germination et une inhibition de la croissance des plantes (Žaltauskaitė et al., 2016 ; Domene et al., 2011 ; Oleszczuk and Hollert, 2011 ; Carbonell et al., 2009 ; Domene et al., 2008). Ces inhibitions seraient liées à la présence de polluants dont les ETMs (Gill, 2014).

Les polluants présents dans les Mafors sont également susceptibles de se bioaccumuler dans les plantes par absorption (Bouallegue, 2011 ; Carbonell et al., 2009 ; Chassin et al., 1996). Le transfert des polluants vers les plantes s'effectue par différentes voies, telles que l'adsorption sur la surface racinaire, l'assimilation racinaire, la translocation et l'assimilation foliaire (Duarte-Davidson and Jones, 1996). La bioaccumulation des polluants dépend fortement des caractéristiques de l'espèce étudiée, des caractéristiques physicochimiques des polluants et des conditions environnementales (Schroll et al., 1994). Après intégration dans les tissus des plantes *via* le système racinaire, les polluants peuvent migrer vers d'autres structures, se transformer en d'autres composés par des processus de dégradation ou être stockés. Certains polluants sont connus pour se bioaccumuler dans les plantes comme les ETMs (Aladesanmi et al., 2019 ; Agrawal et al., 2009). La bioaccumulation des résidus de médicaments est encore peu étudiée. Toutefois, quelques travaux tendent à confirmer la bioaccumulation de certaines familles d'antibiotiques comme les tétracyclines, les fluoroquinolones et les sulfonamides dans les plantes (Kodešová et al., 2019 ; Pan and Chu, 2017 ; Li et al., 2014 ; Sabourin et al., 2012 ; Hu et al., 2010 ; Jin et al., 2009 ; Dolliver et al., 2007).

2.4.3 Macroorganismes

Les invertébrés du sol sont considérés comme de bons organismes sentinelles pour suivre la contamination chimique (Cortet et al., 1999). En effet, le contact direct avec le sol, l'eau interstitielle et par ingestion de sol provoque une exposition continue des invertébrés. Les organismes les plus couramment utilisés dans l'évaluation des risques de toxicité des sols contaminés sont les vers de terre (Reinecke and Reinecke, 2004), les escargots (Baroudi et al., 2020) et les collemboles (Filser et al., 2014). Ces invertébrés ont également été utilisés pour évaluer l'impact écotoxique des Mafors sur les macroorganismes du sol (Courtois et al., 2021b ; Domene et al., 2011 ; Tidona et al., 2009 ; Gunadi and Edwards, 2003 ; Domene et al., 2008). Par leur rôle pour la fertilisation des sols agricoles et leur intérêt dans l'évaluation des risques, notre analyse des connaissances scientifiques s'est concentrée sur les vers de terre dans le chapitre suivant.

Points clés à retenir

- ✓ L'épandage des boues d'épuration et des effluents d'élevage est la source de contamination en résidus de médicaments et ETMs dans les sols agricoles.
- ✓ Les antibiotiques des familles tétracyclines et sulfonamides constituent la majeure partie des résidus de médicaments identifiés dans les effluents d'élevage alors que les fluoroquinolones sont les antibiotiques majoritaires dans les boues d'épuration.
- ✓ Le cuivre et le zinc sont les ETMs les plus concentrés dans les Mafors. Certains ETMs tels que le cadmium et le mercure sont considérés comme écotoxiques vis-à-vis des organismes du sol à faible dose.
- ✓ Les polluants sont présents dans les différents constituants du sol en fonction de leurs propriétés intrinsèques. L'adsorption est le mécanisme d'interaction majeur qui détermine leur mobilité dans le sol.
- ✓ Les paramètres physico-chimiques du sol tels que le pH, la matière organique et la composition minérale du sol influencent le comportement et la mobilité des polluants dans les différents constituants du sol et dans les différents compartiments de l'écosystème terrestre.
- ✓ La dégradation des polluants organiques peut générer des métabolites encore plus écotoxiques que les composés mères.
- ✓ Les analyses chimiques des sols amendés ont révélé des ETMs et des résidus de médicaments à des concentrations quantifiables pouvant générer un risque écotoxique pour les organismes du sol.
- ✓ L'épandage de Mafors induit des effets écotoxiques sur les microorganismes, les plantes et les macro-invertébrés. Ces organismes sont également utilisés dans les bioessais pour évaluer les risques environnementaux.

Chapitre 3. Le ver de terre comme modèle d'étude

3.1 Généralités

Les vers de terre sont des invertébrés terrestres appartenant à la macrofaune du sol (Lavelle and Spain, 2001). D'un point de vue taxonomique, les vers de terre appartiennent à l'embranchement des annélides, dans la classe des clitellates, la sous-classe des oligochètes et l'ordre des Haplotaxida. Les vers de terre appelés également lombriciens est le nom commun regroupant l'ensemble des espèces appartenant au sous-ordre des Lumbricina. La majorité des vers de terre en France appartiennent à la famille des *Lumbricidae* (Bouché, 1972).

L'anatomie du ver de terre se compose de segments appelés métamères qui forment trois régions distinctes : la première région est composée du prostomium et du péristomium qui portent les organes sensoriels et la bouche, la deuxième région nommée pygidium correspond à l'anus et la troisième région est le soma (Bouché, 1972). Les organes sensoriels se composent de chimiorécepteurs qui leur permettent de détecter certaines molécules comme le glucose, la quinine ou encore le saccharose dans le sol et également les signaux chimiques de champignons (Zirbes et al., 2011). La mobilité est assurée par contraction et l'élongation de leurs muscles situés à la base des soies, fines extensions tégumentaires chitineuses leurs permettant de s'accrocher au sol et de se déplacer.

Le système digestif traverse l'ensemble des métamères en commençant par la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, le jabot, le gésier et enfin l'intestin qui se termine par le prostomium (Figure 7). L'intestin présente une très forte activité microbienne et de nombreuses enzymes de digestion originaire du tractus digestif. L'activité microbienne et l'activité enzymatique accélère la décomposition des aliments (Bouché, 1972).

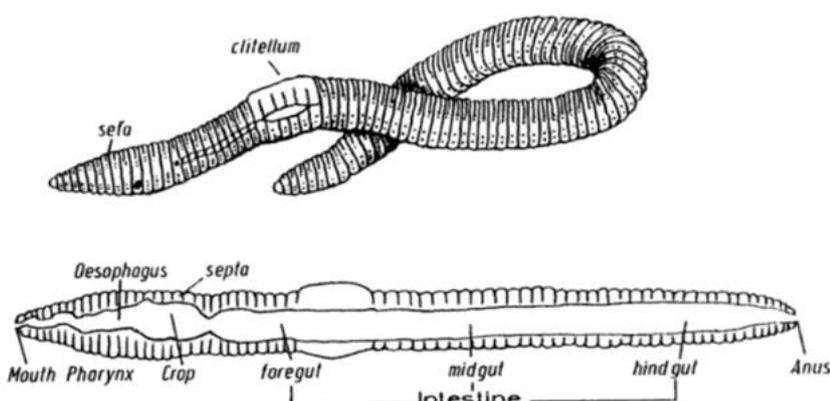


Figure 7. Morphologie externe et interne d'un ver de terre appartenant au sous-ordre des *Lumbricina* (Benckiser, 1997).

Les vers de terre sont hermaphrodites protandres⁵ avec une fécondation externe et un développement direct sans stade larvaire. La plupart des familles de vers de terre sont biparentaux et s'accouplent tête-bêche sur la partie ventrale pour s'échanger leur sperme. Le sperme est transféré du pore mâle vers les spermathèques de l'autre individu grâce à la bande génitale. Lors de la maturité génitale, ils possèdent un clitellum formé par un renflement d'anneau où un cocon muqueux est produit et les ovules déposés (**Figure 8**). La fixation des vers de terre pour la copulation s'effectue grâce à des soies génitales et des sécrétions. Lorsque les ovules sont matures, le clitellum sécrète un mucus qui donnera un cocon contenant des éléments nutritifs. Ce cocon glissera par la suite afin de réceptionner les spermatozoïdes de l'autre ver de terre stockés dans les spermathèques afin de réaliser la fécondation (Bouché, 1972).

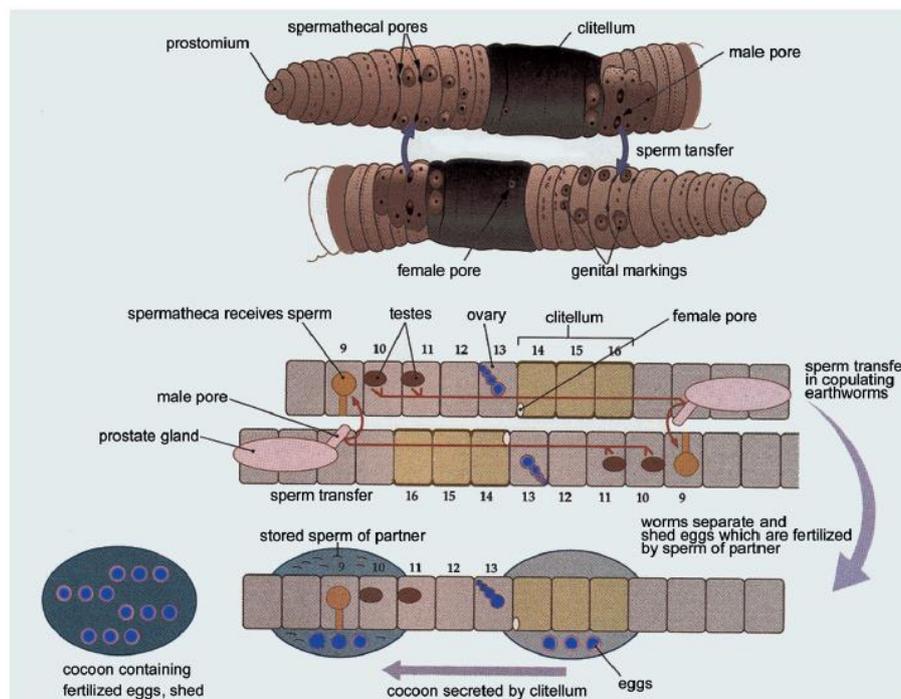


Figure 8. Reproduction du ver de terre du genre *Spenceriella*, famille *Megascolecidae* (Jamieson and Ferraguti, 2006).

La durée du cycle de vie des vers de terre varie en fonction de l'espèce et des conditions du milieu. Par exemple, *Eisenia fetida* est un ver de fumier qui a un cycle de vie qui dure de 45 à 51 jours dans des conditions optimales (Dominguez and Edwards, 2010). L'accouplement des vers de terre se déroule généralement à la surface du sol. Après accouplement, les deux

⁵ Les vers de terre possèdent les organes génitaux mâles et femelles qui s'activent successivement.

individus produisent des cocons qui seront déposés près de la surface du sol dans des conditions humides ou en profondeur lorsque les conditions sont sèches (Edwards and Bohlen, 1996). Les cocons sont des structures fibreuses généralement de petite taille avec des formes et des couleurs qui varient en fonction de l'espèce (**Figure 9**). Ces cocons sont mous lorsqu'ils sont produits mais deviennent plus durs et très résistants aux conditions extrêmes comme la sécheresse (Edwards and Bohlen, 1996). Le nombre de cocons produits par an varie en fonction de l'espèce, de la saison, de leur âge et des conditions environnementales. L'espèce *Aporrectodea caliginosa* produit 27 cocons par an, l'espèce *Lumbricus terrestris* 17 cocons par an, mais d'autres espèces qui appartiennent au groupe des épigés dont les genres *Lumbricus* et *Dendrobaena* peuvent en produire jusqu'à 106 par an (Satchell, 1967). Le temps d'incubation des cocons et le nombre de vers de terre à l'éclosion diffèrent en fonction des espèces et des conditions environnementales. Les cocons peuvent contenir de 1 à 4 ovules mais en général un à deux vers de terre en ressortent (Edwards and Bohlen, 1996). Les vers de terre atteignent leur maturité après quelques mois selon les espèces. Des conditions défavorables (sécheresse, froid, etc.) peuvent retarder fortement la maturité des juvéniles (Edwards and Bohlen, 1996).

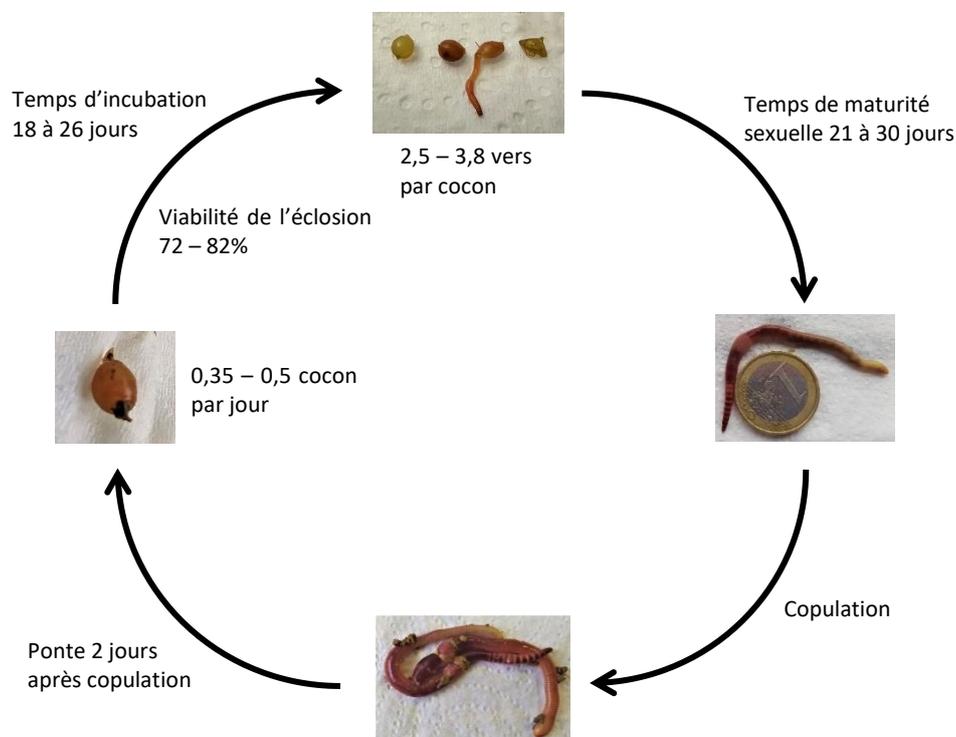


Figure 9. Cycle de vie dans des conditions optimales (température 25 °C et humidité 80 %) d'un ver de terre épigé *Eisenia fetida* (Dominguez and Edwards, 2010).

3.2 Groupes fonctionnels des vers de terre

La distribution verticale des vers de terre dans les sols a donné une nouvelle approche à l'étude fonctionnelle des vers de terre (Wilcke, 1953). Suite à ces travaux, une nouvelle classification a été mise en place par plusieurs auteurs dont Bouché (1972) afin d'identifier les divers types fonctionnels des vers de terre et leurs distributions dans l'écosystème. Elle est basée sur leurs morphologie, leurs cycles de vie, leurs comportements et la profondeur de sol dans laquelle la durée de leurs activités est la plus importante. Toutefois, cette classification reste discutable puisque la distribution verticale des vers de terre est influencée par les conditions mésologiques telles que la saison, le climat, la compétition et l'activité humaine (Bouché, 1972). Par exemple, *Eisenia fetida* est considéré comme un ver de fumier mais il est rarement retrouvé dans les excréments d'un animal en dehors d'une ferme. En effet, on le retrouve naturellement dans le bois en putréfaction qui se fait rare dans les forêts françaises en raison de l'action humaine (Bouché, 1972).

Les trois principaux groupes fonctionnels issus de cette classification sont les épigés, les endogés et les anéciques (**Figure 10**). L'utilisation des sous-catégories mentionnées dans l'étude de Bouché (1972) ou l'utilisation des pourcentages relatifs à ces trois principaux groupes sont utilisés pour catégoriser plus précisément une espèce (Capowiez et al., 2022 ; Botinelli et al., 2021). En fonction des trois groupes fonctionnels principaux, des caractéristiques communes des vers de terres ont été décrites par Bouché (1977, 1972).

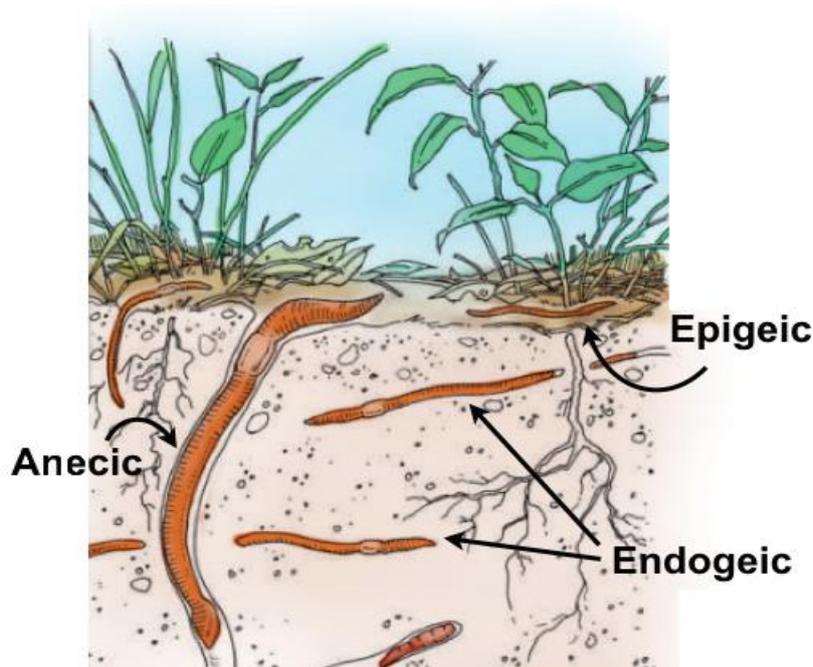


Figure 10. Représentation des trois principaux groupes fonctionnels des vers de terre (Lavelle et al., 2000).

Les épigés sont des vers de terre de petite taille (10 à 30 mm) avec une pigmentation importante et homochrome qui varie en fonction de la litière (rouge, rose) (**Figure 11**). Leur musculature de contraction longitudinale et de fouille est faible. Dans des conditions normales, ces vers de terre vivent dans la litière mais présentent également des adaptations pour le bois mort et l'accumulation temporaire de matières organiques. Ils ont un cycle de vie court et un taux de reproduction très élevé (**Figure 9**). Vivant hors du sol, ils sont soumis à une forte prédation qu'ils compensent grâce à une mobilité importante leur permettant un comportement de fuite. Ils sont également soumis aux aléas climatiques qu'ils peuvent compenser par une lubrification importante.

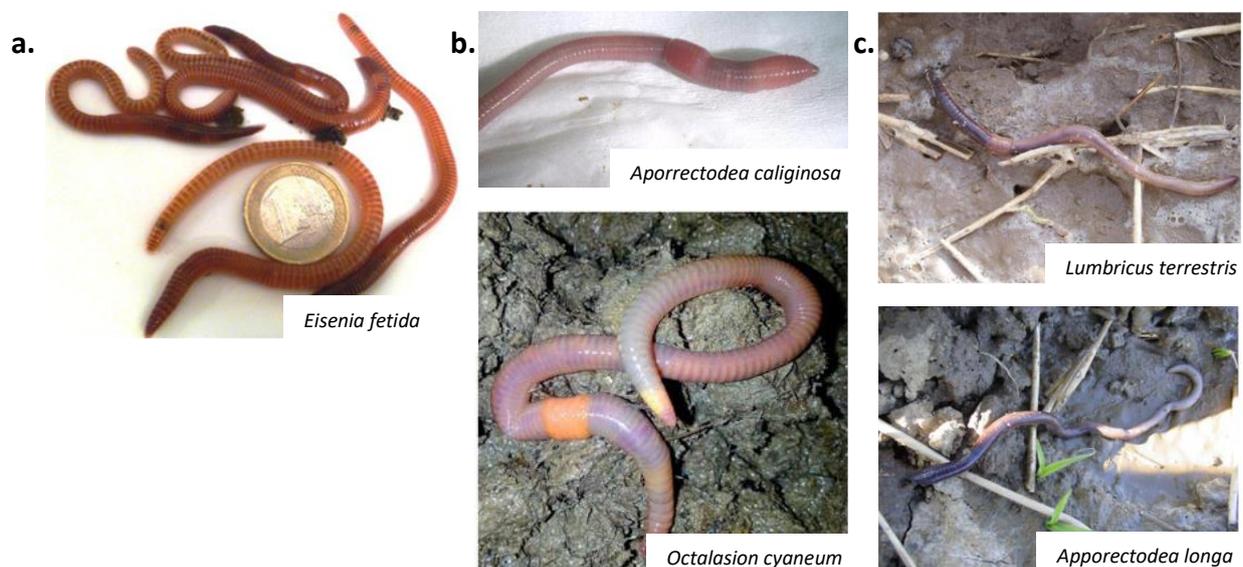


Figure 11. Photographie de différentes espèces de vers de terre classées dans les trois principaux groupes fonctionnels (Pelosi et al., 2014 ; Bouché, 1972). « a » correspond au groupe fonctionnel épigé, « b » au groupe fonctionnel endogé et « c » au groupe fonctionnel anécique.

Les endogés sont des vers de terre avec une faible pigmentation et des tailles variables (**Figure 11**). Ils possèdent une contracture longitudinale faible mais une bonne musculature de fouille. Ils vivent dans le substrat organo-minéral du sol et créent des galeries principalement horizontales en se nourrissant de racines mortes et de matières organiques intégrées au substrat. La faible teneur en matière organique dans le sol est compensée par une surface intestinale d'échanges très développée. Leurs caractères morphologiques peuvent se rapprocher des épigés lorsqu'ils vivent près de la surface du sol. Lorsque les

conditions sont défavorables, ils peuvent passer en quiescence avec un arrêt de leur activité. Leur taux de reproduction est faible.

Les anéciques sont des vers de terre de grande taille (20 à 110 cm) avec une pigmentation rouge, brune à noirâtre et souvent dorsale (**Figure 11**). Ils possèdent une musculature de fouille et une contracture longitudinale très développée. Ces vers de terre vivent dans le sol en créant des galeries le plus souvent verticales et très profondes (1 à 6 m) qu'ils utilisent pour se nourrir la nuit dans la litière et en l'entraînant en profondeur dans le sol. Ils sont soumis à la prédation qu'ils compensent avec un retrait rapide par contraction et un fort pouvoir de régénération. Ils peuvent se mettre en diapause ou en quiescence lorsque les conditions sont défavorables. Leur taux de reproduction est faible.

3.3 Rôles dans les écosystèmes terrestres

Les vers de terre représentent la biomasse la plus importante de la macrofaune du sol dans de nombreux types de sol (Edwards and Bohlen, 1996 ; Bouché, 1972). Dans les sols de type prairie, les vers de terre peuvent atteindre plus de 71 % de la biomasse totale des métazoaires du sol (Bouché, 1972). Plus de 1 000 individus/m² et 200 g/m² ont déjà été observés (Edwards, 1997). Les vers de terre réalisent de nombreuses fonctions écosystémiques les qualifiant de bioingénieurs dans de nombreux écosystèmes (Edwards, 1997). Leur forte biomasse rend les actions des vers de terre non négligeables dans les écosystèmes. L'activité des vers de terre impacte la formation des sols, l'aération des sols, les processus de décomposition de la matière organique et le cycle des nutriments (Blouin et al., 2013 ; Cortez et al., 2000).

L'activité des vers de terre dans un sol réside dans la formation de galeries issues de l'ingestion de sol ou de nouvelles prospections et dans l'enfouissement de la matière organique. Par cette activité, les vers de terre ont une action de bioturbation importante. Ces activités d'ingestion de sol par les vers de terre peuvent atteindre une consommation de 2 à 30 fois leur masse en sol par jour (Lee, 1985). En fonction du groupe fonctionnel, ces activités créent des galeries verticales débouchant à la surface ou des galeries horizontales, les processus d'infiltration de l'eau et d'aération du sol en sont profondément modifiés. Ces galeries définissent une augmentation de la macroporosité du sol qui conduit à une augmentation de la surface d'échanges atmosphère/sol, une augmentation de l'aération et

de l'oxygénation dans les couches inférieures du sol et une augmentation de l'infiltration des eaux (Capowiez et al., 2014 ; Bouché, 1972). Ainsi leur présence favorise indirectement la formation d'une structure de sol intermédiaire entre un sol meuble et un sol compact (Barré et al., 2009 ; Snyder et al., 2009). Cette structure agrégative est induite par les fonctions écosystémiques des vers de terre endogés qui démontre ainsi une bonne fertilité et une bonne dynamique de la matière organique (Abiven et al., 2009).

La matière organique, généralement composée de macromolécules organiques, procure une source de nourriture et un substrat aux organismes du sol. Cette association de macromolécules agit sur le sol en formant des agrégats limitant l'érosion et créant une porosité du sol, une rétention de cations et piège les nutriments sous forme organique (Lavelle and Spain, 2001). Les vers de terre, qualifiés de saprophages, ont la capacité d'assimiler et de décomposer cette matière organique provenant de nombreux déchets organiques. La consommation et le passage de la matière organique dans le tractus digestif des vers de terre augmentent sa minéralisation par fragmentation en éléments nutritifs simples (N, P, K, C_{org}) dans les sols et son humification (Blouin et al., 2013 ; Lavelle and Spain, 2001 ; Cortez et al., 2000). L'étude de Bertelow et al. (1998) recense une diminution du taux de matière organique (48,1 à 30,8 %) dans un sol forestier laissé à l'abandon suite à l'activité des vers de terre (Burtelow et al., 1998). Une autre étude montre une diminution du taux de carbone organique total de 28 % lorsque les vers de terre sont introduits dans des parcelles de culture de maïs (Desjardins et al., 2003). Ces éléments nutritifs simples seront alors remobilisés dans le cycle du carbone, de l'azote, du potassium et du phosphore (Lemtiri et al., 2014). Le passage de la matière organique dans le tractus digestif des vers de terre va également stimuler indirectement l'activité des microorganismes qui sont les principaux décomposeurs de la matière organique du sol. En effet, de 80 à 99,7 % du carbone organique serait décomposé par ceux-ci (Lavelle and Spain, 2001). Les actions de fractionnement et de brassage dans le système digestif des vers de terre décuplent les surfaces d'interaction entre la matière organique du sol et les microorganismes (Lemtiri et al., 2014 ; Bouché, 1972). De plus, les petites molécules résultant de la lyse des éléments organiques par les sécrétions enzymatiques dans le système digestif des vers de terre seront plus facilement assimilables par la microflore intestinale et la microflore de rejet qui se retrouvent dans les fèces des vers de terre (Bouché, 1972). Ces deux conséquences de

l'action des vers de terre accélèrent les processus de minéralisation et accélèrent la dégradation de la matière organique par une stimulation des microorganismes du sol (Lemtiri et al., 2014 ; Brown et al., 2013 ; Sizmur and Hodson, 2009 ; Bouché, 1972).

Grâce à toutes ces actions, les vers de terre contribuent à la fertilisation, à la bioturbation et à l'évolution du sol affectant ainsi les propriétés physiques, chimiques et microbiologiques du sol (Blouin et al., 2013 ; Bartlett et al., 2010 ; Bouché, 1972). Par tous ces attributs, les vers de terre sont des acteurs clés de la santé des sols soumis aux activités anthropiques.

3.4 Interaction avec les polluants

De nombreux polluants sont toxiques pour les organismes terrestres et cette toxicité dépend de plusieurs facteurs :

- Les caractéristiques physicochimiques intrinsèques du polluant ;
- La concentration en polluant ;
- Les conditions d'exposition ;
- Le type d'organismes ;
- Le stade de vie de l'organisme ;
- L'accumulation du polluant dans l'organisme.

Les vers de terre sont très sensibles à la contamination des sols (Lanno et al., 2004). Plusieurs voies d'exposition conduisent à l'interaction des vers de terre avec les polluants. Ils sont les principaux consommateurs de matières organiques et de sol, capables de consommer des résidus agricoles ou des boues d'épuration épandues, substrats majoritairement constitués de matières organiques biodégradables (Bhat et al., 2018). Cette consommation les expose constamment, à travers leur tube digestif, aux contaminants organiques et inorganiques adsorbés sur les particules solides des sols comme la matière organique. L'autre voie d'exposition des contaminants est le contact permanent des vers de terre avec le sol et avec les eaux interstitielles potentiellement chargées en contaminants chimiques solubles. Leur fin tégument facilite la perméabilité à l'eau mais également les contacts directs avec les polluants dans le sol par absorption cutanée. Les caractéristiques spécifiques de chaque polluant telles que leur capacité à se solubiliser ou leur hydrophobicité déterminent des voies préférentielles vers les organismes. L'absorption cutanée serait la voie principale d'exposition aux contaminants chez les vers de terre (Vijver

et al., 2003). Cette capacité à consommer la matière organique, à interagir fortement avec le sol et leur sensibilité à divers polluants classent les vers de terre comme bioindicateurs efficaces dans les études évaluant la contamination des sols (Lanno et al., 2004 ; Jager et al., 2003).

Par leurs activités, les vers de terre influencent le devenir des polluants dans les sols. Leurs activités peuvent en effet altérer directement la disponibilité des polluants : en digérant la matière organique et en favorisant leur biodégradation par les microorganismes, les changements de la chimie du sol tels que le pH modifient le niveau d'adsorption des contaminants sur les particules et leur spéciation. La stimulation des microorganismes accélère également la dégradation des contaminants par les processus de métabolisation et de volatilisation. L'amélioration des propriétés du sol telles que l'infiltration de l'eau dans les sols et la capacité de rétention en eau favorise le transfert des polluants vers les couches inférieures du sol et le transfert vers les plantes (Blouin et al., 2013).

En présence de contaminants, les vers de terre sont capables de les bioaccumuler dans leurs tissus. Ce phénomène de bioaccumulation dépend fortement des espèces et de leur métabolisme (De Vaufleury and Gimbert, 2013). De nombreux polluants organiques s'accumulent dans les tissus des vers de terre par absorption cutanée et ingestion comme les résidus de médicaments et les hydrocarbures aromatiques (Kinney et al., 2008). Les vers de terre bioaccumulent également les ETMs tels que le cadmium, le cuivre, le zinc et le plomb en lien avec de nombreux mécanismes de séquestration (Andre et al., 2009 ; Barrera et al., 2001). Les ETMs se retrouvent principalement bioaccumulés chez les vers de terre dans le tissu chloragène entourant le tube digestif postérieur (Morgan and Morris, 1982). Ce processus de bioaccumulation est gouverné par les propriétés physicochimiques des contaminants et du milieu environnemental, telles que leur concentration dans le milieu, leur spéciation, les propriétés du sol et la durée d'exposition (Hernandez-Soriano, 2012). La bioaccumulation avérée de ces polluants organiques et inorganiques dans les vers de terre conduit à une voie d'entrée dans la chaîne trophique et un risque important de bioamplification. Les vers de terre sont à la base de la chaîne alimentaire et représentent une source d'alimentation importante pour de nombreuses espèces telles que les taupes, les oiseaux, les amphibiens et les poissons.

3.5 Évaluation de l'écotoxicité des Mafors sur les vers de terre

En écotoxicologie terrestre, il existe plusieurs méthodologies pour étudier l'impact d'une contamination. Les essais biologiques sont généralement réalisés en laboratoire et consistent à évaluer l'écotoxicité d'une substance, d'un mélange de substances ou d'un échantillon environnemental comme les Mafors sur un organisme terrestre dans un milieu en conditions contrôlées. L'utilisation des bioessais en laboratoire permet de réaliser des tests répétables, reproductibles et économiques tout en contrôlant les conditions abiotiques (température, photopériode, intensité lumineuse et durée d'exposition) et les conditions biotiques (organisme d'étude, âge) des bioessais.

La biosurveillance *in situ* est également un autre outil de bioévaluation d'un milieu. Cette méthodologie consiste à suivre dans le temps et l'espace l'impact d'une contamination ou d'une modification d'un milieu sur une espèce ou un écosystème. Ces essais, sur terrain expérimental, sont certes plus représentatifs d'une situation réelle, mais sont toutefois plus difficilement réalisables et leur reproductibilité est plus délicate en raison de la variabilité de nombreux facteurs tels les conditions climatiques, les caractéristiques spécifiques du sol, etc.

3.5.1 Essais biologiques sur les vers de terre en laboratoire

Le ver de terre est un modèle biologique très utilisé dans les bioessais en écotoxicologie. L'importance de son utilisation en tant qu'espèce bioindicatrice dans l'évaluation des effets des sols contaminés justifie les efforts de conception de tests standardisés à l'échelle européenne. Parmi les vers de terre utilisés lors des bioessais, *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* sont les espèces les plus couramment utilisées en écotoxicologie terrestre grâce à leur cycle de vie rapide et leur reproduction facilement contrôlée en laboratoire. Toutefois, ces espèces, qualifiées de vers de fumier, sont absentes des sols agricoles français et sont souvent moins sensibles que les autres espèces de vers de terre retrouvées dans les sols. Ils ont également un rôle fonctionnel réduit. Aujourd'hui, d'autres vers de terre comme *Apporectodea caliginosa* sont de plus en plus utilisés dans les essais biologiques en laboratoire pour leur pertinence scientifique et écologique (Bart et al., 2018).

Ces bioessais sur les vers de terre sont séparés en deux catégories en fonction du temps d'exposition :

- 1) Les tests de toxicité aiguë : ils évaluent à court terme les effets d'une substance à forte dose sur l'espèce étudiée, simulant un pic de contamination ;
- 2) Les tests de toxicité chronique : ils évaluent à long terme les effets d'une substance généralement à faible dose.

Les effets écotoxicologiques peuvent se produire à tous les niveaux d'organisation biologique, du niveau moléculaire au niveau de l'écosystème (Fent, 2004). Au cours de ces tests, plusieurs paramètres du cycle de vie des vers de terre sont étudiés tels que le taux de survie, le taux de croissance, le taux de reproduction, et l'accumulation/l'excrétion de polluants. En complément, il est également possible d'évaluer les effets des polluants à l'échelle cellulaire/organe avec la réalisation de tests de neurotoxicité (activité de l'acétylcholine estérase), de génotoxicité (test des comètes) et de biotransformation (activité enzymatique). Selon les résultats, il est parfois possible d'estimer une valeur de référence pour chaque polluant ou échantillon grâce à la détermination d'une concentration létale pour 50 % de la population (CL₅₀) ou une concentration pour laquelle 50 % des effets sont observés (CE₅₀). Ces deux paramètres permettent de comparer deux polluants entre eux et de les classer.

La bioaccumulation des polluants est également un critère d'évaluation permettant d'estimer le risque à l'échelle de l'individu et le transfert des polluants vers la chaîne trophique lors des essais en laboratoire et *in situ*. Cette bioaccumulation donne également une information importante sur la biodisponibilité du polluant dans le milieu. La bioaccumulation chez les vers de terre peut être exprimée par le facteur de bioaccumulation (FBA) mesurée par le rapport de la concentration en contaminant dans le ver de terre et dans le sol.

3.5.1.1 Évaluation de l'écotoxicité d'une substance sur les vers de terre

De nombreuses familles de polluants ont été identifiées dans les Mafors comme les ETMs et les résidus de médicaments (cf. tableau A.1, tableau A.2 et tableau A.4 de l'ANNEXE A, page 248). Pour évaluer l'écotoxicité potentielle de ces polluants sur les vers de terre, la grande

majorité des publications porte sur l'étude d'un sol non contaminé dopé avec un ou plusieurs polluants.

Dans le cas d'une contamination par un polluant, les fractions biodisponibles du polluant dans le milieu vont jouer un rôle prépondérant dans son écotoxicité (**Figure 12**). Ces fractions biodisponibles dépendent de la concentration présente dans le milieu et du substrat utilisé lors des bioessais. Les bioessais sont généralement réalisés sur un substrat « simple » comme un sol sableux ou un sol artificiel ISO ou OCDE constitué de sable, de kaolinite et de tourbe. L'avantage de ces types de substrats est de contrôler la composition du sol et de limiter les interactions entre les polluants et les constituants du sol. Néanmoins, la représentativité de ces sols est réduite par rapport à un sol naturel, dans la mesure où les interactions des polluants avec les constituants du sol auront des conséquences sur leur disponibilité. L'utilisation d'un sol réel permet de réaliser les bioessais dans des conditions plus réalistes où des interactions entre les polluants et les paramètres physicochimiques s'exercent pouvant alors inhiber ou exacerber l'écotoxicité des polluants sur les organismes du sol (Nahmani et al., 2007 ; Spurgeon and Hopkin, 1999).

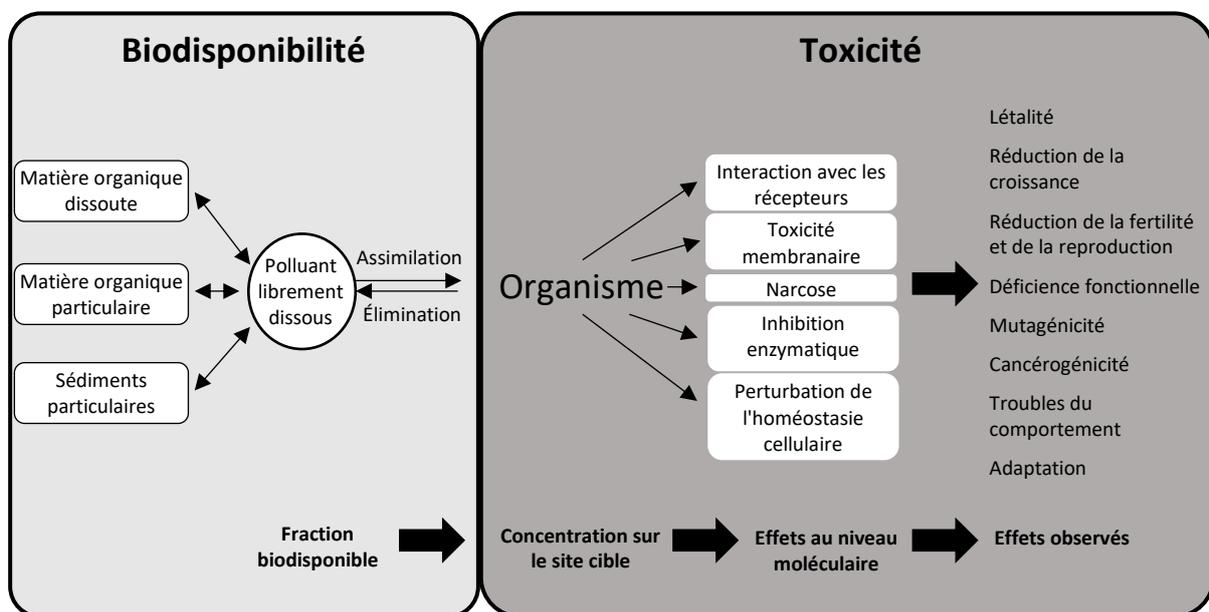


Figure 12. Effets écotoxicologiques en fonction de la fraction biodisponible en polluant (Fent, 2004).

Cas des résidus de médicaments

Les études d'impact des résidus de médicaments sur les vers de terre en laboratoire sont référencées dans le **Tableau 5**. Les bioessais à court terme sur les vers de terre ont permis d'observer l'augmentation du taux de mortalité en fonction de la concentration en résidus de médicaments avec des concentrations de l'ordre du mg.kg^{-1} de sol. Les travaux de Pino et al. (2015) montrent des CL_{50} pour de nombreux résidus de médicaments compris entre 64,8 à 4 000 mg.kg^{-1} MS. Toutefois, certaines concentrations testées ne sont pas représentatives de celles mesurées dans les sols. Dans le cas des Mafors et des sols amendés, les concentrations en résidus de médicaments retrouvées sont nettement plus basses, de l'ordre du $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS (cf. tableau A.1, tableau A.2 et tableau A.4 de l'ANNEXE A, page 248).

Outre la mortalité directe induite par les résidus de médicaments, leurs effets sublétaux doivent être considérés pour une analyse complète de leurs impacts. Ces effets sublétaux se manifestent sur la physiologie et le comportement des vers de terre et peuvent entraîner une diminution de la capacité d'une population à se maintenir à l'équilibre. Ces effets sublétaux peuvent se manifester à faible dose sur une exposition à court terme ou à long terme.

Dans un premier temps, le test d'évitement est capable de réaliser une mesure très sensible de la toxicité à court terme d'un polluant. Les vers de terre possèdent des chimiorécepteurs leur permettant de détecter certaines substances nocives et déclencher un comportement de fuite. Les travaux de Li et al. (2015) mettent en évidence un comportement de fuite dans un sol artificiel OCDE dopé en enrofloxacin grâce à ces tests d'évitement. Dans un second temps, les effets de l'exposition à long terme des vers de terre à des résidus de médicaments peuvent être mesurés par l'évaluation du taux de reproduction, paramètre essentiel dans le maintien des populations des organismes. Le test de reproduction des vers de terre est en mesure d'évaluer les effets des polluants sur les vers de terre après 28 jours d'exposition. Les travaux de Lin et al. (2012) ont permis de détecter une inhibition de la reproduction des vers de terre en présence de chlortétracycline dans le milieu.

Tableau 5. Test d'écotoxicité en laboratoire des résidus de médicaments sur les vers de terre.

Composés	Organismes d'essais	Paramètres étudiés	Substrat d'essai	Références
Ciprofloxacine	<i>Eisenia fetida</i>	Activité enzymatique	Sol	(Wang et al., 2018)
	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sable	(Wen et al., 2011)
Enrofloxacin	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, activité enzymatique	Papier filtre, fumier de vache	(Gao et al., 2008)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction, évitement, respiration	OCDE	(Li et al., 2015)
Tétracycline	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
	<i>Eisenia fetida</i>	Activité enzymatique, génotoxicité	OCDE	(Dong et al., 2012)
Oxytétracycline	<i>Enchytraeus crypticus</i>	Létalité, reproduction	Sable	(Baguer et al., 2000)
	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Croissance, reproduction	Sable	(Baguer et al., 2000)
Chlortétracycline	<i>Eisenia fetida</i>	Reproduction, activité enzymatique	Sol	(Lin et al., 2012)
	<i>Eisenia fetida</i>	Activité enzymatique, génotoxicité	Sol	(Dong et al., 2012)
Tylosine	<i>Enchytraeus crypticus</i>	Létalité, reproduction	Sable	(Baguer et al., 2000)
	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Létalité, croissance, reproduction	Sable	(Baguer et al., 2000)
Sulfaméthoxazole	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
Acide salicylique	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
Ibuprofène	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
Paracétamol	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
Diclofénac	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sol	(Carter et al., 2014)
	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sol	(Carter et al., 2016)
Propranolol	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	OCDE	(Pino et al., 2015)
Carbamazépine	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sol	(Carter et al., 2014)
	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sol	(Carter et al., 2016)
Fluoxétine	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sol	(Carter et al., 2014)
	<i>Eisenia fetida</i>	Bioaccumulation	Sol	(Carter et al., 2016)
Olaquinox	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, activité enzymatique	Papier filtre, fumier de vache	(Gao et al., 2007)

Les bioessais sont parfois complétés par des mesures de biomarqueurs. Un biomarqueur est défini comme étant un changement observable et/ou mesurable aux niveaux moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui se déclenche à la suite d'une exposition à une substance (Lagadic et al., 1997). On distingue les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet. L'organisme mobilise son système de défense dans le but de rendre inactif la substance en l'éliminant ou en la métabolisant. La mesure du niveau d'expression de ces mécanismes va alors traduire l'exposition à des substances toxiques pour les organismes (= biomarqueur d'exposition). En revanche, les biomarqueurs d'effet correspondent à des cibles moléculaires endommagées suite à des mécanismes de défense ou de détoxification insuffisants (dommage à l'ADN). Les travaux de Dong et al. (2012) se sont intéressés à ces deux types de biomarqueurs lors de l'exposition à des résidus de médicaments (tétracycline et chlortétracycline). Les auteurs observent une augmentation des activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et de la chloramphénicol acétyltransférase dans les vers de terre durant une exposition de 28 jours à ces deux résidus pour réduire les radicaux libres. En revanche, les effets génotoxiques ont été observés à plus faible dose lorsque les activités enzymatiques n'étaient pas encore induites.

Certaines molécules ont également été suivies pour évaluer le transfert et la bioaccumulation dans les vers de terre. L'étude de Wen et al. (2011) montre une bioaccumulation de la ciprofloxacine. La carbamazépine, le diclofénac et la fluoxétine ont également été détectés et quantifiés dans les vers de terre durant les travaux de Carter et al. (2016, 2014).

3.5.1.2 Évaluation de l'écotoxicité d'un mélange sol-Mafors sur les vers de terre

L'étude de l'écotoxicité d'un échantillon environnemental comme un sol amendé par une Mafor permet de prendre en compte les interactions entre les contaminants (effets additifs, synergiques et antagonistes) et la matrice sol. Les travaux étudiant les effets de l'épandage de Mafors dans un sol sur les vers de terre en laboratoire sont référencés dans le **Tableau 6**. Ces études réalisent des bioessais d'écotoxicité soit sur un sol artificiel, soit sur un sol naturel amendé par différentes teneurs en Mafors. La majorité des études évalue l'écotoxicité des Mafors sur les vers de terre en suivant les paramètres de survie, de croissance, de reproduction et d'évitement. Quelques études suivent également l'intégrité

cellulaire des vers de terre exposés par l'extraction des coelomocytes⁶. Plus rarement, des travaux suivent l'activité enzymatique et les dommages à l'ADN.

La survie des vers de terre exposés à des Mafors dépend de la teneur testée, du type de Mafors et du sol d'exposition. La plupart des études sur les boues d'épuration ne montre pas d'effet sur la survie des vers de terre en dessous d'une teneur en boues d'épuration dans le sol de 50 g.kg⁻¹ MS (Žaltauskaitė et al., 2016 ; Pivato et al., 2014 ; Domene et al., 2011 ; Carbonell et al., 2009). L'étude de Žaltauskaitė et al. (2016) montre une diminution de la survie à partir de 250 g.kg⁻¹ MS de boues d'épuration. Ces teneurs affectent la survie des vers de terre, mais à des doses d'épandage bien au-dessus de la réalité du terrain (~ 10 g.kg⁻¹ MS).

Des tests plus sensibles tels que l'évaluation du comportement d'évitement et la reproduction sont utilisés pour évaluer les effets à des doses d'épandage beaucoup plus basses. Les vers de terre ont un comportement d'évitement dès 8 g.kg⁻¹ MS en boues d'épuration (Rastetter and Gerhardt, 2017 ; Moreira et al., 2008). À cette même teneur, une diminution de la croissance et du nombre de juvéniles produits des vers de terre exposés est également constatée (Moreira et al., 2008). Des effets reprotoxiques sont observés à des doses proches de 10 g.kg⁻¹ MS de boues urbaines compostées (Pivato et al., 2014). Parmi les rares études sur l'évaluation de l'écotoxicité des effluents agricoles, les auteurs mentionnent des effets reprotoxiques apparaissant à des doses similaires (Parente et al., 2021 ; Huguier et al., 2015). Les récents travaux de Parente et al. (2021) montrent que l'exposition à un lisier de volaille a un impact significatif sur la mortalité des vers de terre dès 60 g.kg⁻¹ MS, une diminution de la croissance dès 40 g.kg⁻¹ MS et une diminution de la reproduction dès 20 g.kg⁻¹ MS. Les travaux de Huguier et al. (2015) révèlent un comportement d'attraction vers le sol amendé à des teneurs en fumier de vache allant jusqu'à 300 g.kg⁻¹ MS et des effets reprotoxiques qu'au-delà de 150 g.kg⁻¹ MS de fumier de vache.

⁶ Cellules immunocompétentes en suspension dans le fluide coelomique des vers de terre.

Tableau 6. Évaluation de l'impact de l'amendement de sol par des Mafors à travers des bioessais en laboratoire sur les vers de terre.

Mafors	Organismes d'essais	Paramètres étudiés	Dose d'épandage (g.kg ⁻¹ MS)	Substrat	Références
Boue d'épuration *1	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction, intégrité cellulaire, bioaccumulation	-	Sol agricole amendé	(Urionabarrenetxea et al., 2022)
Boue secondaire	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	0 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 *3	ISO	(Artuso et al., 2011)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction, bioaccumulation	-	Sol amendé	(Lahive et al., 2017)
Boue secondaire digérée	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	25 ; 50 ; 75 ; 100	Sol artificiel	(Alvarenga et al., 2007)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, bioaccumulation	25 ; 50 ; 100 ; 200 *3	Sol	(Žaltauskaitė et al., 2022)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, bioaccumulation	11,8 ; 23,6 ; 47,2	Sol	(Carbonell et al., 2009)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction, intégrité cellulaire	250 ; 500 ; 750 ; 1000	ISO	(Žaltauskaitė et al., 2016)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction, intégrité cellulaire, bioaccumulation	30 ; 60 ; 100	Sol	(Courtois et al., 2021b)
	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement, reproduction	3,3 ; 16,5 ; 33 ; 165 ; 330	ISO	(Huguier et al., 2015)
	<i>Eisenia andrei</i>	Évitement, reproduction	4, 8	ISO	(Moreira et al., 2008)
Boue secondaire activée	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement	1 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100	LUFA	(Rastetter and Gerhardt, 2017)
Boue secondaire séchée	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction, intégrité cellulaire	250 ; 500 ; 750 ; 1000	ISO	(Žaltauskaitė et al., 2016)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	10 ; 25,1 ; 63,1 ; 158 ; 398 ; 700 ; 1000	Sol artificiel	(Domene et al., 2008)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, reproduction, bioaccumulation	10 ; 20 ; 30 ; 40	Sol	(Kinney et al., 2012)
Boue secondaire compostée	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	1,2 ; 4 ; 20 ; 50	Sol artificiel	(Domene et al., 2011)
Compost de boue d'épuration, déchets verts et déchets organiques	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	25 ; 50 ; 100 ; 400 ; 700 ; 1000	ISO	(Pivato et al., 2014)
Compost digéré de déchets organiques et de déchets verts	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	25 ; 50 ; 100 ; 400 ; 700 ; 1000	ISO	(Pivato et al., 2014)
Compost de déchets organiques et de déchets verts	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	25 ; 50 ; 100 ; 400 ; 700 ; 1000	ISO	(Pivato et al., 2014)
Compost de boue d'épuration et de déchets verts	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Létalité, croissance	10 ; 100	Sol	(Capowiez et al., 2009)
Compost d'ordure ménagère résiduelle	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Létalité, croissance	10 ; 250	Sol	(Capowiez et al., 2009)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	25 ; 50 ; 75 ; 100	Sol artificiel	(Alvarenga et al., 2007)
Compost de déchets verts	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité	25 ; 50 ; 75 ; 100	Sol artificiel	(Alvarenga et al., 2007)
Compost de serre	<i>Eisenia andrei</i>	Létalité, croissance, reproduction, bioaccumulation	1,88 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 60	Sol naturel + LUFA	(González et al., 2013)
Fumier de vache	<i>Amyntas gracilis</i>	Activité enzymatique, dommage à l'ADN, intégrité cellulaire	-	Sol agricole amendé	(Parelho et al., 2018)
	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement, reproduction	3,3 ; 16,5 ; 33 ; 165 ; 330	ISO	(Huguier et al., 2015)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	1000	Aucun	(Gunadi et al., 2003)
Fumier de porc	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	1000	Aucun	(Gunadi et al., 2003)
Lisier de vache	<i>Lumbricus terrestris</i>	Létalité	50 ; 100 ; 200	Sol	(Moinard et al., 2021)
	<i>Apporectodea caliginosa</i>	Létalité	100 ; 200	Sol	(Moinard et al., 2021)

Lisier de volailles	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement	50 ; 100 ; 150 ; 200 ; 250 ; 500 ; 750 ; 1000	ISO	(Parente et al., 2021)
		Létalité	20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100	ISO	(Parente et al., 2021)
		Reproduction, intégrité cellulaire	5 ; 10 ; 20	ISO	(Parente et al., 2021)
Déchets alimentaires	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	1000	Aucun	(Gunadi et al., 2003)
Cendres industrielles	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement, reproduction	1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100	ISO	(Huguier et al., 2015)
Boue de papeterie	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement, reproduction	1,7 ; 8,5 ; 17 ; 34 ; 68	ISO	(Huguier et al., 2015)
Boue de marbre	<i>Eisenia andrei</i>	Létalité, croissance, reproduction, bioaccumulation	2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80	Sol + LUFA	(González et al., 2013)
Biochar	<i>Eisenia fetida</i>	Évitement, croissance, reproduction, activité enzymatique	10, 100, 200	ISO	(Li et al., 2011)
	<i>Eisenia fetida</i>	Létalité, croissance, reproduction	7,1 ; 14,2 ; 21,3 ; 28,3	ISO	(Liesch et al., 2010)
Digestat liquide de mélange *2	<i>Lumbricus terrestris</i>	Létalité	25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 *4	Sol	(Moinard et al., 2021)
	<i>Apporectodea caliginosa</i>	Létalité	25 ; 50 ; 100 ; 200 *4	Sol	(Moinard et al., 2021)
Digestat liquide aéré de mélange *2	<i>Lumbricus terrestris</i>	Létalité	50 ; 100 ; 150 ; 200 *4	Sol	(Moinard et al., 2021)
	<i>Apporectodea caliginosa</i>	Létalité	200 *4	Sol	(Moinard et al., 2021)
Digestat de culture de couverture *2	<i>Lumbricus terrestris</i>	Létalité	25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 *4	Sol	(Moinard et al., 2021)

*1 Traitement de la boue non mentionné ; *2 Mélange composé de lisier, fumier, boue d'épuration, déchets agro-industriels, etc. ; *3 Mg.ha⁻¹ MS ; *4 Matière fraîche

Les travaux précédemment mentionnés s'accordent à dire que les effets écotoxiques des Mafors proviennent en grande partie de la présence de polluants ou de mélange de polluants conduisant à des stress pouvant conduire à la mort des organismes (Parente et al., 2021 ; Žaltauskaitė et al., 2016 ; Moreira et al., 2008). Toutefois, d'autres études mettent également en avant d'autres phénomènes nuisibles aux organismes terrestres dans ces Mafors, tels que la salinité, l'acidité, la présence d'ammoniac, la dessiccation et/ou le manque d'oxygène (Moinard et al., 2021 ; Pivato et al., 2014 ; Artuso et al., 2011). Ces différents impacts écotoxiques vont dépendre principalement des propriétés de la Mafor épandue, de la dose d'épandage, de la durée d'exposition, de l'espèce et du substrat d'exposition (Žaltauskaitė et al., 2016).

3.5.2 Biosurveillance sur site

Les études de terrain pour la bioévaluation des sols sont réparties en deux catégories :

1) Biosurveillance passive

La biosurveillance passive correspond au prélèvement d'organismes autochtones dans le milieu étudié à un temps donné. Ces organismes sont qualifiés d'organismes sentinelles et leur sensibilité servira d'indicateur de changements environnementaux.

Pour évaluer les effets des épandages agricoles, la méthode expérimentale consiste à prélever des organismes dans un sol amendé et dans un sol témoin dans le but de comparer les paramètres suivis. Ces prélèvements peuvent être réalisés à partir de lysimètres mis en place dans le but de délimiter une zone et effectuer le suivi des organismes au cours du temps (Barrera et al., 2001), ou être réalisés en plein champ (Moinard et al., 2021 ; Murchie et al., 2015 ; Capowiez et al., 2009 ; Kinney et al., 2008). La densité, la biomasse, la diversité et la proportion des juvéniles/adultes des vers de terre sont les paramètres classiquement étudiés dans ces études sur les vers de terre.

Les différentes études réalisées sur les Mafors ne montrent pas d'effets délétères sur les vers de terre avec parfois des effets bénéfiques sur la biomasse (Murchie et al., 2015 ; Capowiez et al., 2009). Les travaux de Murchie et al. (2015) suggèrent que l'apport de matières organiques dans le milieu contrebalance les effets négatifs des polluants et notamment du cuivre retrouvé à de fortes concentrations dans le lisier de vache étudié.

2) Biosurveillance active

Les bioessais *in situ* consistent à réaliser des encagements d'organismes pour permettre une biosurveillance active de l'écosystème. L'encagement de vers de terre est très difficile à réaliser contrairement aux escargots qui sont des invertébrés idéaux, restant à la surface et donc facilement encageable, pour réaliser des suivis sur le terrain (Louzon et al., 2022 ; De Vaufleury and Gimbert, 2013 ; De Vaufleury et al., 2006). Une seule étude mentionne l'encagement de vers de terre sur une durée de 48 h dans un milieu contaminé pour évaluer le risque de transfert de polluants (Antunes et al., 2008).

Points clés à retenir

- ✓ Les vers de terre constituent la biomasse la plus importante de la macrofaune du sol.
- ✓ La distribution verticale des vers de terre définit trois groupes fonctionnels principaux : les épigés, les endogés et les anéciques.
- ✓ Les vers de terre contribuent à la bioturbation, à la fertilisation et à l'évolution du sol.
- ✓ Leur interaction avec le sol et leur sensibilité à divers polluants font des vers de terre des bioindicateurs efficaces à l'utilisation des terres par l'activité humaine et à l'évaluation de la contamination des sols.
- ✓ Les vers de terre sont exposés à divers contaminants par plusieurs voies : passivement par le contact tégumentaire avec le sol et les eaux interstitielles du sol et activement par l'ingestion du sol.
- ✓ Les vers de terre sont également capables de bioaccumuler les polluants. Ce phénomène de bioaccumulation représente un risque pour les chaînes trophiques supérieures.
- ✓ En écotoxicologie, le ver de terre *Eisenia fetida* est largement utilisé pour sa facilité à être élevé en laboratoire et pour son cycle de vie rapide.
- ✓ Pour évaluer l'impact des substances ou des échantillons environnementaux, des tests de toxicité aiguë et chronique normés en laboratoire existent sur *Eisenia fetida*.
- ✓ Ces tests consistent à évaluer la survie, la croissance et la reproduction des vers de terre face à une exposition à des sols contaminés ou à des sols amendés.
- ✓ Ces tests écotoxiques sont efficaces pour évaluer les effets des résidus de médicaments sur les vers de terre.
- ✓ L'exposition d'un sol amendé en Mafors peut provoquer des effets négatifs sur les vers de terre. Ces effets dépendent principalement de la Mafor étudiée, de sa dose d'épandage et du substrat d'essai.
- ✓ Par ailleurs, l'évaluation des risques liés à l'épandage des Mafors peut être mesurée par des bioessais *in situ* grâce à de l'encagement d'organismes et par le prélèvement d'organismes sentinelles à un temps donné sur un site d'étude amendé ou non.

Objectifs de la thèse

L'objectif de la première partie de cette thèse était de réaliser un état de l'art sur la pratique d'épandage des Mafors en France, les bénéfices apportés pour la fertilisation des sols et d'identifier les risques environnementaux qu'ils génèrent en termes d'écotoxicité.

Cette thèse vise à mettre en place une démarche expérimentale dans le but d'évaluer l'écotoxicité d'une large gamme de Mafors. Pour cela, différents objectifs de la thèse ont été identifiés :

- Établir un profil des différentes Mafors étudiées avec des analyses chimiques ;
- Caractériser les Mafors en termes de mesures d'effets sur les organismes terrestres à l'aide de bioessais en laboratoire et d'encagement *in situ* ;
- Évaluer le transfert des résidus de médicaments identifiés et des ETMs présents dans les Mafors vers les plantes et les vers de terre ;
- Faire le lien entre les pratiques d'épandage actuelles des Mafors et les effets des Mafors sur les organismes dans le but d'émettre des recommandations sur les doses d'épandage à appliquer afin de garantir leur innocuité sur les organismes terrestres.

Partie 2. Étude expérimentale

Chapitre 4. Matériels et Méthodes

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'écotoxicité de différents Mafors en utilisant les analyses physico-chimiques et les bioessais sur les organismes terrestres. La **Figure 13** présente la démarche expérimentale de la thèse.

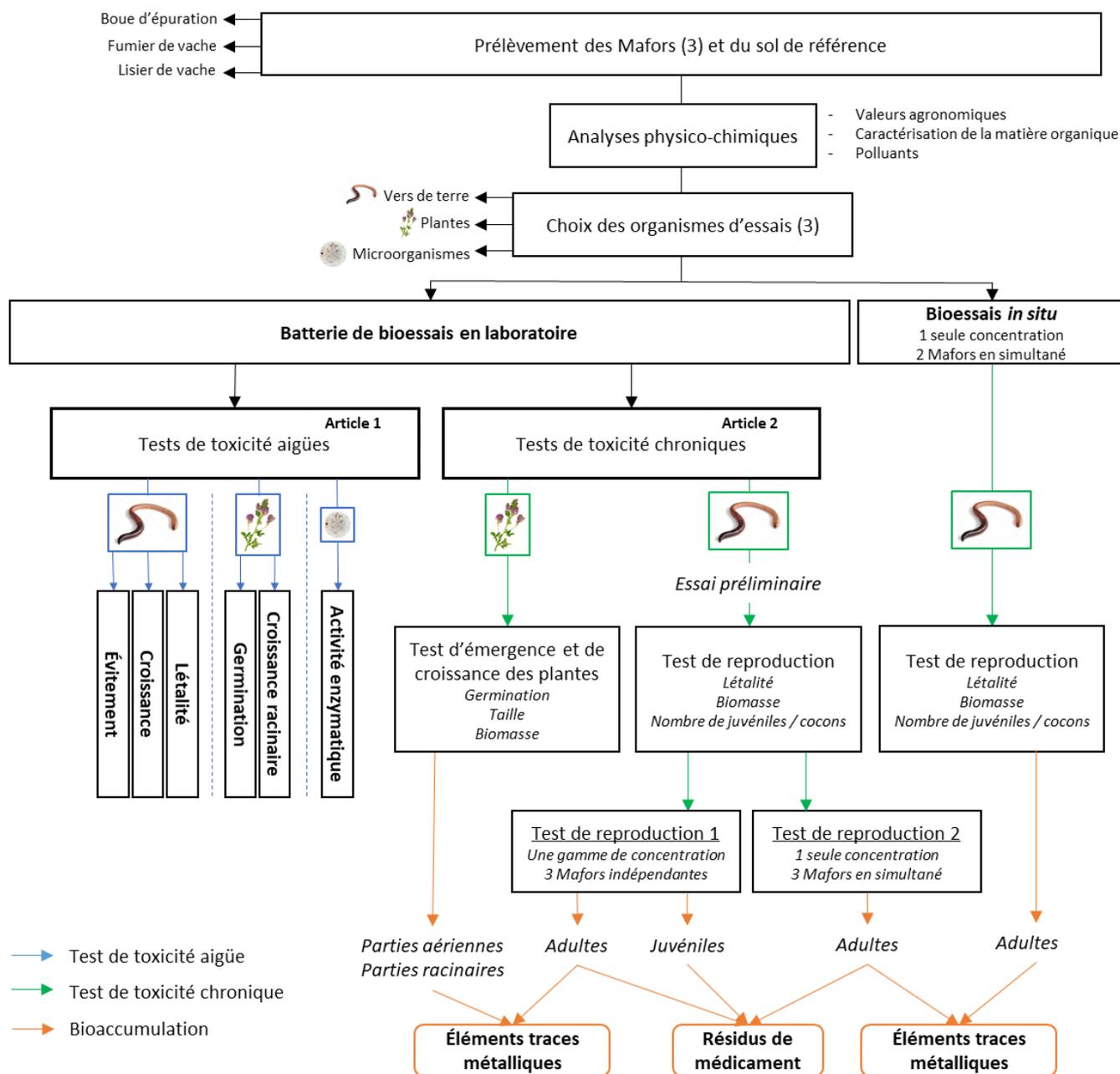


Figure 13. Schéma général de l'organisation expérimentale de la thèse.

La première étape de notre étude porte sur le choix des différents Mafors à étudier et sur la sélection du sol de référence. La sélection des Mafors s'est appuyée sur les données de Mafors épandues en France et les objectifs du programme RISMEAU : une boue d'épuration d'origine urbaine, un fumier de vache et un lisier de vache. Les Mafors étudiées et le sol de référence sont collectés puis, au sein du laboratoire, les différentes matrices sont traitées et stockées.

La deuxième partie de notre étude consiste à caractériser les différentes matrices sélectionnées. Pour cela, des analyses physicochimiques sont réalisées sur les Mafors par les laboratoires partenaires du programme RISMEAU. Certaines analyses sont sous-traitées par des laboratoires extérieurs au projet, c'est le cas des propriétés agronomiques et des polluants organiques persistants. Ainsi, l'ensemble de ces analyses permettent d'estimer d'une part le potentiel agronomique des Mafors, et d'autre part leur écotoxicité potentielle.

La troisième partie de notre étude porte sur l'analyse écotoxicologique des Mafors à travers des bioessais sur différents organismes d'essai. Les tests d'écotoxicité sont distingués en deux catégories :

- Les tests de toxicité aiguë des Mafors réalisés sur les vers de terre, les plantes et les microorganismes à l'aide de bioessais en laboratoire. Cette batterie de tests repose sur l'étude de la survie, de la croissance et du comportement des vers de terre, sur la germination et la croissance racinaire des plantes ainsi que la mesure de l'activité enzymatique dans les sols.
- Les tests de toxicité chronique des Mafors réalisés sur les vers de terre et les plantes. L'évaluation de l'écotoxicité des Mafors sur les plantes est étudiée avec le test d'émergence et de croissance des plantes. Sur les vers de terre, les tests de toxicité chronique sont réalisés en laboratoire et en conditions *in situ* :
 - Pour les tests en laboratoire, les conditions expérimentales ont d'abord été établies à l'aide d'un essai préliminaire pour adapter les conditions mentionnées dans la norme. Puis, deux tests sont effectués : le test de reproduction n° 1 porte sur des tests indépendants réalisés avec une gamme de concentrations par Mafor étudiée ; le test de reproduction n° 2 est réalisé à une unique concentration en Mafors.

- Pour le test de reproduction dans des conditions *in situ*, le test de reproduction est réalisé avec une exposition à une unique concentration en boue d'épuration et en lisier de vache.

La quatrième étape consiste à évaluer le transfert des polluants dans les vers de terre et les plantes exposés aux sols amendés en différents Mafors durant les tests de toxicité chronique. Les sols amendés sont analysés dans le but de connaître la concentration en polluants potentiellement accumulables par les organismes.

4.1 Historique du territoire d'étude

La zone d'étude de ces travaux de recherche se situe à l'échelle du bassin versant de l'Arve dans le département de la Haute-Savoie (74) en France (**Figure 14**). Les matrices étudiées (sol + Mafors) sont prélevées dans cette zone délimitée dans le cadre du programme RISMEAU dans lequel la thèse est intégrée.

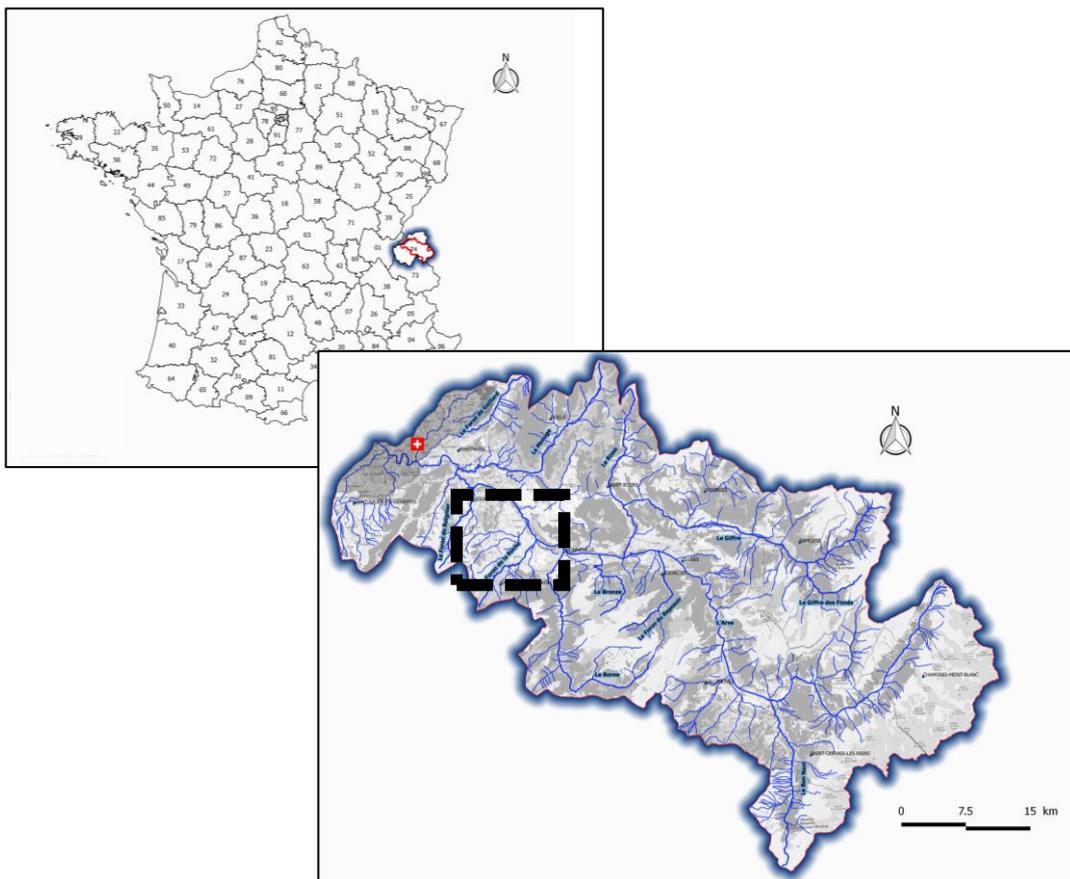


Figure 14. Zone d'étude du projet RISMEAU - Bassin versant de l'Arve situé en Haute-Savoie, France. L'encadré en pointillés noirs représente les zones de prélèvement du sol et des Mafors (Source GEOFLA Département).

La zone d'étude a déjà fait l'objet d'un programme antérieur à RISMEAU avec le site pilote de Bellecombe de l'observatoire SIPIBEL. Cet observatoire actif de 2010 à 2018 avait pour objectifs la caractérisation, la traitabilité et l'étude de l'impact des effluents hospitaliers sur l'activité de la station d'épuration urbaine de Bellecombe. Les caractéristiques des boues d'épuration et des eaux traitées ont été suivies pour évaluer le transfert des résidus de médicaments en fonction des différents traitements appliqués et en fonction des proportions d'effluents urbains et hospitaliers (Bertrand-Krajewski et al., 2022). Durant cette étude, le sulfaméthoxazole (antibiotique sulfonamide), la carbamazépine (antidépresseur), le propranolol (bêtabloquant), l'acide salicylique (anti-inflammatoire), l'éconazole (antifongique) et la ciprofloxacine (antibiotique fluoroquinolone) ont été identifiés et quantifiés dans les boues d'épuration. Les premiers résultats ont montré une forte concentration de la ciprofloxacine et de l'éconazole avec des concentrations situées entre 100 et 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS. En complément des analyses en micropolluants, l'évaluation écotoxicologique des boues d'épuration a permis d'identifier des effets écotoxiques à des concentrations élevées en boue d'épuration sur les vers de terre et les plantes lors des tests de reproduction et de germination.

4.2 Prélèvement et conservation des matrices d'essai

4.2.1 Sol de référence

Le sol dit « de référence » est un sol issu d'une parcelle appartenant au Syndicat des Eaux Rocailles et Bellecombe (SRB) à Scientrier (74930). Cette parcelle est située dans le périmètre de protection du captage des eaux qui n'a pas subi d'impact associé aux activités humaines (46°07'16.0"N 6°18'37.3"E). Ce sol de référence est donc représentatif du sol agricole présent dans la zone d'étude et la faible activité humaine sur la parcelle montre une contamination très faible en polluant dans ce sol, confirmée par les analyses chimiques (cf. ANNEXE C, page 262).

Le projet Téléphore, projet issu du programme RISMEAU et réalisé en parallèle de notre étude, a mis en place des lysimètres d'une profondeur de 1 m sur la même parcelle agricole. L'objectif du prélèvement a donc été d'obtenir un échantillon homogène et identique à la profondeur des lysimètres. Le prélèvement du sol de référence a été réalisé le 22 novembre 2019 sur les premiers 80 cm de profondeur (**Figure 15**). Il a ensuite été tamisé à 2 mm pour

retirer les racines, homogénéisé manuellement dans une cuve en inox, puis séché à l'air libre et enfin stocké à température ambiante.



Figure 15. Site de prélèvement du sol de référence et homogénéisation manuelle dans une cuve en inox (© Roques Olivier).

4.2.2 Sol artificiel ISO

Ce sol artificiel ISO est préparé selon les recommandations de la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a). Il est constitué de 10 % de tourbe de sphaignes finement moulues, 20 % d'argile kaolinique et de 69 % de sable de quartz industriel. Du carbonate de calcium est ajouté au mélange afin d'obtenir un pH autour de 6, recommandé par la norme ISO.

4.2.3 Choix des Mafors

Les Mafors étudiées sont sélectionnées dans la zone d'étude en fonction de leur typologie, de leur quantité valorisée en épandage agricole d'après la littérature et de leur potentielle concentration en résidus de médicaments. La sélection s'est tournée vers une boue d'épuration urbaine, un fumier de vache et un lisier de vache.

4.2.3.1 Boue d'épuration

Le choix s'est porté sur la boue d'épuration de la station d'épuration de Bellecombe située à Scientrier (46°08'04.7"N 6°19'07.2"E), sur la base de deux critères :

- La boue d'épuration a été suivie lors du projet du site pilote de Bellecombe (SIPIBEL⁷) de 2010 à 2018 et a montré la présence de résidus de médicaments et un effet écotoxique (effets sur la croissance et la reproduction à des dose d'épandage réalistes) sur les organismes du sol (Bertrand-Krajewski et al., 2022) ;
- L'épandage agricole est la voie principale d'élimination des boues d'épuration de la station d'épuration de Bellecombe. Cette station d'épuration a épandu une quantité de 319 tonnes de matière sèche de boues d'épuration en 2016 (donnée non publiée).

La station d'épuration de Bellecombe a une capacité de 40 000 équivalents habitants et reçoit des eaux usées urbaines et hospitalières issues de 30 communes. Les eaux usées subissent un traitement primaire classique de dégrillage et de décantation. Puis, le traitement secondaire de cette station d'épuration est le procédé biologique dit « à boue activée » qui consiste à éliminer la pollution soluble dans l'eau usée (pollution carbonée, azotée et phosphorée) par voie biologique en introduisant des bactéries dans les bassins alimentés en eaux et en oxygène par aération forcée.

Les boues activées obtenues sont décantées dans le but d'augmenter la siccité des boues. Ces boues sont ensuite épaissies par addition de polymères et de chlorures ferriques avant d'être en partie déshydratées par un filtre-presse. La dernière étape consiste à sécher les boues sous des serres ventilées avant épandage sur les sols agricoles (**Figure 16**). Le produit final obtenu est une boue de type secondaire.

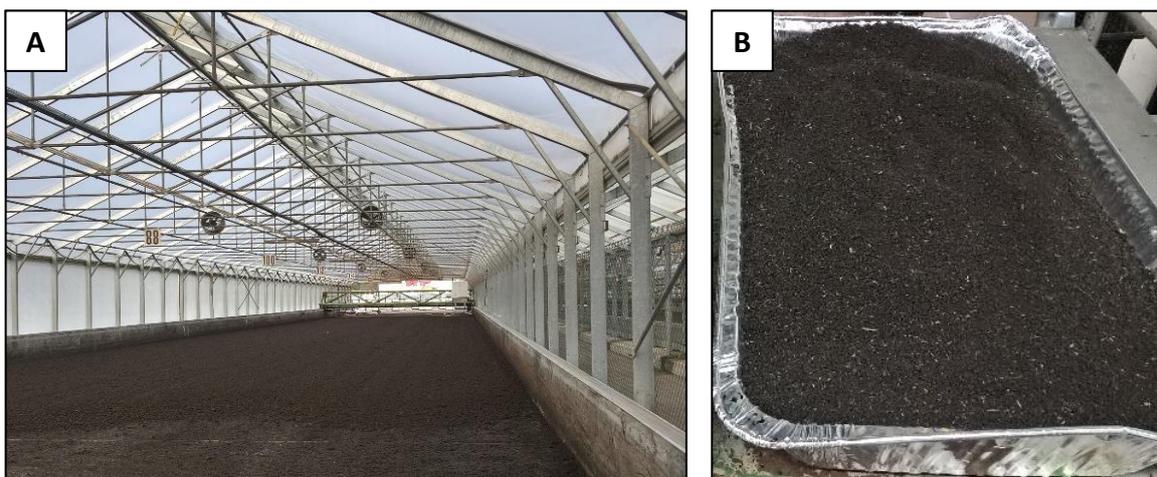


Figure 16. Serre de séchage (A) et boue d'épuration prélevée et tamisée à 2 mm (B) avant conservation à -20 °C (© Roques Olivier).

⁷ <http://www.graie.org/Sipibel/index.html>

Pour notre étude, la boue d'épuration a été prélevée le 22 novembre 2019 dans les serres de séchage de la station d'épuration de Bellecombe. Suite au prélèvement, la boue d'épuration est tamisée à 2 mm puis homogénéisée dans une cuve en inox avant d'être conservée dans des bocaux en verre de 2 L à -20 °C (**Figure 16**).

4.2.3.2 Les effluents d'élevage

Les effluents d'élevage proviennent d'un élevage bovin de vache laitière. Il représente l'élevage majoritaire dans le territoire de l'étude. En effet, d'après les données de 2010 de l'Agreste (Agreste, 2011), le cheptel bovin représente 82 % de l'élevage total dans la région dont 46 % de vaches laitières.

Le recensement des établissements bovins dans la zone d'étude a été réalisé par la chambre d'agriculture de Savoie Mont-Blanc (données non publiées). La traçabilité des pratiques agricoles des éleveurs et la participation de la chambre d'agriculture au projet RISMEAU ont été déterminants dans la décision des établissements agricoles à échantillonner. Les agriculteurs favorables à une participation à l'étude ont été contactés afin d'obtenir des échantillons d'amendements organiques.

Parmi les établissements volontaires, les échantillons d'effluents d'élevage qui ont révélés des concentrations en résidus de médicaments les plus élevées lors des mesures préliminaires ont été choisis pour la suite de l'étude. Dans l'intérêt d'une bonne représentativité des pratiques agricoles, un effluent solide de type fumier et un effluent liquide de type lisier ont été sélectionnés. Ces deux échantillons proviennent de deux exploitations appartenant à un groupement agricole d'exploitation en commun (GAEC).

Le fumier de vache laitière

Le fumier de vache laitière a été prélevé dans l'exploitation agricole « La ferme de la follieuse » située à Bonne (74380) en Haute-Savoie (46°10'52.1"N 6°18'56.0"E), chez l'éleveur Patrick Condevaux le 5 octobre 2020. Le prélèvement a été réalisé à différentes hauteurs du tas de fumier afin d'obtenir un échantillon moyen et représentatif de sa maturation (**Figure 17**).



Figure 17. Tas du fumier prélevé (A), broyage du fumier dans un broyeur à cisaillement (B) et homogénéisation dans une cuve en inox (C) (© Roques Olivier).

Pour assurer son homogénéité et faciliter son usage pour les tests d'écotoxicité, le fumier est broyé plusieurs fois dans un broyeur à cisaillement (broyeur BLIK). Grâce aux broyages successifs, la taille des pailles est réduite à une dimension de 5 cm (**Figure 17**). Le fumier est ensuite homogénéisé dans une grande cuve en inox avant d'être fractionné puis conservé dans des bocaux en verre à -20 °C sans séchage préalable.

Le lisier de vache laitière

Le lisier de vache laitière a été récolté dans l'exploitation agricole « Vert Val » située à Nangy (74380) en Haute-Savoie chez M. Yves Besson le 29 mars 2021 (46°08'33.8"N 6°18'33.1"E). Le prélèvement du lisier est réalisé après une homogénéisation de la cuve à lisier à l'aide d'un mélangeur disposé directement à l'intérieur (**Figure 18**).

Pour faciliter sa manipulation et la réalisation des bioessais, un séchage du lisier par ventilation à 20 °C dans une étuve pendant 5 jours est appliqué. Ce séchage à basse température a permis d'éviter de dégrader les polluants organiques. L'humidité du lisier est abaissée à 80 % environ (identique à celle du fumier) (**Figure 18**). Puis, les échantillons sont homogénéisés, distribués dans des bocaux en verre et conservés à -20 °C.

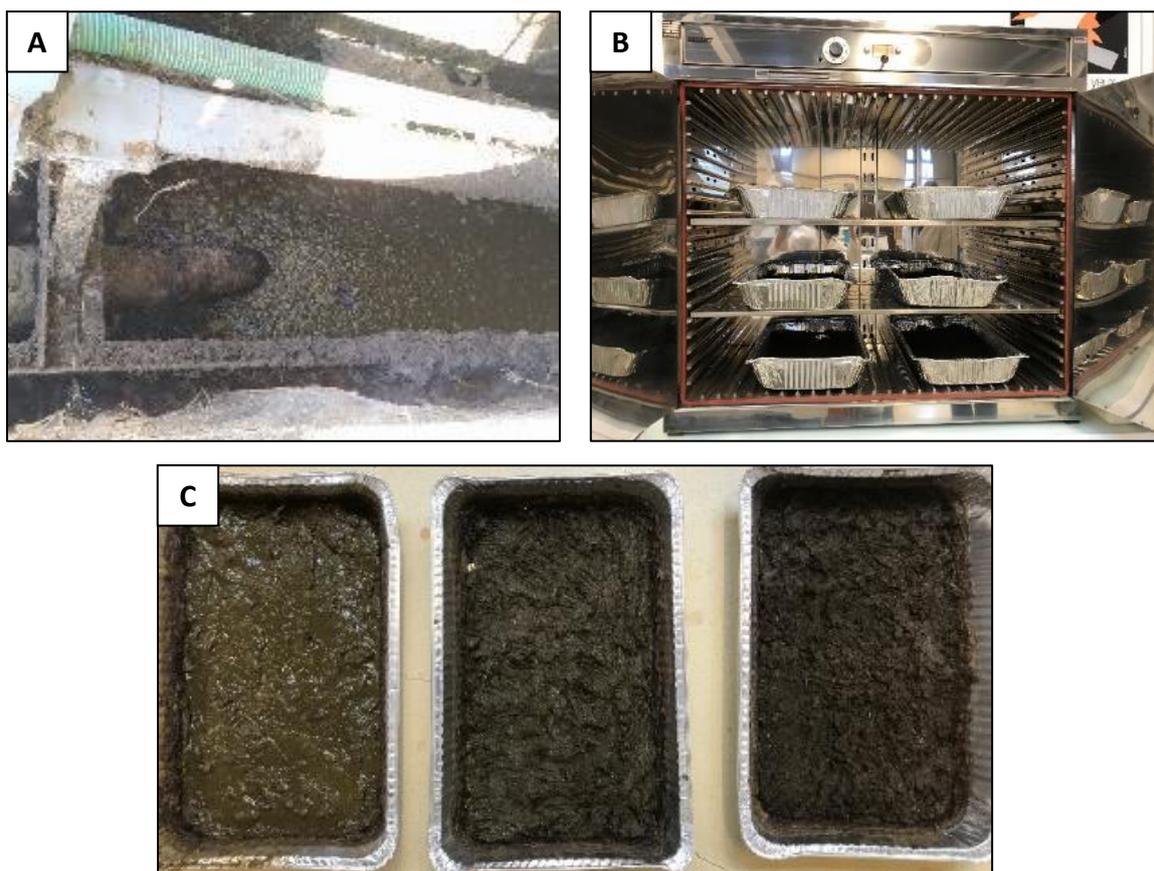


Figure 18. Trappe de la fosse à lisier et bras mécanique permettant le mélange du lisier (A) séchages du lisier dans une étuve (B) et différents stades de séchage du lisier (de gauche à droite, la siccité du lisier augmente) (C) (© Roques Olivier).

4.2.4 Crottin de cheval biologique

Dans notre étude, le crottin de cheval biologique provient d'un élevage biologique garantissant l'absence d'utilisation de produits phytosanitaires (élevage confidentiel). Pour son utilisation, le crottin de cheval est séché à 70 °C pendant une semaine, broyé à 2 mm puis conservé à température ambiante. Le crottin de cheval biologique est l'aliment utilisé pour entretenir les élevages de vers de terre. Il est également utilisé comme nourriture de base dans la réalisation des tests de reproduction de vers de terre. En effet, la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a) encadrant le test de reproduction des vers de terre mentionne le crottin de cheval comme un aliment adéquat pour l'élevage et la réalisation des tests d'écotoxicologie.

4.3 Choix des organismes d'essai

4.3.1 Le ver de terre

Durant les bioessais écotoxicologiques pour évaluer l'écotoxicité des Mafors, le choix de l'espèce étudiée s'est orienté vers l'espèce *Eisenia fetida* (**Figure 19**). Le choix se justifie par plusieurs critères de sélection (cf. Chapitre 3, page 62) :

- *E. fetida* est un ver de fumier pouvant vivre directement dans la matière organique et la biodégrader ;
- *E. fetida* est une espèce épigée. Ce groupe fonctionnel est directement impacté par le changement du milieu lors d'un épandage agricole de Mafors puisque celui-ci affecte les 10 premiers centimètres du sol ;
- *E. fetida* est considéré comme une espèce modèle de biosurveillance pour déterminer le risque écotoxique des polluants dans les sols contaminés ;
- *E. fetida* a été sélectionné par les instances internationales de normalisation comme organisme-test dans des bioessais aigus et chroniques ;
- *E. fetida* a un cycle de vie rapide et une reproduction facilement contrôlée en laboratoire permettant de réaliser des bioessais à faible coût, avec plusieurs réplicats.

Les organismes d'essais sont fournis par un élevage interne de vers de terre en Allemagne puis maintenus dans le laboratoire d'écotoxicologie de Provademse (Plateforme technologique d'INSAVALOR) situé à Villeurbanne (69100), France. L'élevage de vers de terre est conditionné dans un milieu contenant un mélange de crottin de cheval biologique et de tourbe de coco (50/50) et maintenu dans une salle climatisée à 20 °C. Le milieu d'élevage est ajusté entre 60 et 80 % de la teneur maximale de rétention en eau avec de l'eau déminéralisée, et brassé manuellement chaque semaine. Tous les bioessais sur les vers de terre ont été réalisés au laboratoire Provademse.



Figure 19. Ver de terre *Eisenia fetida* utilisé comme organisme d'essai dans les tests d'écotoxicité (© Roques Olivier)

4.3.2 Les plantes

Les espèces de plantes étudiées sont choisies en fonction des différents types de cultures réalisées dans notre zone d'étude et des listes d'espèces proposées dans les normes ISO (**Figure 20**). D'après les résultats issus de l'Agreste (2011), la culture prédominante dans la région Haute-Savoie est la culture fourragère qui représente 62,9 % des cultures totales de la surface agricole utile de la région (en dehors des prairies). La luzerne cultivée, *Medicago sativa* (Fabacées), a donc été choisie puisqu'elle est produite comme culture fourragère et donc représentative du site d'étude. De plus, la luzerne est également une plante recommandée dans les tests normés (ISO, 2013). Derrière la culture de fourrage, les grandes cultures comme les céréales représentent 33,9 % des cultures totales de la surface agricole utile du site d'étude (Agreste, 2011). Pour représenter cette culture, la moutarde blanche, *Sinapis alba* (Brassicacées), espèce à la fois cultivée en grande culture et en culture fourragère, a été utilisée. Cette espèce est d'ailleurs couramment sélectionnée dans la littérature scientifique dans les tests de phytotoxicité (Oleszczuk and Hollert, 2011). Enfin, pour représenter la culture maraîchère, représentant seulement 1,1 % de la culture totale du territoire d'étude, la courgette, *Cucurbita pepo* (Cucurbitacées), a été choisie. Elle est également utilisée dans les bioessais en laboratoire (Huang et al., 2010).

Pour les essais d'écotoxicité, les lots de graines bio des différentes espèces ont été achetés dans le magasin ©Gamm Vert.

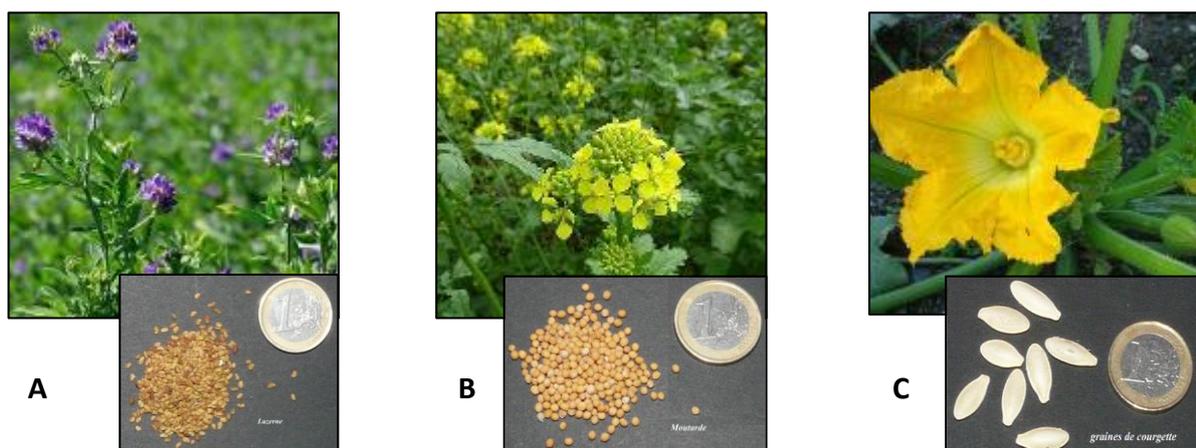


Figure 20. Plantes utilisées dans les bioessais d'écotoxicologie (A. *Medicago sativa* ; B. *Sinapis alba* ; C. *Cucurbita pepo*).

4.4 Doses d'épandage expérimentales retenues

4.4.1 Doses d'épandage des Mafors appliquées à l'échelle du territoire d'étude

De nombreuses Mafors sont épandues sur les sols agricoles de la zone d'étude à des doses différentes selon leur origine et la culture concernée. Le recensement des doses d'épandage appliquées dans la zone d'étude est présenté dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Doses d'épandage appliquées aux boues d'épuration issues de la station d'épuration de Bellecombe et aux effluents d'élevage de type lisier/fumier issus des établissements de la région Savoie et Haute-Savoie en fonction du type de culture sur le site du bassin versant de l'Arve.

Type de cultures	Mafors	Doses d'épandage	Références ⁸
Prairie	Fumier bovin	15 - 20 t.ha ⁻¹ MB	Chambre d'agriculture de Savoie Mont-Blanc, 2020
	Lisier bovin	15 - 25 m ³ .ha ⁻¹ MB	Chambre d'agriculture de Savoie Mont-Blanc, 2020
	Boue d'épuration	0,69 – 2,42 t.ha ⁻¹ MS	Cabinet Birraux, 2019
Céréales	Lisier bovin	25 - 35 m ³ .ha ⁻¹ MB	Chambre d'agriculture de Savoie Mont-Blanc, 2020
Blé	Boue d'épuration	0,41 – 3,10 t.ha ⁻¹ MS	Cabinet Birraux, 2019
Orge	Boue d'épuration	1,69 – 1,89 t.ha ⁻¹ MS	Cabinet Birraux, 2019
Maïs	Boue d'épuration	0,91 – 2,14 t.ha ⁻¹ MS	Cabinet Birraux, 2019
	Fumier bovin	30 - 35 t.ha ⁻¹ MB	Chambre d'agriculture de Savoie Mont-Blanc, 2020
Non défini	Fumier bovin	30 t.ha ⁻¹ MB	Cabinet Birraux, 2017
	Lisier bovin	20 - 30 m ³ .ha ⁻¹ MB	
	Purin bovin	20 m ³ .ha ⁻¹ MB	
	Lisier porc	30 m ³ .ha ⁻¹ MB	
	Composts déchets végétaux	15 - 20 t.ha ⁻¹ MB	
	Composts boue/déchet vert	10 t.ha ⁻¹ MB	

D'après ce recensement, les doses d'épandage de fumier et de lisier peuvent atteindre jusqu'à 35 t.ha⁻¹ MB et 35 m³.ha⁻¹ MB respectivement sur les sols agricoles chaque année. Il est possible d'estimer la dose d'épandage en matière sèche autour de 7 à 10 t.ha⁻¹ MS si on estime une teneur en eau moyenne comprise entre 70 et 80 %. L'épandage des boues d'épuration sur les sols atteint des doses d'épandage comprises entre 0,41 et 3,10 t.ha⁻¹.an⁻¹

⁸ Données non publiées

MS pour toutes cultures confondues et jusqu'à $10 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ MS pour des boues compostées en mélange avec des déchets verts.

Au-delà de la zone d'étude, les boues d'épuration peuvent être épandues à des doses plus importantes en France. En effet, l'étude de Huguier et al. (2015) montre que les boues d'épuration digérées sont épandues jusqu'à $12 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ MB dans leur zone d'étude. Cependant, la dose d'épandage des boues d'épuration reste limitée à $30 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ MS sur 10 ans sur les sols agricoles en France (cf. Chapitre 1.6, page 38).

4.4.2 Dose d'épandage moyenne calculée à l'échelle nationale

Dans notre étude, il est nécessaire d'établir une dose d'épandage moyenne et représentative à l'échelle du territoire français. À partir de la réglementation, plusieurs scénarios d'épandage des boues d'épuration peuvent être envisagés tels qu'un épandage de 3, 6 et $10 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ MS (Courtois et al., 2021b). Ces scénarios d'épandage correspondent également à la dose d'épandage moyenne des fumiers.

Pour adapter ces scénarios d'épandage à nos bioessais, il est nécessaire de convertir les doses d'épandage (fournis en $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$) en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Pour réaliser cette conversion, la superficie du sol est ramenée en poids sec de sol en estimant la profondeur de sol affectée par le labourage et la densité du sol :

- La profondeur affectée par le labourage du sol, noté h_{sol} , est estimée entre 5 et 20 cm. La profondeur définie pour le calcul de la dose d'épandage peut varier dans certaines études avec une profondeur de 5 cm (OECD, 2000 ; Rastetter and Gerhardt, 2017), 10 cm (Moreira et al., 2008) ou 20 cm (Domene et al., 2011 ; Li et al., 2011 ; Pivato et al., 2014) ;
- Le facteur de densité du sol, noté d_{sol} , varie en fonction de la région de prélèvement. Certaines études préconisent une densité de sol de $1,25 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (Pivato et al., 2014 ; Domene et al., 2011), alors que d'autres préconisent $1,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (Moreira et al., 2008 ; OECD, 2000 ; Rastetter and Gerhardt, 2017).

À partir de l'équation n° 1, les différents scénarios d'épandage en $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ MS sont convertis en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS en tenant compte des différentes profondeurs et densités du sol mentionnées dans la littérature (**Tableau 8**).

La dose d'épandage en g.kg^{-1} MS, notée D, est calculé par la formule suivante :

$$\text{Équation n° 1 : } D = \frac{\text{dose d'épandage (kg/ha MS)}}{10\,000 \times h_{\text{SOL}} \times d_{\text{SOL}}} \quad \text{Où } h_{\text{SOL}} \text{ en m et } d_{\text{SOL}} \text{ en } \text{g.cm}^{-3}.$$

Tableau 8. Estimation de la dose d'épandage moyenne et réaliste appliquée aux boues d'épuration sur le sol agricole (g.kg^{-1} MS) en fonction des paramètres de profondeur de labourage, de la densité du sol et de la dose d'épandage appliquée (t.ha^{-1} MS)

Profondeur (cm)	Densité du sol (g.cm^{-3})	Dose d'épandage en t.ha^{-1} MS		
		3	6	10
5	1,25	4,8	9,6	16
	1,50	4	8	13,3
10	1,25	2,4	4,8	8
	1,50	2	4	6,7
20	1,25	1,2	2,4	4
	1,50	1	2	3,3

Sur la base des différents scénarios possibles établis dans le **Tableau 8** et des informations sur les doses d'épandage testées dans la littérature scientifique (**Tableau 6**), une dose moyenne d'épandage de 10 g.kg^{-1} MS a été retenue dans le cadre de notre étude, représentant la dose moyenne appliquée pour la boue d'épuration, le fumier et le lisier.

4.4.3 Gamme de teneurs testées en Mafors

Les travaux de Huguier et al. (2015) suggère d'étudier des gammes allant de 1 à 10 fois la dose recommandée durant les tests de toxicité des amendements organiques sur les organismes terrestres. Notre étude évalue la toxicité de ces Mafors à 0,5x, 1x, 2x et 5x la dose moyenne d'épandage lors des tests de toxicité chronique sur les organismes du sol étudiés et allant jusqu'à 10x, 20x et 50x la dose d'épandage moyenne lors des tests de toxicité aigüe.

4.5 Méthodes d'analyse des différentes matrices

4.5.1 Caractérisations physicochimiques

Les différentes matrices sont caractérisées par leurs propriétés physicochimiques en mesurant le pH, la conductivité électrique, la teneur en eau et la capacité de rétention en eau. La granulométrie est mesurée uniquement sur le sol de référence. Les valeurs agronomiques sont mesurées et détaillées dans la partie suivante.

➤ Le pH

Le pH des différentes matrices est déterminé selon la norme ISO 10390 : 2005 (ISO, 2005). Un échantillon séché à l'air est mélangé avec un volume d'eau d'un ratio $1/5$ (soit 5 mL dans 25 mL d'eau) dans un pilulier de 30 mL. Le pilulier est placé dans un rotateur à retournement (7 tours/minute) pendant 1 h puis la mesure de pH est réalisée après 1 h de décantation.

Durant les tests écotoxicologiques, la mesure de pH du sol est réalisée avec le même protocole précédemment décrit à l'exception que la prise d'essai est faite avec 5 g de sol séché à l'air puis mélangé dans 25 mL d'eau.

➤ La conductivité électrique

La conductivité électrique est mesurée selon la norme ISO 11265 : 1995 (ISO, 1995). La mesure de l'échantillon sec est réalisée dans un volume d'eau avec un ratio $1/5$ (mL) pour les sols (sol de référence et sol artificiel ISO) et avec un ratio $1/10$ (mL) pour les Mafors et le crottin. Le mélange est placé dans un rotateur à retournement (7 tours/minute) pendant 30 min avant mesure.

➤ La granulométrie

La mesure de la granulométrie du sol de référence est réalisée à l'aide d'un granulomètre laser Mastersizer 3000[®], équipé d'une unité de dispersion par voie hydraulique hydro LV. L'échantillon analysé est incorporé jusqu'à obtenir une obscurité comprise entre 10 et 20 %. Les mesures s'effectuent tout d'abord à l'aide d'un laser blanc puis d'une seconde mesure à l'aide d'un laser bleu, qui sont répétées trois fois pour obtenir une moyenne des trois mesures effectuées. De plus, l'agitateur et la pompe sont lancés à 2500 tours/minute pendant la mesure et les ultrasons sont émis à 90 % de leur puissance maximum pendant 10 secondes avant la mesure afin de disperser et fractionner les agrégats pour obtenir les particules élémentaires. Les statistiques granulométriques des différentes classes sont obtenues par la procédure Gradistat (Blott and Pye, 2001).

➤ La teneur en eau

La teneur en eau est déterminée en séchant un échantillon à 105 °C pendant 24 h (ISO, 1994). La masse d'eau évaporée est calculée avec la pesée avant et après séchage selon la formule suivante :

$$\text{Équation n° 2 : } w = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100$$

Où w = teneur en eau (exprimée en % de matière sèche), m_1 = masse humide de sol ou de Mafor, m_2 = masse sèche de sol ou de Mafor.

➤ La capacité de rétention en eau

La capacité de rétention en eau (CRE) des différentes matrices est déterminée en suivant la méthode mentionnée en annexe de la norme ISO 11268-1 : 2015 (ISO, 2015b). Une quantité de sol ou de Mafor est immergée d'eau pendant 3 h puis égouttée sur une grille pendant 2 h. L'échantillon saturé en eau est ensuite pesé, séché à 105 °C jusqu'à masse constante et pesé à nouveau.

$$\text{Équation n° 3 : } CRE = \frac{m_S - m_D}{m_D} \times 100$$

Où, CRE = capacité de rétention en eau (exprimée en % de masse sèche), m_S = masse saturée en eau de sol ou de Mafor, m_D = masse sèche de sol ou de Mafor.

4.5.2 Valeurs agronomiques

Les valeurs agronomiques des différentes matrices étudiées sont déterminées par le laboratoire CESAR à Ceyzériat (259 Les Soudanières, 01250 Ceyzériat, France) pour toutes les matrices incluant les sols et les Mafors. Les analyses sont réalisées en triplicats d'échantillons et les paramètres suivis sont le carbone organique (ISO 10694), l'azote total (ISO 13878), l'azote ammoniacal (déterminé par un spectrophotomètre), le phosphore Olsen (ISO 11885), le potassium (ISO 11885), le calcium (ISO 11885), le magnésium (ISO 11885). La capacité d'échange cationique (NF X31-130) et le calcaire (ISO 10693) ont été déterminés uniquement pour le sol de référence et le sol artificiel ISO.

4.5.3 Fractionnement chimique de la matière organique des Mafors et analyse des extraits organiques

Le fractionnement chimique des différentes matrices étudiées a été réalisé par le laboratoire LBE (Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRAe) à Narbonne (Avenue des Étangs, 11100 Narbonne, France).

L'extraction séquentielle chimique suit la méthode décrite dans l'étude de Jimenez et al. (2015) et renseigne sur l'accessibilité de la matière organique. Dans ce protocole expérimental, le fractionnement de la matière organique est automatisé grâce à un système d'extraction accélérée par solvants (ASE) Dionex™ ASE™ 350. L'ASE™ 350 est un système automatique pour l'extraction des composés organiques à partir d'échantillons solides (**Figure 21**). Il facilite l'extraction de la matière organique en utilisant des solvants à des températures élevées. Une pression est appliquée à la cellule d'extraction pour maintenir le solvant chauffé à l'état liquide pendant le processus. Pour chaque fraction, des paramètres d'extractions sont définis (**Tableau 9**). Seule la quatrième étape est manuelle car nécessitant l'utilisation d'acide sulfurique à 72 %, trop concentré pour l'appareil.

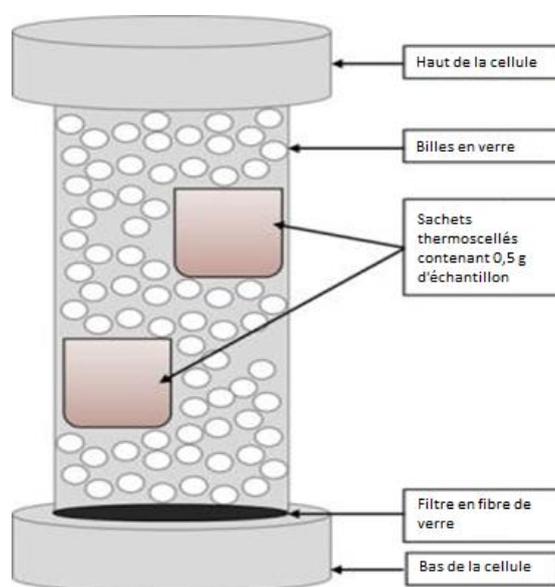


Figure 21. Système d'extraction accélérée par solvants Dionex™ ASE™ 350 automatique des composés organiques à partir d'échantillons solides.

Tableau 9. Récapitulatif des paramètres d'extractions sur l'ASE™ 350.

Fraction	Chaleur (min)	Température (°C)	Temps du palier (min)	Volume de rinçage (%)	Purge (s)	Cycle	Nombre d'extractions par cellule
SPOM	5	40	7	30	200	6	2
REOM	5	40	10	0	200	1	9
SEOM	5	40	7	30	200	6	4

SPOM = Matière organique particulaire très facilement extractible, REOM = Matière organique particulaire facilement extractible, SEOM = Matières organique particulaire lentement extractible.

Le fractionnement chimique est réalisé à partir d'un échantillon lyophilisé et tamisé à 1 mm. Brièvement, 0,5 g d'échantillon sec (1 g pour l'analyse des sols et 2,5 g pour l'analyse des Mafors) sont introduits dans deux sachets filtrants (pesés à vide). Les sachets sont ensuite thermoscellés à plusieurs reprises et les échantillons répartis de façon homogène dans le sachet. Un filtre en fibre de verre est déposé sur le bas de la cellule puis vissé fermement. Des billes (0,5 cm de diamètre) sont introduites dans le système pour recouvrir le fond puis un premier sachet est déposé contre la paroi. Le sachet est recouvert par des billes puis un second sachet est déposé contre la paroi en quinconce avec le premier sachet. La cellule est fermée après que le second sachet a été recouvert par des billes.

Chaque matrice est fractionnée pour obtenir cinq fractions distinctes par l'extraction séquentielle :

- Matière organique particulaire très facilement extractible (SPOM). La fraction SPOM est extraite à l'aide d'une solution de CaCl_2 à 10 mM (afin d'éviter une éventuelle rupture des membranes cellulaires). Cette fraction soluble en phase aqueuse contient principalement des sucres et des protéines.
- Matière organique particulaire facilement extractible (REOM). La fraction REOM est extraite à l'aide d'une solution saline de soude ($\text{NaCl} = 10 \text{ mM} / \text{NaOH} = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 11$). Cette fraction contient principalement des protéines, des acides nucléiques, des sucres et des lipides.
- Matière organique particulaire lentement extractible (SEOM). La fraction SEOM est extraite à l'aide d'une solution de soude ($\text{NaOH} = 100 \text{ mM}$, $\text{pH} = 12$). Cette fraction contient principalement des protéines, des substances humiques et des lipides.

- Matière organique particulière peu extractible ou fraction ligno-cellulosique (PEOM). Cette fraction PEOM, inspirée par le fractionnement van Soest, est extraite à l'aide d'une solution d'acide sulfurique commerciale concentrée (72 %). Cette fraction contient la cellulose et l'hémicellulose.
- Matière organique non extractible (NEOM). Cette fraction est obtenue en soustrayant la masse totale de la matière organique extraite à la masse initiale de l'échantillon. Cette fraction est composée essentiellement de matière organique de type ligno-cellulosique.

Chaque fraction extraite est ensuite caractérisée par la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) selon le protocole ISO 15705 : 2002 (ISO, 2002) (taille du compartiment extrait versus total).

L'avantage de cette méthode d'extraction par rapport à la méthode van Soest classiquement réalisée sur ce type de matrice est qu'elle est efficace sur toutes les matrices (matrices de type lignocellulosique et digestat) (Jimenez et al., 2015). Elle permet également une mesure par spectroscopie de fluorescence tridimensionnelle des extraits. Cette fluorescence renseigne aussi sur la nature des molécules (molécules uniquement fluorescentes) qui sont présentes dans chaque fraction. Les extraits liquides sont analysés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer LS55 pour obtenir les spectres de fluorescences. La longueur d'onde d'excitation est comprise entre 200 et 600 nm avec des incréments de 10 nm. Selon la méthode décrite par Jimenez et al. (2015), les spectres obtenus sont décomposés en sept zones attribuées à de grands groupes biochimiques. Les zones n° 1, 2, 3 présentent essentiellement des acides aminés, des petites molécules protéiques et des sucres alors que les autres zones présentent des molécules complexes et plus grosses (zone n° 4 = acides fulviques, zone n° 5 = glycoprotéines, VI = mélanoidines, lignocelluloses et acides humiques et zone n° 7 = acides humiques). Puis, un indice représentant le ratio de complexité est calculé pour chaque fraction selon Muller et al. (2014). Cet indice est défini comme le rapport entre la somme des zones de fluorescence les plus complexes (zones n° 4 à n° 7) sur la somme des zones de fluorescences de type protéine (zones n° 1 à n° 3). Cet indice renseigne donc sur la complexité de la fraction.

À partir du couplage du fractionnement de la matière organique et de la fluorescence 3D, l'indicateur ISBAMO (Indice de Stabilité et de Bioaccessibilité de la Matière Organique) a

permis de prédire le potentiel biométhanogène et le carbone minéralisable de ces matrices à l'aide du modèle prédictif de régression développé par Jimenez et al. (2017).

Les profils de fractionnements et les ratios de complexité des matrices de référence (sol de référence et crottin de cheval biologique) sont présentés dans le tableau B.1 (cf. ANNEXE B, page 259).

4.5.4 Concentrations en polluants

4.5.4.1 Éléments traces métalliques

Les concentrations des ETMs contenus dans les différentes matrices étudiées ont été déterminées au laboratoire LEHNA (Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, UMR 5280) situé à Vaulx-en-Velin (69120), France. Les ETMs mesurés sont présentés dans le **Tableau 10**.

Les Mafors sont séchées à 105 °C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'une masse constante avant d'être broyées manuellement dans un mortier en agate. Un échantillon sec de 0,1 g de sol (sol de référence ou sol artificiel ISO) est digéré dans un volume de HNO₃ (2 mL, Merck Suprapur) et un volume d'HCl (6 mL à 30 %, Merck Suprapur) dans un système à micro-ondes (CEM 6 : 110 - 180 °C à une pression de 120 PSI) où la température est montée à 180 °C en 15 min effectuant un palier de 30 min. Pour les matrices riches en matière organique (Mafors et crottin de cheval biologique), 0,5 g d'échantillon sec est prélevé puis digéré dans un volume de HNO₃ (8 mL, Merck Suprapur) et un volume de H₂O₂ (2 mL, Merck Suprapur). La digestion est réalisée dans un système à micro-ondes (CEM 6) où la température est montée à 200 °C en 15 min, puis maintenue pendant 15 min. Les échantillons digérés sont ensuite filtrés sur filtre Whatman n° 541 à 22 µm en utilisant 25 mL d'eau distillée ultrapure et les concentrations en ETMs sont mesurées par un spectromètre d'absorption atomique avec un PinAAcle 900 T Perkin Elmer. Chaque échantillon est analysé en triplicats.

4.5.4.2 Résidus de médicaments

La quantification des résidus de médicaments dans les différentes matrices a été réalisée par le laboratoire ISA (Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280) à Villeurbanne (69100), France. Un plan expérimental de screening de suspects a été établi et appliqué sur les différentes Mafors. Brièvement, trois extractions différentes et deux méthodes d'analyse par

spectrométrie de masse sont réalisées. Ainsi, ce screening a permis d'identifier 33 résidus de médicaments dont 12 produits de transformation (cf. **Tableau 11**). Les molécules retenues dans la suite de notre étude ont été sélectionnées sur la base des résultats de ce screening. Cinq molécules font exception : le triclosan a été détecté par l'INRAE ; le diméthyl-didécyl ammonium a été détecté durant l'observation SIPIBEL ; l'érythromycine, connue pour être retrouvée dans les boues d'épuration, a été recommandée par l'ANSES (ANSES, 2020) ; la doramectine et l'éprinomectine font partie des molécules utilisées dans les élevages échantillonnés d'après la chambre d'Agriculture de Savoie Mont-Blanc en 2020.

Brièvement, les échantillons de Mafors sont séchés par lyophilisation, puis 2 g sec d'échantillon sont cryobroyés avant d'être tamisés à 250 µm. L'extraction des résidus de médicaments est réalisée dans une solution contenant 5 mL d'eau avec 0,1 M d'acide EDTA (éthylènediaminetétraacétique) et 1 % d'acide acétique, ainsi que 10 mL d'acétonitrile et 5 mL d'heptane. La séparation de phase est réalisée grâce à l'ajout de sels NaCl et Na₂SO₄. La phase liquide est analysée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec une calibration matrice (Guironnet et al., 2021). L'analyse des échantillons de sol suivent la même procédure à l'exception de l'extraction : les sols sont séchés sous hotte durant une nuit, broyés dans un mortier et tamisés à 250 µm puis l'extraction est réalisée sans heptane.

4.5.4.3 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ont été analysés par le laboratoire ECOSYS (Écologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes, INRAE) à Versailles (78000), France. Le choix des HAPs mesurés s'est porté sur 15 HAPs classiquement recherchés dans la littérature (cf. **Tableau 10**). Après séchage à température ambiante et broyage des échantillons de chaque matrice, une extraction ASE est appliquée sur les différentes matrices étudiées. L'identification et la quantification des 15 HAPs sont réalisées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection par fluorescence (ISO, 2018a).

4.5.4.4 Composés aromatiques et retardateurs de flammes bromés

Les polluants organiques persistants (POPs) dont les retardateurs de flamme bromés (RFBs) ont été analysés par le laboratoire LABERCA (La Chantrerie – Route de Gachet, 44307

Nantes, France). Les POPs suivis comprennent les polychlorodibenzo-*p*-dioxine (PCDD), les polychlorodibenzofuranes (PCDF) et les polychlorobiphényles (PCBs) incluant les polychlorobiphényles non-ortho substitués (PCBno), les polychlorobiphényles mono et di-ortho substitués (PCBmdio) et les polychlorobiphényles non dioxine-like (PCBNDL). Les mesures des RFBs sont réalisées sur les polybromodiphényléthers (PBDE), les nouveaux retardateurs de flamme bromés⁹ (nRFB), les polybromobiphényles (PBB) et les hexabromocyclododécane (HBCDD). Les POPs suivis sont présentés dans le **Tableau 10** et les analyses ont été réalisées d'après les protocoles mentionnés dans Coelho (2019).

Pour quantifier les POPs, la procédure d'extraction ASE est réalisée à l'aide d'un Speed Extractor (Büchi) sur chaque aliquote issue des matrices testées. Chaque aliquote est introduite dans une cellule d'extraction (120°, 100 bar) où un mélange de toluène et d'acétone (70/30, v/v) est injecté trois fois avec des cycles de 5 min chacun permettant d'extraire tous les composés apolaires. La phase organique extraite est ensuite séchée à l'évaporateur rotatif (Büchi R200), pesée et dissoute dans 15 mL d'hexane. Des standards internes marqués au ¹³C sont ajoutés avec la phase organique et l'hexane.

Pour séparer les PCBs des PBDE, trois étapes de nettoyage sont réalisées à l'aide de colonnes de purification de silice acide, de Florisil® et de célite/carbone. La séparation des PCBs coplanaires (PCBno) est réalisée par un mélange de Florisil®, de Carbopack C et de Celite 545 activé pendant une nuit à 130 °C. Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec par un léger courant d'azote puis dilués à nouveau dans 20 µL de toluène pour les PCBno et PCBmdio et dans 50 µL de toluène pour les PBDE. Pour séparer les nRFB, un extrait d'échantillon est élué par deux cycles de 15 mL d'hexane dans les colonnes couplées. Les PBB et certains nRFB (pTBX, TBCT, nPBB, nHBB, PBT, PBEB et OBIND) sont à nouveau élués dans 45 mL d'hexane. La fraction éluée est évaporée jusqu'à atteindre 1 mL avant d'être purifiée dans une colonne carbone/Florisil®, évaporée à sec sous un léger courant d'azote puis diluée dans 20 mL de toluène. Pour séparer les HBCD et les DBDPE, un extrait d'échantillon est élué par trois colonnes de silice avec 130 mL de dichlorométhane. La

⁹ nRFB : PBEB = Pentabromoéthylbenzène; PBT = Pentabromotoluène ; TBCT = Tétrabromo-*o*-chlorotoluène ; nHBB = Hexabromobenzène ; nPBB = Pentabromobenzène ; pTBX = 2,3,5,6-tétrabromo-*p*-xylène ; OBIND = octabromotriméthylphényllindane ; DBDPE = décabromodiphényléthane.

fraction éluée est ensuite évaporée et de l'hydroxyde (1 mL, 1 M) est ajouté. Les HBCDD et DBDPE sont extraits de la phase aqueuse avec 5 mL et 2 mL d'hexane.

Les POPs sont quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS, 7890A (Agilent)/JEOL 800D (JEOL, Tokyo, Japon)). Deux μL sont injectés en mode splitless avec 1 mL/min d'hélium comme gaz porteur. Le programme GC utilisé est : pour les PCBs : 1 min à 120 °C, 20 °C/min à 200°C, 3 °C/min à 260,5 °C et 30 °C/min à 330 °C et maintenu pendant 3,5 min, pour les PBDE et PBB : 2 min à 120 °C, 10 °C/min à 215 °C, 3°C/min à 270 °C, 30 °C/min à 330 °C et maintenu pendant 3,5 min, pour les PCDD, PCDF et les HBCD : 3 min à 120 °C, 20 °C/min à 170 °C, 3 °C/min à 260,5 °C et 25 °C/min à 300 °C et maintenu pendant 5 min, pour le PBDE 209 : 1 min à 180 °C, 20 °C/min à 280 °C et 3 °C/min à 260,5 °C. La résolution du spectromètre de masse est réglée à 10 000 (FWHM) et les signaux spectrométriques sont enregistrés en mode de surveillance d'un seul ion tout en se concentrant sur deux ions abondants. L'assurance qualité et le contrôle qualité sont effectués.

Tableau 10. Polluants suivis dans cette étude et limite de quantification (LOQ MS) des méthodes d'analyses des ETMs et des POPs dans les Mafors, les sols et les organismes terrestres.

Polluants	LOQ			
	LOQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
ETM				
Zn	1,5			
Cu	0,014			
Cd	0,002			
Cr	0,040			
Pb	0,050			
Ni	0,070			
HAP	LOQ SOL ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ BOUE ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ LISIER ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ FUMIER ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Acénaphthène	0,08	0,08	0,16	0,16
Anthracène	0,08	0,07	0,15	0,19
Benz[a]anthracène	0,08	0,07	0,17	0,26
Benzo[b]fluoranthène	0,05	0,05	0,16	0,14
Benzo[k]fluoranthène	0,08	0,07	0,1	0,26
Benzo[ghi]pérylène	0,09	0,08	0,16	0,14
Benzo[a]pyrène	0,07	0,03	0,16	0,24
Chrysène	0,03	0,02	0,12	0,22
Dibenz[a,h]anthracène	0,04	0,02	0,09	0,15
Fluoranthène	0,11	0,1	0,09	0,2
Fluorène	0,09	0,08	0,16	0,24
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	0,37	0,32	0,16	0,59
Naphthalène	0,35	0,31	0,35	0,3
Phénanthrène	0,12	0,1	0,12	0,35
Pyrène	0,08	0,07	0,21	0,29

PCDD	LOQ (ng.kg ⁻¹)			
2.3.7.8 – TCDD	0,297			
1.2.3.7.8 – PeCDD	0,203			
1.2.3.4.7.8 – HxCDD	0,662			
1.2.3.6.7.8 – HxCDD	0,287			
1.2.3.7.8.9 – HxCDD	0,287			
1.2.3.4.6.7.8 – HpCDD	0,694			
OCDD	0,694			
PCDF	LOQ (ng.kg ⁻¹)			
2.3.7.8 – TCDF	0,632			
1.2.3.7.8 – PeCDF	0,632			
2.3.4.7.8 – PeCDF	0,632			
1.2.3.4.7.8 – HxCDF	0,632			
1.2.3.6.7.8 – HxCDF	0,215			
1.2.3.7.8.9 – HxCDF	0,338			
2.3.4.6.7.8 – HxCDF	0,215			
1.2.3.4.6.7.8 - HpCDF	0,632			
1.2.3.4.7.8.9 - HpCDF	0,495			
OCDF	0,632			
PCB				
4 PCBno	LOQ (ng.kg ⁻¹)			
PCB 77	3,11			
PCB 81	0,614			
PCB 126	3,11			
PCB 169	2,497			
8 PCBmdio	LOQ (ng.kg ⁻¹)			
PCB 105	63,12			
PCB 114	63,15			
PCB 118	63,12			
PCB 123	63,12			
PCB 156	63,12			
PCB 157	63,12			
PCB 167	63,12			
PCB 189	21,03			
6 PCBNDL	LOQ (µg.kg ⁻¹)			
PCB 28	0,007			
PCB 52	0,026			
PCB 101	0,085			
PCB 138	0,152			
PCB 153	0,25			
PCB 180	0,221			
RFB				
9 PBDE	LOQ (µg.kg ⁻¹)			
PBDE 28	0,022			
PBDE 47	0,349			
PBDE 49	0,349			
PBDE 99	0,349			
PBDE 100	0,349			
PBDE 153	0,096			
PBDE 154	0,291			
PBDE 183	0,211			
PBDE 209	0,349			
8 nRFB	LOQ *			
PBEB				
PBT				
TBCT				
nHBB				
nPBB				
pTBX				

	OBIND			
	DBDPE			
3 PBB	LOQ *			
	PBB 52			
	PBB 101			
	PBB 153			
3 HBCDD	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)			
	HBCDD α	0,022		
	HBCDD β	0,205		
	HBCDD γ	0,008		

* sur la base des concentrations réalisées sur les blancs.

Tableau 11. Résidus de médicaments suivis dans cette étude et limite de détection (LD) et de quantification (LOQ) des méthodes d'analyse dans les Mafors et les sols (en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS).

Résidus de médicaments	Activités	Familles	Métabolites	Molécules mères	LD	LOQ
3-amino-5-méthylisoxazole	Fongicide	Azole	X	Isoxazole	3,3	10
5-Hydroxythiabendazole	Fongicide	Benzimidazole	X	Thiabendazole	2,3	7,0
Acétyle-sulfaméthoxazole	Antibiotique	Sulfonamide	X	Sulfaméthoxazole	0,2	0,6
Albendazole-2-aminosulfone	Fongicide	Benzimidazole	X	Albendazole	0,03	0,1
Anhydroérythromycine	Antibiotique	Macrolide	X	Érythromycine	0,03	0,1
Bromacil	Herbicide	Uracil			0,7	2,0
Chlorhexidine	Antiseptique	Bisdiguanide			4,0	12
Ciprofloxacine	Antibiotique	Fluoroquinolone	X	Enrofloxacine	0,3	1,0
Diméthyl-didécyl ammonium	Biocide				165	500
Desméthyl-ofloxacine	Antibiotique	Fluoroquinolone	X	Ofloxacine	0,2	0,5
Doramectine	Antiparasitaire	Avermectine			17	50
Épitétracycline	Antibiotique	Tétracycline	X	Tétracycline	0,3	1,0
Éprinomectine	Antiparasitaire	Avermectine			2,3	7,0
Érythromycine	Antibiotique	Macrolide			0,2	0,6
Flubendazole	Anthelminthique	Benzimidazole			0,3	0,8
Hydroxy-flubendazole	Anthelminthique	Benzimidazole	X	Flubendazole	0,2	0,5
Hydroxy-levamisole	Antiparasitaire	Imidazothiazole	X	Levamisole	0,2	0,5
Kétoprofène	Anti-inflammatoire				0,1	0,3
Levamisole	Antiparasitaire	Imidazothiazole			0,2	0,6
Méthamidophos	Insecticide		X	Acéphate	12	35
Ofloxacine	Antibiotique	Fluoroquinolone			0,3	1,0
Oxfendazole	Anthelminthique	Benzimidazole	X	Fenbendazole	0,2	0,5
Pyrantel	Anthelminthique				0,03	0,1
Pyriméthamine	Antiparasitaire				0,03	0,1
Sulfaguanidine	Antibiotique	Sulfonamide			0,1	0,4
Sulfaméthoxazole	Antibiotique	Sulfonamide			0,2	0,5
Sulfathiazole	Antibiotique	Sulfonamide			4,0	13
Sulfoxaflor	Insecticide	Néonicotinoïde			0,2	0,7
Tébuconazole	Fongicide	Triazole			0,3	1,0
Tétracycline	Antibiotique	Tétracycline			59,6	178,9
Thiabendazole	Fongicide	Benzimidazole			0,03	0,1
Triclosan	Biocide				1,7	5,0
Triméthoprim	Antibiotique	Diaminopyridine			0,3	0,8

4.6 Tests de toxicité aiguë

4.6.1 Les levures : activité œstrogénique et androgénique

Les perturbateurs endocriniens peuvent interférer avec le fonctionnement du système hormonal en (1) imitant l'action d'une hormone naturelle et en se fixant sur le récepteur cellulaire (effet agoniste), ou en (2) se fixant sur le récepteur hormonal et en empêchant l'émission du signal (effet antagoniste). Dans cette étude, deux hormones ont été suivies : les œstrogènes et les androgènes.

Les évaluations de l'activité œstrogénique et de l'activité androgénique sont effectuées par le test *in vitro* de dépistage des œstrogènes de levure (YES) et des androgènes de levure (YAS). Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire Toxem (12, rue des Quatre Saisons, 76290 Montivilliers, France). Le principe du test est basé sur les travaux de Routledge et Sumpter (1996). Les déterminations de l'activité œstrogénique et androgénique sont réalisées en utilisant deux souches génétiquement modifiées de la levure *Saccharomyces cerevisiae* contenant un gène récepteur des œstrogènes humains (hER) ou un gène récepteur des androgènes humains (hAR). Les cellules de levure contenaient également un plasmide d'expression intégré avec le gène rapporteur lac-Z qui code pour la β -galactosidase. L'activation du gène rapporteur lac-Z suite à la liaison sur les récepteurs hER ou hAR par une substance active d'œstrogène ou androgène a donné lieu à la synthèse de β -galactosidase dans le milieu qui a converti le substrat chlorophénol red- β -D-galactopyranoside, substrat de la β -galactosidase, en rouge chlorophénol. L'activité de l'enzyme, directement proportionnelle à la présence de chlorophénol rouge, et la viabilité cellulaire sont déterminées par mesure de l'absorbance à 570 nm et 690 nm, respectivement.

Ces évaluations de l'activité œstrogénique et androgénique sont réalisées sur des éluutriats préparés à partir des échantillons bruts des matrices étudiées (sol + Mafors) et sur leurs extraits organiques. Les éluutriats des échantillons bruts sont réalisés à partir de 10 g MS pour 100 mL d'eau ultrapure. Les extractions organiques des échantillons sont réalisées par l'extraction ASE où un échantillon est mélangé avec deux solvants, le dichlorométhane et l'acétone (1/1, v/v). Les phases organiques extraites sont ensuite évaporées à l'aide d'un évaporateur Multivapor P-12 (Büchi) avant d'être remises en suspension avec du

diméthylsulfoxyde soit à 1 mL par 10 g MS d'échantillon de sol de référence ou de boue d'épuration, soit à 2 mL par 10 g MS d'échantillon de fumier de vache ou de lisier de vache.

Les résultats sont estimés en termes d'effets agonistes (YES, YAS) et antagonistes (ANTI-YES, ANTI-YAS) et sont également évalués pour les effets cytotoxiques. Pour l'évaluation de l'activité agoniste et antagoniste des éluviats et des extraits organiques des Mafors ou sols, les cellules de levure génétiquement modifiées sont exposées à une gamme de concentrations des échantillons, de contrôles agonistes positifs et de contrôles antagonistes positifs. L'exposition des levures aux éluviats est réalisée en triplicats aux concentrations suivantes : $5,0 \cdot 10^{-2}$; $1,6 \cdot 10^{-1}$; $5,0 \cdot 10^{-1}$; 1,58 ; 5 ; 15,8 ; 50 % v/v. Pour les extraits organiques, les concentrations testées sont réalisées à $1 \cdot 10^{-3}$; $3,16 \cdot 10^{-3}$; $1,10 \cdot 10^{-2}$; $3,16 \cdot 10^{-2}$; $1,10 \cdot 10^{-1}$; $3,16 \cdot 10^{-1}$; 1 % v/v pour le sol de référence et la boue ; $5 \cdot 10^{-4}$; $1,58 \cdot 10^{-3}$; $5,0 \cdot 10^{-3}$; $1,58 \cdot 10^{-2}$; $5,0 \cdot 10^{-2}$; $1,58 \cdot 10^{-1}$; $5 \cdot 10^{-1}$ % v/v pour le fumier et le lisier. Les levures sont ensuite incubées pendant 48 h à 30 °C en présence du substrat de la β -galactosidase. Pour la référence du test agoniste, les étalons de 17- β -œstradiol (test YES) et 5 α -dihydrotestostérone (test YAS) sont utilisés pour les courbes d'étalonnage à sept concentrations comprises entre $2,7 \cdot 10^{-9}$ - $2,7 \cdot 10^{-6}$ g.L⁻¹ et $2,9 \cdot 10^{-7}$ - $2,9 \cdot 10^{-4}$ g.L⁻¹ respectivement. Pour le test antagoniste, les étalons de 4-hydroxytamoxifène en présence d'œstradiol (test anti-YES) et de flutamide en présence de dihydrotestostérone (test anti-YAS) sont utilisés pour les courbes d'étalonnage à sept concentrations comprises entre $3,9 \cdot 10^{-6}$ - $3,9 \cdot 10^{-3}$ g.L⁻¹ et $2,8 \cdot 10^{-5}$ - $2,8 \cdot 10^{-2}$ g.L⁻¹. Les réponses obtenues avec des concentrations d'échantillons induisant plus de 50 % de mortalité des cellules ne sont pas prises en compte dans les résultats. Les échantillons testés sont considérés comme œstrogéno-mimétiques ou androgéno-mimétiques lorsque la réponse obtenue dépasse 10 % de la réponse obtenue avec un œstrogène ou androgène de référence. De la même façon, les potentiels anti-œstrogénique ou anti-androgénique des Mafors ou sols testés sont identifiés lorsque l'inhibition de la réponse à l'œstradiol ou à la dihydrotestostérone est supérieure à 50 % de la réponse obtenue avec un anti-œstrogène ou anti-androgénique de référence.

4.6.2 Sur les microorganismes : activités enzymatiques

Les activités enzymatiques de la β -glucosidase (β -GLU ; EC : 3.2.1.21), de la phosphatase alcaline (PAK ; EC : 3.1.3.1), de la phosphatase (PHOS ; acide ou alcaline selon le pH de la solution), et de l'arylamidase (ARN ; EC : 3.4.11.2) sont impliquées dans la décomposition de

différents substrats en relation avec les cycles biogéochimiques du carbone (C), de l'azote (N) et du phosphore (P). Ces enzymes jouent un rôle dans la réduction des polysaccharides en glycosides simples pour la β -glucosidase, dans l'hydrolyse des liaisons phosphodiester et la libération de phosphore pour les phosphatases et dans l'hydrolyse des protéines en ammonium pour l'arylamidase. Les différentes enzymes ont été suivies durant 14 jours dans les sols amendés à des doses réalistes en Mafors de 0, 10 et 20 g.kg⁻¹ MS en six réplicats.

Les activités enzymatiques du sol sont analysées sur des plaques 96 puits en triple exemplaire selon la norme ISO 20130 : 2018 (Cheviron et al., 2022 ; ISO, 2018b). Brièvement, 4 g de chaque traitement (sol et sol amendé) et de chaque réplicat sont prélevés et mis en agitation pendant 10 min dans 25 ml d'eau déminéralisée pour la PHOS et la β -GLU ou dans un tampon Tris (0,05 M à pH = 11) pour la PAK. La suspension de sol est ensuite introduite dans les puits puis incubée avec un substrat de 4-nitrophényl- β -glucopyranoside 0,01 M (360,3 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) pour l'activité β -GLU durant 1 h à 37 °C et de 4-nitrophénylphosphate 0,05 M (371,12 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) pour l'activité PHOS et PAK durant 30 min à 37 °C. La réaction est stoppée avec 0,5 M de CaCl₂ et 0,1 M de tampon Tris à pH = 12 puis chaque microplaque est centrifugée pendant 5 min à 1 500 g. Ensuite, 200 μ l de surnageant sont introduits dans une autre microplaque où l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur Infinite 200 (Tecan). Les quantités de para-nitrophénol sont obtenues en mesurant l'absorbance à λ = 405 nm et leur comparaison avec des courbes d'étalonnage a permis d'évaluer l'activité des microorganismes.

Pour l'activité ARN, le sol est mis en agitation pendant 10 min dans un tampon TRIS (0,5 M à pH = 7,5). La suspension de sol est ensuite incubée avec un substrat de L-leucine- β -naphthylamide hydrochlorure 0,008 M (292,8 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) pendant 2 h à 37 °C. La réaction est stoppée avec de l'éthanol à 96° puis chaque plaque est centrifugée pendant 5 min à 1 500 g. La production du β -naphthylamine est révélée par ajout d'éthanol acidifié à 96° et du *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMCA, Sigma-Aldrich) après 20 min d'incubation à l'obscurité. Les quantités de β -naphthylamine sont obtenues en mesurant l'absorbance à λ = 540 nm et leur comparaison avec des courbes d'étalonnage a permis d'évaluer l'activité des microorganismes. Les activités enzymatiques du sol sont exprimées en nmole de substrat hydrolysé par minute pour un gramme de sol sec correspondant à mU.g⁻¹ de sol sec.

4.6.3 Sur les plantes : Test de germination et croissance racinaire

Le test aigu de germination est réalisé à l'aide du phytotoxkit© en suivant la norme ISO 18763 : 2020 (ISO, 2020a). Les Phytotoxkit© permettent de mesurer la diminution (ou l'absence) de graines germées et la taille des jeunes racines après une exposition à différentes matrices testées en comparaison avec un sol témoin non contaminé. L'évaluation du test de germination est réalisée sur les différentes espèces de plantes déterminées dans le paragraphe précédent : la courgette *Cucurbita pepo*, la luzerne *Medicago sativa* et la moutarde *Sinapis alba* (**Figure 20**). Les tests sont réalisés d'un côté avec un mélange de sable et de Mafors aux concentrations suivantes : 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 g.kg⁻¹ MS et de l'autre avec un mélange de sol de référence et de Mafors aux concentrations suivantes : 0, 10, 20, 50, 100, 200 g.kg⁻¹ MS. Les plaques d'essai en plastique transparent issues des phytotoxkits© d'une dimension de 21 cm x 15,5 cm sont composées de deux compartiments identiques de dimension 8,8 cm x 12,5 cm et d'épaisseur de 8 mm et séparés par une crête médiane (**Figure 22**). Le compartiment inférieur est rempli du mélange saturé à la CRE maximale, puis recouvert par un papier buvard sur lequel dix graines ont été déposées à égale distance et à 1 cm de la crête médiane. La plaque est ensuite fermée à l'aide d'un couvercle transparent et placée à 45° dans une salle climatisée à 20 ± 2 °C et une photopériode de 16 h jour/8 h nuit. La fin du test est déterminée lorsque les racines atteignent moins de 1 cm du bord de la plaque. À la fin de l'exposition, une image numérique est prise pour chaque plaque d'essais et le comptage du nombre de graines germées est effectué. Les mesures de longueur ont été prises à l'aide de l'outil ImageJ© (**Figure 22**). Pour chaque Mafor testée, trois réplicats (trois plaques) sont utilisés pour chaque espèce de plantes et chaque concentration. Le pourcentage de graines non germées, noté g et exprimé en %, est obtenu pour toutes les graines de chaque réplicat par la formule suivante :

$$\text{Équation n° 4 : } g = \left(\frac{A}{B} \right) \times 100$$

Où A = nombre de graines non germées dans le traitement et B = nombre de graines initiales dans le traitement. La validité du test est vérifiée si les témoins négatifs montrent un taux de germination supérieur à 70 % et que leur croissance racinaire atteint une longueur d'au moins 30 mm.



Figure 22. Photographie du Phytotoxkit© utilisé lors des tests de germination (© Roques Olivier).

4.6.4 Sur les vers de terre : létalité, croissance et évitement

Les bioessais sont réalisés dans une salle climatisée à 20 ± 2 °C et une photopériode de 16 h jour/8 h nuit au laboratoire Provademse. Le mélange sol-Mafors est préparé 5 jours avant le début de l'essai afin de permettre une recolonisation du milieu par les microorganismes et la stabilisation de la teneur en eau. La teneur en eau est ajustée à 70 % de la CRE du mélange. Seuls les vers de terre adultes compris entre 350 mg et 600 mg en matière fraîche, avec un clitellum visible et bien développé, sont sélectionnés pour les tests de toxicité. Après avoir été introduits dans le milieu, une vérification sur l'enfouissement des vers de terre dans le sol après 2 h d'exposition est réalisée afin de s'assurer de leur viabilité. Avant et après la fin des tests, les vers sont nettoyés avec de l'eau déminéralisée par rinçage, puis mis à jeûner pendant 24 h avant d'être pesés pour éviter les variations liées à la nourriture présente dans leur tube digestif. La teneur en eau du milieu d'exposition est vérifiée chaque semaine par pesée et rectifiée si nécessaire avec de l'eau déminéralisée.

4.6.4.1 Test de létalité

Le test aigu de létalité est réalisé selon la norme ISO 11268-1 : 2015 (ISO, 2015b). Durant les tests, des bocaux en verre de 1 L (Le Parfait®) sont utilisés (11 cm de diamètre, 16,5 cm de hauteur) et fermés à l'aide de couvercles en plastique percés uniformément pour éviter la fuite des vers de terre et une oxygénation du milieu (**Figure 23**). Les tests sont réalisés indépendamment des autres Mafors testées. Environ 600 g de sol de référence, ou de sol de référence amendé, sont introduits dans chaque bocal en verre. Le volume de sol introduit est ajusté au même niveau entre toutes les concentrations testées d'une même Mafor. Ainsi, dix vers de terre incluant trois réplicats par traitement sont exposés sur 14 jours (**Figure 23**). Un test préliminaire a permis d'établir les gammes de concentrations qui encadraient 0 % et 100 % de mortalité. À partir de ces résultats, les concentrations testées sont : 10, 20, 30, 40, 50, 100, 120, 140, 160, 180 et 200 g.kg⁻¹ MS pour la boue d'épuration ; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g.kg⁻¹ MS pour le fumier de vache et le lisier de vache. La mortalité est mesurée à 14 jours (**Équation n° 5**) et la quantité de biomasse « vers de terre vivants » est déterminée au début et en fin du test afin de calculer le taux de croissance durant la période d'exposition (**Équation n° 6**). Les vers de terre ne sont pas nourris durant le test. Ils sont considérés comme morts si aucun mouvement n'est observé lors d'une piqûre sur leur partie antérieure. Le pourcentage de vers de terre morts, noté z et exprimé en %, est obtenu pour chaque réplicat par la formule suivante :

$$\text{Équation n° 5 : } z = \left(\frac{D}{T} \right) \times 100$$

Où D = nombre de vers de terre morts dans le traitement et T = nombre de vers de terre initial dans le traitement.

Le taux de croissance des vers de terre adulte entre le début et la fin de l'expérience, noté g et exprimé en %, est obtenu pour chaque réplicat par la formule suivante :

$$\text{Équation n° 6 : } g = \left(\frac{mf - mi}{mi} \right) \times 100$$

Où mf = masse de vers de terre vivants à la fin de l'expérience et mi = masse de vers de terre vivants au début de l'expérience.

La validité du test est vérifiée si, dans les essais témoins, une mortalité inférieure à 10 % et une perte de biomasse fraîche ne dépassant pas les 20 % sont observées.



Figure 23. Dispositif expérimental utilisé lors des tests de létalité et de reproduction sur les vers de terre *Eisenia fetida* exposés à des sols amendés en Mafors (© Roques Olivier).

4.6.4.2 Test d'évitement

Le test aigu d'évitement est réalisé en suivant la procédure expérimentale décrite dans la norme ISO 17512-1 : 2020 (ISO, 2020b). Le test est réalisé à des concentrations où aucune mortalité n'a été observée pour les vers de terre sur le test de létalité. Un sol artificiel ISO est mélangé aux concentrations suivantes : 10, 20, 50 g MS.kg⁻¹ pour la boue d'épuration et le fumier de vache ; 5, 10, 20 g MS.kg⁻¹ pour le lisier de vache. L'expérimentation est réalisée avec quatre réplicats pour chaque traitement. Ainsi, 700 g de sol équivalent sec sont introduits dans un contenant en plastique divisé en six sections égales grâce à des plaques (**Figure 24**). Le sol artificiel ISO témoin sans Mafors et le sol artificiel ISO amendé en Mafor sont placés alternativement dans les différentes sections. La cavité centrale est restée vide. Ainsi, dix vers de terre sont placés dans la section vide et les plaques de sections sont retirées. Les contenants sont ensuite fermés par des couvercles percés de trous permettant l'oxygénation du milieu et empêchant la fuite des vers de terre. Le test est réalisé pendant 48 h, les vers de terre ne sont pas nourris durant le test. Après 48 h d'exposition, les plaques de sections sont remises et les vers de terre sont dénombrés dans chacune des différentes sections. Un ver de terre coupé en deux est comptabilisé 0,5/0,5 pour les sections concernées. La réponse de l'évitement, notée AR et exprimé en %, est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$\text{Équation n° 7 : } AR = \left(\frac{C-T}{N} \right) \times 100$$

Où, C = nombre total de vers de terre dans le sol artificiel ISO témoin par contenant,
T = nombre de vers de terre total dans le sol artificiel ISO amendé en Mafors par contenant
et N = nombre total de vers de terre par contenant.

Une valeur de AR positive indique un comportement d'évitement, à l'opposé, une valeur de AR négative indique un comportement d'attraction du milieu testé. Le comportement d'évitement signifie une fuite du milieu lorsque l'évitement est compris entre 20 et 80 %. Au-delà de 80 %, le milieu testé est caractérisé comme milieu à fonction d'habitat limité pour les vers de terre. Lorsque la valeur de AR est inférieure à -80 %, la présence de substances chimiques ne peut pas être exclue. La validité du test est vérifiée par une mortalité inférieure à 10 % dans chacun des traitements.

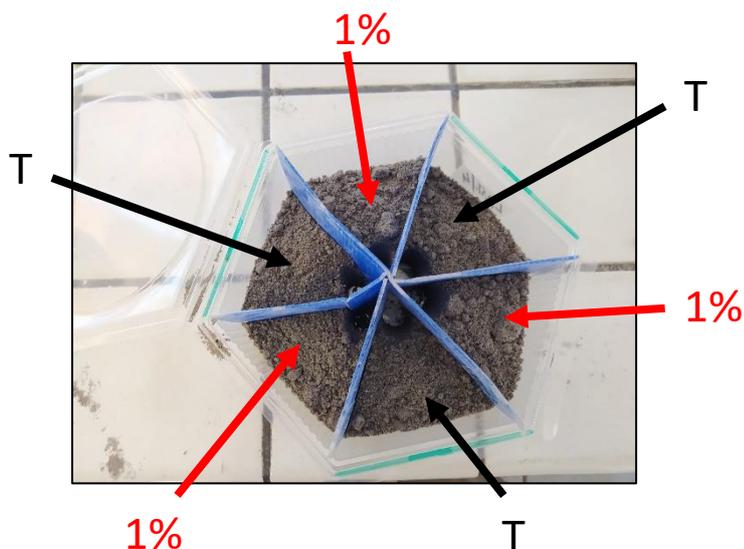


Figure 24. Dispositif expérimental utilisé lors des tests d'évitement sur les vers de terre *Eisenia fetida* avec un sol artificiel ISO amendé à 1 % en Mafors et T = sol artificiel ISO non amendé (© Roques Olivier).

4.7 Tests de toxicité chronique

4.7.1 Sur les plantes : émergence et croissance des plantes

Pour ce test de toxicité chronique, le choix des plantes retenues a été déterminé par les résultats obtenus lors des tests de toxicité aiguë, leur représentativité dans les cultures mises en place dans la zone d'étude et leur utilisation dans la norme ISO 11269-2 : 2013 (ISO, 2013) et la littérature. La luzerne cultivée *Medicago sativa* et la moutarde blanche *Sinapis alba* ont été sélectionnées pour évaluer la toxicité chronique des différentes Mafors amendées dans le sol de référence. Le test de toxicité chronique s'est déroulé en adaptant la norme ISO 11269-2 : 2013 (ISO, 2013).

Les tests sont réalisés avec un mélange de sol de référence et de Mafors aux concentrations suivantes : 0, 10 et 20 g.kg⁻¹ MS. Des pots en terre cuite de dimension 13,5 cm de hauteur et 14 cm de diamètre troués à leur base sont recouverts avec un papier en aluminium pour éviter les échanges d'eau et de polluants entre le sol amendé et la terre cuite (**Figure 25**). Un grillage de moustiquaire est déposé sur le fond pour retenir le sol à travers le trou et pour laisser circuler l'eau par capillarité. Tous les pots sont ensuite remplis avec le sol de référence amendé ou non en Mafors à une quantité identique jusqu'à environ 2 cm au-dessous du bord. Chaque concentration testée est réalisée en triplicat. Les mélanges sont préparés 5 jours avant la mise en place des graines et introduits dans les pots placés dans la chambre de culture pour relancer l'activité microbienne dans le sol et ainsi « stabiliser » le dispositif expérimental. Pour chacune des espèces, 75 graines sont déposées de façon homogène à la surface puis celles-ci sont recouvertes d'une épaisseur de 1 cm par le sol de référence amendé ou non en Mafors. Pour maintenir une teneur en eau appropriée du sol au cours des essais, les pots sont arrosés trois fois par semaine par vaporisation à la surface et placés sur une coupelle remplie d'eau déminéralisée permettant une humidification par capillarité. Une vérification de la teneur en eau par pesée est effectuée chaque semaine. Le test est réalisé dans une salle climatisée à 20 ± 2 °C et une photopériode de 16 h jour/8 h nuit où les pots sont placés aléatoirement sur les étagères d'exposition (**Figure 25**). Un témoin négatif est réalisé pour chaque espèce dans un terreau.



Figure 25. Dispositif expérimental des bioessais en laboratoire sur l'émergence et la croissance des plantes (© Roques Olivier).

La germination et la croissance des graines sont suivies pendant 28 jours pour *M. sativa* et 21 jours pour *S. alpa*. À la fin de l'exposition, les plantes cultivées sont retirées. Les parties aériennes (tige et feuille) sont coupées à la séparation avec les parties racinaires, puis quantifiées et photographiées. Les parties racinaires sont retirées du sol par rinçage du sol sur un tamis de maille 630 μm (**Figure 26**). Les parties aériennes et racinaires sont rassemblées dans un b cher d'eau déminéralisée sous ultrasons durant 5 min. Les échantillons sont ensuite nettoyés dans quatre bains successifs à l'aide d'une passoire. La germination des graines est identifiée et le taux calculé grâce à l'équation n  4. Les tailles des parties aériennes et racinaires sont mesurées par traitement numérique des photographies prises sur le logiciel ImageJ . Les parties aériennes et racinaires sont ensuite séchées séparément sur un papier absorbant avant d'être pesées par réplicat afin d'obtenir la masse fraîche des plantes (**Figure 26**). Après séchage d'une semaine dans une étuve à 50  C, les parties aériennes et racinaires sont à nouveau pesées pour obtenir la masse sèche des plantes.



Figure 26. Séchage des parties aériennes et récupération des parties racinaires (  Roques Olivier).

4.7.2 Sur les vers de terre en laboratoire : test de reproduction

4.7.2.1 Bioessai préliminaire – Effet de la matière organique

Le facteur « nourriture » peut affecter les réponses des organismes face à des milieux contaminés lors des tests de toxicité chronique. Dans un premier temps, un test préliminaire

est réalisé pour évaluer l'effet de la matière organique mesurée à travers le carbone organique sur la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*. Dans un second temps, la sensibilité des vers de terre est vérifiée à l'aide d'une substance de référence, l'acide borique, connu pour réduire la reproduction des vers de terre à faible dose (ISO, 2015a).

L'influence de la matière organique sur la reproduction des vers de terre *E. fetida* est étudiée durant 56 jours en suivant la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a). Le but de ce test préliminaire est : (1) d'évaluer l'effet de l'apport du carbone organique sur la reproduction des vers de terre *E. fetida* et (2) de tester la réponse des vers de terre *E. fetida* issus de l'élevage à une substance de référence, l'acide borique. Des boîtes en plastique (L = 14,5 cm, l = 9 cm, h = 8 cm) sont utilisées et fermées à l'aide de couvercles en plastique percés uniformément pour éviter la fuite des vers de terre et assurer l'oxygénation du sol (**Figure 27**). Les boîtes sont ensuite recouvertes à la base par une bande de papier d'aluminium de 5 cm de hauteur pour garantir l'obscurité dans le sol.



Figure 27. Dispositif expérimental recommandé par la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a) et utilisé lors de l'essai préliminaire sur le test de reproduction des vers de terre *Eisenia fetida* exposés à différentes conditions d'exposition (© Roques Olivier).

Ainsi, quatre conditions sont testées au cours de ce test préliminaire (**Tableau 12**) :

- Le traitement témoin négatif (T-). L'apport en nourriture suit les conditions de la norme ISO, soit 5 g de crottin sec ajoutés chaque semaine dans le milieu ;
- Les traitements A et B. Ici, 10 g (A) ou 20 g (B) de crottin sont ajoutés chaque semaine dans le milieu ;

- Les traitements C et D. 40 g et 80 g de crottin sont ajoutés dès le début du test, soit une teneur en crottin équivalent à 10 et 20 % dans le milieu. Aucune alimentation n'est ajoutée par la suite ;
- Le traitement témoin positif (T+). Le milieu est dopé à une concentration en acide borique de 450 mg.kg⁻¹ MS connue pour inhiber de 50 % la reproduction des vers de terre (ISO, 2015a). L'apport en nourriture suit les mêmes conditions que le traitement témoin négatif et la norme ISO.

Tableau 12. Conditions d'essais lors du test préliminaire évaluant l'effet de la teneur en carbone organique sur la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*.

Traitement	Teneur en crottin initiale (%)	Ajout de crottin par semaine (g MS)	Teneur en carbone organique final issu du crottin (%)	Humidité t0 (%)	pH t0
T-	0	5	1,82	24,36 ± 0,05	6,48 ± 0,01
A	0	10	3,64	24,36 ± 0,05	6,48 ± 0,01
B	0	20	7,28	24,36 ± 0,05	6,48 ± 0,01
C	10	0	4,15	35,54 ± 0,11	7,01 ± 0,01
D	20	0	8,30	56,17 ± 0,54	7,35 ± 0,03
T+	0	5	1,82	24,36 ± 0,05	7,25 ± 0,05

Chaque mélange est préparé 5 jours avant le début de l'essai à 70 % de la CRE du mélange afin de permettre une recolonisation du milieu par les microorganismes et la stabilisation de la teneur en eau. Environ 600 g de sol ISO artificiel humide ou du mélange humide sont introduits dans chaque boîte. Le volume de sol introduit est ajusté au même niveau entre toutes les conditions testées. Puis, dix vers de terre sont introduits dans chacune des conditions réalisées en quatre réplicats. La teneur en eau est vérifiée chaque semaine par pesée et ajustée si nécessaire avec de l'eau déminéralisée.

Après 28 jours d'exposition, les vers de terre adultes sont retirés puis dénombrés pour évaluer la mortalité des vers de terre (**Équation n° 5**) et pesés pour évaluer la croissance des vers de terre (**Équation n° 6**). Chaque condition reçoit 5 g de crottin sec, aucune nourriture n'est ensuite ajoutée jusqu'à la fin du test. Après 56 jours d'exposition, les juvéniles et cocons non éclos sont retirés du sol manuellement et dénombrés. La validité du test de reproduction se vérifie avec les essais témoins par une mortalité inférieure à 10 %, une production de juvéniles supérieure à 30 et une variabilité inférieure à 30 %.

4.7.2.2 Bioessais sur les Mafors

Sur la base des résultats obtenus avec le test préliminaire de reproduction des vers de terre, la procédure expérimentale de la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a) a nécessité une adaptation. L'adaptation consistait à fixer la teneur en carbone organique entre chacune des concentrations testées en Mafors dès le début de l'expérience afin de s'abstraire du facteur confondant « nourriture » et ainsi éviter de masquer les potentiels d'effets écotoxiques des Mafors sur la reproduction des vers de terre.

Pour atteindre cet équilibre, du crottin de cheval biologique est ajouté dans chacune des conditions jusqu'à atteindre la teneur en carbone organique du sol amendé à la plus forte concentration testée en Mafors. Pour le test de reproduction sur la boue d'épuration, le sol amendé à la plus forte concentration en boue d'épuration atteignait une quantité en carbone organique d'environ 8,36 g (**Figure 28**). Pour atteindre cette quantité en carbone organique, environ 20 g de crottin sont ajoutés dans les essais témoins. Cette quantité de crottin apportée est similaire à la quantité en crottin apporté dans la norme ISO durant le test de reproduction et permet de s'assurer une bonne croissance des vers de terre au cours des essais. Tous les tests de reproduction ont débuté avec une quantité en carbone organique de 8,36 g dans chacune des conditions, sans ajout complémentaire de nourriture au cours des essais.

Deux tests de reproduction sont réalisés pour évaluer l'écotoxicité chronique des Mafors sur les vers de terre aux conditions suivantes :

- **Test de reproduction n° 1.** Des tests indépendants réalisés sur chacune des Mafors testées avec des concentrations de 0, 10, 20, 50 g.kg⁻¹ MS pour la boue d'épuration et pour le fumier de vache en trois répétitions par concentration et de 0, 5, 10, 20 g.kg⁻¹ MS pour le lisier de vache avec quatre répétitions par concentration ;
- **Test de reproduction n° 2.** Un test de vérification sur les trois Mafors étudiées réalisé **simultanément** sur une seule concentration de 20 g.kg⁻¹ MS avec quatre répétitions par concentration.

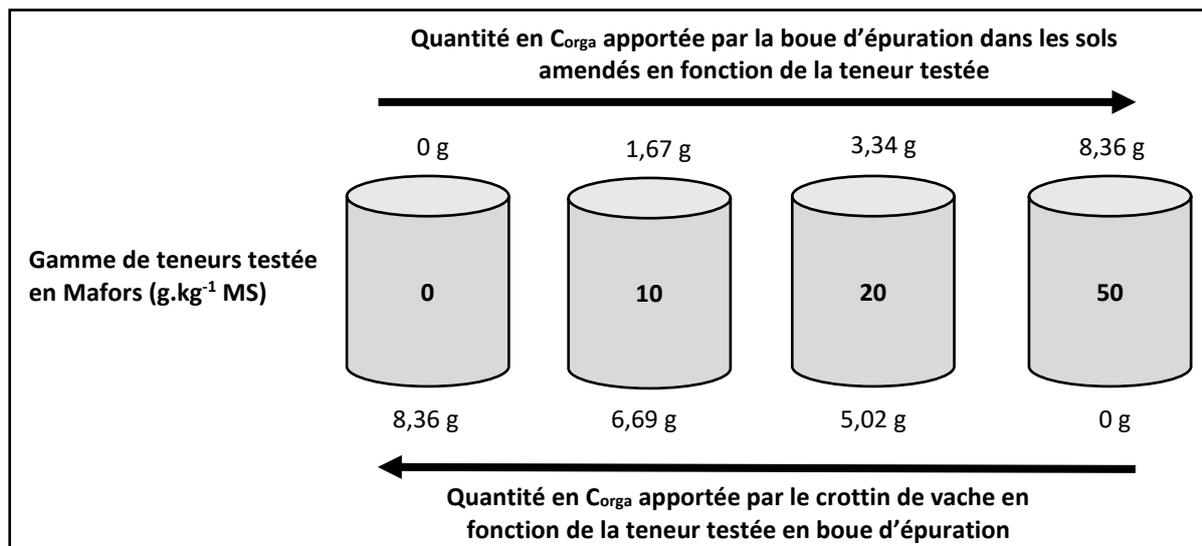


Figure 28. Gradient inverse appliqué sur le carbone organique (C_{orga}) pour équilibrer toutes les conditions avec la teneur en C_{orga} obtenue à la plus forte concentration en boue d'épuration testée lors du test de reproduction.

Les tests de reproduction sont réalisés durant 56 jours à des concentrations en Maifors où aucune mortalité n'a été observée pour les vers de terre lors du test de létalité. Durant les tests, des bocaux en verre de 1 L (Le Parfait®) sont utilisés (11 cm de diamètre, 16,5 cm de hauteur) et fermés à l'aide de couvercles en plastique percés uniformément pour éviter la fuite des vers de terre et assurer l'oxygénation du sol (**Figure 23**). Chaque mélange est préparé 5 jours avant le début de l'essai à 70 % de la CRE du mélange afin de permettre une recolonisation du milieu par les microorganismes et la stabilisation de la teneur en eau. Ainsi, 450 g de masse sèche de sol de référence ou de sol de référence amendé en Maifors sont introduits dans chaque bocal en verre recouvert à la base par une bande de papier d'aluminium de 6 cm de hauteur pour maintenir l'obscurité dans le sol. Puis, dix vers de terre comprenant trois ou quatre réplicats par traitements sont exposés aux concentrations définies précédemment pendant 28 jours. Un témoin négatif est réalisé pour chacun des tests dans un sol artificiel ISO défini dans la norme ISO (ISO, 2015a). La teneur en eau est vérifiée chaque semaine par pesée et rectifiée si nécessaire avec de l'eau déminéralisée.

Après 14 jours d'exposition, les vers de terre adultes sont dénombrés afin de vérifier la mortalité puis réintroduits dans le milieu d'essai brassé manuellement pour l'aérer. Après 28 jours d'exposition, les vers de terre adultes sont retirés, dénombrés pour évaluer le taux de mortalité (**Équation n° 5**) et pesés après 24 h de jeûne pour évaluer le taux de croissance

(Équation n° 6). Les vers de terre sont considérés comme vivants s'ils sont capables de répondre à un stimulus mécanique. Les vers de terre sont ensuite endormis à 4 °C (24 h) dans un tube en verre avant d'être conservés à -20 °C pour les différentes analyses chimiques. Le test s'est poursuivi 28 jours de plus. À l'issue de l'essai, les juvéniles et les cocons non éclos sont retirés du sol à l'aide d'un système de filtration d'eau et une superposition de tamis (1 mm, 630 µm et 200 µm) et dénombrés (**Figure 29**). Les juvéniles de tous les réplicats d'une condition sont regroupés dans un tube en verre, mis à jeûner 24 h, puis endormis à 4 °C avant d'être conservés à -20 °C pour les analyses en résidus de médicaments. La validité du test de reproduction se vérifie chez les témoins exposés au sol de référence non amendé par : (i) une mortalité inférieure à 10 %, (ii) une production de juvéniles supérieure à 30, et (iii) une variabilité inférieure à 30 %. Le pH et la conductivité des sols sont mesurés à 0, 28 et 56 jours pour toutes les conditions et pour tous les tests de reproduction réalisés. Ces deux paramètres ont permis de suivre la dégradation de la matière organique à travers l'acidification et l'augmentation des espèces ioniques en solution.



Figure 29. Dispositif de récupération des juvéniles (© Roques Olivier).

4.7.3 Sur les vers de terre *in situ* : test de reproduction

Le test de reproduction *in situ* des vers de terre est réalisé dans le but d'évaluer l'impact écotoxique des Mafors dans des conditions environnementales non contrôlées.

Les chambres d'essais sont spécialement conçues pour effectuer le test *in situ* avec des vers de terre. Les chambres sont constituées avec des tubes en PVC (polychlorure de vinyle) de 20 cm de hauteur et de 19,5 cm de diamètre. Dans le fond, l'ouverture est recouverte par

une moustiquaire de maille 2 mm et une chaussette de maille 140 μm fixées par du ruban adhésif permettant de retenir le sol et les vers de terre ainsi que l'évacuation de l'eau en excès (**Figure 30**). L'ouverture du haut est recouverte par une moustiquaire de 2 mm de maille maintenue par un élastique pour éviter la fuite des vers de terre, l'introduction de matières végétales ou d'organismes dans le système et l'aération du milieu ainsi que les interactions avec les changements physicochimiques du milieu.



Figure 30. Dispositif expérimental du test *in situ* de reproduction des vers de terre *Eisenia fetida* (© Roques Olivier).

Pour se rapprocher au plus près des conditions réalistes, le sol de référence est amendé à une concentration de 10 g.kg^{-1} MS de boue d'épuration ou de lisier de vache, simulant le sol du terrain. Chaque mélange est préparé 5 jours avant le début de l'essai à 70 % de la CRE du mélange afin de permettre une recolonisation du milieu par les microorganismes et la stabilisation de la teneur en eau.

Les chambres d'essai sont ensuite remplies avec le sol de référence sur les 7,5 cm du fond et du sol amendé dans les 7,5 cm du dessus (partie en surface). Ainsi, une quantité de 2,4 kg de sol de référence sont introduits sans tassement dans les 7,5 cm de profondeur de la partie inférieure des tubes en PVC dans toutes les conditions. Puis, les chambres d'essais sont complétées sur une hauteur de 7,5 cm, par 2,2 kg de sol de référence amendé en boue d'épuration ou en lisier de vache. La condition témoin est représenté par un mélange de sol de référence amendé avec du crottin de cheval bio dans les 7,5 cm supérieurs du sol pour obtenir une teneur en carbone organique équivalente aux essais avec les Mafors. Ainsi,

trois traitements sont réalisés (sol témoin amendé en crottin de cheval bio (témoin), sol amendé en boue d'épuration, sol amendé en lisier de vache) avec quatre réplicats par traitement. Afin de s'assurer la survie des vers de terre, le milieu est humidifié au début de l'expérimentation à 70 % de la CRE du mélange.

L'engagement des vers de terre est réalisé durant la période de juillet. L'essai *in situ* a commencé par l'introduction de 18 vers de terre dans chacune des chambres d'essais, suivie par un placement aléatoire des chambres sur un terrain plat, ensoleillé du lever du soleil jusqu'à 14 h et ombragé ensuite jusqu'à la tombée de la nuit. Les chambres sont enterrées de manière à ce que le sol à l'intérieur soit au même niveau que le sol extérieur. Durant l'expérimentation, un relevé météorologique et une mesure de la teneur en eau à l'aide de sonde ont permis d'ajuster tous les deux jours la teneur en eau dans chacune des conditions au cours de l'exposition pour maintenir l'humidité proche de 70 % (cf. tableau B.2 de l'ANNEXE B, page 259). Aucune nourriture n'est ajoutée au cours de l'expérience dans les différentes conditions.

Après 28 jours d'exposition, les chambres d'essais sont retirées du sol, et les vers de terre et les cocons sont récupérés et dénombrés pour évaluer la mortalité des vers de terre (**Équation n° 5**) et la reproduction. Les vers de terre adultes sont pesés pour évaluer le taux de croissance (**Équation n° 6**) puis conservés à -20 °C pour des analyses ultérieures en micropolluants. Les cocons sont introduits dans des boîtes de Petri humidifiées 4 semaines supplémentaires pour obtenir le nombre de juvéniles éclos et le nombre de cocons non éclos.

4.8 Extractions et analyses des plantes et des vers de terre

4.8.1 Dans les plantes

La mesure des ETMs est réalisée durant le test de croissance et d'émergence des plantes. Les mesures sont effectuées dans les parties aériennes des plantes pour les deux espèces de plantes, *Medicago sativa* et *Sinapis alba*, et dans les parties racinaires de *Medicago sativa* uniquement. Après décongélation, les plantes sont séchées dans une étuve à 60 °C jusqu'à stabilisation de la masse (96 h). Ensuite, 150 à 200 mg d'échantillon sec sont prélevés et digérés dans un volume de HNO₃ (8 mL, Merck Suprapur) et un volume de H₂O₂ ultrapur (2 mL) dans un système à micro-ondes (Mars X, CEM) où la température est montée à 180 °C

en 15 min, puis maintenue pendant 10 min. Les échantillons digérés sont ensuite filtrés sur filtres Whatman n° 541 (22 µm) en utilisant 25 mL d'eau distillée. Les concentrations en ETMs sont mesurées par spectrométrie d'absorption atomique avec un PinAAcle 900 T de Perkin Elmer pour le chrome, le plomb, le nickel et le zinc (FDT, 1996) et un four en graphite pour le cadmium et le cuivre (ISO, 2004). Chaque condition est analysée en triplicats.

4.8.2 Dans les vers de terre

Issus du test de reproduction n° 1, les vers de terre adultes sont analysés pour quantifier les réserves énergétiques (glucides, lipides et protéines), les ETMs et les résidus de médicaments. Les résidus de médicaments sont également quantifiés dans les vers de terre juvéniles.

Issus du test de reproduction n° 2, les vers de terre adultes sont analysés pour quantifier les ETMs et les résidus de médicaments. Au vu des résultats précédents, l'analyse quantitative des résidus de médicaments dans les juvéniles n'est pas réalisée.

Issus du test de reproduction *in situ*, les vers de terre adultes sont utilisés pour quantifier les ETMs.

4.8.2.1 Réserves énergétiques des vers de terre

L'analyse des réserves énergétiques est réalisée sur les glucides, les lipides et les protéines dans les vers de terre exposés. Toutes les mesures biochimiques sont effectuées sur des vers de terre individuellement et sélectionnés aléatoirement dans chacun des traitements. Pour chaque traitement, les analyses biochimiques des réserves énergétiques sont réalisées sur sept vers de terre en suivant le protocole décrit par Pelosi et al. (2016). Les vers de terre congelés sont individuellement homogénéisés en utilisant un microbroyeur (Ultra-Turrax IKAT10, 15 000 rpm) dans 1 mL de tampon phosphate glacé à 100 mM (pH 7,2 et 1 mM d'acide EDTA) pour 100 mg de vers de terre.

➤ Protéines

La teneur en protéines est déterminée en utilisant la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay) décrite par Smith et al. (1985). L'homogénat de vers de terre est introduit dans une microplaque où 200 µL du réactif à l'acide bicinchoninique sont ajoutés (22 mL d'acide bicinchoninique et 0,44 mL de sulfate de cuivre à 4 %). La microplaque est ensuite incubée

30 min à 37 °C. La complexation entre les ions cuivreux Cu^+ et l'acide bichinchoninique forme un complexe mesurable à 562 nm. La teneur en protéines est calculée en utilisant la courbe d'étalonnage établie avec du sérum d'albumine bovine (BSA).

➤ Lipides

Un prélèvement de 500 μL d'homogénats de vers de terre est extrait trois fois à l'aide d'un solvant organique composé de 1,25 mL de méthanol et 0,65 mL de chloroforme, par agitation vortex (3 min) puis par centrifugation pendant 5 min à 1 800 g à 10 °C. Les lipides sont ensuite séparés de l'extrait précédent en ajoutant 2,37 mL de chloroforme et 2,73 mL d'eau et en agitant (vortex 1 min). Suite à une nouvelle centrifugation à 1 800 g pendant 5 min à 10 °C, l'extrait dans le chloroforme est introduit dans des tubes Pyrex et le chloroforme est éliminée par évaporation en utilisant un flux d'azote. L'hydrolyse des lipides contenus dans les tubes Pyrex est ensuite réalisée en incubant l'échantillon avec 5 mL d'acide sulfurique (18 mM) dans un bain-marie à 100 °C pendant 10 min avant de les refroidir dans de la glace pendant 5 min. Enfin, un volume de 200 μL du mélange est prélevé et additionné avec 3 mL de réactif acide phosphorique-vanilline préparé selon Knight et al. (1972). Après une incubation de 15 min dans un bain-marie à 37 °C pour former un complexe lipide-phosphovanilline, l'absorbance à 525 nm est mesurée et la teneur en lipides des échantillons est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'huile d'olive.

➤ Glycogène

Le glycogène est quantifié dans les homogénats de vers de terre avec l'utilisation du kit Glucose Assay Reagent (HK, Sigma). Un volume de 250 μL d'homogénat de tissus est incubé dans 1 M de NaOH à 80 °C pendant 3 h, puis 100 μL du mélange d'extraction sont incubés à nouveau pendant 2 h à 37 °C avec 50 μL d'amyloglucosidase (à 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dans 850 μL de tampon acétate (0,25 M, pH 4,4). Après incubation, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 10 000 g à 40 °C. Le glucose formé par l'hydrolyse enzymatique est quantifié à l'aide du réactif issu du kit conduisant à la formation de NADH mesurable par absorbance à 340 nm. Les teneurs en glycogène sont calculées à partir d'une courbe étalonnage avec le glucose ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1 M NaOH).

4.8.2.2 Concentration en ETMs

Pour l'extraction des ETMs dans les vers de terre, deux vers de terre adultes par réplicat sont groupés puis séchés dans une étuve à 60 °C jusqu'à ce que la masse des vers de terre séchés ne varie plus (96 h). Ensuite, 100 à 200 g d'échantillon sec sont prélevés et digérés dans un volume de HNO₃ (10 mL, Merck Suprapur) et un volume de H₂O₂ ultrapur (2 mL) dans un dispositif d'extraction à micro-ondes (Mars X, CEM) où la température augmente à 200 °C en 10 min, puis maintenue pendant 20 min. Les échantillons digérés sont ensuite filtrés sur filtre Whatman n° 541 à 22 µm en utilisant 25 mL d'eau distillée et les concentrations en ETMs sont mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (PinAAcle 900 T, Perkin Elmer) pour le chrome, le plomb, le nickel et le zinc (FDT, 1996) et un four en graphite pour le cadmium et le cuivre (ISO, 2004). Chaque condition est analysée en triplicats.

4.8.2.3 Concentration en résidus de médicaments

Pour quantifier les niveaux de bioaccumulation des résidus de médicaments dans les tissus des vers de terre, les individus sont séchés par lyophilisation. Le broyage d'environ 250 mg de vers de terre est réalisé avec un barreau en céramique au GenoGrinder durant 1 min (entre 700 et 1000 agitations par min). Le broyat est ensuite tamisé à 250 µm et une double extraction est réalisée selon la procédure mentionnée précédemment à l'exception de la quantité en acétonitrile (5mL). Les limites de détection et de quantification des mesures en résidus de médicaments dans les vers de terre sont affichées dans le tableau B.3 (cf. ANNEXE B, page 259).

4.8.3 Facteur de bioaccumulation (BAF)

Dans le but d'évaluer le risque potentiel des polluants mesurés sur les organismes vivants, il est utile de calculer l'indice facteur de bioaccumulation ou BAF. Le BAF est utilisé dans l'évaluation des risques pour estimer le transfert trophique des contaminants du sol à la faune et flore. Cet indice est couramment utilisé dans l'étude de la bioaccumulation des ETMs dans les organismes du sol (Zhang et al., 2009). Il est calculé à partir des rapports des concentrations en polluants dans les vers de terre à celles mesurées dans les sols amendés ou non, pour évaluer la mobilité potentielle des polluants et le risque de bioaccumulation (**Équation n° 7**) (OECD, 2010).

Équation n° 7 : $BAF = \frac{[Polluant] \text{ Vers de terre}}{[Polluant] \text{ Sol}}$

Une bioaccumulation est effective lorsque le BAF est supérieur à 1.

4.9 Analyses statistiques

Toutes les données expérimentales sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel RStudio avec un seuil de significativité égale à $p < 0,05$.

Les proportions obtenues sur la germination, la létalité et l'évitement des vers de terre sont traitées à l'aide du test exact de Fisher sur un tableau de contingence comprenant les effectifs cumulés de tous les réplicats pour chacun des traitements. Les CL_{50} du test de létalité des vers de terre et les CE_{50} du test de germination et de croissance des plantes sont calculées à l'aide d'un modèle dose/réponse du package « drc » de R. Les données sur l'activité enzymatique des microorganismes, la biomasse et la reproduction des vers de terre, la biomasse et la taille des racines des plantes sont exprimées avec une moyenne et un écart-type. La normalité et l'homoscédasticité de ces données sont vérifiées à l'aide du test de Shapiro-Wilk et du test de Bartlett, respectivement. Pour les paramètres vérifiant la normalité et l'homoscédasticité des données, une analyse des variances paramétriques (ANOVA) est réalisée. Les différences significatives entre les différents traitements sont extraites par un test post-hoc de Student. Lorsque les conditions ne sont pas vérifiées, une analyse des variances non-paramétriques est réalisée par le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn.

Chapitre 5. Caractérisation physicochimique et écotoxicologique à court terme des trois Mafors étudiées

5.1 Contexte et enjeux

L'objectif de cette étude est de connaître les caractéristiques physicochimiques et d'évaluer l'écotoxicité potentielle de trois Mafors de différentes sources : boue d'épuration, fumier de vache et lisier de vache. En effet, si les Mafors sont épandues pour leurs propriétés fertilisantes et structurantes du sol, elles peuvent être aussi sources de pollutions diverses. Leur apport dans un sol conduit à la modification (i) des paramètres physicochimiques du sol et/ou (ii) des conditions de vie des organismes du sol. L'analyse chimique des Mafors permet d'identifier les polluants minéraux et organiques susceptibles de provoquer des effets écotoxiques sur les organismes du sol. En parallèle, des bioessais sont mis en place pour déterminer l'écotoxicité aiguë de ces Mafors (de 2 à 14 jours). Pour cela, les tests d'écotoxicité sont réalisés sur l'activité des microorganismes du sol (activités enzymatiques du sol), sur trois espèces de plantes avec la luzerne cultivée *Medicago sativa*, la moutarde blanche *Sinapis alba*, et la courgette *Cucurbita pepo* (germination et émergence des racines), et sur le ver de terre *Eisenia fetida* (survie, croissance et évitement). Les particularités de ces tests sont qu'ils sont normés, rapides, peu onéreux, utilisés fréquemment et permettent donc d'estimer le potentiel écotoxique de ces échantillons environnementaux.

5.2 **Article 1 - Assessing the potential ecotoxicological risk of different organic amendments used in agriculture: approach using acute toxicity tests on plants and earthworms**

Article soumis le 21 septembre 2022 dans le journal « Archives of Environmental Contamination and Toxicology » et accepté le 5 janvier 2023

DOI : 10.1007/s00244-023-00979-2

Assessing the potential ecotoxicological risk of different organic amendments used in agriculture: approach using acute toxicity tests on plants and earthworms

Olivier Roques^{a,b*}, Jean-Philippe Bedell^a, Julia Le Maux^b, Laure Wiest^c, Sylvie Nélieu^d, Christian Mougin^{de}, Nathalie Cheviron^{de}, Olivier Santinif^f, Vivien Lecomte^g, Rémy Bayard^b

^a UMR 5023 LEHNA, ENTPE, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Univ Lyon, 69518 Vaulx-en-Velin, France

^b Laboratoire DEEP EA7429, INSA Lyon, Université de Lyon, 9 rue de la Physique, 69621 Villeurbanne, France

^c UMR 5280, CNRS, Institut des Sciences Analytiques, Université Claude Bernard Lyon 1, Univ Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

^d UMR EcoSys, INRAE, AgroParistech, Université Paris-Saclay, 91120 Palaiseau, France

^e UMR EcoSys, INRAE, Platform Biochem-Env, Université Paris-Saclay, 91120 Palaiseau, France

^f INSAVALOR, Plateforme PROVADEMSE, 12 Avenue des Arts, 69621 Villeurbanne Cedex, France

^g Groupe de Recherche, d'Animation technique et d'Information sur l'Eau (GRAIE), 66 boulevard Niels Bohr, Villeurbanne F-69100, France

Résumé

En Europe, l'épandage de matières organiques pour fertiliser les sols agricoles est une alternative courante à l'utilisation d'engrais chimiques. Par leurs apports en nutriments et en composés organiques, ces matières favorisent la croissance des plantes et donc la production agricole. Toutefois, ces amendements organiques peuvent potentiellement contenir des polluants minéraux et organiques. Des analyses chimiques et écotoxicologiques sont nécessaires pour garantir leurs innocuités sur le sol et ses organismes au cours de l'épandage. L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'écotoxicité potentielle de trois amendements organiques de différentes origines (boue d'épuration, fumier de vache laitière, lisier de vache laitière) en réalisant une caractérisation chimique des contaminants présents dans les Mafors étudiées et en réalisant des tests d'écotoxicité aiguë sur trois types d'organismes : les vers de terre, les plantes et les communautés microbiennes du sol. Les analyses ont révélé des concentrations plus élevées pour certains résidus pharmaceutiques, hydrocarbures aromatiques polycycliques et éléments traces métalliques dans la boue d'épuration en comparaison aux deux autres typologies d'amendements organiques. L'évaluation écotoxicologique a montré un effet dose-dépendant sur les organismes du sol pour les trois amendements organiques avec des effets écotoxiques plus importants lors des essais d'exposition à un sol amendé en lisier de vache. Cependant, à des doses d'épandages réalistes (10 et 20 g.kg⁻¹ MS) sur un sol représentatif d'exposition, ces trois amendements organiques n'ont pas montré de toxicité sur les trois organismes étudiés, et a eu des effets positifs tels qu'une augmentation la biomasse des vers de terre, une augmentation de la croissance racinaire des plantes et un comportement d'attraction des vers de terre pour la boue d'épuration. En revanche, la réalisation des essais d'exposition dans un substrat limité comme le sable a montré une augmentation de la toxicité des amendements organiques sur

la germination et la croissance racinaire des plantes. Globalement, l'analyse écotoxicologique révèle une toxicité plus grande sur les organismes du sol lors d'un amendement de lisier de vache, contrairement à l'analyse chimique qui présente l'épandage de la boue d'épuration comme un risque plus élevé par la présence en plus grande quantité de polluants. L'analyse de la composition chimique et l'utilisation de tests d'écotoxicité aiguë est une première étape indispensable pour évaluer le risque écotoxicologique de l'épandage d'amendements organiques sur les organismes du sol. En complément des tests normés, l'étude suggère l'utilisation d'un sol représentatif dans les tests d'écotoxicité aiguë afin d'éviter une surestimation des effets.

Abstract

In Europe, spreading organic wastes to fertilize soils is an alternative commonly used instead of chemical fertilizers. Through their contributions of nutrients and organic matter, these wastes promote plant growth and thus agricultural production. However, these organic amendments can also contain mineral and organic pollutants requiring chemical and ecotoxicological analyses to guarantee their harmlessness on soil and its organisms during spreading. The purpose of this study was to assess the potential toxicity of three organic amendments from different sources (sewage sludge, dairy cow manure, dairy cow slurry) by performing chemical analyses and acute toxicity tests on 3 types of organism: earthworms, plants and soil microbial communities. Chemical analysis revealed a higher content of certain pharmaceuticals, polycyclic aromatic hydrocarbons and metals in sewage sludge in comparison to the two other types of organic wastes. The ecotoxicological assessment showed a dose-dependent effect on soil organisms for the three organic amendments with higher toxic effects during the exposure tests with a soil amended with dairy cow slurry. However, at realistic spreading doses (10 and 20 g.kg⁻¹ dry weight of organic amendments) on a representative exposed soil, organic amendment did not show any toxicity in the three organisms studied, and had positive effects such as increased earthworm biomass, increased plant root growth, and earthworm behavior showing attraction for organic amendment. On the contrary, exposure assays carried out on a limited substrate like sandy soil showed increased toxicity of organic amendments on plant germination and root growth. Overall, the ecotoxicological analysis revealed greater toxicity for soil organisms during the amendment of cow slurry, contrary to the chemical analysis which showed the potential high risk of spreading sewage sludge due to the presence of a higher quantity of pollutants. The analysis of the chemical composition and use of acute toxicity tests is the first essential step for assessing the ecotoxicological risk of spreading organic amendments on soil organisms. In addition to standard tests, the study suggests using a representative soil in acute toxicity tests to avoid overestimating the toxic effects of these organic amendments.

Keywords

Bioassays, pharmaceuticals, land application, soil amended with organic amendments, sustainable fertilizer.

Highlights

- Sewage sludge has a wide diversity of organic and inorganic pollutants.
- The toxicity of organic amendments is higher than the sandy soil compared to representative soil.

- A dose-dependent effect is observed on plants and earthworms exposed.
- At common spreading doses, no toxic effects are observed.

1. Introduction

Managing organic wastes has become a major challenge around the world. Increased demographics generate considerable pressure on the food sector and water management. The stock of sewage sludge increases by 3% in the European Union every year due to the increased volumes of water used to treat urban and industrial wastes (Kelessidis and Stasinakis, 2012). These agricultural inputs are also increasing following the rise in food demand. Recycling organic matter in the agricultural sector as an organic amendment has become a practice that has been generalized for many types of organic wastes. In France, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), authorizes the spreading of many organic wastes on agricultural soils such as sewage sludge, industrial wastes, agricultural inputs and composted wastes. More than 70% of sewage sludge is exploited for spreading on farmland in France (Collivignarelli et al., 2019) and almost all produced manures are spread in France (Loyon, 2017).

This utilization for agricultural spreading appears to be an efficient solution against the impoverishment of agricultural soils regarding their organic and nutrient contents caused by intensive farming and to aid the management of stocks of agricultural residues (Gomiero et al., 2011; Spargo et al., 2011). Indeed, these organic wastes contain fertilizing components like nitrogen, phosphorous and potassium in large quantities capable of improving soil fertility through organic amendment (Goss et al., 2013). Many studies have shown that organic amendment improves crop productivity (Zuo et al., 2019; Jamil et al., 2006). However, this practice may be the source of pollutants that can affect soil organisms in particular, depending on the origin and characteristics of the organic matter spread. Indeed, these organic materials can contain metallic trace elements (MTEs) and persistent organic pollutants like pharmaceuticals and endocrine disruptors (Parente et al., 2021; Iglesias et al., 2018; Hou et al., 2015; Díaz-Cruz et al., 2009). Moreover, several studies have revealed toxic effects on earthworms exposed to the regular amendment of certain matrixes on agricultural soils (Murchie et al., 2015; Gunadi and Edwards, 2003; Barrera et al., 2001).

Among the measures taken to regulate the spreading of organic wastes in the European Union, Directive 86/278/EEC was introduced in view to preventing their undesirable effects on soil organisms and human health (EC, 1986). This directive was specifically aimed at sewage sludge and industrial wastes. It mentioned a maximum threshold for certain metals and organic pollutants in organic wastes and in soils receiving the spreading. However, the improvement of analysis techniques revealed the presence of various contaminants in these organic wastes, potentially toxic for terrestrial organisms, such as pesticides (Clarke et al., 2010), pharmaceuticals (Bloem et al., 2017; Hou et al., 2015; Kinney et al., 2008), nanoparticles (Courtois et al., 2021b), brominated flame retardants (Navarro et al., 2016), and compounds not listed in the directive 86/278/EEC (EC, 1986). The cocktail of these different pollutants contained in this type of matrix remains a poorly assessed risk (Alengebawy et al., 2021). The physicochemical and ecotoxicological monitoring of organic wastes spread on agricultural soils therefore appears essential to guarantee their harmlessness for soil organisms (Renaud et al., 2017).

Indeed, the toxic effects of these mixtures of pollutants have been subject to few studies although ecotoxicological tests have shown themselves to be pertinent for assessing environmental risks (Huguier et al., 2015). Among the existing standardized ecotoxicity tests, the lethality ISO 11268-1:2015 (ISO, 2015b) and avoidance 17512-1:2020 (ISO, 2020b) tests for earthworms and the germination test for plants, ISO 18763:2020 (ISO, 2020a), resulting from European standards have the particularity of being rapid and inexpensive. They allow analyzing the ecotoxicity of substrates on different organisms. In our study, bioassays were carried out on three different trophic levels, microorganisms, decomposers with earthworms, and primary consumers with plants. Earthworms are often studied in laboratory bioassays in impact studies of spreadable organic wastes (Parente et al., 2021; Rastetter and Gerhardt, 2017; Liesch et al., 2010; Carbonell et al., 2009). These studies showed the toxic effects on the mortality, growth and reproduction of earthworms. However, some studies have also mentioned the stimulation of growth and reproduction of earthworms as a function of the type of amendment (Siddique et al., 2005; Neuhauser et al., 1980) which can act as a bio-fertilizer in these complex matrixes (Bhat et al., 2018). This study focuses on the species *Eisenia fetida*, belonging to the functional group of epigeic worms, representing the species most exposed during spreading as they live in the first centimeters of the soil (Bouché, 1972). Phytotoxicity tests on plants are also often used in the ecotoxicological assessment of soils and organic wastes in the form of germination and root growth tests (Oleszczuk and Hollert, 2011; Oleszczuk, 2008).

The objectives of this study were to (i) estimate the potential ecotoxicological risk by carrying out physicochemical analyses of three organic amendments: sewage sludge, dairy cow manure and dairy cow slurry, and (ii) assess the ecotoxic risk of these organic wastes on soil organisms by performing acute ecotoxicity tests. The assessment of potential ecotoxicity focused on these three amendments mixed with a natural soil representative of the medium receiving these organic wastes and an ISO inert artificial soil, ISO 17512-1:2020 (ISO, 2020b). The physicochemical characterization of organic wastes was performed with, in particular, the analysis of MTEs, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), pharmaceuticals, polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorodibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorodibenzofuran (PCDFs) and brominated flame retardants (BFRs). The toxicity tests focused on the activity of microorganisms exposed to these organic wastes, the assessment of the germination and root growth of plants exposed to these organic wastes, and on the assessment of mortality, biomass and avoidance of earthworms exposed to these organic wastes.

2. Materials and methods

2.1. Origins and preparation of matrixes

The reference soil used in this study was collected in November 2019 from a meadow not receiving spreading (46°07'16.0"N 6°18'37.3"E, Scientrier, 74930). This soil was homogenized, dried and sieved to 2 mm to remove small stones and roots, and then conserved at ambient temperature with a water content of $4.63 \pm 0.24\%$. It was composed of sand (51.1 %), silt (45.6 %) and clay (3.2 %). An artificial soil was prepared according to standard ISO 17512-1:2020 (ISO, 2020b) with a mixture of 69% fine sand, 20% kaolinitic clay,

10% sphagnum peat and 1% calcium carbonate to obtain a pH of 6.0 ± 0.5 . The physical and chemical properties of these soils are presented in supplementary material¹⁰.

The three amendments selected, spread on agricultural soils in the region, were characterized. The sewage sludge was collected in November 2019 from the wastewater treatment plant of Bellecombe located in Scientrier (Department of Haute-Savoie, France). The sludge came from a secondary treatment, thickened by the addition of polymers and ferric chloride, then dried by ventilation in a greenhouse after pressing in a filter press. The two organic amendments resulting from bovines were collected in October 2020 for the dairy cow manure (mixture of animal excrement and a large proportion of litter) and in March 2021 for the dairy cow slurry (mixture of animal excrement, a large proportion of water and a very small amount of bedding) from two different farms located a few kilometers from Annemasse (Department of Haute-Savoie, France). These two organic amendments represent the major part of the organic amendments applied in the study area.

Pre-treatments before conservation were performed on the three different matrixes. The sewage sludge was sieved to 2 mm. The cow manure was crushed by a shearing crusher to obtain smaller straws in the region of 5 cm. The cow slurry was dried at ambient temperature and ventilated in a drying oven at 25°C to reduce the water content. The three organic amendments were homogenized by manual agitation of all the stock collected, treated and then conserved at -20 °C with initial water contents of $53.97 \pm 0.44\%$ for the sewage sludge, $82.39 \pm 0.50\%$ for the cow manure and $78.07 \pm 3.14\%$ for the dairy cow slurry before the different analyses and toxicity tests were performed. The manure had a high water content due to a high proportion of animal excrement and a low proportion of straw.

The spreading doses were prepared for the earthworm avoidance tests and to monitor the enzymatic activity of the soil microorganisms exposed to the different organic wastes. For the sewage sludge, the maximum spreading dose over 10 years on agricultural soil in France (Circular DE/GE n°357 of 03/16/99, 1999), 30 t/ha dry equivalent, was divided by 3, i.e. 10 t/ha dry equivalent, corresponding to a concentration of sewage sludge of about 10 g.kg^{-1} of dry soil (1 ha of soil = 1250 t of dry soil of 10 cm depth and a medium soil density of $1,25 \text{ g.cm}^{-3}$). The concentrations tested were once, twice and five times the average spreading dose. For the two agricultural amendments tested during this study, the average spreading dose was based on the agricultural practice of the study area, i.e., a spreading dose of 35 t/ha of raw material. The average application rate of agricultural waste was also determined at 10 g.kg^{-1} dry soil in the area studied for the agricultural amendments, and the concentrations tested were x 0.5, x 1, x 2 and x 5 the average spreading dose.

2.2. Physicochemical characterizations

The following parameters were analyzed: concentration in nutrients, composition of organic material, concentration in organic pollutants (pharmaceuticals and persistent organics pollutants (POPs: PAHs, BFRs, PCBs, PCDDs, PCDFs)) and MTEs.

The different analyses were performed by the ISA laboratory (Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne, France), the CESAR laboratory (Centre Scientifique Agricole

¹⁰ Tableau C.1 de ANNEXE C, page 262

Régional, Ceyzériat, France), the ENTPE (École Nationale des Travaux publics de l'État, Vaulx-en-Velin, France), the INRAe (Institut National de la recherche agronomique, Versailles, France) and the LABERCA laboratory (Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments, Nantes, France). The analysis methods are summarized in **Table 1**.

Table 1. Methods and references of physical and chemical parameters analyzed on the organic amendments studied.

Parameters	Methods/references	Institute carrying out analysis
pH water	NFX 31-117, NFX 31-033	ENTPE, UMR 5023 LEHNA, CNRS, Vaulx-en-Velin, France
Electrical conductivity	NFX 31-053	
Humidity	NFX 12-880	
Water holding capacity	ISO 11268-1	
Agronomic values		
Organic carbon	ISO 10694	CESAR laboratory, Ceyzériat, France
Total nitrogen	ISO 13878	
Ammonia nitrogen	Spectrocolorimetry	
Olsen phosphorous	NFX31-160, ISO 11885	
Potassium	NFX31-108, ISO 11885	
Calcium	NFX31-108, ISO 11885	
Magnesium	NFX31-108, ISO 11885	
Total calcium	NFX31-105	
Pollutants		
Metallic trace elements	Aqua regia extraction and measurement by atomic absorption spectrometry	ENTPE, UMR 5023 LEHNA, CNRS, Vaulx-en-Velin, France
Pharmaceuticals	Analysis by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (Guironnet, 2021)	ISA, UMR 5280, Lyon, France
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Accelerated Solvent Extraction procedure and measure by HPLC-Fluo (NF EN 16181)	INRAE, UMR 1402 Ecosys, Palaiseau, France
Brominated flame retardants Polychlorobiphenyls Polychlorodibenzo-p-dioxins Polychlorodibenzofuran	Accelerated Solvent Extraction procedure and quantified by Gas chromatography and high-resolution mass spectrometry (Coelho, 2019)	LABERCA laboratory, Nantes, France

2.3. Measures of enzymatic activities in amended soils

The activities of β -glucosidase (β -GLU; EC: 3.2.1.21), alkaline phosphatase (PAK; EC: 3.1.3.1), phosphatase (PHOS; acid or alkaline according to the pH of the solution), and arylamidase (ARN; EC: 3.4.11.2) are involved in the decomposition of different substrates in relation with the biogeochemical cycles of carbon (C), nitrogen (N) and phosphorous (P). These different enzymes were monitored after 14 days' exposure of the reference soil amended with organic wastes at 0, 10 and 20 g.kg⁻¹ DW (dry weight) in 6 replicates. The enzymatic activities of the soil were analyzed on 96-well plates in triplicate according to standard ISO 20130:2018 (Cheviron et al., 2022; ISO, 2018b). In brief, 4 g of amended soil of each replicate was agitated for 10 min in 25 ml of demineralized water for PHOS and β -GLU or in Tris buffer (0.05 M at pH 11) for PAK. The soil suspension was then introduced in the wells and incubated with a substrate of 4-nitrophenyl- β -glucopyranoside 0.01 M (360.3 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) for β -GLU activity for 1 h at 37 °C and 4-nitrophenylphosphate 0.05 M (371.12 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) for PHOS and PAK activity for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped with 0.5 M of CaCl₂ and 0.1 M Tris at pH 12 then each plate was centrifuged for 5 min at

1,500g. Then, 200 µl of supernatant was introduced in another microplate for which the absorbance was measured using an Infinite 200 (Tecan) plate reader. Thus, the quantities of para-nitrophenol obtained by measuring the absorbance at $\lambda = 405$ nm and their comparison with the calibration curves allowed assessing microorganism activity.

Regarding ARN activity, the soil was agitated for 10 min in TRIS buffer (0.5 M at pH 7.5). The soil suspension was then incubated with a substrate of L-leucine- β -naphthylamide hydrochloride 0.008 M (292,8 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) for 2 h at 37 °C. The reaction was stopped with ethanol at 96° then each plate was centrifuged for 5 min at 1,500g. The production of β -naphthylamine was revealed by the addition of ethanol acidified at 96° and p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMCA, Sigma-Aldrich) after 20 min of incubation in darkness. The quantities of β -naphthylamine obtained by measuring the absorbance at $\lambda = 540$ nm and their comparison with the calibration curves permitted the assessment of microorganism activities. The enzymatic activities of the soil were expressed in nmol of hydrolyzed substrate per minute for a gram of dry soil corresponding to mU.g⁻¹ of dry soil.

2.4. Ecotoxicological tests

The ecotoxicological tests performed in this study are given in **Table 2**.

Table 2. Summary of the parameters of ecotoxicological tests performed on plants (germination test) and earthworms (avoidance test and lethality test).

Organisms	Plants	Earthworms	
Species	<i>Medicago sativa</i> <i>Sinapis alba</i> <i>Cucurbita pepo</i>	<i>Eisenia fetida</i>	
Acclimatization	None	Dark chamber containing coco peat and organic manure (50/50)	
Test	Germination	Avoidance	Lethality
	ISO 18763	ISO 17512-1	ISO 11268-1
Test parameters			
Exposure medium	Sand and reference soil	ISO soil	Reference soil
Length of exposure	12 days (<i>M. sativa</i>) and 5 days (<i>S. alba</i> and <i>C. pepo</i>)	2 days	14 days
Number of organisms	10/replicate	10/replicate	10/replicate
Replicate	3	4	3
Test temperature	20 ± 2°C	20 ± 2°C	20 ± 2°C
Photoperiod	16h day / 8 h night (400-800 lx)	16h day / 8 h night (400-800 lx)	16h day / 8 h night (400-800 lx)
Measures	% of seeds not germinated Root size	Avoidance behavior	Mortality rate Biomass of individuals
Validity criterion	Germination of controls > 70% Root size of controls > 30mm	Mortality rate of each treatment < 10%	Mortality rate of controls < 10% Loss of biomass of controls < 20%

2.4.1. Germination test on three plant species

The phytotoxicity tests were carried out using the Phytotoxkit© according to standard ISO 18763:2020 (ISO, 2020). The Phytotoxkit© allows measuring the reduction (or absence) of seeds germinated and the length of young roots following exposure to different matrixes tested in comparison to a non-contaminated control soil. Root length assessment is often mentioned in the literature as a more sensitive parameter than germination. The germination test assessment was performed on the following species: the zucchini *Cucurbita pepo*, the alfalfa *Medicago sativa* and the mustard *Sinapis alba*. The batches of seeds were purchased from the store Gamm Vert©. On the one hand, the tests were performed with a mixture of sandy soil and organic amendments at the following concentrations: 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 g.kg⁻¹ DW and on the other, with a mixture of reference soil and organic amendments at the following concentrations: 0, 10, 20, 50, 100, 200 g.kg⁻¹ DW. The transparent plastic test plates from the phytotoxkits© are composed of two identical compartments of a thickness of 8 mm separated by a median ridge. The lower compartment was filled with the soil-amendment saturated to its water holding capacity (WHC), then covered by blotting paper on which 10 seeds were placed at equal distance and 1 cm from the median ridge. The plate was then closed by a transparent lid and placed vertically in an air-conditioned room at 20 ± 2 °C and a photoperiod of 16 h day/8 h night. The test stopping criterion was the duration of incubation necessary for the roots to grow at least 1 cm from the edge of the plate. At the end of exposure, a digital image was taken for each test plate. The length measures were taken using ImageJ©. For each organic amendment tested, 3 replicates (3 plates) were used for each plant species and each concentration. The percentage of non-germinated seeds, noted g and expressed in %, was obtained for all the seeds of each replicate by the following formula:

$$\text{Equation 1: } g = \left(\frac{A}{B}\right) \times 100$$

where A = the number of non-germinated seeds and B = initial number of seeds. The validity of the test was verified if the negative controls presented a germination rate exceeding 70% and their root growth reached a length of at least 30 mm.

2.4.2. Ecotoxicity test on *E. fetida*

The test organisms, *E. fetida*, were supplied by an internal earthworm breeding unit in Germany. After receiving the earthworms, they were kept in a medium comprising horse manure from an organic horse breeding stable and coco peat (50/50) with a water content close to 70% of maximum water holding capacity and a temperature of 20 ± 2 °C in the ecotoxicological laboratory of Provademse (Villeurbanne, France). Only the adult earthworms between 350 mg and 600 mg in fresh matter with a visible and well-developed clitellum were selected for the toxicity tests. Before starting the tests, the earthworms were cleaned by rinsing with demineralized water, weighed and fasted for 24 h.

2.4.2.1. Lethality test

The acute lethality test was performed according to standard ISO 11268-1:2015 (ISO, 2015b). The test was performed in an air-conditioned room at 20 ± 2 °C and a photoperiod of 16 h day/8 h night. Each mixture was prepared 5 days before the start of the test to permit the recolonization of the medium by the microorganisms and the stabilization of the water

content. The water content was adjusted to 70% of the maximum WHC of the mixture. During the tests, 1l glass jars (@Le Parfait) were used (11 cm in diameter, 16.5 cm high) closed by uniformly perforated plastic lids to prevent the earthworms from escaping and the oxygenation of the medium. The tests were performed independently from the other organic wastes tested. About 600 g of reference soil and amended reference soil was introduced in each glass jar. The volume of soil introduced was adjusted to the same level between all the concentrations of the same organic waste tested. Thus, 10 earthworms comprising 3 replicates per treatment were exposed for 14 days to the following concentrations: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 120, 140, 160, 180 and 200 g.kg⁻¹ DW for the sewage sludge; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g.kg⁻¹ DW for the cow manure and the cow slurry. Mortality was measured at 14 days and the biomass was determined at the start and end of the test on the living earthworms to determine a growth rate during exposure. Before each weighing, the earthworms were fasted for 24 h and rinsed with demineralized water then placed on absorbent paper. The earthworms did not feed during the test. They were considered dead if no response vs movement was observed when pricking their rear part. The percentage of dead earthworms, noted z and expressed in %, was obtained for each replicate by the following formula:

$$\text{Equation 2: } z = \left(\frac{D}{T}\right) \times 100$$

where D = number of dead earthworms and T = initial number of earthworms.

The growth rate, noted g and expressed in %, was obtained for each replicate by the following formula:

$$\text{Equation 3: } g = \left(\frac{mf - mi}{mi}\right) \times 100$$

Where mf = mass at the end of the exposure and mi = mass at the beginning of the exposure.

The validity of the test was verified by the controls by a mortality less than 10 % and a loss of fresh biomass not exceeding 20 %.

2.4.2.2. Avoidance test

The avoidance test was performed according to the experimental conditions of standard ISO 17512-1:2020 (ISO, 2020b). The test was performed at concentrations at which no mortality was observed for the earthworms during the lethality test. An artificial ISO soil was mixed at the following concentrations: 10, 20, 50 g.kg⁻¹ DW for the sewage sludge and cow manure; 5, 10, 20 g.kg⁻¹ DW for the cow slurry. Each mixture was prepared 5 days before the test to permit the recolonization of the medium by the microorganisms and the stabilization of the water content. The water content was adjusted to 70% of the maximum WHC of the soil alone and in mixture. The experiment was performed with 4 replicates for each treatment. Thus, 700 g of dry soil equivalent, amended or not, was placed in a plastic container divided into 6 equal sections by plates. The ISO control soil without amendment and the tested amended ISO soil were placed alternatively in the different sections. The central cavity was kept empty. Ten earthworms were placed in the empty section and the plates separating the sections were withdrawn. The test was performed in an air-conditioned room at 20 ± 2 °C and a photoperiod of 16 h day/8 h night for 48 h. The containers were then closed by perforated lids to allow oxygen to reach the medium and prevent the earthworms from

escaping. The earthworms were not fed during the test. After 48 h, the plates of the sections were returned in place and the earthworms were counted in each of the different sections. An earthworm cut in two was counted 0.5/0.5 for the sections concerned.

The avoidance response, noted AR and expressed in %, was obtained with the following equation:

$$\text{Equation 4: } AR = \left(\frac{C-T}{N} \right) \times 100$$

where C = total number of earthworms in the ISO soil per container, T = total number of earthworms in the soil mixed with an organic waste per container and N = total number of earthworms per container. A positive AR indicates avoidance behavior; on the contrary, a negative AR indicates an attraction behavior of the medium tested. The avoidance behavior means an escape from the medium when the avoidance is between 20 and 80%. Above 80%, the medium tested is characterized as a medium with a limited habitat function for earthworms. When AR is < -80 %, the presence of chemical substances cannot be excluded. The validity of the test is verified by a mortality lower than 10% in each of the treatments.

2.5. Statistical analyses

The proportions obtained on germination, lethality and earthworm avoidance were processed using Fisher's exact test on a contingency table comprising the cumulated numbers of all the replicates for each treatment. The LC₅₀ of the lethality test on earthworms, germination and plant growth were calculated using a dose/response model of the "drc" package of R©. A binomial two-parameters log-logistic function was applied to calculate the LC₅₀ of earthworms and plants. For plant growth, the same model was applied to calculate EC₅₀ with a continuous three-parameter log-logistic function.

The data on the enzymatic activity of microorganisms, earthworm biomass and plant root size are expressed with a mean and a standard deviation. The normality and homoscedasticity of these data were verified by the Shapiro-Wilk test and Bartlett's test, respectively. An analysis of parametric variances (ANOVA) was performed for the parameters verifying the normality and homoscedasticity of the data. The significant differences between the different treatments were extracted by a post-hoc Student's test. When the conditions were not verified, an analysis of non-parametric variances was performed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. The statistical tests were analyzed with the RStudio© software with a significance threshold equal to p < 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical characteristics of the organic amendments tested

The main physical and chemical characteristics of the organic amendments studied are summarized in **Table 3**. In our study, the quantity of organic matter reached similar values from 705 to 787 g.kg⁻¹ DW in the organic amendments studied. The sewage sludge stood out from the agricultural organic amendments due to its organic nitrogen content which was present in greater quantity, 69.36 ± 1.20 g.kg⁻¹ DW and a lower C/N ratio 5.04 ± 0.07. The agronomic characteristics of the two organic amendments resulting from cattle were very similar. The main difference was observed in the content of ammonia nitrogen which

reached $6.90 \pm 8.86 \text{ g.kg}^{-1} \text{ DW}$ for the cow slurry versus $3.81 \pm 0.06 \text{ g.kg}^{-1} \text{ DW}$ for the cow manure. The ammonia nitrogen present in the organic amendments is susceptible to exert a considerable negative effect on plant germination and root growth (Selim et al., 2012). The latter study also showed that the composting of cow manure drastically reduces the ammonia nitrogen content. The sewage sludge exhibited lower potassium values than the agricultural wastes but higher phosphorous values.

Table 3. Physical and chemical properties of the different organic amendments studied (sewage sludge, cow manure, cow slurry).

Matrixes tested		Sewage sludge	Cow manure	Cow slurry
	Humidity (%)	53.97 ± 0.44	82.39 ± 0.50	78.07 ± 3.14
	pH	6.86 ± 0.02	8.82 ± 0.05	9.83 ± 0.08
	EC (mS.cm^{-1})	3.25 ± 0.12	6.70 ± 0.03	7.87 ± 0.02
	WHC ($\text{mL}/100 \text{ g DW}$)	266.51 ± 21.89	319.1 ± 9.43	307.6 ± 22.90
Organic status ($\text{g.kg}^{-1} \text{ DW}$)				
	Organic carbon	374.74 ± 10.58	371.57 ± 3.23	412.71 ± 15.85
	Organic matter	764.00 ± 2.65	705.33 ± 11.37	787.00 ± 14.93
	Total nitrogen	74.39 ± 1.14	27.48 ± 1.02	30.09 ± 4.95
	Ammonia nitrogen	5.03 ± 0.09	3.81 ± 0.06	6.90 ± 8.86
	Organic nitrogen	69.36 ± 1.20	23.67 ± 0.99	23.19 ± 3.91
	C/N ratio	5.04 ± 0.07	13.53 ± 0.55	13.90 ± 1.61
Fertilizing elements ($\text{g.kg}^{-1} \text{ DW}$)				
	P	25.73 ± 2.02	4.66 ± 0.17	6.48 ± 0.17
	P ₂ O ₅	58.92 ± 4.63	10.67 ± 0.40	14.84 ± 0.40
	K	7.24 ± 0.14	33.84 ± 3.64	46.21 ± 3.74
	K ₂ O	8.69 ± 0.17	40.60 ± 4.36	55.46 ± 4.48
	Ca	30.21 ± 1.95	24.63 ± 2.08	23.74 ± 2.26
	CaO	42.29 ± 2.73	34.49 ± 2.90	33.24 ± 3.17
	Mg	5.24 ± 0.45	6.74 ± 0.37	7.76 ± 0.36
	MgO	8.70 ± 0.75	11.19 ± 0.61	12.87 ± 0.60

Average values (n=3) and \pm standard deviation.

These contributions of organic wastes modified the chemistry of the amended soil. The pH and electrical conductivity exhibited different values as a function of the origin of the organic amendments. The pH of the sewage sludge was the same as that of our reference soil with an average value of 6.86 ± 0.02 . However, the residual livestock products exhibited higher pH values with an average of 8.82 ± 0.05 for the cow manure and 9.83 ± 0.08 for the cow slurry. These pH values are frequent in analyses of cow manure (Garg et al., 2006; Siddique et al., 2005; Gunadi and Edwards, 2003). A high pH shows an organic material with low stability (Bhat et al., 2018; Garg et al., 2006). The modification of soil chemistry through pH can also modify the interaction conditions between pollutants and the soil matrix, the pollutants being more or less readily bioavailable for the soil organisms. Regarding electrical conductivity, the three organic amendments studied presented a high electrical conductivity. The sewage sludge presented a lower value, contrary to the livestock products, $3.25 \pm 0.12 \text{ mS.cm}^{-1}$ versus $6.70 \pm 0.03 \text{ mS.cm}^{-1}$ for the cow manure and 7.87 mS.cm^{-1} for the cow slurry. These electrical conductivity values reflect the salinity of the organic matrix. High EC values revealed toxic effects on plants (Bhat et al., 2018; Lasaridi et al., 2006) and a reduction of growth in earthworms (Flack and Hartenstein, 1984). The increase in electrical conductivity pointed to a higher quantity of ions that may be beneficial for plant growth although certain salts such as sodium chloride and sodium sulfate can, on the contrary,

become toxic for soil organisms by causing cell plasmolysis effects (Ramade, 2002). The study by Owojori et al. (2009) showed a decrease in the production of earthworm cocoons with the addition of sodium chloride in the exposure medium.

The presence of pollutants in the three organic amendments that could induce an ecotoxicity is summarized in **Table 4**. The MTEs concentrations present in the different organic matrixes were within the ranges of concentration found for organic amendments issued by the European Union (Bloem et al., 2017; Östman et al., 2017; Huguier et al., 2015). Among the MTEs, the more concentrated in organic amendments are zinc and copper, reaching in the sewage sludge $483.43 \pm 9.48 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DW}$ and $208.41 \pm 1.78 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DW}$, respectively. However, such concentrations are consistent with similar studies in the literature (Hammoudani et al., 2019; Rastetter and Gerhardt, 2017; Goss et al., 2013; Carbonell et al., 2009). Furthermore, these concentrations remained below the regulatory limits required by European legislation for spreading with a concentration limited to $3,000 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DW}$ for zinc and $1,000 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DW}$ for copper (EC, 1986). The concentrations of zinc and copper did not seem to have an effect on the survival and growth of earthworms, as observed in the study by Lukkari et al. (2005) on an artificial soil to which zinc and copper had been added. Zinc is an essential mineral element for plants and plays an important role in the growth and regulation of plant organs (Marschner, 1995). Nonetheless, an excessive concentration of zinc can lead to a reduction of plant biomass and inhibited root growth (Sturikova et al., 2018; Broadley et al., 2007). However, synergetic interactions between the physicochemical parameters of soil and pollutants may magnify toxicity effects. The presence of copper associated with a medium with a high EC can lead to toxic effects on earthworms (Owojori et al., 2009). On the contrary, the high organic matter content found in the organic amendments studied, could reduce the mobility and bioavailability of pollutants (Barriuso et al., 1996).

Table 4. Concentrations measured in metallic trace elements, drug residues and persistent organics pollutants in the organic amendments studied.

Groups of pollutants	Sewage sludge	Cow manure	Cow slurry
Metallic trace elements ($\text{mg.kg}^{-1} \text{ DW}$)			
Zn	483.43 ± 9.48	67.83 ± 1.61	165.79 ± 17.69
Cu	208.41 ± 1.78	17.86 ± 0.75	23.88 ± 0.70
Cd	0.87 ± 0.02	2.58 ± 0.12	0.13 ± 0.01
Cr	26.71 ± 0.05	20.01 ± 3.28	4.61 ± 0.22
Pb	14.93 ± 0.78	0.20 ± 0.02	0.74 ± 0.05
Ni	11.69 ± 0.35	9.21 ± 0.93	2.45 ± 0.05
Drug residues ($\mu\text{g.kg}^{-1} \text{ DW}$)			
3-amino-5-methylisoxazole	55.9 ± 14.0	28.0 ± 1.0	10.30
5-Hydroxythiabenzazole	<LD	<LD	<LD
Acetyl-sulfamethoxazole	<LD	<LD	<LD
Albendazole-2-aminosulfone	2.5 ± 0.6	0.47	0.1 ± 0.0
Anhydroerythromycin	<LD	<LD	<LD
Bromacil	<LD	<LD	<LD
Chlorhexidine	$2,066.7 \pm 517.0$	<LD	<LD
Ciprofloxacin	129.0 ± 32.0	<LD	<LD
Dimethyl-didecyl ammonium	$36,936.4 \pm 9,234.0$	<LOQ	<LOQ
Desmethyl-ofloxacin	37.7 ± 9.4	<LOQ	<LOQ
Doramectine	<LD	<LD	<LD
Epitetracyclin	30.5 ± 7.6	1.3 ± 0.4	2.8 ± 0.9

Eprinomectin	<LD	<LD	<LD
Erythromycin	<LD	<LD	<LD
Flubendazole	17.5 ± 4.4	<LD	<LD
Hydroxy-flubendazole	1.6 ± 0.4	<LOQ	<LOQ
Hydroxy-levamisole	<LD	<LD	<LD
Ketoprofen	<LOQ	< LOQ	<LOQ
Levamisole	8.5 ± 2.1	<LD	<LD
Methamidophos	<LD	<LD	<LD
Ofloxacin	957.7 ± 239.4	<LD	<LD
Oxfendazole	<LOQ	<LD	<LD
Pyrantel	6.6 ± 1.7	0.2 ± 0.1	2.0 ± 0.6
Pyrimethamine	<LD	<LOQ	<LOQ
Sulfaguanidin	<LD	<LD	<LD
Sulfamethoxazole	<LD	<LD	<LD
Sulfathiazole	<LD	<LD	<LD
Sulfoxaflo	<LD	<LD	<LD
Tebuconazole	<LD	<LD	<LD
Tetracycline	24.2 ± 6.0	1.2 ± 0.4	2.9 ± 2.9
Thiabendazole	1.83	<LOQ	<LOQ
Triclosan	21.4 ± 5.3	<LD	<LD
Trimethoprim	<LOQ	<LD	<LD
Polycyclic aromatic hydrocarbons (µg.kg⁻¹ DW)			
Acenaphthene	0.34 ± 0.06	2.86 ± 0.25	0.75 ± 0.16
Anthracene	1.14 ± 0.03	6.57 ± 0.16	1.88 ± 0.40
Benz[a]anthracene	6.36 ± 0.15	2.85 ± 0.43	0.26 ± 0.12
Benzo[b]fluoranthene	17.64 ± 1.61	6.13 ± 0.40	0.41 ± 0.35
Benzo[k]fluoranthene	6.32 ± 0.15	2.95 ± 1.19	<LOQ
Benzo[ghi]perylene	10.48 ± 0.24	6.03 ± 0.36	0.33 ± 0.12
Benzo[a]pyrene	9.82 ± 0.25	3.97 ± 0.13	0.48 ± 0.06
Chrysene	20.16 ± 0.18	10.81 ± 1.25	0.74 ± 0.06
Dibenz[a,h]anthracene	0.51 ± 0.04	0.29 ± 0.08	0.78 ± 0.24
Fluoranthene	25.52 ± 1.45	14.06 ± 2.84	11.07 ± 1.02
Fluorene	19.53 ± 0.03	14.64 ± 0.25	4.81 ± 0.19
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	8.43 ± 0.67	1.92 ± 0.68	1.01 ± 1.14
Naphthalene	ND	ND	6.37 ± 0.7
Phenanthrene	74.09 ± 3.90	25.59 ± 0.30	8.69 ± 2.22
Pyrene	42.24 ± 0.84	31.03 ± 1.11	2.61 ± 0.48
Polychlorinated dibenzodioxins (µg.kg⁻¹ DW)			
Σ 7 PCDDs	0.397	0.030	0.003
Polychlorinated dibenzofurans (µg.kg⁻¹ DW)			
Σ 10 PCDFs	0.028	0.002	0.001
Polychlorinated biphenyl (µg.kg⁻¹ DW)			
Σ 4 PCBno	0.220	0.009	0.004
Σ 8 PCBmdio	4.655	0.204	0.082
Σ 6 PCBNDL	19.716	0.770	0.293
Brominated flame retardants (µg.kg⁻¹ DW)			
Σ 9 PBDE	0.05	0.05	0.05
Σ 3 PBB	<LD	<LD	<LD
Σ 3 HBCDD	28.87	2.81	0.06

ND = Not detected, LD = Limit of detection, LOQ = Limit of quantification (detailed in supplementary material¹¹). Average values (n=3) and standard deviation (except for PCB, RFB, PCDF, PCDD where n=1).

¹¹ Tableau 10, page 108 et Tableau 11 page 110 du chapitre 4.5.4.

The presence of pharmaceuticals in the livestock effluents remained low. Only 5 molecules were quantified out of the 33 sought, with values in the region of $\mu\text{g kg}^{-1}$ DW. Tetracyclines, often identified in livestock effluents, were present in lower contents than those of the average contents found in Europe which are in the region of 17 to 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ DW (Bloem et al., 2017).

Some veterinary antibiotics such as tylosin (not investigated in our study) are known to be quantified at high concentrations in agricultural effluents (Li et al. 2013; Deliguoro et al. 2003). However, the contents of drug residues in the sewage sludge were high for certain families. The family of fluoroquinolone antibiotics are often sought in organic amendments (Bloem et al., 2017). The concentration of ofloxacin reached $957.7 \pm 239.4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ DW and that of ciprofloxacin $129.0 \pm 32.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ DW in our sewage sludges. Two pharmaceuticals stemming from biocides, chlorhexidine and dimethyl-didecyl-ammonium, were found with high values reaching $2,066.7 \pm 517.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ DW and $36,936.4 \pm 9,234.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ DW respectively. Certain studies have also shown the presence of chlorhexidine at contents equivalent to those found in our study in sewage sludge (Östman et al., 2017). Chlorhexidine is known to be toxic in low doses for freshwater organisms (Jesus et al., 2013). However, dimethyl-didecyl-ammonium has been given little attention in the literature with only one study on mice which showed the toxic effects on the fertility of females exposed to this molecule (Melin et al., 2014). Triclosan was found in low contents in the sewage sludges, but it is known to be easily bio-accumulable by earthworms with bioaccumulation factors capable of reaching a value of 27 (Kinney et al., 2008).

Other organic pollutants were detected in low quantities in the reference soil and livestock effluents, commonly detected in the literature (Mailler et al. 2017). The sewage sludge presented relatively low PAHs concentrations in the order of $\mu\text{g.kg}^{-1}$ DW, but which remained slightly above the averages for the soil of the region for phenanthrene and pyrene (Villanneau et al., 2013). In addition, the levels of PCBs and HBCDDs are high in sewage sludge, including the low data found in urban sewage sludge in Paris (Mailler et al. 2017). Estrogens are also known to be present in significant concentrations in these different organic amendments that may cause ecotoxic effects on terrestrial organisms (Mailler et al. 2017; Andaluri et al. 2012).

3.2. Enzymatic activities in amended soils

The effects of organic amendments on soil microorganisms, studied through some soil enzymatic involved in the biogeochemical cycles of carbon (β -Glucosidase, β -GLU), nitrogen (arylamidase, ARN) and phosphate (phosphatase, PHOS and alkaline phosphatase, PAK), are presented in **Fig. 1**.

In our study, the activity of arylamidase increased significantly as from an amendment of 10 g.kg^{-1} DW for each of the organic amendments assessed. This increase in enzymatic activity observed for arylamidase appeared to be mainly due to the increase of nitrogen, the substrate hydrolyzed by these enzymes. The contribution of nitrogen supplied by the different types of organic amendments added to the soils stimulated the enzymatic activity of arylamidase (Obriot et al., 2016). In the literature, the amendment of organic matter in soils is known to generally improve all their enzymatic activities (Lupwayi et al., 2019; Kader et al., 2017). However, the addition of microorganisms contained in the organic wastes

intended to amend soils could also be responsible for the increase of these enzymes under study.

The biochemical cycle of phosphate was monitored by measuring the activity of phosphatase and alkaline phosphatase. Our results show that the amendment of organic wastes improved the enzymatic activity of alkaline phosphatase whereas phosphatase did not appear to be stimulated. By contrast, its activity decreased in the presence of slurry. In the literature, it has been reported that increasing pH increases the efficiency of alkaline phosphatase. The high pH value found in the slurry reduced the enzymatic activity of the phosphatase. Phosphatase was stimulated only by the sewage sludge, also mentioned in the literature (Carbonell et al., 2009). β -glucosidase activity increased slightly with the amendment of sewage sludge and cow slurry. The addition of carbon resulting from the amendment of organic matter in the reference soil stimulated enzymatic activity (Hojati and Nourbakhsh, 2009).

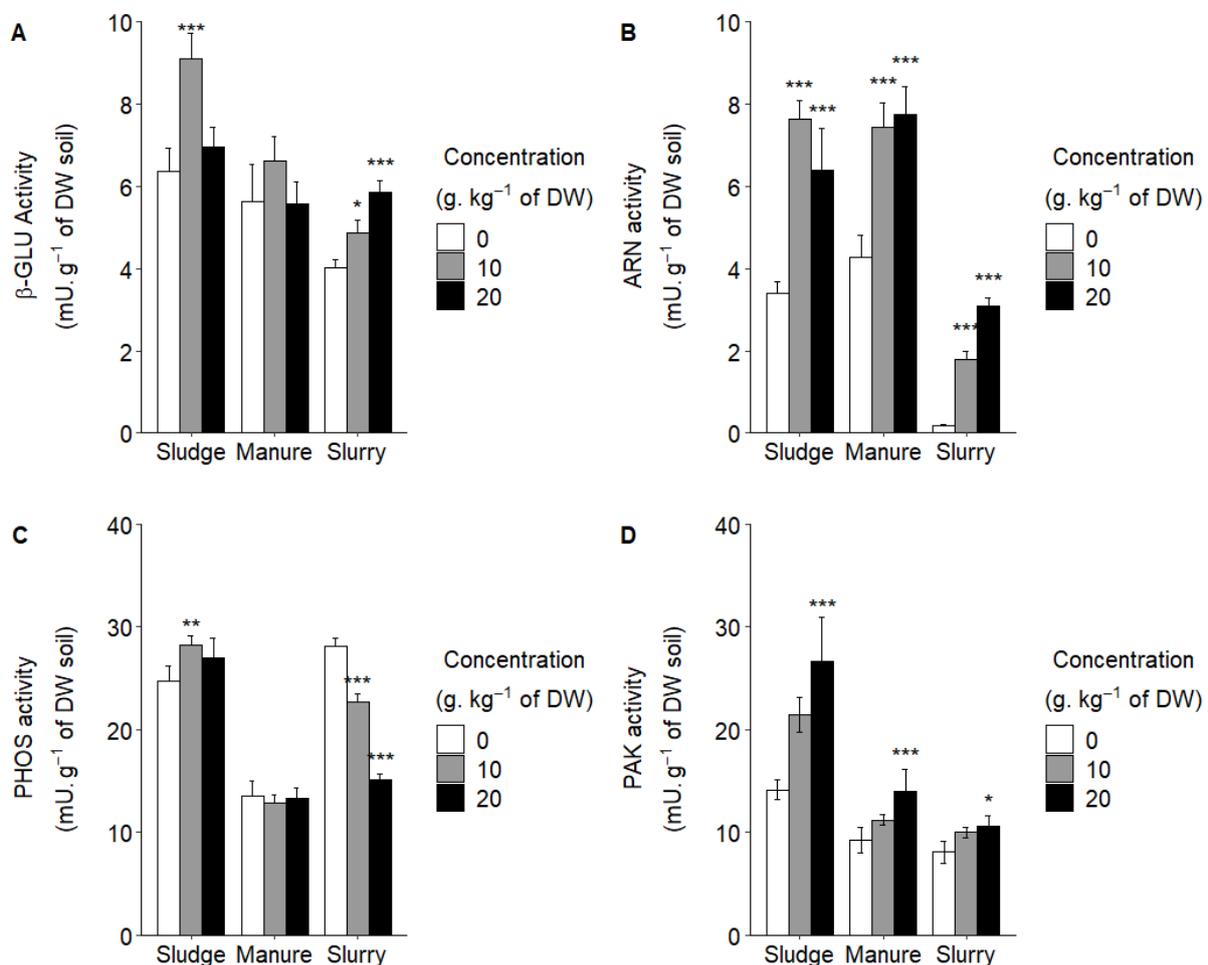


Fig. 1. Enzymatic activities of phosphatase (PHOS), alkaline phosphatase (PAK), arylamidase (ARN) and β -glucosidase (β -GLU) in the reference soils amended with different concentrations of organic amendments.

Mean values (n=6) and standard deviation. * indicates that the difference between the control and the treatment is significant with a significance level of: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

3.3. Assessment of toxicity on plants

3.3.1. In the sandy soil

The phytotoxicity of organic wastes varies and depends on the type of organic waste, the exposure dose, the species exposed and the substrate used. The sandy soil amended with the three organic matrixes revealed increased inhibition of germination for the three species of plants exposed when their concentrations increased (**Fig. 2**). In our study, the amendment of sewage sludge significantly decreased the number of seeds germinated as from 200 g.kg⁻¹ DW on alfalfa and 100 g.kg⁻¹ DW on mustard and zucchini. The inhibition of germination of 66.7% was observed for mustard at 100 g.kg⁻¹ DW of sewage sludge, in line with the study of Oleszczuk and Hollert (2011). Regarding the other two plants, the number of non-germinated seeds was lower with 36.7% at 100 g.kg⁻¹ DW of sewage sludge. However, the results obtained for the inhibition of seed germination were different from those of the study performed by Žaltauskaitė et al. (2016). In this study, the amendment of treated sewage sludge in a substrate of peat did not lead to a significant toxicity effect on the germination of common millet seeds. Regarding agricultural wastes, the amendment of slurry on the sandy soil had a more toxic effect than the addition of manure on the germination of the three species of plant tested. The cow slurry significantly inhibited germination as from 50 g.kg⁻¹ DW for alfalfa, from 100 g.kg⁻¹ DW for mustard and from 200 g.kg⁻¹ DW for zucchini. No alfalfa or mustard seeds germinated under strong doses of cow slurry. On the contrary, the addition of cow manure in the sandy soil had a significant toxic effect on the germination of seeds exposed only to the highest doses, from 200 g.kg⁻¹ DW for alfalfa and mustard and from 500 g.kg⁻¹ DW for zucchini. The EC₅₀ on the germination of plants exposed to slurry showed lower values than the other organic amendments on alfalfa and mustard with values of 65.26 ± 7.07 g.kg⁻¹ DW for alfalfa and 53.64 ± 5.22 g.kg⁻¹ DW (**Table 5**). Many MTEs such as cadmium, arsenic and mercury are known to reduce photosynthesis capacity and cause late germination in plants (Bharti and Sharma, 2021). Another reason is that the salinity of slurry may lead to reduced water consumption due to osmotic pressure and decrease the respiration of seeds, leading to late germination (Meng et al., 2022).

The length of the roots of seeds exposed to the different organic wastes was also measured (**Fig. 3**). In our study, root length appeared to be more sensitive to exposure to organic wastes with amendment performed at low doses, closer to agricultural practices. The amendment of organic wastes in a sandy soil showed a significant effect on the root length of germinated seeds, depending on the type of organic waste, exposure dose and the species exposed. Increasing the dose of each of the amendments revealed a gradual inhibition of root growth for the three species of plant tested in the sandy soil. The exposure of plants to sewage sludge showed a significant negative effect from 50 g.kg⁻¹ DW on mustard, and from 100 g.kg⁻¹ DW on alfalfa and zucchini. Whatever the exposure substrate, the study by Oleszczuk and Hollert (2011) showed a significant inhibition at low doses of mustard exposed to different treated sewage sludges. Regarding the agricultural residues tested in our study, the results once again show the stronger phytotoxicity of cow slurry with lower values of EC₅₀ (Table 5). Root length decreased significantly at low exposure doses, with a significant effect from 20 g.kg⁻¹ DW on alfalfa and 50 g.kg⁻¹ DW for mustard and zucchini. The inhibition of root growth could be observed from 100 g.kg⁻¹ DW on the three species of plant exposed to cow manure. The study by Selim et al. (2012) also showed decreased root growth when exposing the cress *L. sativum* to cow manure.

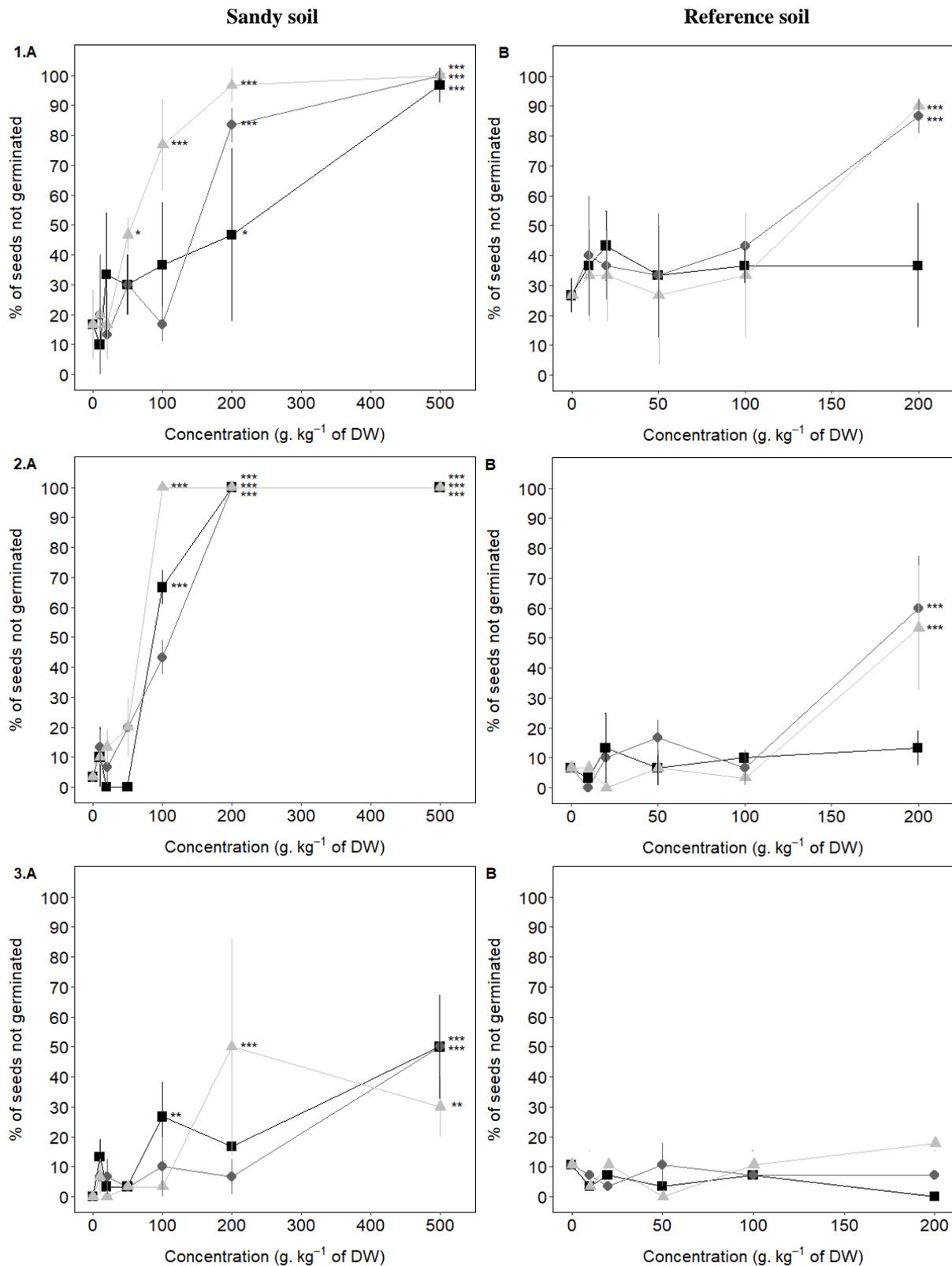


Fig. 2. Percentage of non-germinated seeds of different plant species (1 = Alfalfa; 2 = Mustard; 3 = Zucchini) exposed to different concentrations of organic amendments (square = Sludge; round = Manure; triangle = Slurry) in 2 different substrates (A = Sandy soil; B = Reference soil).

Mean values (n = 3) and standard deviation. * indicates that the difference between the control and the treatment is significant with a significance level of: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

Table 5. Mean values of EC₅₀ (inhibition of plant germination and growth), NOEC, and LOEC (g.kg⁻¹ of DW) during the toxicity tests depending on the substrate (sandy soil, reference soil) and the organic amendment tested (sewage sludge, cow manure, cow slurry).

Organic amendment	Organisms	Endpoint	Substrates	Parameters (g kg ⁻¹ of DW)		
				NOEC	LOEC	EC ₅₀
Sewage sludge	<i>M. sativa</i>	Germination	Sandy soil	100	200	177.54 ± 27.74
			Reference soil	200	-	-
		Root length	Sandy soil	50	100	86.20 ± 32.91
			Reference soil	50	100	-
	<i>S. alba</i>	Germination	Sandy soil	50	100	89.97 ± 6.74
			Reference soil	200	-	-
		Root length	Sandy soil	20	50	32.25 ± 8.25
			Reference soil	200	-	-
	<i>C. pepo</i>	Germination	Sandy soil	50	100	-
			Reference soil	200	-	-
		Root length	Sandy soil	50	100	154.64 ± 27.26
			Reference soil	50	100	-
Cow manure	<i>M. sativa</i>	Germination	Sandy soil	100	200	148.33 ± 14.95
			Reference soil	100	200	141.71 ± 41.01
		Root length	Sandy soil	50	100	75.07 ± 15.40
			Reference soil	50	100	65.92 ± 10.39
	<i>S. alba</i>	Germination	Sandy soil	100	200	84.88 ± 9.51
			Reference soil	100	200	184.65 ± 11.32
		Root length	Sandy soil	50	100	45.38 ± 4.74
			Reference soil	50	100	76.19 ± 12.25
	<i>C. pepo</i>	Germination	Sandy soil	200	500	-
			Reference soil	200	-	-
		Root length	Sandy soil	50	100	121.57 ± 27.46
			Reference soil	50	100	134.17 ± 12.26
Cow slurry	<i>M. sativa</i>	Germination	Sandy soil	20	50	65.26 ± 7.07
			Reference soil	100	200	151.36 ± 28.82
		Root length	Sandy soil	10	20	16.49 ± 1.23
			Reference soil	20	50	50.76 ± 10.60
	<i>S. alba</i>	Germination	Sandy soil	50	100	53.64 ± 5.22
			Reference soil	100	200	-
		Root length	Sandy soil	20	50	27.91 ± 4.10
			Reference soil	50	100	74.20 ± 8.94
	<i>C. pepo</i>	Germination	Sandy soil	100	200	-
			Reference soil	200	-	-
		Root length	Sandy soil	20	50	64.81 ± 10.99
			Reference soil	100	200	158.17 ± 14.46

The symbol “-” indicates that the value could not be calculated. NOEC = No Observed Effect Concentration. LOEC = Lowest Observed Effect Concentration

3.3.2. In the reference soil

Soil appeared to play a major role in the degree of toxicity exhibited by the organic wastes on seed germination. Indeed, the type of soil led to a different level of phytotoxicity on plants when adding treated sewage sludge (Oleszczuk and Hollert, 2011). This study showed that the negative impact of treated sewage sludge on three species of plant was lower when the test soil was silty, contrary to a sandy soil. Indeed, a standard soil and sandy soil do not have the same physicochemical properties. It is known in the literature that organic matter content plays a major role among the factors liable to interfere with the mobility and bioavailability of pollutants. Increasing organic matter can influence the biological activity of soil and favor the adsorption of pollutants (Sassman et al., 2007).

In our study, the exposure of plants to different organic wastes in the reference soil, classed as a silty soil, also exhibited a reduction of their phytotoxicity observable for germination (**Fig. 2**) and root length (**Fig. 3**) as well as the EC₅₀ values (**Table 5**). Seed germination was not impacted by exposure to sewage sludge. Agricultural organic amendments caused a significant reduction of germination only above 200 g.kg⁻¹ DW for alfalfa and mustard.

The root length of the plants exposed to the different organic wastes was also influenced according to the type of substrate. In our study, the reference soil mitigated the toxic effect of the organic amendments. Exposure to the sewage sludge in the reference soil did not modify the phytotoxicity of the sewage sludge except for mustard for which the exposure dose no longer had any effect on the length of mustard roots. A hormesis effect appeared regarding the size of mustard roots at low concentrations (10, 20 and 50 g.kg⁻¹ DW of sewage sludge). Generally, a low dose of the organic amendment applied stimulates plant growth. In the study of Žaltauskaitė et al. (2016), the size and biomass of the aerial and root parts increased when the exposure dose was lowest. Regarding the organic amendments of agricultural origin, the toxic doses were the same on the plants exposed to cow manure. On the contrary, exposure to cow slurry presented lower phytotoxicity.

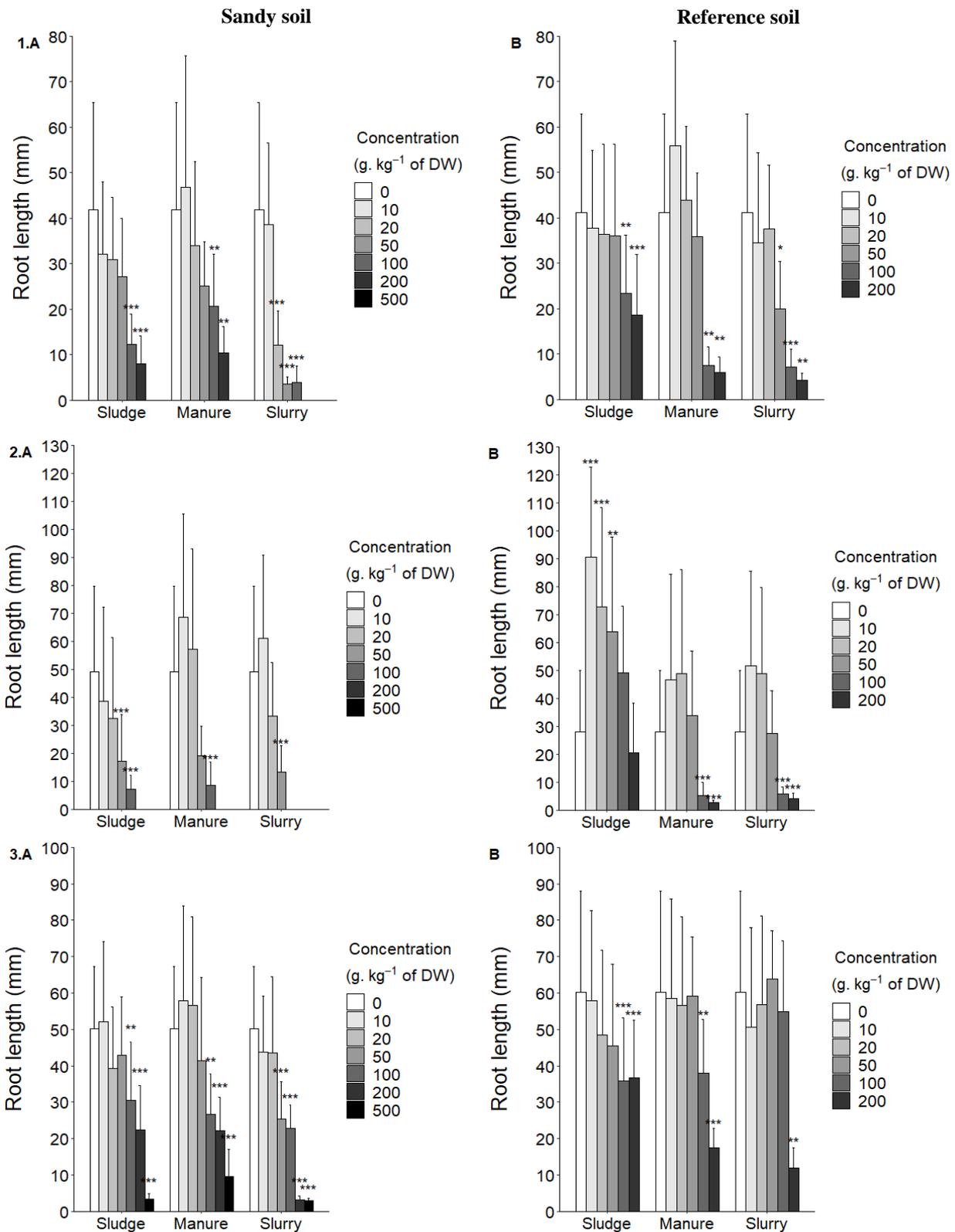


Fig. 3. Root lengths of different plant species (1: Alfalfa; 2: Mustard; 3: Zucchini) exposed to different concentrations of organic amendments (Sludge, Manure, Slurry) in 2 different substrates (A = Sandy soil; B = Reference soil).

Mean values ($n = 30$) and standard deviation. The means of the root lengths are calculated from germinated seeds. * indicates that the difference between the control and the treatment is significant with a significance level of: * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 .

3.4. Assessment of toxicity on earthworms

The test to assess earthworm mortality and growth was performed in the presence or not of organic amendments for 14 days. No mortality was observed in the control tests. However, an increase in earthworm mortality was apparent during exposure to the different amendments tested (Fig. 4). The results showed that all the earthworms died at levels higher than 160 g kg⁻¹ DW of sewage sludge, 80 g kg⁻¹ DW of cow manure and 60 g kg⁻¹ DW of cow slurry after 14 days' exposure. The LC₅₀ estimated after 14 days' exposure to sewage sludge reached 122.13 ± 3.54 g kg⁻¹ DW. This LC₅₀ was higher than the LC₅₀ obtained with the residual livestock products. Indeed, a high pH value, electrical conductivity and ammonia nitrogen content are among the factors responsible for lower earthworm survival (Moinard et al., 2021; Gunadi and Edwards, 2003; Sherman, 2003; Flegel and Schrader, 2000). Cow manure conducted to an LC₅₀ of 62.23 ± 1.15 g.kg⁻¹ DW while for cow slurry it was 46.48 ± 1.15 g.kg⁻¹ DW. The values obtained were close to the values determined in the study performed by Parente et al. (2021), in which the exposure of *E. fetida* earthworms to poultry slurry gave an LC₅₀ of 28.5 g.kg⁻¹ DW. The addition of fresh agricultural organic residues without prior composting had a considerable negative impact on earthworm mortality (Gunadi and Edwards, 2003).

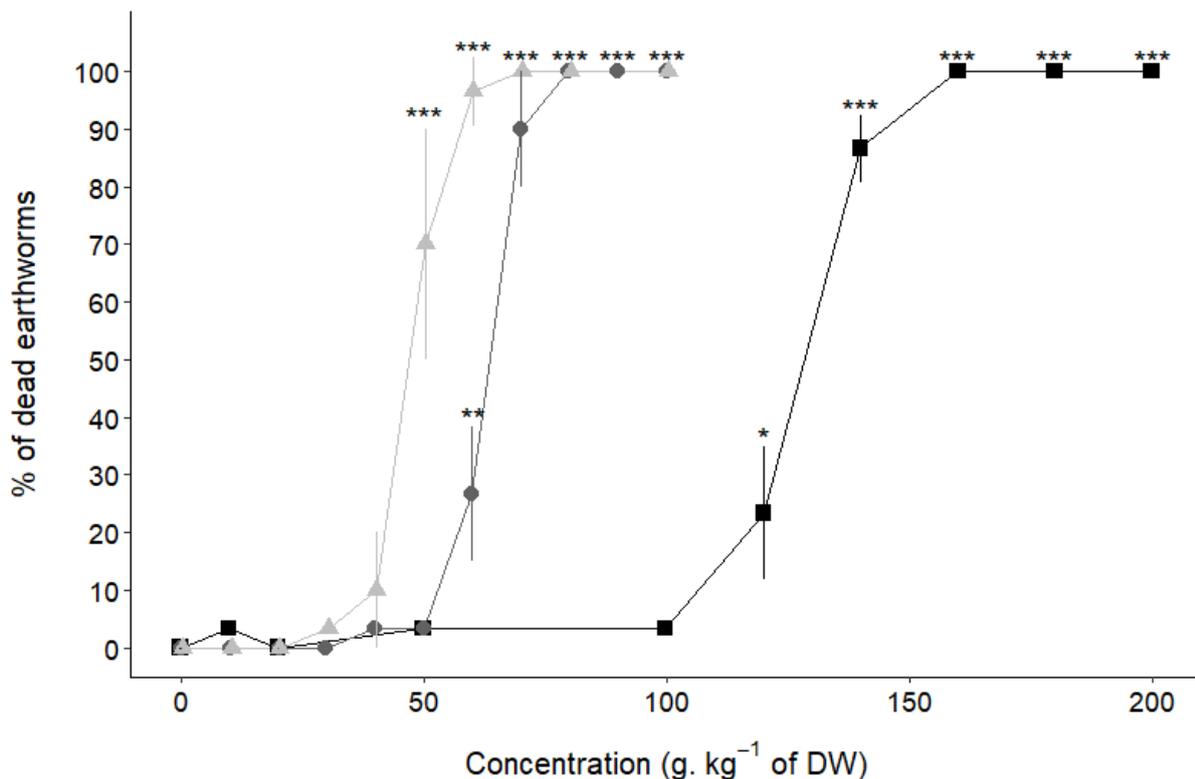


Fig. 4. Survival of earthworms *E. fetida* exposed to different concentrations of organic amendments for 14 days (square = Sewage sludge; round = Cow manure; triangle = Cow slurry).

Mean values (n=30) and standard deviation. * indicates that the difference between the control and the treatment is significant with a significance level of: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

Earthworm growth partly depends on the biochemical characteristics of the organic materials they assimilate. Easily assimilable organic material and the quantity of carbohydrates are the main determinants of their growth and reproduction (Vodounnou et al., 2016; Edwards, 1988). In our study, the small quantity of organic material in our reference soil led to a considerable loss of growth, from -10 to -20 %, after 14 days' exposure for the earthworms present in the control treatment without the addition of organic amendment (Fig. 5). On the contrary, the addition of organic matter led to an increase of growth rate as a function of the type of waste and dose. The presence of sewage sludge in the medium led to a strong increase in the growth rate in comparison with the other amendments tested. The growth rate reached $78.86 \pm 6.44\%$ at a dose of sewage sludge of 100 g.kg^{-1} DW. This strong increase in the fresh biomass of earthworms exposed to sewage sludge is frequent in the literature (Carbonell et al., 2009). The organic residues of agricultural origin also increased growth rate (Reinecke and Viljoen, 1990). The results showed that this increase reached $41.95 \pm 0.67\%$ for 50 g.kg^{-1} DW of manure and 32.19 ± 14.59 for 30 g.kg^{-1} DW of slurry in our study. On the contrary, when the dose of slurry or sludge had a negative effect on the survival of earthworms, the increase in the biomass of the earthworms was not significantly different from the growth observed for the control treatment.

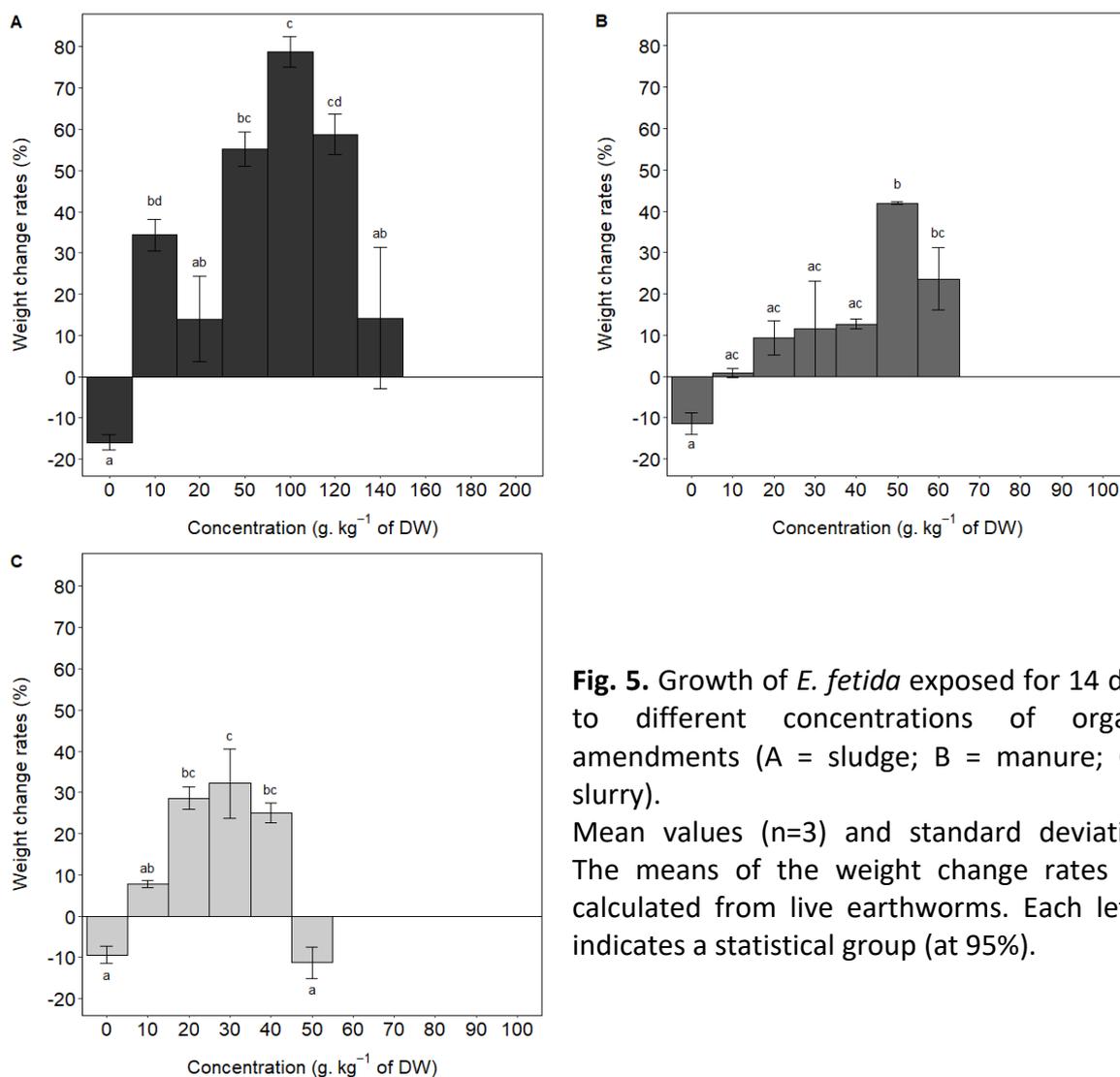


Fig. 5. Growth of *E. fetida* exposed for 14 days to different concentrations of organic amendments (A = sludge; B = manure; C = slurry).

Mean values (n=3) and standard deviation. The means of the weight change rates are calculated from live earthworms. Each letter indicates a statistical group (at 95%).

The analysis of avoidance behavior of earthworms in the presence of different organic amendments is shown in **Fig. 6**. No mortality was observed in the different tests with amendments. The control without organic amendment did not show any avoidance behavior. The presence of sewage sludge and cow manure did not lead to avoidance behavior in earthworms. A significant attraction behavior was even observable above 10 g.kg⁻¹ of cow manure and 20 g.kg⁻¹ of sewage sludge. The addition of nutrients and organic matter by the different organic amendments could be the cause of the attraction behavior observed in earthworms, in comparison to the ISO soil whose composition was relatively poor. Exposure to cow slurry showed a slight avoidance response of 25.00 ± 33.17% and 27.50 ± 37.75% at 5 and 10 g.kg⁻¹ DW respectively. However, these differences were not significant following considerable variability of avoidance between the different replicates. In the realistic agricultural spreading scenarios with these agricultural wastes, the epigeous earthworms did not appear to be affected. The increase of WHC in the different media amended with organic wastes could also explain the attraction behavior of earthworms. Indeed, Li et al. (2011) showed that desiccation is an important factor to be taken into account in avoidance behavior during the amendment of soils with biochar.

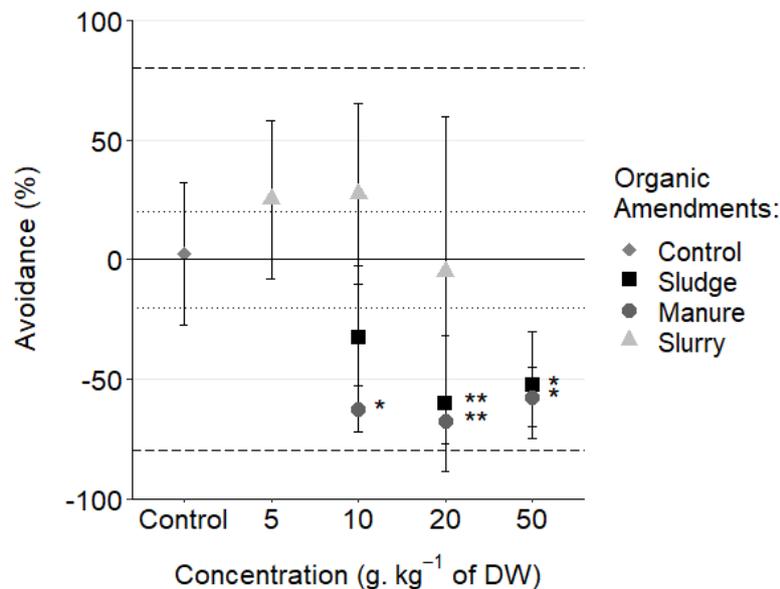


Fig. 6. Avoidance response of earthworms (*Eisenia fetida*) to different organic amendments as a function of their concentration (48h test).

Mean value (n=4) and standard deviation. The dotted line means an avoidance value of 20%. The dashed line means an avoidance value of 80%. * indicates the difference between the control and the treatment is significant with a significance level of: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

4. Conclusion

The organic amendment of agricultural soil including sewage sludge, dairy cow manure and dairy cow slurry considerably modified the physicochemical parameters and biological activity of soil. The presence of pollutants in sewage sludge points to potentially considerable toxicity. Mineral pollutants such as zinc and copper as well as organic pollutants like pharmaceuticals, PAHs and PCBs were present in non-negligible quantities capable of affecting soil organisms. Out of the three organic amendments studied, the ecotoxicological tests revealed a dose-dependent effect on plants and earthworms. The results showed the death of all the earthworms at values above 160 g.kg⁻¹ DW for sewage sludge, 80 g.kg⁻¹ DW for cow manure and 60 g.kg⁻¹ DW for cow slurry. On the contrary, at more realistic spreading doses and in conformity with European regulations, i.e., 10 to 20 g.kg⁻¹ DW, no mortality was observed. The results also showed an increase of the biomass of earthworms and behavior of attraction to amended soils. Earthworms were more sensitive than plants to organic amendments which makes them an efficient bioindicator for assessing the ecotoxicity of these organic amendments before spreading on agricultural soils.

Regarding the plants, the study showed that the type of soil is a decisive factor for toxicity to plants and the effects depend on the dose and type of organic materials used as amendments. The tests on a sandy soil showed an “overestimation” of toxic effects of organic materials on plants in comparison to a reference soil. Soil composition and the presence of organic material play an important role in trapping pollutants, suggesting the use of an additional reference soil for the ecotoxicological tests. At realistic spreading doses, the organic amendment of soil did not appear to affect soil microbial activity and even improves plant growth, in accordance with the agronomic goal of the practice of spreading organic waste. The use of several organisms of different trophic levels during the test appeared pertinent in the assessment of the ecotoxicity of these materials to avoid overestimating and underestimating their toxic effect.

Among the organic amendments tested, dairy cow slurry appeared to be the most toxic organic waste according to the different toxicity tests. Nonetheless, for doses close to those of realistic agricultural spreading, no toxic effect of the three organic amendments was observed in the plants and earthworms. However, it is important to note that higher doses can be observed during transient deposition of organic amendments on part of the field. To complete the ecotoxicological assessment of these different organic amendments, the implementation of a chronic toxicity test, thus longer in terms of exposure, on earthworms appears essential to protect populations and ensure the harmlessness of these materials. Thus, monitoring the reproduction and bioaccumulation of certain pollutants would appear to be sufficient for this additional diagnostic.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

These studies were funded by the French Office for Biodiversity (OFB).

Acknowledgements

The authors thank the GRAIE (Research, Technical Coordination and Information on Water Group) for managing the RISMEAU project (Risks linked to drug residues, biocides and anti-bioresistance of human and veterinary origin in the water resources of the Arve catchment area), the Provademse platform for its technical support and laboratories that analyzed the different pollutants present in this study (Myriam Hammada, LEHNA laboratory; Marjolaine Deschamps, Ghislaine Delarue, Erell Naslain and Françoise Poiroux ECOSYS laboratory; Philippe Marchand, Residues and Contaminants in Food Analysis Laboratory). We also thank the volunteers of the water treatment plant and farms for providing the different organic amendments studied. RISMEAU is a research program supported by Bellecombe site (SIPIBEL), a field observatory on hospital effluents and urban sewage treatment plan. Biochem-Env (<https://doi.org/10.15454/HA6V6Y>) is a service of the “Investissement d’Avenir” infrastructure AnaEE-France, overseen by the French National Research Agency (ANR) (ANR-11-INBS-0001).

5.3 Synthèse et conclusion des caractéristiques et des effets d'écotoxicité aiguë des trois Mafors étudiées

Au cours de ce travail, les analyses chimiques mettent en évidence la présence de composés inorganiques (ETMs) et organiques (résidus de médicaments, HAP, PCB) dans les différentes Mafors suivies à des concentrations susceptibles d'impacter les organismes du sol. En complément des analyses chimiques, les résultats écotoxicologiques des Mafors sur les organismes étudiés (microorganismes, plantes et ver de terre) soulignent un risque écotoxique variable selon le type de Mafor, de la dose d'épandage et du substrat d'essais (sol artificiel et sol naturel). Deux résultats majeurs sont à relever : la boue présente le potentiel écotoxique le plus élevé en termes de contaminants détectés et de leurs concentrations tandis que le lisier de vache montre une écotoxicité plus importante lors des tests écotoxicologiques à des doses d'épandage élevées. Toutefois, à des doses d'épandage réalistes, les bioessais montrent une absence d'effet écotoxique à court terme des Mafors et un effet bénéfique sur les organismes étudiés est observé pour toutes les Mafors.

L'analyse chimique et l'analyse écotoxicologique à court terme sont deux approches pertinentes et complémentaires pour évaluer l'écotoxicité potentielle des Mafors. Cependant, ces bioessais testés ne permettent pas de prendre en compte les effets chroniques qui dépendent de la durée d'exposition. Par ailleurs, les effets bénéfiques observés à court terme issus de l'apport en matière organique peuvent masquer les effets écotoxiques des Mafors. À long terme, des effets reprotoxiques et génotoxiques ainsi que des phénomènes de bioaccumulation de certains polluants peuvent apparaître sur les organismes exposés. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés par la suite aux effets à long terme de ces Mafors en suivant les paramètres de reproduction des vers de terre et de croissance des plantes. Un rapide aperçu des effets reprotoxiques des Mafors à long terme est mis en évidence à l'aide du test YES-YAS qui révèle la présence de composés perturbant potentiellement le système endocrinien des organismes (cf. ANNEXE D, page 268).

Chapitre 6. Effets à long terme des épandages agricoles sur les organismes terrestres (vers de terre et plantes)

6.1 Étude/Validation du bioessai en laboratoire

6.1.1 Contexte et objectifs

L'impact écotoxique de certains polluants ou échantillons environnementaux peut être dissimulé par un manque ou un surplus d'éléments nutritifs dans le milieu d'exposition. En effet, le facteur confondant de la « nourriture » peut affecter les réponses des organismes face à des milieux contaminés lors des tests de toxicité chronique (Antunes et al., 2004).

Dans notre étude, les Mafors apportent une teneur élevée en matière organique dans les sols amendés durant les tests écotoxicologiques. Or, l'augmentation de la teneur en carbone organique dans le milieu modifie le taux de reproduction des organismes terrestres et aquatiques (Leppänen and Kukkonen, 1998 ; Ankley et al., 1994). Il convient donc de vérifier si les caractéristiques des Mafors, dont leurs teneurs élevées en matière organique, peuvent impacter l'activité des organismes durant nos bioessais.

Pour vérifier cette hypothèse, un test préliminaire est réalisé sur l'effet de la teneur en carbone organique dans le milieu sur la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida* (Chapitre 4.7.2.1, page 120). En complément, une vérification de la sensibilité des vers de terre *Eisenia fetida* issus de l'élevage est effectuée à l'aide d'une substance de référence. La substance de référence testée est l'acide borique, utilisé pour inhiber la reproduction des vers de terre à faible dose et préconisé par la norme ISO 11268-2 (ISO, 2015a).

6.1.2 Résultats et discussion

6.1.2.1 Effets de la teneur en matière organique et des conditions d'apport sur la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*

Les paramètres de croissance et de reproduction d'*Eisenia fetida* sont suivis durant les 56 jours du test de reproduction sur un sol artificiel ISO dans des conditions alimentaires distinctes, c'est-à-dire avec des doses de crottin et des conditions d'apports variables (**Figure 31**). Le taux de mortalité des vers de terre adultes est faible, voire nul, à la fin des 28 jours d'exposition. Seule la condition C (10 % de crottin ajouté au début de l'expérience) conduit à un taux de mortalité positif, égal à $5,00 \pm 10,00$ % (données non présentées).

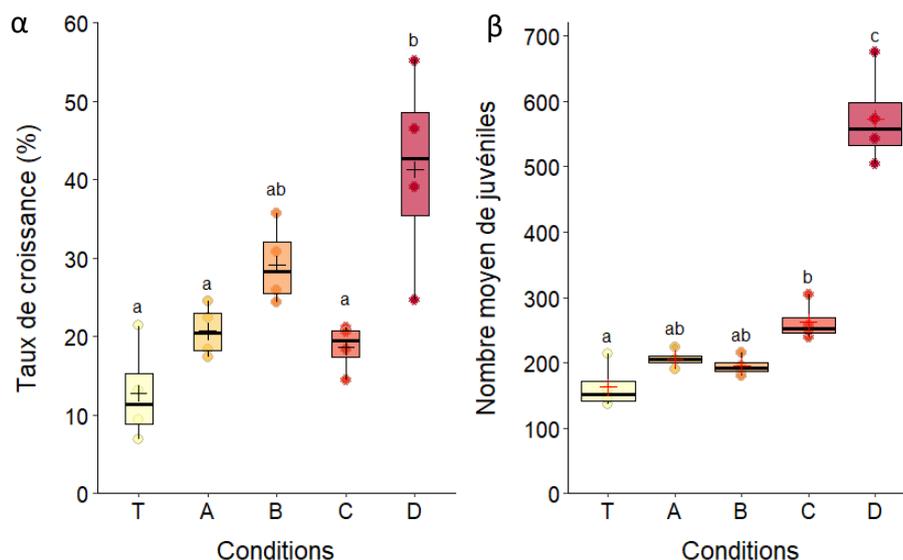


Figure 31. Croissance (en %) (α) et reproduction (mesurée en nombre de juvéniles éclos) (β) des vers de terre *Eisenia fetida* exposés à un sol artificiel ISO et différentes conditions de nutrition.

Valeurs moyennes ($n = 4$). Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %). Les conditions sont désignées par différentes lettres : T = ajout de 5 g de crottin sec par semaine ; A = ajout de 10 g de crottin sec par semaine ; B = ajout de 20 g de crottin sec par semaine ; C = 10 % de crottin ajouté au début de l'expérience ; D = 20 % de crottin ajouté au début de l'expérience.

Tout d'abord, un gain de biomasse des vers de terre adultes est observé dans toutes les conditions. Les vers de terre témoins présentent un taux moyen de croissance de $12,75 \pm 6,29$ %. Un apport hebdomadaire plus conséquent en crottin provoque un gain de biomasse légèrement supérieur mais non significatif. En effet, les conditions A (10 g par semaine) et B (20 g par semaine) conduisent à des taux de croissance de $20,67 \pm 3,34$ % et $29,19 \pm 5,16$ % respectivement (**Figure 31- α**). Dans les milieux enrichis en crottin de 10 % (C) et de 20 % (D) au début de l'expérience, seule la biomasse des vers de terre de la condition D a augmenté significativement avec un taux de croissance atteignant $41,33 \pm 12,97$ %.

Les données sur le nombre de juvéniles, **Figure 31- β** , montrent des résultats similaires entre les conditions témoins et les conditions A et B. Les vers de terre de la condition A et B produisent un nombre de cocons de $211 \pm 9,20$ et $190 \pm 23,11$ respectivement contre $162,75 \pm 34,71$ dans les conditions témoins. Au contraire, les vers de terre exposés à des milieux enrichis en crottin au début du test (conditions C et D) présentent une reproduction significativement plus élevée que les témoins. En effet, les vers de terre obtiennent une production de juvéniles de $261,75 \pm 29,33$ dans la condition C et de $548,50 \pm 88,93$ dans la

condition D (**Figure 31-β**). La présence de nourriture dès le début de l'expérience avec une teneur en carbone organique importante influence donc positivement la croissance et la reproduction des vers de terre. L'étude de Reinecke et Viljoen (1990) montre que la croissance et la reproduction sont corrélées positivement et dépendent fortement de la source de nourriture testée et de la biodisponibilité de la matière organique. Il faudra donc tenir compte de cette quantité de carbone organique dans nos bioessais.

6.1.2.2 Test de l'acide borique sur la reproduction des vers de terre issus de l'élevage « contrôle positif selon la norme »

Ce test préliminaire est également utilisé pour vérifier la sensibilité du ver de terre d'élevage avec l'acide borique comme substance de référence. Connu pour inhiber la reproduction asexuée et la régénération segmentale chez les vers de terre (Martinez et al., 2006), l'acide borique est conseillé dans la norme ISO 11268-2 (ISO, 2015a) pour vérifier la sensibilité des vers de terre et les conditions d'essais en laboratoire. La condition de ce témoin positif est un sol artificiel ISO dopé à une concentration en acide borique de 450 mg.kg⁻¹ MS (T+).

L'ajout d'acide borique dans le milieu conduit à une légère augmentation du taux de croissance des vers de terre sans toutefois être significative. En effet, un taux de croissance de 22,18 ± 9,05 % est obtenu dans la condition du témoin positif contre 12,75 ± 6,29 % dans le témoin négatif. Des effets positifs ont déjà été observés chez les microorganismes, les plantes et les vers de terre pour des concentrations faibles en acide borique (Becker et al., 2011). En revanche, avec la concentration testée en acide borique, une baisse significative du nombre de juvéniles est observée en comparaison avec les essais témoins. Le taux d'inhibition de la reproduction atteint 63,17 ± 14,85 % pour ces vers de terre exposés à l'acide borique. Le nombre de juvéniles a atteint 58,50 ± 20,04 dans la condition du témoin positif contre 162,75 ± 34,71 dans la condition témoin. En conclusion de ce test, l'acide borique a bien un effet négatif sur la reproduction des vers de terre. Ces résultats sont similaires à l'étude de Becker et al. (2011) et aux données disponibles dans la norme ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a) sur l'inhibition de la reproduction du ver *Eisenia fetida* exposé à l'acide borique.

La réponse des vers de terre à un milieu contaminé en acide borique correspond aux données de la littérature et de la norme ISO (Becker et al., 2011 ; ISO, 2015a). Ce constat

signifie que les vers de terre utilisés pour nos essais sont sensibles et en capacité de répondre efficacement à la présence de substances toxiques dans un milieu lors des tests de reproduction.

6.1.3 Conclusion

Durant ce bioessai préliminaire, les résultats permettent de confirmer l'influence de la teneur en matière organique sur la reproduction des vers de terre. Dans ces conditions d'enrichissement du milieu sol par épandage de matière organique, les paramètres de croissance et de reproduction sont plus élevés que dans les conditions témoins de la norme ISO. Ce facteur « nourriture » doit être pris en compte lors des études sur des échantillons environnementaux riches en matière organique puisque ce facteur pourrait masquer des effets potentiellement toxiques.

L'utilisation de l'acide borique comme substance de référence montre une inhibition supérieure à 50 % de la reproduction des vers de terre. Ces résultats nous ont permis de vérifier la sensibilité suffisante des vers de terre à répondre à une substance toxique au travers de la reproduction. Enfin, les conditions d'essais mises en place dans le laboratoire semblent adéquates pour la mise en place des tests de reproduction.

Nous présentons dans la partie ci-dessous (Chapitre 6.2) la réalisation des tests de toxicité chronique des Mafors sur la reproduction des vers de terre et l'émergence et la croissance des plantes. Pour minimiser l'effet « nourriture » un gradient inverse d'apport de matière organique « crottin de cheval » sera appliqué dans toutes les conditions en fonction de la dose en Mafors (Chapitre 4.7.2.2, page 123).

6.2 Bioessais en laboratoire – Tests de toxicité chronique

6.2.1 Contexte et enjeux

Dans un contexte agricole d'épandage de Mafors, les doses agronomiques appliquées annuellement sont faibles et avoisinent les 10 g.kg^{-1} MS dans les sols amendés. Les bioessais sur les effets à court terme de l'épandage de Mafors ne montrent pas d'effet écotoxique à ces doses d'épandage sur les organismes terrestres. La seconde étape de nos investigations consiste à évaluer l'écotoxicité chronique des Mafors avec des mesures d'effets sensibles sur le long terme à des doses d'épandage réalistes (cf. **Figure 13**, page 86). Ce travail est effectué à deux niveaux trophiques : les vers de terre et les plantes. Dans un premier temps, le test de reproduction du ver de terre *Eisenia fetida* est adapté sur la base des données obtenues lors du test préliminaire et, dans un second temps, utilisé pour évaluer les effets reprotoxiques de ces Mafors (56 jours). Pour les plantes, un test d'émergence et de croissance est réalisé (21 - 28 jours). Les résultats sont ensuite complétés par des analyses chimiques et spectrales de la matière organique des Mafors ainsi que l'analyse des réserves énergétiques des vers de terre exposés.

6.2.2 Article 2 – Évaluation de l'écotoxicité chronique par des tests sur les vers de terre et les plantes de différents amendements organiques épandus sur les sols agricoles

Article en cours de finalisation pour une soumission début janvier 2023

Évaluation de l'écotoxicité chronique par des tests sur les vers de terre et les plantes de différents amendements organiques épandus sur les sols agricoles

Olivier Roques^{a,b*}, Julia Le Maux^b, Dominique Patureau^c, Sylvie Néliu^d, Isabelle Lamy^d, Rémy Bayard^e, Jean-Philippe Bedell^a

^a Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69518, Vaulx-en-Velin, France.

^b INSA Lyon, Campus LyonTech-La Doua, avenue Albert Einstein, 69621, Villeurbanne, France. INRAe, Univ. Montpellier, LBE, 102 Avenue des étangs, 11100, Narbonne, France.

^d Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR EcoSys, 91120 Palaiseau, France.

^e University. Lyon, INSA Lyon, DEEP Laboratory, EA7429, F-69621, Villeurbanne cedex, France.

Résumé

L'usage des amendements organiques par épandage sur sols agricoles contribue à valoriser les déchets organiques produits, tels que les déchets de stations d'épuration ou les sous-produits de l'agriculture, et à améliorer la qualité du sol. Mais les impacts environnementaux et sanitaires de ces amendements organiques dépendent étroitement de leurs origines et de leurs caractéristiques bio-physicochimiques. Pour évaluer ces impacts, il existe de nombreux tests d'écotoxicité mais leurs utilisations peuvent donner des résultats contrastés suivant les modèles biologiques étudiés. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence quel test représente au mieux l'écotoxicité chronique dans le cas d'épandage d'amendements organiques sur les sols agricoles. Pour cela, nous avons caractérisé la matière organique de trois amendements organiques différents, une boue de station d'épuration des eaux urbaines, un fumier et un lisier de vache, et évalué leur potentielle écotoxicité chronique avec des tests exposant des vers de terre et des plantes. L'analyse de l'amendement organique de type boue d'épuration révèle des concentrations élevées en micropolluants ainsi qu'une fraction importante de matière organique accessible et biodégradable. Par contraste, le fumier et le lisier de vache présentent une faible contamination chimique et des caractérisations similaires avec des fractions moins biodégradables de leurs matières organiques. La phytotoxicité chronique de ces amendements organiques n'est pas mise en évidence au cours des bioessais réalisés. Au contraire, lors de l'exposition à la boue d'épuration des deux plantes étudiées, une augmentation du taux de germination et de leur biomasse a été mise en évidence. Cet effet agronomique positif est souvent attribué dans la littérature à l'apport d'éléments nutritifs favorables à la croissance végétale et, d'autre part, aux modifications structurales du support de croissance associées à l'augmentation de la teneur en matière organique. Par ailleurs, les essais chroniques de reproduction de vers de terre sur sols amendés avec la boue d'épuration ont permis de mettre en évidence une forte augmentation de leur biomasse en cohérence avec la forte biodégradabilité et accessibilité de cette matière organique. En revanche, au contraire du fumier de vache qui n'a pas montré d'effet écotoxique, les vers de terre exposés à la boue d'épuration et au lisier de vache ont montré une inhibition proche de 78 % de la production de juvéniles à partir de 20 g.kg⁻¹ MS. Dans le cas du lisier, cet effet reprotoxique ne peut pas être imputé à la présence de micropolluants, au contraire de la boue d'épuration. L'analyse des populations de vers de terre en fin d'essais indique une nette diminution des réserves en glycogènes et en protéines chez les vers de terre exposés à la boue d'épuration par rapport aux vers de

terre témoins, suggérant une allocation de l'énergie pour lutter contre un stress. Pour les vers de terre exposés au lisier de vache, les réserves en protéines et en lipides ont augmenté. En conclusion majeure, si la boue d'épuration présente un fort potentiel nutritionnel à la fois pour les plantes et les vers de terre, un risque non-négligeable est avéré sur la reproduction des vers de terre. Nos résultats confirment, en particulier sur les amendements organiques type boue d'épuration, l'intérêt d'utiliser plusieurs tests d'écotoxicité chronique à des niveaux biologiques et des modèles biologiques différents et de croiser les résultats obtenus dans le but de garantir leur innocuité dans les différents compartiments de l'environnement. Suivant les objectifs visés (santé du sol, santé des plantes et/ou santé des aquifères), ce nouveau critère d'écotoxicité intégré, prenant en compte une somme pondérée des résultats de différents tests orienterait la valorisation des amendements organiques tout en garantissant le bon état de santé des écosystèmes agricoles.

Mots clés

Bioessai, *Eisenia fetida*, écotoxicologie, éléments traces métalliques, évaluation du risque, fluorescence 3D, fraction accessible, fraction biodégradable, *Medicago sativa*, résidus de médicaments, *Sinapis alba*.

Points forts

- La fraction accessible de la matière organique de la boue d'épuration est facilement biodégradable.
- Les propriétés fertilisantes de la boue d'épuration augmentent la germination et la croissance des plantes.
- La boue d'épuration et le lisier de vache ont des effets reprotoxiques sur les vers de terre.
- Le stress généré par la boue d'épuration réduit les réserves énergétiques des vers de terre contrairement au lisier de vache qui les augmente.

1. Introduction

Dans le contexte de développement de l'économie circulaire dans tous les secteurs économiques, la valorisation des déchets organiques et résidus agricoles comme amendements organiques est un enjeu majeur pour la substitution des engrais chimiques, l'amélioration de la qualité du sol et la séquestration du carbone (Cucina et al., 2021 ; Cucina et al., 2019 ; Scotti et al., 2015). Les amendements organiques comprennent généralement les effluents d'élevage et les déchets municipaux et industriels tels que les boues d'épuration urbaines et industrielles (Collivignarelli et al., 2019 ; Loyon, 2017). Ces amendements organiques sont souvent caractérisés par leurs fortes teneurs en matière organique et en éléments nutritifs de nature organique ou inorganique (Goss et al., 2013). Les composés organiques sont une source nutritive intéressante pour les organismes décomposeurs tels que les vers de terre et les microorganismes du sol tandis que les éléments nutritifs inorganiques seront directement assimilables par les plantes. Parmi les éléments nutritifs, l'azote, le phosphore et le potassium sont des éléments nécessaires au développement des plantes.

L'épandage des amendements organiques sur les sols agricoles présente un intérêt majeur pour fertiliser les sols et accroître le rendement des cultures (Zuo et al., 2019). Ces amendements organiques améliorent également la qualité du sol par une restructuration et une stabilisation du sol (Khaliq and Abbasi, 2015). En effet, la forte teneur en matière organique améliore la capacité de rétention en eau, la porosité du sol et la conductivité hydrique (Głąb et al., 2018). Toutes ces améliorations conduisent à favoriser la croissance des plantes et la biodiversité du sol par une stimulation de l'activité microbienne et des organismes décomposeurs tels que les vers de terre. De ce fait, les analyses de la composition chimique et physique de ces amendements organiques permettent de mieux appréhender leur effet fertilisant sur les sols et pourraient justifier leur utilisation en amendement organique du sol. De plus, des méthodes combinant extraction et caractérisation biochimique de la matière organique donnent également des informations importantes sur leur accessibilité et leur biodégradabilité qui jouent un rôle important sur leur vitesse de minéralisation et leur mobilité dans le sol. L'accessibilité est définie comme la quantité massique d'un produit chimique qui est ou peut devenir disponible dans un laps de temps donné et dans des conditions données (Reichenberg and Mayer, 2006). Cette fraction devient alors mobilisable et disponible pour les processus tels que la biodégradation et l'absorption digestive (Loehr and Webster, 1996 ; Mayer et al., 1996).

Toutefois, des polluants organiques ou inorganiques sont présents dans ces amendements organiques et sont susceptibles de contaminer le sol amendé. En effet, selon l'origine de ces amendements organiques, des éléments traces métalliques (ETMs) et des polluants organiques persistants ou non sont identifiés à des concentrations quantifiables (Fijalkowski et al., 2017 ; Goss et al., 2013). Pour limiter la contamination du sol, plusieurs directives européennes visent à contrôler la dissémination de certains polluants dans les sols agricoles en imposant un seuil maximal pour les principaux ETMs (7), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (3) et les polychlorobiphényles (7) ainsi que des doses maximales d'épandage pour les boues d'épuration et les déchets organiques d'origines domestique et industrielle (EC, 1986). Par ailleurs, les amendements organiques peuvent également générer une acidification et une salinisation des sols liées à la décomposition des matières organiques facilement biodégradables, avec des conséquences sur l'activité biologique des sols amendés (Bonanomi et al., 2014).

L'épandage répété des amendements organiques entraîne une écotoxicité vis à vis des microorganismes du sol (Markowicz et al., 2021), des plantes (Žaltauskaitė et al., 2016 ; Oleszczuk and Hollert, 2011 ; Carbonell et al., 2009) et des macroorganismes (Courtois et al., 2021b ; Domene et al., 2011 ; Tidona et al., 2009 ; Gunadi and Edwards, 2003). Toutefois, à des doses réalistes d'épandage, les tests de toxicité aiguë classiquement réalisés ne permettent pas la mise en évidence d'effet écotoxique lié à l'épandage (Roques et al., 2022¹²). Parmi les tests d'écotoxicité chronique réalisés sur ces amendements organiques, la littérature scientifique mentionne le test sur l'émergence et de la croissance des végétaux supérieurs (Žaltauskaitė et al., 2016), le test de reproduction sur les vers de terre basé sur le comptage des cocons et des juvéniles produits (Urionabarrenetxea et al., 2022), le test de reproduction sur les annélides (Domene et al., 2008) et le test de reproduction sur les collembolés (Kończak and Oleszczuk, 2018). Ces nombreuses études ont permis de mettre en évidence des effets écotoxiques de l'épandage d'amendements organiques sur la

¹² Article 1 présenté dans le chapitre 5.2, page 133

croissance et la germination chez les plantes et la reproduction des vers de terre. La reproduction est un facteur important responsable de la dynamique des populations. Des tests chroniques normés ont ainsi été établis dans le but d'évaluer les effets sublétaux des polluants ou des sols contaminés sur les organismes du sol et portent sur divers groupes écologiques.

L'étude de biomarqueurs durant les tests de toxicité chronique peut également fournir des informations sur l'impact des polluants concernant les organismes à différents niveaux de complexité biologique (Lagadic et al., 1997). La plupart des biomarqueurs étudiés sont des analyses associées à des réponses biochimiques et liées au stress provoqué par le milieu extérieur. Ces réponses biochimiques permettent la mise en évidence d'impacts sur le métabolisme et sont des potentiels indicateurs de stress. Les principaux biomarqueurs de stress biologique portent sur l'intégrité cellulaire, les activités enzymatiques et les réserves énergétiques (Urionabarrenetxea et al., 2022 ; Parente et al., 2021 ; Parelho et al., 2018 ; Pelosi et al., 2016). Le budget énergétique des organismes est fixe et la mise en place de mécanismes de détoxification liée à un stress environnemental conduit à une diminution des réserves énergétiques et une diminution de la quantité d'énergie allouée à d'autres mécanismes tels que la croissance et la reproduction (Calow, 1991).

Certes l'apport d'amendement organique sur les sols agricoles montre un intérêt agronomique mais ces épandages représentent un risque de contamination chronique, avec des conséquences à long terme sur l'activité biologique du sol encore peu identifiées. Les nombreux tests d'écotoxicité disponibles peuvent donner des résultats contrastés suivant les modèles biologiques étudiés. En conséquence, on ne sait quel test, ou combinaison de tests, peut caractériser au mieux la potentielle écotoxicité des amendements organiques sur les sols agricoles. L'objectif de cette étude est d'identifier quel test permet de mieux évaluer l'écotoxicité chronique dans le cas d'épandage agricoles. Pour cela, nous avons (i) caractériser la matière organique de trois amendements organiques différents : une boue d'épuration, un fumier de vache laitière et un lisier de vache laitière et (ii) évaluer le risque écotoxique de ces amendements organiques sur deux organismes terrestres, les plantes et les vers de terre, à l'aide de tests d'écotoxicité chronique. Il s'agit ainsi d'estimer les bénéfices et les risques de l'épandage de ces amendements organiques sur les organismes du sol.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Origines et préparation des matrices

Le sol de référence utilisé dans cette étude a été prélevé à une profondeur maximale de 80 cm en novembre 2019 sur une prairie n'ayant jamais reçue d'épandage (46°07'16.0"N 6°18'37.3"E, Scientrier, 74930). Après retrait des éléments végétaux, ce sol a été homogénéisé, séché à l'air et tamisé à 2 mm puis conservé à température ambiante avec une teneur en eau de $4,63 \pm 0,24$ %. Il est composé de sable (51,1 %), de limon (45,6 %) et d'argile (3,2 %). Ce sol de référence a été caractérisé dans l'article Roques et al. (2022¹³), les informations sont détaillées dans l'annexe de ce mémoire (cf. tableau C.1 de l'ANNEXE C, page 262).

¹³ Article 1 présenté dans le chapitre 5.2, page 133

Les trois amendements organiques ont été sélectionnés pour leur représentativité des pratiques d'épandage dans la zone d'étude située dans le bassin versant de l'Arve en France. Le choix s'est porté sur une boue d'épuration, un fumier de vache et un lisier de vache. La boue d'épuration a été collectée à la station de traitement des eaux usées de Bellecombe située à Scientrier (département de Haute-Savoie, France). C'est une boue de type secondaire issue d'effluents urbains et hospitaliers, collectée après déshydratation sous serre. Les deux amendements organiques issus de l'élevage de bovin ont été prélevés : un lisier et d'un fumier de vaches laitière dans deux exploitations agricoles distinctes situées à quelques kilomètres d'Annemasse (Département de Haute-Savoie, France). Des pré-traitements avant conservation ont été réalisés sur les différentes matrices. La boue d'épuration a été tamisée à 2 mm. Le fumier de vache a été broyé par un broyeur à cisaillement afin d'obtenir des pailles plus petites, de l'ordre de 5 cm maximum. Le lisier de vache a été séché à température ambiante et ventilé dans une étuve à 20 °C pour réduire sa teneur en eau. Les trois amendements organiques ont été homogénéisés par brassage manuel de l'ensemble du stock puis conservés à -20 °C avec des teneurs en eau de $53,97 \pm 0,44$ % pour la boue d'épuration, $82,39 \pm 0,50$ % pour le fumier et $78,07 \pm 3,14$ % pour le lisier.

Les caractéristiques des trois amendements organiques en termes de valeurs fertilisantes et de concentrations en polluants sont décrites dans l'article Roques et al. (2022)¹⁴ et détaillés dans l'annexe de ce mémoire (cf. tableau C.2 de l'ANNEXE C, page 262).

2.2. Choix des doses d'épandage à étudier

Que ce soit pour les tests de reproduction sur les vers de terre comme ceux concernant la croissance des plantes, le choix des doses d'épandage s'est basé sur les doses imposées par la réglementation européenne. Pour les boues d'épuration, la dose d'épandage maximale sur 10 ans sur les sols agricoles en France (EC, 1986), 30 t/ha équivalents secs, a été divisée par trois soit 10 t/ha équivalents secs, correspondant à une concentration en boues d'épuration d'environ 10 g.kg^{-1} MS de sol sec (1 ha de sol = 1250 kg de sol sec avec 10 cm de profondeur et une densité estimée de $1,25 \text{ g.cm}^{-3}$). Ainsi, les concentrations testées ont été 1 fois, 2 fois ou 5 fois la dose moyenne d'épandage. Pour les deux amendements agricoles testés au cours de cette étude, la dose moyenne d'épandage s'est basée sur la pratique agricole de la zone d'étude, soit une dose d'épandage de 35 t/ha de matière brute, soit une concentration en amendements organiques agricoles de 10 g.kg^{-1} de sol sec pour une teneur en matière sèche de 30 %. Les concentrations testées ont donc été 0,5 fois, 1 fois, 2 fois ou 5 fois la dose moyenne d'épandage de la zone d'étude. Ces gammes de concentrations testées ont été déterminées sur la base des résultats obtenus lors des bioessais de létalité des vers de terre réalisés par Roques et al. (2022)¹⁴.

2.3. Caractérisation de la matière organique par couplage d'un fractionnement chimique et l'analyse des extraits organiques par spectroscopie de fluorescence

Les amendements organiques ont été lyophilisés et tamisés (1 mm). L'extraction séquentielle chimique a été réalisée selon la méthode décrite par Jimenez et al. (2015). Cette procédure permet de caractériser la matière organique et de fournir des informations

¹⁴ Article 1 présenté dans le chapitre 5.2, page 133

sur la bioaccessibilité de la matière organique. Chaque fraction a été analysée par la détermination de charge de carbone organique par la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) selon le protocole ISO 15705 : 2002 (ISO, 2002) (taille du compartiment extrait versus total). Les caractéristiques de la matière organique contenue dans les différentes fractions ont été identifiées par spectroscopie de fluorescence tridimensionnelle (nature des composés de chaque compartiment).

Dans ce protocole expérimental, le fractionnement de la matière organique (ISBAMO* : Indice de Stabilité et de la Bioaccessibilité de la Matière Organique) réalisé sur un échantillon de 0,5 g sec est automatisé grâce à un système d'extraction accélérée par solvants Dionex™ ASE™ 350. Seule la quatrième étape est manuelle car nécessitant l'utilisation d'acide sulfurique à 72 %, trop concentré pour l'appareil.

Brièvement, 5 fractions sont obtenues par l'extraction séquentielle :

- Matière organique particulaire très facilement extractible (SPOM). La fraction SPOM est extraite à l'aide d'une solution de CaCl_2 à 10 mM (afin d'éviter une éventuelle rupture des membranes cellulaires). Cette fraction soluble en phase aqueuse contient principalement des sucres et des protéines.
- Matière organique particulaire facilement extractible (REOM). La fraction REOM est extraite à l'aide d'une solution saline de soude ($\text{NaCl} = 10 \text{ mM}$ / $\text{NaOH} = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 11$). Cette fraction contient principalement des protéines, des acides nucléiques, des sucres et des lipides.
- Matière organique particulaire lentement extractible (SEOM). La fraction SEOM est extraite à l'aide d'une solution de soude ($\text{NaOH} = 100 \text{ mM}$, $\text{pH} = 12$). Cette fraction contient principalement des protéines, des substances humiques et des lipides.
- Matière organique particulaire peu extractible ou fraction ligno-cellulosique (PEOM). Cette fraction PEOM, inspirée par le fractionnement Van Soest, est extraite à l'aide d'une solution d'acide sulfurique commerciale concentrée (72 %). Cette fraction contient la cellulose et l'hémicellulose.
- Matière organique non extractible (NEOM). Cette fraction est obtenue en soustrayant la masse totale de la matière organique extraite à la masse initiale de l'échantillon. Cette fraction est composée essentiellement de matières organiques de type ligno-cellulosique.

Les spectres de fluorescence de chacune des fractions ont été mesurés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer LS55. La longueur d'onde d'excitation variait de 200 à 600 nm avec des incréments de 10 nm. Selon la méthode décrite dans Jimenez et al. (2015), les spectres obtenus ont été décomposés en sept zones selon la fluorescence de grands types biochimiques (protéines, acides humiques, fulviques). Puis, un indice de complexité a été calculé selon Muller et al. (2014), pour chaque fraction. Cet indice est défini comme le rapport entre la somme des zones de fluorescences les plus complexes (zones n° 4 à 7) sur la somme des zones de fluorescences de type protéine (zones n° 1 à 3).

2.4. Bioessais

2.4.1. Germination des plantes et croissance

Le test chronique d'émergence et de croissance des plantes supérieures a été réalisé en adaptant la procédure standardisée ISO 11269-2 : 2013 (ISO, 2013). Deux espèces ont été

sélectionnées : la luzerne *Medicago sativa* et la moutarde *Sinapis alba*. Ces deux espèces ont été sélectionnées pour leur représentativité dans les cultures mises en place dans la zone d'étude et sont recommandées dans la norme ISO 11269-2 et fréquemment citées dans la littérature. Le test est réalisé en chambre climatique thermostatée à 20 ± 2 °C et une photopériode de 16 h jour/8 h nuit. Les mélanges sol-amendement sont préparés 5 jours avant le démarrage du bioessai afin de permettre une recolonisation du milieu par les microorganismes et la stabilisation de la teneur en eau fixée à 70 % de la capacité de rétention en eau pour tous les mélanges testés.

Les tests sont réalisés avec un sol de référence amendé en boue d'épuration, en fumier de vache ou en lisier de vache aux concentrations suivantes : 0, 10, 20 g.kg⁻¹ MS. Des pots en terre cuite troués à sa base (14 cm de diamètre, 13,5 cm de hauteur) sont recouverts d'un papier d'aluminium pour éviter les échanges d'eau et de polluants entre le sol amendé et le pot en terre cuite. Les pots sont ensuite remplis du sol de référence ou du sol de référence amendé jusqu'à environ 2 cm au-dessous du bord. Puis, 75 graines sont déposées de façon homogène à la surface du sol puis recouvertes de 1 cm d'épaisseur par le sol de référence ou le sol de référence amendé. Chaque traitement est réalisé en triplicats. Pour maintenir une teneur en eau appropriée du sol au cours des essais, les pots sont arrosés trois fois par semaine et placés sur une coupelle remplie d'eau déminéralisée permettant une humidification par capillarité. Une vérification de la teneur en eau par pesée est réalisée chaque semaine.

La germination et la croissance des graines sont suivies pendant 28 jours pour *M. sativa* et 21 jours pour *S. alba*. À la fin de l'essai, les parties aériennes des plantes sont coupées à la séparation avec la racine, comptées et mesurées par traitement numérique avec le logiciel ImageJ[®]. Les parties aériennes et racinaires sont nettoyées à l'aide de bains successifs sous ultrasons. Enfin, les parties aériennes et racinaires sont pesées avant et après séchage pendant 96 h dans une étuve à 50 °C.

2.4.2. Reproduction sur *Eisenia fetida*

Les vers de terre de l'espèce *Eisenia fetida* ont été fournis par un élevage en Allemagne. Après réception, ces vers de terre sont maintenus dans un milieu constitué de crottins de cheval issu d'un élevage biologique et de tourbe de coco (50/50) avec une teneur en eau proche de 70 % de la capacité de rétention en eau et une température de 20 ± 2 °C. Seuls les vers de terre adultes compris entre 350 mg et 600 mg en matière fraîche avec un clitellum visible et bien développé ont été sélectionnés pour les tests d'écotoxicité chronique. Avant le début des essais, les vers de terre sont nettoyés avec de l'eau déminéralisée par rinçage, pesés et mis à jeûner pendant 24 h.

Le test de reproduction sur les vers de terre *Eisenia fetida* est réalisé pendant 56 jours en adaptant la procédure ISO 11268-2 : 2015 (ISO, 2015a). Il est réalisé dans une salle thermostatée à 20 ± 2 °C et une photopériode de 16 h jour/8 h nuit. Chaque mélange est préparé 5 jours avant le début de l'essai afin de permettre une recolonisation du milieu par les microorganismes et la stabilisation de la teneur en eau. La teneur en eau est ajustée à 70 % de la capacité de rétention en eau du mélange. Durant les tests, des bocaux en verre de 1 L (Le Parfait[®]) ont été utilisés (11 cm de diamètre, 16,5 cm de hauteur) et fermés à l'aide de couvercles en plastique percés uniformément pour éviter la fuite des vers de terre et assurer une oxygénation du milieu. Ainsi, 450 g de masse sèche de sol de référence ou de sol

de référence amendé ont été introduits dans chaque bocal recouvert à la base par une bande de papier d'aluminium de 6 cm de hauteur pour maintenir l'obscurité dans le sol. Ensuite, dix vers de terre comprenant trois réplicats par traitement ont été exposés pendant 28 jours aux concentrations suivantes : 10, 20 et 50 g.kg⁻¹ MS (1x, 2x et 5x la dose moyenne d'épandage) pour la boue d'épuration et le fumier de vache ; 5, 10, 20 g kg⁻¹ MS (0,5x, 1x et 2x la dose moyenne d'épandage) pour le lisier de vache. Un quatrième réplicat a été réalisé pour l'exposition à l'amendement organique de lisier de vache. Un témoin négatif a été réalisé pour chacun des tests dans un sol artificiel ISO défini par la norme ISO (ISO, 2015a). La teneur en eau a été vérifiée chaque semaine par pesée et rectifiée si nécessaire avec de l'eau déminéralisée.

Pour éviter de masquer de potentiels effets de toxicité des amendements organiques testés par la présence d'une teneur en matière organique plus élevée, un gradient inverse du carbone organique a été appliqué entre les différentes conditions testées grâce à l'apport de crottin de cheval biologique. Le crottin de cheval biologique est utilisé comme aliment de base dans l'élevage des vers de terre. D'après les résultats d'analyse détaillés dans le tableau C.2 de l'annexe de ce mémoire (cf. ANNEXE C, page 262), cet amendement est dépourvu de tout contaminant organique et contient des concentrations basses en ETMs. Une quantité d'environ 20 g secs de crottin de cheval biologique soit 8,36 g de carbone a été atteinte pour les témoins. Cette quantité est identique à celle ajoutée chaque semaine pendant un mois sur le test de reproduction de la norme ISO permettant de s'assurer d'une croissance effective des vers de terre. Aucun apport nutritif n'est ajouté au cours de l'essai.

Après 14 jours d'exposition, les vers de terre adultes sont dénombrés afin de vérifier la mortalité, puis réintroduits dans le milieu d'essai brassé manuellement pour l'aérer. Après 28 jours d'exposition, les vers de terre adultes sont retirés, dénombrés et pesés après 24 h de jeûne afin d'évaluer la mortalité (équation n° 1) et le taux de croissance des vers de terre (équation n° 2). Les vers de terre sont considérés comme vivants s'ils sont capables de répondre à un stimulus mécanique. Les vers de terre ont ensuite été congelés à -20 °C pour réaliser l'analyse des réserves énergétiques.

$$\text{Équation n° 1 : } z = \left(\frac{l}{T} \right) \times 100$$

Où l = nombre de vers de terre mort et T = nombre de vers de terre initial. La validité de l'essai d'écotoxicité chronique est vérifiée chez les témoins par une mortalité inférieure à 10 % et une perte de biomasse fraîche ne dépassant pas les 20 %.

$$\text{Équation n° 2 : } g = \left(\frac{mf - mi}{mi} \right) \times 100$$

Où mf = masse des vers de terre vivant à la fin de l'expérience et mi = masse des vers de terre vivant au début de l'expérience. La validité de l'essai d'écotoxicité chronique est vérifiée si dans les essais témoins, une mortalité inférieure à 10 % et une perte de biomasse fraîche ne dépassant pas les 20 % sont observées.

Le test s'est poursuivi jusqu'à 56 jours, les juvéniles et les cocons non éclos sont retirés du sol à l'aide d'un système de filtration d'eau et une superposition de tamis (1 mm, 630 µm et 200 µm) puis dénombrés. La validité du test se vérifie chez les témoins par une mortalité inférieure à 10 %, une production de juvéniles supérieures à 30 et une variabilité inférieure à 30 %. Le pH et la conductivité électrique ont été mesurés à 0, 28 et 56 jours du test de reproduction. Ces deux paramètres ont permis de suivre la dégradation de la matière

organique à travers la production d'acides organiques (baisse du pH) et des ions en solution (augmentation de la conductivité).

2.5. Analyses des réserves énergétiques des vers de terre exposés

L'analyse des réserves énergétiques permet de détecter une réponse des vers de terre suite à la présence de contaminants ou d'un mélange de contaminants dans le milieu. Le stress de l'organisme peut se traduire par une diminution ou une augmentation de ces réserves énergétiques. Toutes les mesures biochimiques sont effectuées sur des vers de terre individuellement et sélectionnés aléatoirement dans chacun des traitements. Pour chaque traitement, les analyses biochimiques des réserves énergétiques sont réalisées sur 7 vers de terre en suivant le protocole décrit par Pelosi et al. (2016). Les vers de terre congelés sont individuellement homogénéisés en utilisant un microbroyeur (Ultra-Turrax IKAT10, 15 000 rpm) dans 1 mL de tampon phosphate glacé à 100 mM (pH 7,2 et 1 mM d'acide EDTA) pour 100 mg de vers de terre.

2.5.1. Protéines

La teneur en protéines est déterminée en utilisant la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay) décrite par Smith et al. (1985). L'homogénat de vers de terre est introduit dans une microplaque où 200 µL du réactif à l'acide bicinchoninique est ajouté (22 mL d'acide bicinchoninique et 0,44 mL de sulfate de cuivre à 4 %). La microplaque est ensuite incubée 30 min à 37 °C. La complexation entre les ions cuivreux Cu^+ et l'acide bicinchoninique forme un complexe mesurable à 562 nm. La teneur en protéines est calculée en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec du sérum d'albumine bovine (BSA).

2.5.2. Lipides

Un prélèvement de 500 µL d'homogénat de vers de terre est extrait trois fois à l'aide d'un solvant organique composé de 1,25 mL de méthanol et 0,65 mL de chloroforme, par agitation vortex (3 min) puis par centrifugation pendant 5 min à 1800 g à 10 °C. Les lipides sont ensuite séparés de l'extrait précédent en ajoutant 2,37 mL de chloroforme et 2,73 mL d'eau et en agitant (vortex 1 min). À la suite d'une nouvelle centrifugation à 1 800 g pendant 5 min à 10 °C, l'extrait dans le chloroforme est introduit dans des tubes Pyrex et le chloroforme évaporé sous flux d'azote. L'hydrolyse des lipides contenus dans les tubes Pyrex est ensuite réalisée en incubant l'échantillon avec 5 mL d'acide sulfurique (18 mM) dans un bain marie à 100 °C pendant 10 min avant de les refroidir dans de la glace pendant 5 min. Enfin, 200 µL du mélange sont prélevés et mélangés avec 3 mL de réactif acide phosphorique-vanilline préparé selon Knight et al. (1972). Après une incubation de 15 min dans un bain-marie à 37 °C pour former un complexe lipide-phosphovanilline, l'absorbance à 525 nm est mesurée et la teneur en lipides des échantillons est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'huile d'olive.

2.5.3. Glycogène

Le glycogène est quantifié dans les homogénats de vers de terre avec l'utilisation du kit Glucose Assay Reagent HK (Sigma). Un volume de 250 µL d'homogénat de tissus est incubé dans 1 M de NaOH à 80 °C pendant 3 h, puis 100 µL du mélange d'extraction sont incubés à nouveau pendant 2 h à 37 °C avec 50 µL d' α -amylglucosidase (à 20 mg.mL⁻¹) dans 850 µL de

tampon acétate (0,25 M, pH 4,4). Après incubation, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 10 000 g à 40 °C. Le glucose formé par l'hydrolyse enzymatique a été quantifié à l'aide du réactif issu du kit conduisant à la formation de NADH mesurable par absorbance à 340 nm. Les teneurs en glycogènes sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec le glucose (1 mg.mL⁻¹, 1 M NaOH).

2.6. Analyses statistiques

La taille des parties aériennes des plantes, la biomasse des plantes et des vers de terre, le nombre de juvéniles et la quantité des substrats énergétiques des vers de terre sont exprimés avec une moyenne et un écart-type. La normalité et l'homoscédasticité de ces données ont été vérifiées à l'aide du test de Shapiro-Wilk et du test de Bartlett respectivement. Pour les paramètres vérifiant la normalité et l'homoscédasticité des données, une analyse des variances paramétriques (ANOVA) est réalisée. Les différences significatives entre les différents traitements sont déterminées par un test post-hoc de Student. Lorsque les conditions ne sont pas vérifiées, une analyse des variances non-paramétriques est réalisée par le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn. Les tests statistiques ont été analysés à l'aide du logiciel RStudio[®] avec un seuil de significativité égale à $p < 0,05$.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation physicochimique des amendements organiques

Les trois amendements organiques montrent des teneurs en carbone organique situées entre 371 et 412 g.kg⁻¹ MS (cf. tableau C.2 de l'ANNEXE C, page 262). Les valeurs fertilisantes N, P, K des effluents agricoles sont d'ordres de grandeur similaires. Le fumier de vache présente une valeur en azote total de $27,48 \pm 1,02$ g.kg⁻¹ MS, en phosphore de $4,66 \pm 0,17$ g.kg⁻¹ MS et en potassium de $33,84 \pm 3,64$ g.kg⁻¹ MS. En revanche, la boue d'épuration se distingue par ses propriétés fertilisantes avec des teneurs en azote total et en phosphore nettement supérieures (respectivement $74,39 \pm 1,14$ g.kg⁻¹ MS et $25,73 \pm 2,02$ g.kg⁻¹ MS) mais une teneur inférieure en potassium ($7,24 \pm 0,14$ g.kg⁻¹ MS). Une forte teneur en azote ammoniacal ou une forte teneur en azote organique caractérisent une valeur fertilisante importante de l'amendement organique (Houot et al., 2014). En effet, les boues d'épuration sont connues pour présenter une teneur en azote organique élevée et facilement minéralisable (Cucina et al., 2021). En revanche, les fumiers sont plutôt connus pour avoir une valeur fertilisante plus faible. De plus, le rapport C/N de la fraction organique est un indicateur intéressant pour prédire la disponibilité à court terme de l'azote (Gutser et al., 2005). Dans notre étude, le ratio C/N organique de la boue d'épuration (5,40) est beaucoup plus faible que les effluents agricoles (13,53 pour le fumier et 13,90 pour le lisier). Un ratio plus faible indique une forte libération d'azote dans les sols et une meilleure fertilisation du sol à court terme (Gutser et al., 2005).

Les analyses chimiques ont montré une diversité importante en micropolluants dans les amendements organiques (cf. tableau C.2 de l'ANNEXE C, page 262). Les éléments traces métalliques (ETMs) sont classiquement recherchés et quantifiés dans les amendements organiques. Le cuivre et le zinc sont les ETMs les plus élevés dans les amendements organiques (Goss et al., 2013). Dans notre étude, la boue d'épuration a montré une valeur de $483,43 \pm 9,48$ mg.kg⁻¹ MS en zinc et $208,41 \pm 1,78$ mg.kg⁻¹ MS en cuivre. Dans les

amendements agricoles, ces valeurs en ETMs restent relativement faibles. Par ailleurs, les polluants organiques sont peu présents dans ces deux amendements agricoles, contrairement à la boue d'épuration sélectionnée dans notre étude. En effet, les analyses en résidus de médicament dans la boue d'épuration ont montré la présence d'antibiotiques à des concentrations élevées comme celles de l'ofloxacine ($957,7 \pm 239,4 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$) et de la ciprofloxacine ($129,0 \pm 32,0 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$). Des biocides sont également présents dans la boue d'épuration à de fortes concentrations tels que le diméthyl-didécyl ammonium ($36,9 \pm 9,2 \text{mg.kg}^{-1} \text{MS}$), la chlorhexidine ($2\ 066,7 \pm 517,0 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$), le triclosan ($21,4 \pm 5,3 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$) ainsi qu'un métabolite de l'isoxazole ($55,9 \pm 14 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$). D'autres polluants organiques tels que certains hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles et retardateurs de flamme bromés ont montré également des concentrations élevées dans la boue d'épuration avec le phénanthrène ($74,09 \pm 3,90 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$), le pyrène ($42,24 \pm 0,84 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$), les nouveaux retardateurs de flamme bromés ($28,87 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$) et les polychlorobiphényles non dioxine-like ($19,72 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{MS}$).

Au regard de la littérature, certains de ces polluants détectés dans les amendements organiques présentent des risques chroniques sur les organismes. Les polluants organiques montrent une inhibition de la reproduction à des doses élevées en antibiotiques fluoroquinolones chez les vers de terre (Li et al., 2015), en diméthyl-didécyl ammonium chez les souris (Melin et al., 2014) et en chlorhexidine sur les organismes d'eau douce (Jesus et al., 2013). De plus, le triclosan est connu pour avoir des effets à faible dose sur la reproduction des vers de terre (Chevillot et al., 2018). De ce fait, la présence de ces polluants en mélange dans ces amendements organiques confirme la nécessité d'évaluer l'écotoxicité chronique sur les organismes terrestres.

3.2. Fraction extraite et spectre de fluorescence des matrices étudiées

La caractérisation de la matière organique dans les différents amendements organiques a été obtenue selon la procédure décrite dans la **Figure 1**. Cela permet de comparer la distribution des compartiments accessibles à non-extractibles pour les trois amendements. Les deux amendements organiques d'origine agricole présentent des fractions non extractibles de 18,2 % à 26,1 % et une part importante de la DCO (autour de 40 %) se retrouve dans la fraction ligno-cellulosique (PEOM) en lien avec la présence des pailles dans ces deux matrices. La boue d'épuration présente la fraction non extractible la plus importante avec 35,7 % et une part importante de la DCO a été aussi retrouvée dans la fraction PEOM liée à la présence de fibres. L'étude de Jimenez et al. (2014) a également observé que les fractions les plus importantes qui composent la matière organique des boues d'épuration sont la fraction non-extractible (NEOM) et la fraction ligno-cellulosique (PEOM).

Le fumier de vache présente une somme des fractions SPOM+REOM+SEOM, correspondant aux trois fractions les plus accessibles de 43,2 % de la DCO totale du fumier. Le fumier serait donc majoritairement composé de protéines simples et complexes, de lipides et acides humiques et fulviques, en lien avec la présence des matières fécales transformées. Pour la boue d'épuration et le lisier de vache, la somme des 3 fractions les plus accessibles est de 29,7 % et 30,8 %, respectivement. Si la taille de ces trois fractions est similaire pour ces deux matrices, la signature de fluorescence est très différente, avec des indices de complexité toujours supérieurs pour le lisier. Pour ce dernier, ceci souligne la présence dans ces fractions accessibles de protéines complexes et d'acides humiques et fulviques. Au contraire,

la boue d'épuration présente des fractions accessibles aux indices de complexité plus faibles, donc contenant plutôt des sucres et des protéines simples. C'est également cet amendement organique qui a la fraction SPOM la plus élevée (10,6 %), cette fraction étant la plus accessible (extractible à l'eau (SPOM)).

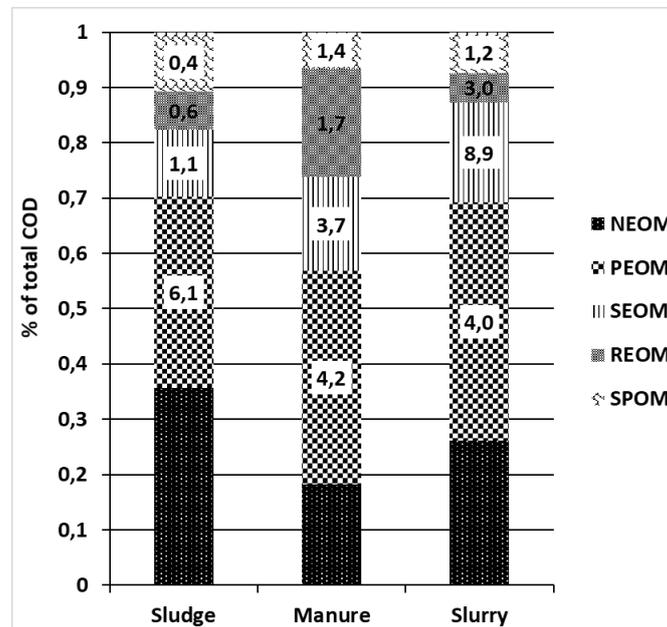


Figure 1. Profil de fractionnement des échantillons des différentes matrices étudiées (en % de la DCO totale). Les chiffres dans chacune des différentes fractions représentent le ratio de complexité calculé à partir des spectres de fluorescence (cf. figure C.1 de l'ANNEXE C, page 262). Matière organique particulaire très facilement extractible (SPOM). Matière organique particulaire facilement extractible (REOM). Matière organique particulaire lentement extractible (SEOM) Matière organique particulaire peu extractible (PEOM). Matière organique non extraite (NEOM).

On a donc trois amendements qui présentent des profils de fractionnement différents et qui sont cohérents avec les données disponibles sur des matrices organiques similaires (Jimenez et al., 2015). La boue d'épuration présente une faible teneur en fractions accessibles mais assez simples, suggérant leur dégradabilité plus rapide pour ces fractions accessibles. À l'inverse, le fumier de bovin présente une assez forte teneur en fractions accessibles mais dont la matière organique serait plus complexe, suggérant une dégradabilité plus lente. Le lisier pourrait se situer entre les deux. Au demeurant, ces trois matrices présentent une très grande part de matières organiques peu accessibles ou non-extractibles, ce qui les classent parmi des amendements assez stables. D'après le modèle de regression prédictif développé par Jimenez et al. (2017), le carbone minéralisable atteint une valeur plus élevée de 41,3 % dans la boue d'épuration et de 25,8 % et 27,8 % respectivement pour le fumier et le lisier. Le modèle a également calculé le potentiel biométhanogène qui a atteint 243 NmLCH₄.gMV⁻¹ pour la boue d'épuration et variant entre 143 et 147 NmLCH₄.gMV⁻¹ pour le fumier et le lisier respectivement (MV = % de matière volatile MS). La matière organique constitutive de la boue d'épuration est donc plus accessible et plus facilement biodégradable que celle des amendements organiques d'origine agricole dont la biodégradabilité est similaire selon le modèle prédictif.

3.3. Bioessais

3.3.1. Germination des graines et croissances des plantes

Le taux de germination des graines de moutarde et de luzerne est supérieur à 73 % avec un taux moyen de $81,73 \pm 8,00$ % (cf. tableau C.3 de l'ANNEXE C, page 262). Selon l'espèce exposée et l'amendement organique étudié, des effets positifs significatifs sur la germination sont observés. En effet, les taux de germination des graines de moutarde sont plus importants dans un sol amendé en boue d'épuration et en fumier de vache. Le taux de germination a atteint $93,33 \pm 5,81$ % et $92,44 \pm 2,04$ % à des teneurs de 20 g.kg^{-1} MS en boue d'épuration et en fumier de vache respectivement contre $77,33 \pm 14,85$ % pour les témoins. Une légère stimulation non significative de la germination des graines de moutarde a déjà été observée sur ces trois amendements organiques lors d'une exposition de 5 jours (Roques et al., 2022¹⁵). Dans cette même étude, un effet d'hormèse a également été observé sur la croissance racinaire des graines de moutarde exposées à des teneurs de 10 à 50 g.kg^{-1} MS de boue d'épuration. Pour les graines de luzernes, l'amendement des sols en lisier de vache et en boue d'épuration améliore significativement leur taux de germination. Il atteint $95,56 \pm 7,58$ % pour une teneur en lisier de 10 g.kg^{-1} MS et de $84,00 \pm 9,24$ % pour une teneur en lisier de 20 g.kg^{-1} MS alors que les témoins présentent un taux de germination de $73,78 \pm 7,34$ %. Seule la teneur à 10 g.kg^{-1} MS en boue d'épuration conduit à un taux de germination significativement plus grand en atteignant $82,67 \pm 4,00$ %.

La luzerne et la moutarde ont montré une taille des tiges chez les témoins de $87,98 \pm 40,74$ mm après 28 jours d'exposition et $53,90 \pm 22,95$ mm après 21 jours d'exposition respectivement (**Figure 2**). Seules les graines de luzerne exposées à une teneur de 10 g.kg^{-1} MS de boue d'épuration et les graines de moutarde exposées à une teneur de 20 g.kg^{-1} MS de fumier indiquent une augmentation significative de la taille des tiges. La taille des tiges atteint $102,09 \pm 44,66$ mm et $60,17 \pm 25,56$ mm respectivement.

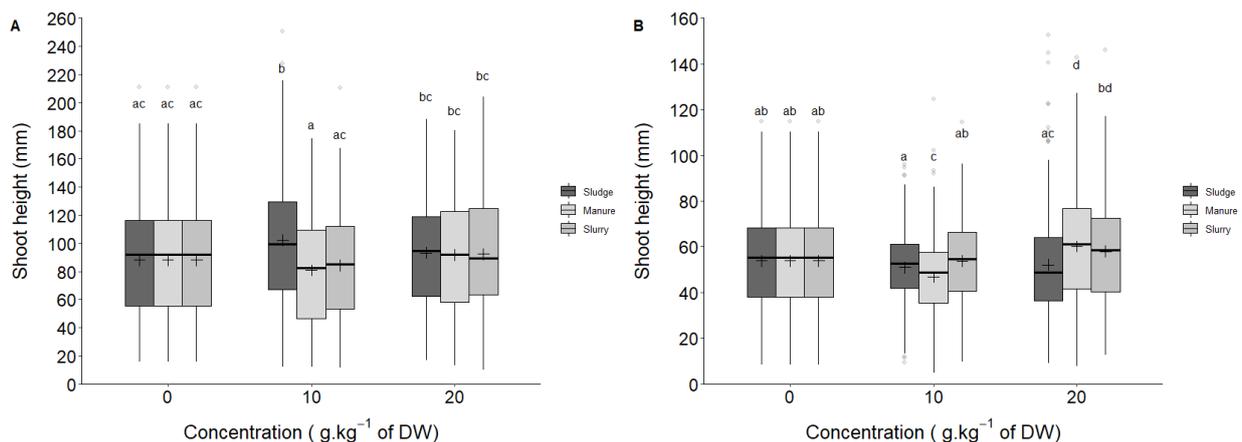


Figure 2. Taille des tiges (A) de la luzerne (*Medicago sativa*) et (B) de la moutarde (*Sinapis alba*) exposées à différents teneurs en amendement organique. Valeurs moyennes (n~225). Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %).

¹⁵ Article 1 présenté dans le chapitre 5.2, page 133

La biomasse fraîche des tiges de la luzerne a augmenté significativement durant l'exposition aux trois amendements organiques par rapport aux témoins (**Figure 3**). À la plus forte teneur testée en amendements organiques, la biomasse fraîche des tiges de la luzerne est de $207,15 \pm 41,59$ mg lors de l'exposition à la boue d'épuration, $158,90 \pm 10,72$ mg lors de l'exposition au fumier et $153,70 \pm 7,69$ mg lors de l'exposition au lisier contre $86,22 \pm 14,72$ mg pour les témoins. L'augmentation de la biomasse fraîche de la luzerne atteint 140,26 % dans le sol amendé en boue d'épuration, 84,30 % dans un sol amendé en fumier et 78,26 % dans un sol amendé en lisier. Cette forte augmentation de la biomasse fraîche a déjà été observée lors d'une exposition à une boue d'épuration sur trois types de plantes : le cresson, le sorgho et la moutarde (Kominko et al., 2022). Dans notre étude, la biomasse fraîche des tiges de la moutarde n'a pas augmenté suite à l'apport d'amendements organiques dans les sols. Cependant, l'analyse de la biomasse fraîche peut être influencée par une rétention d'eau plus importante et/ou le stade de développement des plantes. L'analyse de la biomasse sèche est un indicateur plus robuste et plus pertinent du réel gain de biomasses végétales. Sur l'analyse de la biomasse sèche, les sols amendés en boue d'épuration et en lisier de vache présentent une biomasse sèche des tiges de la luzerne significativement plus élevée que les témoins. En effet, la biomasse sèche des tiges de la luzerne a atteint $17,39 \pm 7,27$ mg et $25,05 \pm 1,80$ mg pour des sols amendés en boue d'épuration de 10 et 20 g.kg^{-1} MS contre $7,62 \pm 1,32$ mg pour les témoins. La luzerne a montré également une biomasse sèche plus élevée dans les sols amendés à 20 g.kg^{-1} MS de lisier avec une biomasse de $12,48 \pm 1,47$ mg. La moutarde a également montré une augmentation de la biomasse sèche des tiges pour les plantes exposées à la boue d'épuration. La biomasse sèche des tiges de la moutarde a atteint à la plus forte teneur en boue d'épuration $14,16 \pm 2,74$ mg alors que les témoins présentaient une biomasse sèche des tiges de $6,72 \pm 0,43$ mg.

Les masses fraîches et sèches des racines de la luzerne sont mesurées après exposition à différentes concentrations à trois amendements organiques différents (**Figure 4**). L'exposition à la boue d'épuration montre un effet positif significatif sur la production de biomasse des racines de la luzerne contrairement aux autres amendements organiques qui n'ont pas eu d'effet. Les biomasses fraîches et sèches des racines de la luzerne ont atteint $77,89 \pm 26,83$ mg et $10,91 \pm 0,24$ mg respectivement dans un sol amendé à 20 g.kg^{-1} MS de boue d'épuration alors que les témoins de la luzerne ont obtenu une biomasse fraîche des racines de $28,44 \pm 1,32$ mg et une biomasse sèche des racines de $2,17 \pm 0,24$ mg. L'analyse de la masse fraîche des racines de la moutarde exposées aux différents amendements organiques a également montré le même résultat avec une augmentation significative de la masse fraîche des racines des plantes exposées à la plus forte concentration en boue. La masse sèche des racines des plantes de moutarde n'a pas pu être mesurée à cause des difficultés expérimentales dans l'extraction des racines du sol.

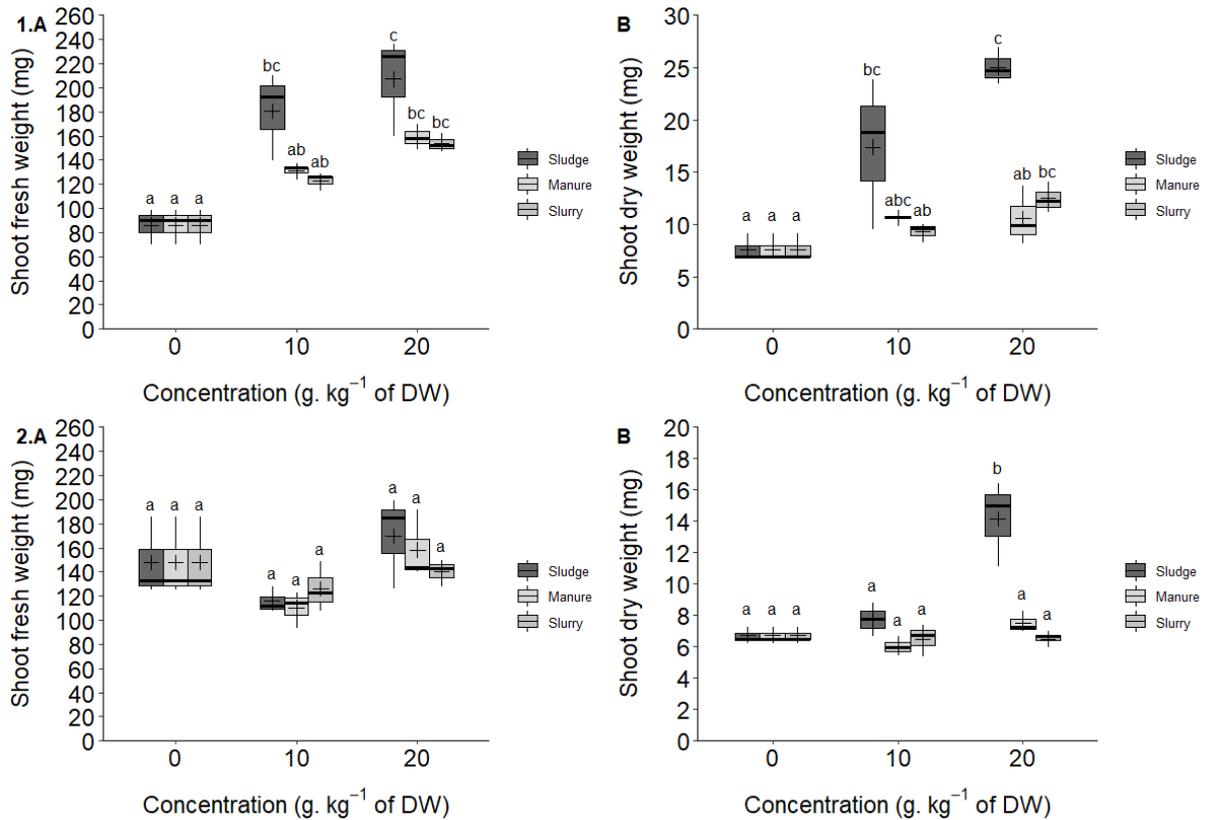


Figure 3. Masse fraîche (A) et sèche (B) des tiges de la luzerne *Medicago sativa* (1) et la moutarde *Sinapis alba* (2) exposées à différentes teneurs en amendement organique. Valeurs moyennes (n = 3). Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %).

Globalement, les amendements organiques aux teneurs testées dans les sols n'ont pas eu d'effet négatif sur la germination et la croissance des deux espèces de plantes étudiées. Par sa valeur fertilisante en azote totale et phosphore plus élevée que les autres amendements organiques étudiés, l'exposition à la boue d'épuration a augmenté significativement la biomasse des parties aériennes et racinaires des deux plantes étudiées. Cette augmentation de la biomasse des plantes exposées à de faibles teneurs en boue d'épuration est couramment observée dans la littérature (Žaltauskaitė et al., 2016). Les travaux de Orman et al. (2014) ont également montré une augmentation de la biomasse des tiges et des racines de la luzerne à de faibles teneurs dans les sols amendés en boue d'épuration. L'augmentation de la biomasse végétale de la luzerne est également mise en évidence dans l'étude de Antolín et al. (2010) après un apport de boue d'épuration dans un milieu en comparaison avec un milieu non amendé. Ces effets positifs sont conformes à l'objectif de l'amélioration de la fertilisation par épandage d'amendements organiques.

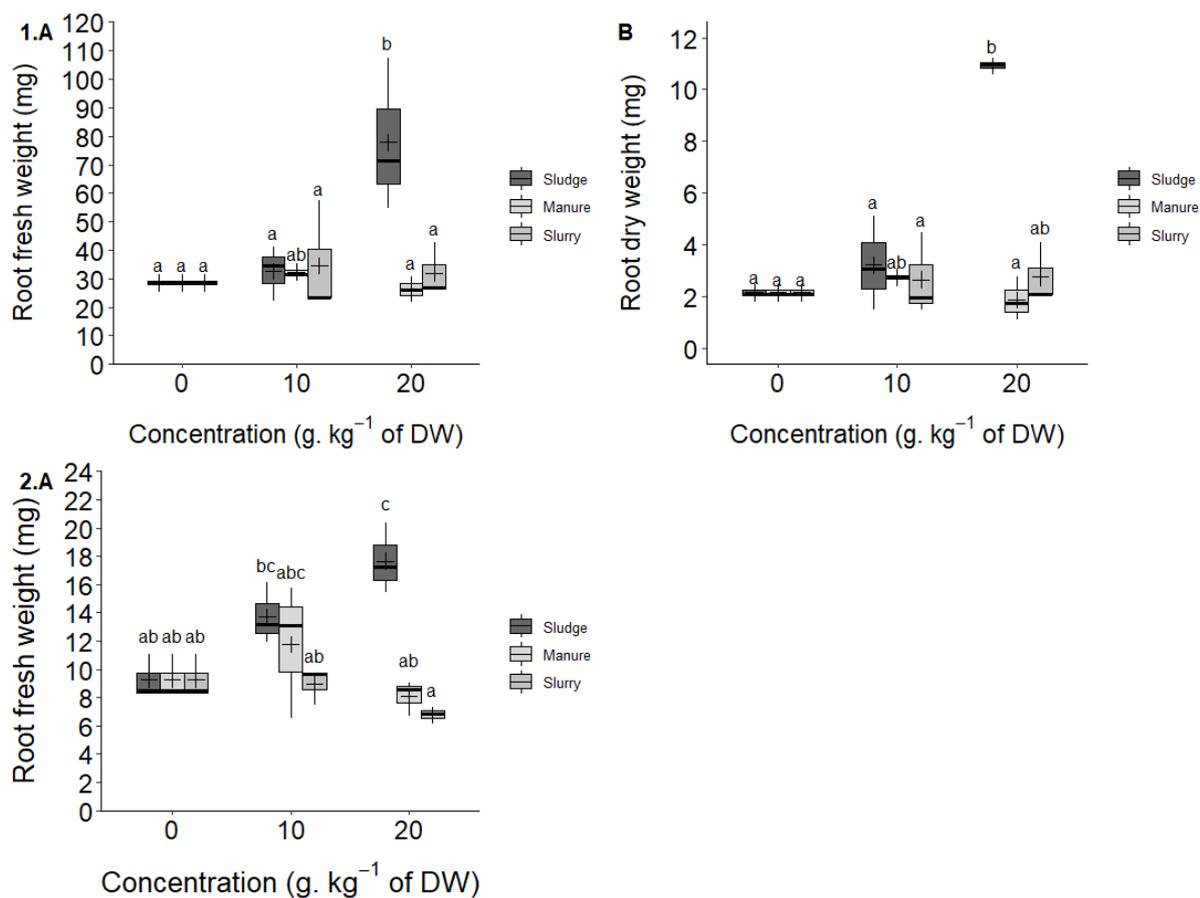


Figure 4. Masse fraîche (A) et sèche (B) des racines de la luzerne *Medicago sativa* (1) et de la moutarde *Sinapis alba* (2) exposées à différentes teneurs en amendement organique. Valeurs moyennes (n = 4). Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %).

3.3.2. Reproduction des vers de terre

3.3.2.1. Évolution du système sol amendé – vers de terre

Lors du test de reproduction des vers de terre, le pH et la conductivité sont mesurés au début et en fin d'exposition des vers de terre adultes à différentes teneurs en amendements organiques (**Tableau 1**). En début d'expérience, l'apport d'amendements organiques d'origine agricole dans le sol de référence a augmenté le pH passant de $6,41 \pm 0,06$ sans amendement à $7,75 \pm 0,02$ pour un amendement de 50 g.kg^{-1} MS de fumier et à $7,63 \pm 0,02$ pour un amendement à 20 g.kg^{-1} MS de lisier. La boue ayant un pH identique au sol de référence, l'amendement du sol en boue d'épuration n'a pas modifié le pH initialement autour de 6,7. En revanche, après 28 jours d'exposition des vers de terre aux différents amendements organiques, le pH du sol amendé en boue a fortement chuté, atteignant $5,64 \pm 0,10$ et $5,08 \pm 0,05$ pour les teneurs à 20 et 50 g.kg^{-1} MS de boue d'épuration. Le pH est resté stable pour les sols complétés en amendements organiques agricoles. Les vers de terre ont tendance à acidifier leur milieu par leur activité (Springett, 1983). Cette acidification des sols amendés en boues pourrait être attribuée à l'activité des vers de terre dans la minéralisation de l'azote et du phosphore, qui sont retrouvés à des teneurs élevées dans les boues d'épuration, en nitrate et orthophosphate ou à la bioconversion de la matière organique en espèces intermédiaires comme des acides organiques (Ndegwa et al., 2000).

Tableau 1. Suivi du pH et de la conductivité électrique (CE) durant l'exposition aux différents amendements organiques lors du test de reproduction

Matrices testées	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg ⁻¹ MS)	pH		CE (μS.cm ⁻²)	
		0 jour	28 jours	0 jour	28 jours
Boue	0	6,56 ± 0,05	7,03 ± 0,06	168,87 ± 8,99	81,43 ± 4,55
	10	6,75 ± 0,03	6,68 ± 0,09	189,67 ± 17,25	230,17 ± 16,80
	20	6,74 ± 0,01	5,64 ± 0,10	224,87 ± 18,60	931,00 ± 28,84
	50	6,67 ± 0,02	5,08 ± 0,05	326,50 ± 18,90	1468,80 ± 66,44
Fumier	0	6,41 ± 0,06	6,99 ± 0,01	163,13 ± 10,95	88,73 ± 10,95
	10	7,09 ± 0,02	7,33 ± 0,03	260,47 ± 20,90	127,60 ± 6,55
	20	7,44 ± 0,19	7,65 ± 0,03	363,73 ± 24,32	187,70 ± 3,87
	50	7,75 ± 0,02	7,80 ± 0,02	712,43 ± 25,11	593,80 ± 25,07
Lisier	0	6,74 ± 0,05	7,03 ± 0,01	113,20 ± 11,63	89,73 ± 6,55
	5	7,20 ± 0,02	7,20 ± 0,02	159,63 ± 7,31	137,63 ± 1,86
	10	7,36 ± 0,01	7,41 ± 0,02	239,47 ± 4,96	184,33 ± 3,59
	20	7,63 ± 0,02	7,75 ± 0,02	382,03 ± 3,42	307,17 ± 5,59

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-type.

L'apport de matières organiques dans les sols a également conduit à une augmentation de la conductivité électrique au début de l'expérience. En effet, l'apport de fumier a montré la plus grande augmentation de la conductivité dans le sol passant de 163,13 ± 10,95 μS.cm⁻² sans amendement à 712,43 ± 25,11 μS.cm⁻² pour un amendement organique en fumier de 50 g.kg⁻¹ MS. Les amendements organiques boue d'épuration et lisier de vache ont montré une augmentation similaire de la conductivité en atteignant 326,50 ± 18,90 μS.cm⁻² et 382,03 ± 3,42 μS.cm⁻² respectivement aux plus fortes teneurs testées. Cependant, après 28 jours d'exposition, la conductivité électrique a diminué dans les sols recevant un amendement organique d'origine agricole d'environ 20 % aux plus fortes teneurs testées. Les travaux de Garg et al. (2006) ont également montré dans un contexte de vermicompostage une diminution de la conductivité électrique dans les sols amendés avec différents amendements organiques d'origine agricole. Par contre, l'amendement en boue se distingue par une forte augmentation de la conductivité électrique après 28 jours. La conductivité électrique dans le sol amendé à 20 g.kg⁻¹ MS de boue d'épuration est passée de 224,87 ± 18,60 μS.cm⁻² au début de l'expérience à 931 ± 28,84 μS cm⁻² après 28 jours d'exposition. De même, la conductivité électrique est passée de 326,50 ± 18,90 μS.cm⁻² au début de l'expérience à 1 468,80 ± 66,44 μS.cm⁻² après 28 jours d'exposition dans le sol amendé à 50 g.kg⁻¹ MS de boue d'épuration. La hausse de la conductivité électrique du sol est probablement due à la métabolisation de la matière organique issue de la boue d'épuration conduisant à la libération de sels/ions dans le sol amendé.

Après le retrait des vers de terre à 28 jours, la conductivité électrique et le pH des différents traitements n'ont plus évolué jusqu'à la fin de l'expérimentation. La modification du pH et de la conductivité électrique générée par un amendement organique a déjà été mentionné comme un des facteurs limitants à la survie et à la croissance des vers de terre (Pivato et al., 2014 ; Gunadi and Edwards, 2003).

3.3.2.2. Mesures d'effets : croissance et reproduction

À la fin des 28 jours d'exposition, le taux de mortalité des vers de terre est faible pour toutes les conditions d'amendement ($\leq 10\%$). Seule la teneur la plus élevée en boue d'épuration présente un taux de mortalité élevé ($36,67 \pm 28,87\%$). Les paramètres de croissance et de reproduction sont suivis durant le test de reproduction pendant 56 jours (**Figure 5**). Un gain de biomasse de 10 à 20 % est observé pour les témoins du sol de référence (T) et de 0 à 20 % pour les témoins du sol artificiel ISO (Ti) durant les tests de reproduction. Les légères différences de taux de croissance entre les témoins issus des deux types du sol proviennent de leurs compositions distinctes. En effet, le sol artificiel ISO est un milieu moins riche en nutriment essentiel et en matière organique en comparaison avec le sol de référence. Le taux de croissance des vers de terre dépend fortement des caractéristiques des matières organiques, de leur bioaccessibilité et de leur facilité à être métabolisés en nutriments (Vodounnou et al., 2016 ; Edwards, 1988). Le taux de croissance des vers de terre après 28 jours d'exposition à la boue d'épuration augmente significativement avec l'augmentation de la teneur en boue. Ce taux atteint $89,41 \pm 8,45\%$ à 10 g.kg^{-1} MS de boue, $129,85 \pm 12,75\%$ à 20 g.kg^{-1} MS de boue et $74,18 \pm 8,69\%$ à 50 g.kg^{-1} MS de boue. Riche en composés organiques facilement biodégradables (sucres et protéines), la boue d'épuration faciliterait la croissance des vers de terre par cet apport nutritionnel. Par ailleurs, la stimulation de la microflore du sol dans un sol amendé en boue d'épuration contribuerait indirectement à une part plus importante des microorganismes dans l'alimentation des vers de terre (Pramanik and Chung, 2011 ; Flack and Hartenstein, 1984). Dans le cas des essais avec épandage de fumier et de lisier de vache, les taux de croissance des vers de terre ne varient pas significativement.

La reproduction a été évaluée par le comptage du nombre de juvéniles après 56 jours d'exposition (**Figure 5**). L'exposition des vers de terre à la boue d'épuration se traduit par une diminution significative du nombre de juvéniles à partir d'une teneur en boue de 20 g.kg^{-1} MS. En effet, le nombre de juvéniles est de $61,33 \pm 20,55$ pour les témoins contre un nombre de juvéniles produits de $13,67 \pm 4,04$ pour les essais d'exposition à 20 g.kg^{-1} MS. Au-delà de cette teneur, l'absence de juvéniles est liée à la mortalité non négligeable des vers de terre. L'inhibition de la reproduction des vers de terre dans un sol en présence de boue d'épuration a déjà été observée (Žaltauskaitė et al., 2016). Malgré le gain en éléments nutritifs associé à l'apport de boue d'épuration, les vers de terre ont produit moins de juvéniles. Les travaux de Pivato et al. (2014) mettent en évidence également une nette baisse de la reproduction malgré le gain de biomasse après un épandage de boues compostées. L'hypothèse proposée par ces auteurs est que la forte biodisponibilité de la matière organique biodégradable et la présence de polluants seraient responsables de cette baisse de fertilité. Les modifications des conditions physicochimiques observées par l'augmentation de la conductivité électrique et la diminution du pH pourrait être également l'une des causes possibles de la mortalité et de la diminution de la reproduction des vers de terre (Pivato et al., 2014 ; Owojori et al., 2009 ; Gunadi and Edwards, 2003). En effet, l'augmentation de la conductivité électrique constatée en fin d'exposition des vers de terre a des conséquences négatives sur la reproduction des vers de terre (Owojori et al., 2009). La baisse de pH observée dans les sols amendés en boue d'épuration ne semble pas être suffisante pour être le facteur responsable de la diminution de la reproduction (Wu et al., 2020). Toutefois, une baisse du pH peut entraîner une désorption des polluants devenant alors plus biodisponibilité pour les vers de terre (Leal et al., 2013). La diminution du nombre

de juvéniles pourrait être également due à un retard de l'éclosion. L'éclosion des cocons est également un paramètre de reproduction susceptible d'être perturbé par la présence de polluants (Yasmin and D'Souza, 2010). Dans notre étude, le nombre de cocons non éclos atteint $8,67 \pm 2,08$ pour une teneur en boue de 20 g.kg^{-1} MS et $14,0 \pm 3,61$ pour une teneur de 50 g.kg^{-1} MS (données non présentées).

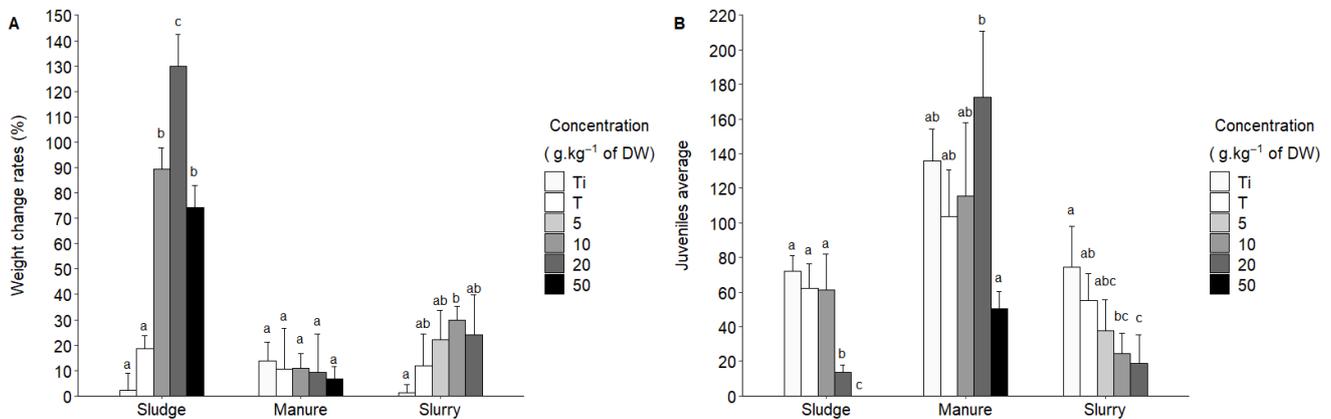


Figure 5. Croissance (A) et reproduction (mesurée en nombre de juvéniles éclos) (B) des vers de terre *Eisenia fetida* exposés à un sol de référence amendé en trois types d'amendements organiques à différentes teneurs pendant 28 jours.

Valeurs moyennes (n = 3 ou 4) et écart-type. Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %) réalisés indépendamment entre chaque amendement organique. Ti = sol artificiel ISO non amendé, T = sol de référence non amendé.

Le plus grand nombre de juvéniles produits est observé pour les vers de terre exposés à un sol amendé à une teneur en fumier de 20 g.kg^{-1} MS. Le nombre de juvéniles atteint $172,67 \pm 38,08$ mais le test ANOVA n'a pas permis de confirmer une augmentation significative par rapport aux essais témoins. Pour le lisier, une diminution dose-dépendant du nombre de juvéniles est constatée. Une diminution significative de la production de juvéniles est identifiée pour le sol amendé en lisier de vache à partir de 20 g.kg^{-1} MS avec une moyenne de $19,00 \pm 16,51$ juvéniles produits soit une inhibition de 77,81 % par rapport aux témoins ($74,50 \pm 23,63$ juvéniles produits). Pour des doses similaires, une diminution du nombre de cocons a été observée lors d'une exposition de vers de terre dans un sol ISO artificiel amendé en lisier de volailles (Parente et al., 2021).

L'activité œstrogénique et androgénique des amendements organiques peuvent également être responsables de l'inhibition ou de l'augmentation de la reproduction des vers de terre exposées à ces différents amendements organiques (cf. ANNEXE D, page 268).

3.3.2.3. Réserves énergétiques (protéines, lipides, glycogène)

Les réserves énergétiques (protéines, lipides et glycogène) ont été quantifiées dans les vers de terre après 28 jours d'exposition à différentes teneurs en amendements organiques (**Figure 6**). Les réserves énergétiques des vers de terre exposés au fumier de vache ne sont pas perturbées.

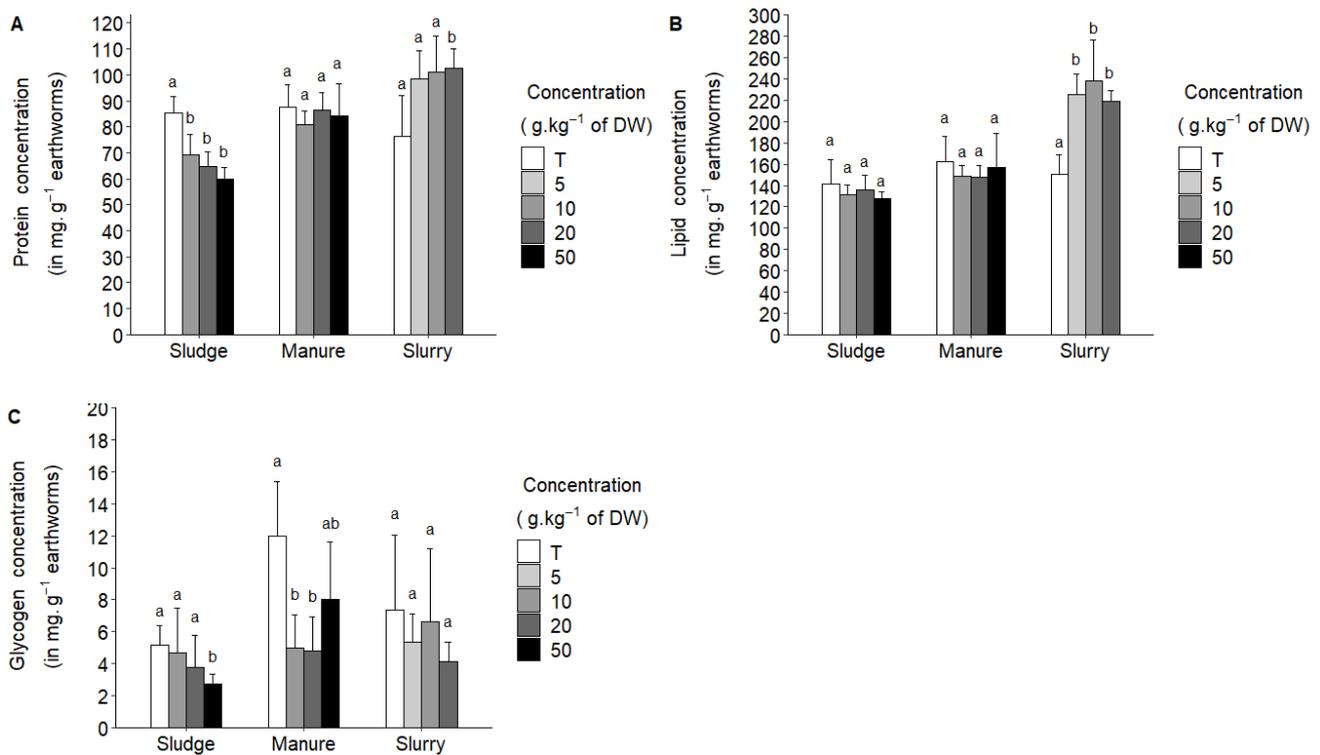


Figure 6. Concentrations en protéines (A), lipides (B) et glycogène (C) dans les vers de terre *Eisenia fetida* exposés pendant 28 jours à un sol de référence amendé en trois types d'amendements organiques à différentes teneurs. Valeurs moyennes (n = 6) et écart-types. Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %) réalisés indépendamment entre chaque amendement organique.

Les glucides sont la première source d'énergie mobilisée par les organismes soumis à un stress toxique (Moolman et al., 2007). La diminution du glycogène et sa mobilisation rapide ont déjà été observées chez les vers de terre exposés à un pesticide, l'époxiconazole ou à des éléments traces métalliques comme le plomb, le cuivre ou des nanoparticules de zinc (Świątek and Bednarska, 2019 ; Beaumelle et al., 2017 ; Pelosi et al., 2016 ; Bundy et al., 2008). Dans notre étude, une diminution de la quantité en glycogène est observée uniquement à la plus forte teneur en boue de 50 g.kg⁻¹ MS (2,75 ± 0,58 mg.g⁻¹) par rapport aux vers de terre exposés à un sol non amendé (5,19 ± 1,17 mg.g⁻¹). C'est également à cette forte teneur en boue que les vers de terre présentent une inhibition totale de la reproduction. L'apport en éléments nutritifs par la boue d'épuration semblerait suffire à compenser les pertes en glycogène liées au stress dans les autres conditions d'exposition. Dans l'étude de Świątek et Bednarska (2019), une diminution de la quantité en glycogènes est mesurée seulement dans le traitement en nanoparticules de zinc où la biomasse des vers de terre diminuait.

Quelle que soit la teneur en boue amendée dans le sol, les réserves en protéines diminuent (85,27 ± 6,49 mg.g⁻¹). Les réserves en protéine atteignent le niveau le plus bas de 59,76 ± 4,74 mg.g⁻¹ à la plus forte teneur en boue de 50 g.kg⁻¹ MS. D'après la littérature, des conditions de stress modérées génèrent une augmentation des réserves en protéines liées à l'expression de protéines de réponse au stress comme la production de glutathion pour

lutter contre l'accumulation des polluants dans les organismes (Sokolova et al., 2012). De nombreuses études présentent une augmentation de la teneur en protéines dans les vers de terre exposés à des polluants dans le milieu (Świątek and Bednarska, 2019 ; Beaumelle et al., 2017 ; Schreck et al., 2008). Notre étude semble aller à l'encontre des résultats observés classiquement dans la littérature. La diminution de la teneur en protéines est potentiellement liée à un effet de dilution induit par la forte augmentation de la biomasse des vers de terre exposé à la boue d'épuration. La diminution de la teneur en protéines pourrait également être induite par une carence énergétique liée à la diminution du glycogène et la mobilisable des protéines pour assurer le métabolisme de base des vers de terre. À l'inverse, les vers de terre exposés au lisier ont montré une augmentation des réserves en protéines à la plus forte teneur testée en lisier où la reproduction des vers de terre a également été affectée. La concentration en protéines dans les vers de terre exposés au lisier a atteint une concentration de $102,66 \pm 7,44 \text{ mg.g}^{-1}$ à 20 g.kg^{-1} MS de lisier.

Les lipides constituent également une source importante d'énergie qui peuvent être mobilisés lors d'un stress avant ou en même temps que le glycogène. Toutefois, les réserves lipidiques n'ont pas été affectées pour les vers de terre exposés à la boue d'épuration et au lisier. Il semblerait que la mobilisation des lipides ne soit pas nécessaire ou n'a pas été enclenchée malgré la diminution de la reproduction pour les vers de terre exposés à la boue d'épuration et au lisier de vache. Étonnamment, la teneur en lipides a même fortement augmenté pour les épandages en lisier, quelles que soient les doses d'épandage testées. La teneur en lipides dans les vers de terre a atteint des valeurs situées entre de $218,83 \pm 10,44$ et $238,27 \pm 38,20 \text{ mg.g}^{-1}$ dans le sol de référence amendé en lisier alors que les témoins présentaient une teneur en lipides de $150,49 \pm 18,27 \text{ mg.g}^{-1}$. Il semblerait que les réserves en lipides ont été conservées au dépend de la reproduction lors du stress lié à l'apport en amendement organique dans le sol.

4. Conclusions

L'épandage des amendements organiques sur les sols agricoles modifie les conditions physicochimiques du sol. La boue d'épuration présente une valeur fertilisante la plus élevée mais avec une diversité importante en polluants potentiellement écotoxiques sur les organismes du sol. C'est également la boue d'épuration qui présente la fraction la plus facilement accessible et biodégradable. Au contraire, le fumier et le lisier de vache présentent des valeurs fertilisantes et des fractions accessibles et biodégradables similaires.

Durant les tests de toxicité chronique, la boue d'épuration révèle un effet agronomique positif sur la croissance végétale, constaté avec l'augmentation de la biomasse sèche des deux plantes testées. Cet amendement conduit également à un gain important de biomasse pour les vers de terre, avec un taux de croissance multiplié par six avec une teneur en boue de 20 g.kg^{-1} MS. Ces effets positifs sont *a priori* liés aux propriétés fertilisantes de la boue d'épuration et de la biodégradabilité élevée de sa matière organique pour les fractions facilement accessibles.

Toutefois, le test de reproduction sur une durée d'incubation de 56 jours a permis également de mettre en évidence les effets écotoxiques des amendements sur des paramètres plus sensibles comme la reproduction des vers de terre et leur réserve énergétique. Au contraire du fumier de vache qui n'a pas montré d'effets écotoxiques, l'exposition des vers de terre à la boue d'épuration a pour effet majeur de diminuer le

nombre de juvéniles, avec une baisse significative principalement liée à l'inhibition de la reproduction de 77,72 % à partir de la teneur en boue de 20 g.kg⁻¹ MS (100 % d'inhibition de la reproduction à 50 g.kg⁻¹ MS) et un retard à l'éclosion. Ces résultats suggèrent un stress lié d'une part aux modifications physicochimiques du milieu d'exposition (diminution du pH et augmentation de la conductivité) et, d'autre part, à la présence de contaminants entraînant une diminution des réserves en énergie allouées à la reproduction. Ce stress se traduit également par une diminution des réserves énergétiques des protéines et du glycogène des vers de terre exposés à la boue d'épuration. L'amendement du sol au lisier de vache conduit également à une diminution de la reproduction des vers de terre avec des réserves en protéines et en lipides plus importantes. Dans le cas du lisier, les effets écotoxiques ne peuvent pas être imputés à la présence de contaminants contrairement à la boue d'épuration.

Notre étude met en évidence des résultats contradictoires si le croisement des résultats sur les plantes et les vers de terre n'est pas réalisé. En effet, si la boue d'épuration est un avantage certain sur la fertilisation des sols et sur l'amélioration du rendement des cultures, il présente également un risque non négligeable sur les macroinvertébrés. Le test de reproduction sur les vers de terre semble pertinent pour évaluer l'écotoxicité de ces amendements organiques. Ce risque doit être considéré dans la perspective de la prise en compte de l'écotoxicité chronique dans la réglementation¹⁶ de l'épandage de certains amendements organiques. De plus, nos résultats confirment l'utilisation de plusieurs tests d'écotoxicité sur plusieurs modèles biologiques dans le but de mieux évaluer les impacts des amendements organiques sur les sols agricoles et sur les écosystèmes agricoles.

Remerciements

Les travaux ont été soutenus financièrement par l'Office Française pour la Biodiversité (OFB). Les auteurs remercient le GRAIE (Groupe de Recherche, Animation technique et Information sur l'Eau) pour la gestion du projet RISMEAU (Risques liés aux résidus de médicaments, biocides et antibiorésistance d'origines humaine et vétérinaire sur les ressources en eau du bassin versant de l'Arve) et la plateforme Provademse pour le support technique. Nous remercions également les volontaires de la station de traitement des eaux et les établissements agricoles pour la transmission des différents amendements organiques étudiés.

¹⁶ Cf. Chapitre 1.6, page 38.

6.2.3 Vérification des données écotoxiques obtenues

Dans le but de confirmer les résultats obtenus dans le chapitre précédent (cf. Article 2), un second test de reproduction (test de reproduction n° 2) est réalisé avec des vers de terre exposés à l'ensemble des trois Mafors en même temps mais uniquement à une teneur en Mafors de 20 g.kg⁻¹ MS.

Lors de ce test, le taux de mortalité est faible dans les différentes conditions. La mortalité des vers de terre varie entre 2,50 et 10,00 % (données non présentées). Les paramètres de croissance et de reproduction sont évalués après 28 jours d'exposition des vers de terre dans les sols amendés en Mafors (**Figure 32**).

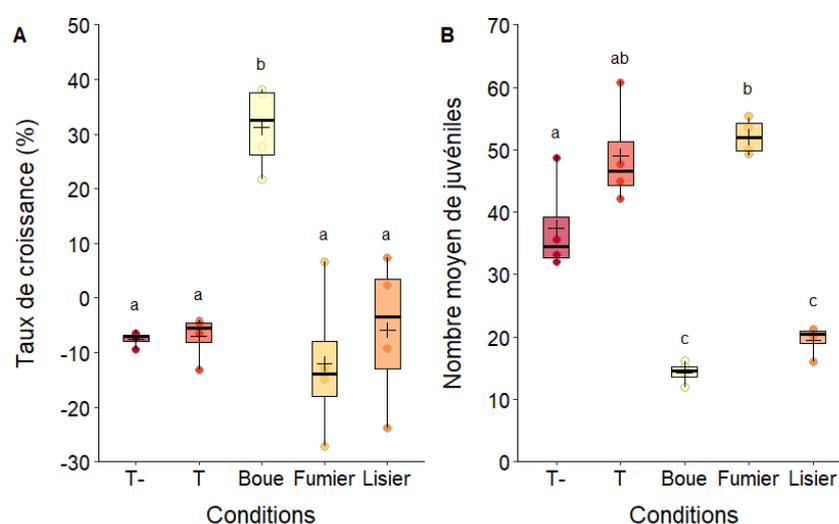


Figure 32. Croissance (A) et reproduction (mesurée en nombre de juvéniles éclos) (B) des vers de terre *Eisenia fetida* exposés à différents Mafors à une teneur de 20 g.kg⁻¹ MS. Valeurs moyennes (n = 4). Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %). T = sol de référence, T- = sol artificiel ISO.

L'évaluation de la croissance des vers de terre montre une perte de biomasse pour les vers de terre exposés au sol de référence (T) ou au sol artificiel ISO (T-) avec des taux de croissance similaires (-7,11 ± 4,14 % et 7,51 ± 1,33 % respectivement). Cette diminution de la biomasse peut s'expliquer par une alimentation insuffisante des vers de terre dans ces conditions d'essais. Toutefois, la perte de biomasse est à relativiser car elle reste faible et ne semble pas avoir eu d'effet sur la reproduction des vers de terre. Les travaux de Coelho et al. (2019) montrent également une diminution de la biomasse des vers de terre exposés à un sol artificiel ISO « témoin » atteignant jusqu'à -22,19 ± 7,75 % sans conséquence sur la reproduction. Pour les vers de terre exposés aux Mafors agricoles, une perte de biomasse

est également observée. Les vers de terre obtiennent un taux de croissance de $-12,06 \pm 13,99$ % dans le sol amendé en fumier et $-5,88 \pm 13,86$ % dans le sol amendé en lisier. Au contraire, un gain de biomasse important est noté pour les vers de terre exposés à la boue d'épuration, avec un taux de croissance positif de $31,26 \pm 7,97$ %. Ces résultats confirment bien que la boue d'épuration présente des propriétés nutritives élevées, améliorant la croissance des vers de terre.

Les résultats sur la reproduction mettent à nouveau en évidence l'impact reprotoxique de la boue d'épuration et du lisier. Dans un premier temps, nous constatons un nombre de juvéniles de $49,00 \pm 8,37$ dans le sol de référence (T), de $36,00 \pm 7,12$ dans le sol artificiel et de $52,00 \pm 2,94$ dans le sol amendé en fumier. Aucune différence significative n'est observée dans ces différentes conditions d'exposition. Dans un second temps, les vers de terre exposés aux sols amendés en boue d'épuration et en lisier de vache révèlent une diminution significative du nombre de juvéniles ($14,25 \pm 1,71$ juvéniles dans le sol amendé en boue d'épuration et $19,50 \pm 2,38$ juvéniles dans le sol amendé en lisier). L'inhibition de la reproduction atteint $70,71 \pm 2,38$ % pour les vers de terre issus du sol amendé en boue d'épuration et atteint $59,82 \pm 4,77$ pour les vers de terre issus du sol amendé en lisier. Cette inhibition est suivie également par une forte réduction de l'éclosion des cocons dans le sol amendé en boue où $48,00 \pm 9,83$ cocons n'ont pas éclos.

6.2.4 Synthèse et conclusion des effets écotoxicologiques des Mafors sur le long terme

Cette étude a permis d'évaluer les effets des Mafors à plus long terme sur le sol et sur les organismes qui y vivent. Les résultats obtenus sur la caractérisation physicochimique soulignent des différences importantes entre les différentes Mafors. La boue d'épuration se différencie des Mafors agricoles par la présence de nombreux polluants, une valeur fertilisante plus élevée, ainsi qu'une fraction accessible et biodégradable importante de la matière organique. Les tests écotoxicologiques confirment l'amélioration de la fertilité et la présence d'une matière organique plus facilement accessible et nutritive dans le sol amendé en boue d'épuration qui se traduisent par une augmentation de la biomasse des plantes et des vers de terre. Cependant, ces tests écotoxicologiques révèlent clairement des effets reprotoxiques sur les vers de terre exposés à des sols amendés en boue d'épuration et en

lisier de vache. Ces vers de terre montrent également des variations de leur réserve énergétique dans ces conditions, signe d'une perturbation de leur métabolisme.

Ces résultats confirment l'efficacité de l'utilisation des bioessais en laboratoire pour évaluer l'écotoxicité chronique de sols amendés par des Mafors. La méthodologie mise en place démontre la fiabilité et la répétabilité des bioessais. Cependant, nos bioessais en laboratoire se heurtent à une faible représentativité puisqu'ils utilisent le ver *Eisenia fetida*, peu présent dans les sols agricoles et appartenant au groupe fonctionnel des épigés. Ces bioessais ne prennent pas en compte non plus les variations climatiques des conditions *in situ*. Pour avoir une plus grande représentativité des effets écotoxiques des Mafors, notre étude expérimente un essai préliminaire d'encagement de vers de terre dans des conditions *in situ*. L'utilisation d'un ver de terre plus représentatif peut également être utilisé, tel que *Aporrectodea caliginosa* (réalisés dans les bioessais en laboratoire par les partenaires du projet RISMEAU).

6.3 Bioessais *in situ* – Impact des Mafors sur la reproduction des vers de terre

6.3.1 Contexte et objectifs

L'intérêt des bioessais en laboratoire est déjà démontré à de nombreuses reprises pour l'évaluation des risques environnementaux. Toutefois, il apparaît utile de compléter ces bioessais par la réalisation d'essais en conditions proches des conditions réelles. Dans le cas d'essais d'écotoxicité sur vers de terre, la pertinence écologique peut ainsi être augmentée avec des essais biologiques *in situ*. La mise en place d'essais *in situ* dans le compartiment aquatique (à la fois dans la colonne d'eau que dans le sédiment) est très bien documentée dans la littérature et a montré son applicabilité et sa pertinence dans l'étude d'une contamination environnementale (Grieshaber et al., 2021 ; Lécrivain et al., 2017). En revanche, les essais *in situ* sur des sols contaminés sont moins fréquents dans la littérature et concernent principalement les escargots (Louzon et al., 2022 ; De Vaufleury et al., 2006).

Dans notre étude, le développement d'un bioessai *in situ* est expérimenté sur le ver de terre. Les protocoles d'encagement de vers de terre sont rares (Antunes et al., 2008). Le développement de méthodologies est nécessaire dans le compartiment sol afin de fournir des outils supplémentaires permettant l'évaluation plus réaliste de la contamination des

sols. La partie suivante détaille les résultats obtenus (sur la survie, la croissance et la reproduction) lors du bioessai *in situ* après une exposition de 28 jours des vers de terre *Eisenia fetida* à des sols amendés à 10 g.kg⁻¹ MS de boue d'épuration ou de lisier de vache.

6.3.2 Résultats et discussions

Les chambres d'essais ont été déployées sur le terrain avec succès (Chapitre 4.7.3, page 125) et ont permis le recueil des résultats sur les différents paramètres suivis durant 28 jours d'exposition à des sols amendés à deux types de Mafors (**Tableau 13**).

Tableau 13. Paramètres suivis durant le test de reproduction *in situ* des vers de terre *Eisenia fetida* exposés à une teneur de 10 g.kg⁻¹ MS de deux Mafors (boue d'épuration et lisier de vache).

Condition	Taux de mortalité j28 (%)	Taux de croissance j28 (%)	Nombre de cocons produits j28	Nombre de juvéniles j56	Nombre de cocons non éclos j56
T *	1,9 ± 3,2 a	-0,04 ± 3,37 a	4,50 ± 3,11 a	4,50 ± 3,11 a	0 a
Boue d'épuration	36,1 ± 19,0 b	33,69 ± 4,09 b	35,50 ± 5,45 b	22,25 ± 3,86 b	13,5 ± 2,65 b
Lisier de vache	13,9 ± 7,2 a	12,01 ± 3,43 c	7,25 ± 4,79 a	5,00 ± 2,16 a	2,50 ± 3,79 a

Valeurs moyennes (n = 4) et ± écart-types. Les mêmes lettres indiquent un groupe statistique identique (à 95 %). T = sol de référence, T- = sol artificiel ISO.

* n = 3 (le quatrième réplicat n'a pas été pris en compte car une fuite des vers de terre a été observée à la suite d'aléas climatiques qui ont décroché la moustiquaire recouvrant l'ouverture de la chambre d'essai).

La mortalité des vers de terre dans les conditions témoins est faible (1,9 ± 3,2 %) et leur biomasse est stable (-0,04 ± 3,37 %) après 28 jours d'exposition. La conception des chambres et les conditions nutritives mises en place dans cette étude semblent suffisantes pour contenir les vers de terre dans le milieu et assurer leur survie et le maintien de leur biomasse durant 28 jours. Pour les sols amendés en Mafors, les résultats montrent une augmentation de la mortalité qui deviennent significatives lors de l'exposition à la boue d'épuration. La mortalité des vers de terre atteint 36,1 ± 19,0 % dans le sol amendé en boue d'épuration. La diminution de la survie des vers de terre a déjà été observée lors d'une exposition de 28 jours à 50 g.kg⁻¹ de boue d'épuration lors des bioessais réalisés en laboratoire. Les conditions d'exposition *in situ* sembleraient amplifier les effets létaux de la boue d'épuration sur les vers de terre. En revanche, l'amendement en Mafors augmente la biomasse des vers de terre avec un taux de croissance significativement plus élevé que les témoins (12,01 ± 3,43 % dans le sol amendé en lisier et jusqu'à 33,69 ± 4,09 % dans le sol amendé en boue

d'épuration). Or, l'augmentation de la biomasse des vers de terre exposés à la boue d'épuration a aussi été observée à toutes les doses d'épandage testées lors des bioessais en laboratoire.

La très faible reproduction des vers de terre dans la condition témoin pourrait s'expliquer soit par une trop faible densité en vers de terre dans la chambre d'essai, soit par une durée d'exposition insuffisante. Les conditions environnementales telles que la température, le taux d'ensoleillement et la pluviométrie peuvent également jouer un rôle dans le retard de la reproduction. De ce fait, les résultats sur le paramètre de reproduction ne permettent pas de conclure. Toutefois, les résultats sur les paramètres de reproduction obtenus dans les sols amendés en boue d'épuration montrent des résultats contradictoires avec les bioessais en laboratoire. En effet, les vers de terre montrent une augmentation significative du nombre de cocons produits et du nombre de juvéniles éclos. Le nombre de cocons non éclos issus du sol amendé en boue est également élevé.

6.3.3 Conclusion et perspectives

Les chambres d'essais développées semblent adaptées pour évaluer l'écotoxicité chronique d'un sol amendé dans des conditions *in situ* sur les vers de terre. La fabrication des chambres est simple et peu onéreuse. Toutefois, la réalisation des tests dans des conditions environnementales estivales nécessite un suivi régulier de la teneur en eau pour éviter une mortalité des vers de terre dans les conditions d'essais. Pour conclure, il ne s'agit, ici, que d'une étude préliminaire et il convient d'optimiser le protocole d'exposition (densité de vers de terre, durée d'exposition, espèce, etc.) pour garantir la reproductibilité de ce bioessai *in situ* et une reproduction suffisante dans les conditions témoins.

Le prochain chapitre traite de l'évaluation de la bioaccumulation des éléments traces métalliques et des résidus de médicaments dans les vers de terre et les plantes.

Chapitre 7. Transfert et bioaccumulation de polluants présents dans les sols amendés en Mafors vers les plantes et les vers de terre

7.1 Contexte et enjeux

Les deux premières étapes de notre étude ont porté sur l'analyse chimique et la mesure d'effets de l'épandage des Mafors sur les plantes et les vers de terre. Une approche complémentaire consiste à réaliser une mesure de la concentration et de la bioaccumulation des polluants dans les organismes exposés à ces Mafors. Il s'agit ici de fournir des informations sur la biodisponibilité des polluants dans l'environnement, leur transfert dans les organismes cibles et estimer ainsi la part des contaminants potentiellement transférés dans les réseaux trophiques.

À partir des bioessais chroniques (Chapitre 6.2), l'analyse de la bioaccumulation s'est réalisée d'une part sur deux types de polluants, les résidus de médicaments et les éléments traces métalliques et, d'autre part sur deux organismes : les vers de terre et les plantes. Les concentrations en polluants sont mesurées sur la totalité du corps des vers de terre (biodisponibilité générale) et sur les parties aériennes/parties racinaires des plantes. Les polluants ciblés varient en fonction du test et des espèces étudiées (**Tableau 14**).

Tableau 14. Analyse de la bioaccumulation des éléments traces métalliques et des résidus de médicaments en fonction des différents tests réalisés et organismes étudiés.

Organismes	Tests réalisés	Espèces	Stade de vie / Organe	Résidus de médicaments	Éléments traces métalliques
Vers de terre	Test de reproduction n° 1 en laboratoire (Chapitre 6.2.2, page 165)	<i>Eisenia fetida</i>	Adultes	X	X
			Juveniles	X	
	Test de reproduction n° 2 en laboratoire (Chapitre 6.2.3, page 188)	<i>Eisenia fetida</i>	Adultes	X	X
			Test de reproduction <i>in situ</i> (Chapitre 6.3, page 190)	<i>Eisenia fetida</i>	Adultes
Plantes	Test d'émergence et de croissance des plantes en laboratoire (Chapitre 6.2.2, page 165)	<i>Medicago sativa</i>	Parties aériennes		X
			Parties racinaires		X
		<i>Sinapis alba</i>	Parties aériennes		X
			Parties racinaires		

7.2 Les résidus de médicaments

7.2.1 Concentrations calculées dans les sols amendés en Mafors

Les concentrations dans les sols amendés au début de l'expérience n'ayant pas pu être analysées, les concentrations sont calculées pour estimer les concentrations en résidus de médicaments dans les sols amendés lors du test de reproduction n° 1 (**Tableau 15**). Ces concentrations sont calculées à partir des concentrations en résidus de médicaments mesurées dans les échantillons bruts (cf. tableau C.1 et tableau C.2 de l'ANNEXE C, page 262) et des teneurs apportées en Mafors et en crottin de cheval dans les sols. L'estimation des concentrations en résidus de médicaments concerne les 15 résidus de médicaments qui ont pu être identifiés et quantifiés initialement dans les différentes matrices de l'étude (Mafors, sol de référence, crottin de cheval ajouté dans les bioessais).

Les résultats mettent en évidence la présence de chlorhexidine dans le sol de référence à des concentrations quantifiables dans toutes les conditions, même en absence de Mafors. Cette contamination provient probablement des exploitations agricoles entourant la parcelle. Excepté le cas de la chlorhexidine, et quelles que soient les doses d'épandage, l'apport de Mafors agricoles ne conduit pas à la présence de résidus de médicaments à des concentrations quantifiables dans le mélange sol-Mafor. En effet, les concentrations calculées sont, en théorie, toutes inférieures aux limites de détection des techniques analytiques mises en œuvre. Or, lors de l'épandage à la boue d'épuration, certaines molécules sont présentes à des concentrations suffisamment élevées dans les sols amendés pour être identifiées et quantifiées. C'est le cas de la chlorhexidine, la ciprofloxacine, le diméthyl-didécyl ammonium et l'ofloxacine dont les concentrations calculées sont nettement supérieures à leur limite de détection. Les travaux de Bourdat-Deschamps et al. (2017) évoquent des concentrations similaires dans des sols amendés en boue d'épuration pour la ciprofloxacine et l'ofloxacine. À partir de ces estimations, on peut supposer un risque de bioaccumulation dans les vers de terre pour les antibiotiques fluoroquinolones et la chlorhexidine connues pour être potentiellement bioaccumulables dans les vers de terre (Sidhu et al., 2019 ; Wen et al., 2011 ; Huang et al., 2009).

Tableau 15. Concentrations calculées en résidus de médicaments ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) dans les sols amendés à différentes teneurs en Mafors lors du test de reproduction n° 1 des vers de terre.

Mafors	Sol de référence	Sol amendé en boue			Sol amendé en fumier			Sol amendé en lisier			
		0	10	20	50	10	20	50	5	10	20
Teneur en Mafors dans le sol de référence (g.kg^{-1} MS)	0										
3-amino-5-méthylisoxazole	ND	0,56	1,12	2,80	0,28	0,56	1,40	0,05	0,10	0,21	
Albendazole-2-aminosulfone	ND	0,03	0,05	0,13	0,01	0,01	0,02	ND	ND	ND	
Chlorhexidine	14,85	35,51	56,17	118,16	14,84	14,84	14,82	14,84	14,84	14,82	
Ciprofloxacine	ND	1,29	2,58	6,45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Diméthyl-didécyl ammonium	ND	369,36	738,73	1846,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Desméthyl-ofloxacine	ND	0,38	0,75	2,80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Épitétracycline	ND	0,31	0,61	1,53	0,01	0,03	0,07	0,01	0,03	0,06	
Flubendazole	ND	0,18	0,35	0,88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Hydroxy-flubendazole	ND	0,02	0,03	0,08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Levamisole	ND	0,09	0,17	0,43	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Ofloxacine	ND	9,58	19,15	47,89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Pyrantel	ND	0,07	0,13	0,33	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	
Tétracycline	ND	0,24	0,48	1,21	0,01	0,02	0,06	0,02	0,03	0,06	
Thiabendazole	ND	0,02	0,04	0,09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Triclosan	ND	0,21	0,43	1,07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Les concentrations théoriques calculées dans chacune des conditions prennent en compte la quantité de résidus de médicaments apportée par les différentes matrices (sol de référence + Mafors + crottin de cheval). Les concentrations supérieures à la limite de quantification de l'analyse sont affichées en gras (cf. **Tableau 11**, page 110). ND = Non déterminé.

7.2.2 Concentrations dans les vers de terre

Au contact direct avec les particules du sol et l'eau interstitielle, les vers de terre sont susceptibles d'accumuler les polluants organiques issus des amendements de Mafors. Cette bioaccumulation est possible soit par absorption alimentaire, soit par absorption cutanée (Vijver et al., 2003). Les voies d'assimilation et la bioaccumulation dépendent de plusieurs facteurs liés aux propriétés des polluants (Jager et al., 2003) et des caractéristiques physicochimiques du sol (De Vaufleury and Gimbert, 2013). Les analyses des concentrations en résidus de médicaments sur *Eisenia fetida* adultes et juvéniles ont pour objectif de mettre en évidence la bioaccumulation effective, ou non, en fonction de l'origine de la Mafor amendée et de sa teneur dans les sols. Après 28 jours d'exposition, les analyses sur les vers adultes et juvéniles tendent à indiquer une bioaccumulation pour certains résidus de médicaments issus de la boue d'épuration lors du test de reproduction n° 1 (**Tableau 16**).

Tableau 16. Concentrations moyennes en résidus de médicaments ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) dans les vers de terre adultes et juvéniles exposés à différentes teneurs en Mafors lors du test de reproduction n° 1.

Condition	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg^{-1} MS)	Stade de vie	ANHY	DDA	ERY	PYR	TETRA	TRI	
Sol amendé en boue	0	Adultes	4,4 ± 1,1	1682,5 ± 252,4	<LD	<LD	<LD	<LD	
		Juveniles	<LD	1448,4 ± 200,3	<LD	<LD	<LD	<LD	
	10	Adultes	4,4 ± 1,0	2100,5 ± 273,1	<LD	<LD	<LD	23,8 ± 3,8	
		Juveniles	1,7 ± 0,4	3235,4 ± 355,9	<LD	<LD	<LD	<LD	
	20	Adultes	4,1 ± 1,1	536,8 ± 85,9	<LD	<LD	<LD	71,2 ± 8,5	
		Juveniles	-	-	-	-	-	-	
	50	Adultes	3,9 ± 1,1	403,5 ± 48,4	0,7 ± 0,2	<LD	<LD	63,2 ± 6,9	
		Juveniles	-	-	-	-	-	-	
	Sol amendé en fumier	0	Adultes	<LD	<LD	3,8 ± 1,1	<LD	<LD	<LOQ
			Juveniles	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
10		Adultes	2,1 ± 4,6	<LD	<LD	1,7 ± 0,5	<LD	<LD	
		Juveniles	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
20		Adultes	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
		Juveniles	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
50		Adultes	2,0 ± 0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
		Juveniles	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
Sol amendé en lisier		0	Adultes	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
			Juveniles	<LD	<LD	1,4 ± 0,4	<LD	<LD	<LD
	5	Adultes	<LD	<LD	<LD	<LD	236,1 ± 65,0	<LD	
		Juveniles	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
	10	Adultes	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
		Juveniles	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
	20	Adultes	<LD	<LD	<LD	<LD	467,8 ± 118,1	<LD	
		Juveniles	<LD	<LD	2,0 ± 0,6	<LD	<LD	<LD	

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-types. LD = Limite de détection, LOQ = Limite de quantification, « - » = Condition non mesurée. Les limites de détection et de quantification sont affichées dans le tableau B.3 (cf. ANNEXE B, page 259). ANHY = Anhydroérythromycine ; DDA = Diméthyl-didécyl ammonium ; ERY = Érythromycine ; PYR = Pyriméthanine ; TETRA = Tétracycline ; TRI = Triclosan.

Lors des analyses dans des matrices complexes telles que les vers de terre, la détection des résidus de médicaments peut être limitée par un manque de sensibilité analytique, des difficultés de l'extraction et/ou une prise d'essai insuffisante en termes de biomasse. Par conséquent, la plupart des résidus de médicaments recherchés ont montré des limites de détection et de quantification beaucoup plus élevées dans les vers de terre que dans les autres matrices analysées (sol et Mafors). Malgré les limites analytiques évoquées, six résidus de médicaments de la liste étudiée (sur 33 molécules recherchées) ont été détectés et quantifiés dans les vers de terre exposés à des sols amendés en Mafors durant le test de reproduction n° 1. Les résidus de médicaments quantifiés sont : un antibiotique avec la tétracycline, un antibiotique macrolide avec l'érythromycine ainsi qu'un de ses métabolites l'anhydroérythromycine, deux biocides avec le diméthyl-didécyl ammonium et le triclosan et un antiparasitaire avec le pyriméthamine (**Tableau 16**). Parmi ces résidus de médicaments, certains avaient déjà été quantifiés dans les différentes Mafors étudiées alors que d'autres n'avaient pas été détectés (tels que l'anhydroérythromycine et l'érythromycine) (cf. tableau C.2 de l'ANNEXE C, page 262).

Dans un premier temps, l'analyse ne révèle quasiment pas de résidus de médicaments dans les vers de terre exposés à un sol amendé en Mafors d'origine agricole. Quelques résidus comme l'anhydroérythromycine, l'érythromycine et le pyriméthamine sont détectés à de faibles concentrations dans les vers de terre exposés aux Mafors d'origine agricole et également dans les témoins (entre $1,4 \pm 0,4$ et $3,8 \pm 1,1$ g.kg⁻¹ MS). D'après la littérature scientifique, l'érythromycine est connue pour être potentiellement bioaccumulée dans les organismes. En effet, les travaux de Wu et al (2021) révèlent des concentrations en macrolides dont l'érythromycine à des concentrations de l'ordre du µg.kg⁻¹ chez les organismes aquatiques. De plus, l'azithromycine, un autre macrolide, a montré une bioaccumulation dans les tissus de vers de terre exposés à des doses réalistes d'une boue d'épuration en laboratoire (Sidhu et al., 2019). Seule la tétracycline présente des valeurs élevées atteignant $236,1 \pm 65,0$ et $467,8 \pm 118,1$ µg.kg⁻¹ MS dans les vers de terre adultes exposés à des sols amendés à 5 et 20 µg.kg⁻¹ MS de lisier de vache respectivement. Toutefois, l'augmentation de la teneur en Mafors dans le sol n'entraîne pas de tendance à l'augmentation de la tétracycline puisque les vers exposés à 10 g.kg⁻¹ MS ne montrent pas de tétracycline dans leur tissu et la variabilité observée dans les échantillons est très élevée.

Seules les plantes ont déjà montré une bioaccumulation des tétracyclines dans les organismes terrestres (Puckowski et al., 2016).

En ce qui concerne les vers exposés dans le sol amendé en boue d'épuration, quatre molécules sont détectées : l'anhydroérythromycine, le diméthyl-didécyl ammonium, l'érythromycine et le triclosan. L'anhydroérythromycine et l'érythromycine sont à nouveau détectées à des concentrations très faibles entre 0,7 et 4,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS, y compris dans les témoins. Pour le triclosan, les concentrations moyennes varient entre $23,8 \pm 3,8$ à $63,2 \pm 6,9$ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS, respectivement de la plus faible teneur ajoutée en boue d'épuration à la plus forte teneur testée. Le triclosan est connu dans la littérature pour sa bioaccumulation par les vers de terre. L'étude de Kinney et al. (2008) montre des concentrations en triclosan jusqu'à 2 610 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS avec un facteur de bioaccumulation élevé (27) dans des vers de terre exposés à un sol amendé en boue d'épuration. Des facteurs de bioaccumulation plus faibles (proches de 10) ont été obtenus dans d'autres études (Pannu et al., 2012 ; Higgins et al., 2011). En ce qui concerne le diméthyl-didécyl ammonium, les concentrations moyennes mesurées dans les vers de terre adultes exposés à la boue d'épuration varient entre $403,5 \pm 48,4$ à $2 100,5 \pm 273,1$ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS. Cependant, la quantification du diméthyl-didécyl ammonium montre également une forte concentration dans les témoins adultes ($1 682,5 \pm 252,4$ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS). Cette concentration dans les vers de terre issus des essais témoins laisse supposer soit une erreur d'analyse, soit une inversion d'échantillon. Aucune étude n'a encore montré la bioaccumulation du diméthyl-didécyl ammonium dans les vers de terre.

La détection de polluants dans les juvéniles peut provenir d'un transfert des résidus depuis les adultes vers les juvéniles ou bien d'une nouvelle bioaccumulation des juvéniles durant la seconde phase du test de reproduction pendant 28 jours. Dans notre étude, les mesures en résidus de médicaments ont pu être réalisées lorsque la masse des juvéniles produites était suffisante dans les différentes conditions d'exposition. Les vers de terre juvéniles montrent une concentration moyenne en diméthyl-didécyl ammonium de $3 235,4 \pm 355,9$ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS à une exposition de 10 g.kg^{-1} MS en boue d'épuration. Cette plus forte concentration en diméthyl-didécyl ammonium retrouvée dans les juvéniles exposés à 10 g.kg^{-1} MS de boue d'épuration suggère une bioaccumulation plus importante des vers de terre juvéniles par rapport aux adultes. Cette forte bioaccumulation peut être issue d'une différence de métabolismes entre les adultes et les juvéniles ou encore une biodisponibilité plus élevée du

diméthyl-didécyl ammonium dans le milieu suite à la forte activité des vers de terre adultes durant la première phase du test de reproduction. Ces différences de concentrations en polluant entre les adultes et les juvéniles ont déjà été observées sur des ETMs dans les travaux de Coelho et al. (2018). Toutefois, une contamination en diméthyl-didécyl ammonium dans les juvéniles témoins est également observée ($1\,448,4 \pm 200,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) et remet en cause les résultats obtenus.

Durant le test de reproduction n° 2, les analyses ne détectent pas de résidus de médicaments dans les vers de terre, à l'exception de l'érythromycine et du tébuconazole et à de faibles concentrations ($1,4$ et $3,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS). Cette seconde analyse souligne la faible robustesse et redondance de l'analyse et met en évidence un problème analytique. La forte variabilité observée lors des analyses sur le diméthyl-didécyl ammonium montre la nécessité d'approfondir le développement analytique sur ce composé.

Points clés à retenir

- ✓ Dans un contexte d'épandage agricole réaliste, les estimations des concentrations en résidus de médicaments dans les sols amendés en Mafors agricoles donnent des valeurs en résidus de médicaments indétectables en raison de la faible concentration des résidus de médicaments dans les Mafors agricoles et des faibles doses d'apports en amendement.
- ✓ Le sol amendé en boue d'épuration révèle tout de même des concentrations calculées en chlorhexidine, ciprofloxacine, diméthyl-didécyl ammonium et ofloxacine suffisamment élevées pour être quantifiées par voie analytique dans le mélange sol-boue.
- ✓ Parmi la liste des 33 résidus de médicaments recherchés, six résidus de médicaments sont détectés et quantifiés dans les vers de terre adultes après une exposition de 28 jours à des sols amendés.
- ✓ Les vers de terre exposés à des sols amendés en Mafors agricoles ne montrent pas de bioaccumulation de résidus de médicaments dans leurs tissus. Seule la tétracycline montre une concentration élevée dans les vers de terre exposés au lisier mais une forte variabilité de la mesure est observée.
- ✓ Une tendance à la bioaccumulation est observée dans les vers de terre exposés à la boue d'épuration pour le triclosan et le diméthyl-didécyl ammonium. Les vers de terre juvéniles montrent également une concentration élevée en diméthyl-didécyl ammonium. Ces tendances ne sont toutefois pas confirmées durant le test de reproduction n° 2.
- ✓ Les biais analytiques ne permettent pas d'affirmer les tendances observées sur la bioaccumulation des résidus de médicaments dans les vers de terre.

7.3 Les éléments traces métalliques

Les concentrations des fractions « pseudo total » en zinc, cuivre, chrome, cadmium, nickel et plomb ont été quantifiées dans les sols amendés en Mafors, dans les vers de terre *Eisenia fetida* et dans les plantes *Medicago sativa* et *Sinapis alba* durant les tests de toxicité chronique.

7.3.1 Concentrations calculées et mesurées dans les sols amendés en Mafors

Dans notre étude, l'évaluation de l'écotoxicité des Mafors est réalisée à des doses d'épandage réalistes comprises entre 5 et 50 g.kg⁻¹ MS durant les tests de toxicité chronique sur les organismes terrestres. En tenant compte du fond géochimique du sol, de la teneur en Mafor et du complément alimentaire (crottin de cheval), les concentrations calculées en ETMs dans les différentes conditions du test de reproduction n° 1 sont présentées dans le **Tableau 17**. Les mesures en ETMs réalisées dans les sols amendés en début d'expérience lors du test de reproduction n° 1, sont également présentées dans ce tableau. La comparaison entre les concentrations calculées et mesurées en ETMs met en évidence des concentrations mesurées légèrement plus élevées que les concentrations calculées, à part les concentrations en zinc et cadmium qui sont plus faibles. Les tendances restent identiques et confirment que les analyses en ETMs sont fiables et représentatives.

L'amendement en Mafors à ces doses d'épandage n'a pas modifié significativement les concentrations en ETMs suivis dans les sols amendés (**Tableau 17**). Toutes les concentrations en ETMs mesurées sont en dessous des valeurs limites citées dans la législation française (**Tableau 1** du chapitre 1.6, page 38). Les concentrations moyennes, obtenues durant le test, sont de 66,23 ± 5,17 mg.kg⁻¹ MS pour le zinc, 17,88 ± 2,46 mg.kg⁻¹ MS pour le cuivre, 0,18 ± 0,01 mg.kg⁻¹ MS pour le cadmium, 74,40 ± 5,95 mg.kg⁻¹ MS pour le chrome, 30,39 ± 1,20 mg.kg⁻¹ MS pour le nickel et 19,22 ± 0,64 mg.kg⁻¹ MS pour le plomb (**Tableau 17**). Toutefois, une tendance à l'augmentation des concentrations est à noter pour le zinc et le cuivre dans les sols amendés en boue d'épuration. En effet, cette tendance à l'augmentation est liée aux concentrations élevées en zinc et cuivre retrouvées dans la boue d'épuration (483,43 ± 9,48 et 208,41 ± 1,78 g.kg⁻¹ MS respectivement). Orman et al. (2014) observent également une légère augmentation des concentrations du zinc et du cuivre dans les sols amendés en boue d'épuration due à un fond géochimique en ETMs moins élevé dans le sol

utilisé et des fortes concentrations de ces deux ETMs dans la boue d'épuration épandue. En général, l'augmentation des ETMs dans les sols est surtout liée à un épandage répété et successif de Mafors (Guo et al., 2018 ; Iglesias et al., 2018 ; Nogueira et al., 2013 ; Smith, 2009 ; Nicholson et al., 2003).

Malgré les concentrations en ETMs identiques entre les sols amendés ou non, la biodisponibilité des ETMs est fortement liée à leur spéciation dans les sols. D'après la littérature, la fraction d'ETMs facilement extractible est plus représentative que la concentration totale des ETMs dans le sol pour l'évaluation du risque (McLaughlin et al., 2000). L'extraction à l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) est l'une des méthodes couramment utilisées permettant de quantifier les fractions facilement disponibles telles que les ETMs solubles, échangeables, absorbés ou complexés à la matière organique (Coelho et al., 2018). Durant notre étude, il aurait été utile de compléter les données par des essais d'extraction séquentielles et/ou des extractions chimiques simples, puisque les Mafors sont connues dans la littérature pour présenter des fractions biodisponibles importantes pour certains ETMs (Li et al., 2010). Les travaux de Orman et al. (2014) montrent une quantité extraite de zinc à l'acide DTPA beaucoup plus importante dans le sol amendé à de faibles doses en boue d'épuration que dans le sol non amendé. Cette même étude montre également une augmentation de la fraction extraite en cuivre et nickel à l'acide DTPA et donc des ETMs plus facilement disponibles dans la boue d'épuration.

Les mesures en ETMs dans les sols amendés durant le test de reproduction n° 2 des vers de terre, le test de reproduction *in situ* des vers de terre et le test d'émergence et de croissance des plantes présentent des tendances identiques au test de reproduction n° 1 des vers de terre. Ces données n'ont pas été présentées dans ce manuscrit.

Tableau 17. Concentrations moyennes calculées et mesurées en ETMs (mg.kg⁻¹ MS) dans les sols amendés à différentes teneurs en Mafors lors du test de reproduction n° 1 des vers de terre.

Condition	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg ⁻¹ MS)	Zn		Cu		Cr		Cd		Ni		Pb	
		Calculée	Mesurée	Calculée	Mesurée	Calculée	Mesurée	Calculée	Mesurée	Calculée	Mesurée	Calculée	Mesurée
Sol de référence	0	67,68	66,36 ± 3,74 ab	12,53	16,45 ± 0,54 ab	50,71	77,15 ± 3,98 ab	0,23	0,18 ± 0,01 a	23,07	29,81 ± 1,23 a	11,29	19,31 ± 0,37 a
Sol amendé en boue	10	71,62	70,09 ± 2,00 ab	14,54	18,21 ± 0,25 a	50,89	74,36 ± 1,88 ab	0,23	0,19 ± 0,00 a	23,14	29,01 ± 0,56 a	11,41	19,88 ± 1,00 a
	20	75,56	70,46 ± 1,50 ab	16,55	19,91 ± 0,09 ab	51,08	73,87 ± 2,15 ab	0,24	0,19 ± 0,01 a	23,22	30,82 ± 2,43 a	11,54	18,65 ± 0,11 a
	50	87,39	75,78 ± 5,26 a	22,59	23,96 ± 1,85 b	51,63	68,71 ± 2,38 ab	0,26	0,19 ± 0,01 a	23,43	31,15 ± 0,71 a	11,90	19,38 ± 0,92 a
Sol amendé en fumier	10	67,45	62,37 ± 1,07 b	12,64	16,38 ± 0,21 a	50,84	73,07 ± 0,94 ab	0,25	0,19 ± 0,01 a	23,13	30,89 ± 1,37 a	11,27	18,91 ± 0,41 a
	20	67,24	59,49 ± 3,37 b	12,74	15,69 ± 0,37 a	50,96	67,47 ± 1,19 a	0,28	0,18 ± 0,02 a	23,17	27,85 ± 1,54 a	11,24	18,06 ± 0,42 a
	50	66,61	59,55 ± 2,95 b	13,06	16,44 ± 0,55 a	51,29	66,68 ± 1,66 a	0,35	0,18 ± 0,02 a	23,31	30,58 ± 1,52 a	11,16	18,65 ± 0,91 a
Sol amendé en lisier	5	68,04	64,96 ± 5,52 ab	12,62	16,70 ± 0,94 a	50,73	86,19 ± 1,65 b	0,23	0,16 ± 0,01 a	23,08	31,96 ± 1,58 a	11,29	19,04 ± 1,76 a
	10	68,41	64,45 ± 2,54 ab	12,70	16,99 ± 0,11 a	50,74	78,60 ± 1,69 ab	0,23	0,16 ± 0,00 a	23,08	31,20 ± 1,17 a	11,29	19,68 ± 0,89 a
	20	69,13	68,79 ± 6,77 ab	12,88	18,03 ± 1,16 a	50,78	77,87 ± 3,36 ab	0,23	0,18 ± 0,02 a	23,09	30,60 ± 1,23 a	11,28	20,42 ± 0,83 a

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-types. Chaque lettre indique un groupe statique identique (p < 0,05). Les valeurs mesurées dans le sol de référence issues des différents tests de reproduction ont été regroupées. Les concentrations théoriques calculées dans chacune des conditions prennent en compte la quantité d'ETMs apportées par les différentes matrices (sol de référence + Mafors + crottin de cheval).

7.3.2 Concentrations dans les organismes

7.3.2.1 Vers de terre

Les vers de terre sont reconnus pour être des accumulateurs efficaces des ETMs dans les sols conduisant à une compartimentation, un stockage ou à l'excrétion des ions métalliques des tissus les plus sensibles (Andre et al., 2009 ; Barrera et al., 2001). De la même manière que les polluants organiques, les voies d'entrée des ETMs sont la pénétration cutanée ou l'absorption à partir du tube digestif des vers de terre (De Vaufleury and Gimbert, 2013). La bioaccumulation des ETMs va dépendre principalement de l'espèce, de son comportement alimentaire et des caractéristiques du milieu de vie telles que la composition organo-minérale du sol et le pH (Van Vliet et al., 2006 ; Morgan and Morgan, 1999).

Au bout de 28 jours d'exposition, les vers de terre témoins exposés au sol de référence présentent des concentrations faibles en plomb, nickel, cadmium et chrome mais plus élevées que les vers de terre issus de l'élevage (**Tableau 18**). En effet, les vers de terre témoins présentent des concentrations moyennes de $2,02 \pm 0,41 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ MS}$ pour le plomb, $3,47 \pm 1,50 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ MS}$ pour le nickel, $4,79 \pm 2,07 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ MS}$ pour le cadmium et $5,91 \pm 2,39 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ MS}$ pour le chrome. Cette légère augmentation en ETMs provient principalement du fond géochimique du sol de référence. Ces ETMs, qualifiés d'éléments « non essentiels », peuvent représenter un risque pour les organismes puisqu'ils sont écotoxiques à faible dose et facilement bioaccumulables (principalement pour le cadmium). Chez les vers de terre, ces ETMs vont être stockés sous des formes non toxiques comme des nodules de phosphate de plomb ou dans la partie granule pour le cadmium (Redeker et al., 2007 ; Morgan and Morgan, 1998). À propos du zinc et du cuivre, deux oligo-éléments essentiels au bon développement des organismes, les concentrations retrouvées dans les vers de terre exposés au sol de référence sont similaires aux concentrations dans les vers de terre issus de l'élevage. Ils sont bioaccumulés à des concentrations plus importantes que les ETMs précédents ($97,88 \pm 5,11 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ MS}$ et $9,53 \pm 0,71 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ MS}$). Le ver de terre *Eisenia fetida* est connu pour réguler sa concentration interne en zinc autour de 95 mg.kg^{-1} quelle que soit la concentration externe en ETMs dans le sol jusqu'à $560 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ de sol sec (Heikens et al., 2001 ; Van Gestel et al., 1993). Cette régulation des ETMs essentiels passe par des voies spécifiques pouvant conduire à un équilibre entre l'absorption et l'excrétion (Hopkin, 1989 ; Spurgeon and Hopkin, 1999). Contrairement au zinc, le cuivre

n'est pas régulé chez les vers de terre. Une corrélation positive a déjà été observée entre la concentration en cuivre dans les vers de terre et les concentrations dans les sols (Helling et al., 2000 ; Morgan and Morgan, 1998).

Suites aux amendements en Mafors, les résultats ne mettent pas en évidence une plus forte bioaccumulation des ETMs dans les vers de terre. En premier, l'amendement du sol en Mafors d'origine agricole ne modifie pas les concentrations en ETMs dans les vers de terre. L'apport des Mafors agricoles dans les sols amendés ne semble pas avoir modifié la biodisponibilité des ETMs contrairement à l'étude de Li et al. (2010) où les sols amendés en fumier de porc présentaient des fractions biodisponibles plus élevées en cadmium et plomb conduisant à une plus forte accumulation de ces ETMs dans les tissus de vers de terre.

En second, l'exposition à la boue d'épuration augmente seulement la concentration en cuivre dans les vers de terre indépendamment de la dose. La concentration en cuivre atteint la valeur de $18,96 \pm 2,04 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ MS}$ dans les vers de terre exposés à $50 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MS}$ de boue d'épuration contre $9,53 \pm 0,71 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ MS}$ dans les témoins. Toutefois, l'augmentation observée de la concentration en cuivre dans les vers de terre reste relativement faible. Cette augmentation pourrait être due à (i) une légère augmentation de la concentration en cuivre dans le sol amendé en boue d'épuration (tendance observée mais peu significative) qui génère une augmentation de la concentration en cuivre dans les vers de terre car ils ne sont pas capables de la réguler, (ii) une spéciation du cuivre plus facilement biodisponible apporté par la boue d'épuration, et/ou (iii) une diminution du pH dans le milieu liée à l'apport de boue d'épuration et l'activité des vers de terre, ce sol acide présenterait alors du cuivre sous une forme plus biodisponible en raison de la diminution des phénomènes d'adsorption (Marinussen et al., 1997). Dans un sol amendé à des doses d'épandage faibles en boue d'épuration, l'étude de Urionabarrenetxea et al. (2022) montre des concentrations en chrome, nickel, cadmium et plomb identiques aux témoins pour la même espèce de vers de terre. En revanche, lorsque les doses d'épandage en boue d'épuration augmentent, une augmentation significative de la concentration en ETMs dans le ver *Eisenia fetida* est observée (Urionabarrenetxea et al., 2022 ; Žaltauskaitė et al., 2022). L'étude de Kızılkaya (2004) note une augmentation en cuivre et zinc dans le ver de terre *Lumbricus terrestris* pour des doses d'épandage et des concentrations en ETMs dans la boue d'épuration similaires à notre étude.

Tableau 18. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg^{-1} MS) dans les vers de terre exposés à différents teneurs en Mafors pendant 28 jours lors du test de reproduction n° 1 et facteur de bioaccumulation.

Condition	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg^{-1} MS)	Zn		Cu		Cr		Cd		Ni		Pb	
		Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA
Élevage	-	96,98 ± 2,97	-	8,81 ± 0,63	-	1,03 ± 0,09	-	1,67 ± 0,07	-	0,48 ± 0,09	-	0,28 ± 0,03	-
Sol de référence	0	97,88 ± 5,11 a	1,47	9,53 ± 0,71 a	0,58	5,91 ± 2,39 a	0,08	4,79 ± 2,07 a	26,09	3,47 ± 1,50 ab	0,12	2,02 ± 0,41 af	0,10
Sol amendé en boue	10	103,76 ± 4,50 a	1,48	16,21 ± 1,03 b	0,89	7,54 ± 0,55 a	0,10	5,91 ± 0,57 a	31,00	4,51 ± 0,52 a	0,16	2,17 ± 0,20 a	0,11
	20	98,85 ± 2,10 a	1,40	17,45 ± 1,11 b	0,88	2,90 ± 0,51 a	0,04	6,07 ± 0,31 a	31,80	2,49 ± 0,35 b	0,08	1,02 ± 0,05 b	0,05
	50	90,78 ± 5,63 a	1,20	18,96 ± 2,04 b	0,79	1,65 ± 0,00 a	0,02	3,69 ± 0,47 a	18,97	3,61 ± 0,36 ab	0,12	0,24 ± 0,08 c	0,01
Sol amendé en fumier	10	94,62 ± 3,84 a	1,52	10,22 ± 1,32 a	0,62	6,14 ± 0,47 a	0,08	6,13 ± 0,15 a	32,91	3,59 ± 0,22 ab	0,12	1,08 ± 0,11 be	0,06
	20	100,86 ± 4,98 a	1,70	10,61 ± 1,57 a	0,68	2,74 ± 0,33 a	0,04	6,34 ± 0,37 a	35,67	2,61 ± 0,22 b	0,09	0,49 ± 0,08 c	0,03
	50	93,91 ± 2,74 a	1,58	9,21 ± 0,57 a	0,56	3,18 ± 0,60 a	0,05	3,76 ± 0,72 a	20,75	2,75 ± 0,18 ab	0,09	0,76 ± 0,24 bc	0,04
Sol amendé en lisier	5	99,00 ± 16,82 a	1,52	8,00 ± 0,43 a	0,48	7,11 ± 0,45 a	0,08	4,53 ± 0,14 a	27,75	3,91 ± 0,59 ab	0,12	1,60 ± 0,06 ef	0,08
	10	97,15 ± 2,05 a	1,51	9,76 ± 0,77 a	0,57	3,16 ± 0,71 a	0,04	5,87 ± 0,84 a	37,48	2,67 ± 0,16 ab	0,09	0,83 ± 0,07 bc	0,04
	20	88,28 ± 2,21 a	1,28	10,78 ± 1,74 a	0,60	3,72 ± 0,16 a	0,05	6,21 ± 0,17 a	33,97	2,83 ± 0,20 ab	0,09	0,84 ± 0,12 bc	0,04

Valeurs moyennes ($n = 3$) et \pm écart-types. Chaque lettre indique un groupe statique identique ($p < 0,05$). Les valeurs mesurées dans les vers de terre exposés dans le sol de référence des différents tests ont été regroupées. Les valeurs de FBA > 1 sont affichées en gras.

Le facteur de bioaccumulation (FBA) est très souvent utilisé dans l'évaluation des risques pour déterminer l'accumulation d'une substance dans l'organisme étudié. Il est défini par le rapport entre la concentration d'un polluant dans l'organisme et la concentration mesurée dans le milieu environnemental (**Équation n° 7**, page 130). L'étude du transfert potentiel des ETMs dans les vers de terre utilise souvent l'indice FBA (Coelho et al., 2018). Dans notre étude, les FBA de chaque ETM suivi ne varient pas selon l'amendement en Mafors reçu dans les sols. Les FBA obtenus après l'exposition des vers de terre dans les sols amendés ou non sont proches de 0 pour le chrome, le nickel et le plomb, proches de 1 pour le cuivre et le zinc, et compris entre 16,19 et 38,42 pour le cadmium. Ces résultats sont similaires à l'étude de Kızılkaya et al. (2004) sur *Lumbricus terrestris*. Toutefois, quelques tendances sont observées dans notre étude. Le FBA du zinc diminue dans les vers de terre lorsque la concentration en zinc augmente dans le sol à la suite d'une dose d'épandage en boue d'épuration plus élevée et le FBA du cuivre est légèrement plus élevée dans les vers de terre exposés à un sol amendé en boue d'épuration. Les FBA obtenus de ces six ETMs chez *E. fetida* sont dans l'ordre suivant : Cd >> Zn > Cu > Pb = Ni = Cr. Ils sont similaires aux études réalisées sur des sols contaminés chez les vers de terre *A. caliginosa* et *L. rubellus* (Dai et al., 2004). La partie biodisponible de ces ETMs dans les sols est responsable de l'augmentation du FBA. On peut supposer dans notre étude que les fractions biodisponibles des ETMs dans les sols n'ont pas été influencées par l'apport en Mafors et l'activité des vers de terre. Pour le cadmium, les FBA obtenus sont élevés malgré une faible concentration dans le sol. Les organismes du sol accumulent facilement le cadmium, même à de faibles concentrations dans les sols (De Vaufleury and Gimbert, 2013).

Les autres séries d'expérimentation (test de reproduction n° 2 et test de reproduction *in situ*) montrent des résultats similaires à la seule différence que l'augmentation de la concentration en cuivre dans les vers de terre est également observée dans le sol amendé en lisier (cf. tableau D.1 et tableau D.2 de l'ANNEXE E, page 272). Les conditions environnementales fluctuantes lors du test *in situ* (teneur en eau, température, ensoleillement, etc.) n'ont pas eu d'influence sur les concentrations en ETMs dans les vers de terre et les phénomènes de bioaccumulation.

Points clés à retenir

- ✓ Les concentrations en ETMs dans les sols amendés sont inférieures aux seuils limites mentionnés dans la législation française.
- ✓ Globalement, la dose et le type de Mafors ne modifient pas les concentrations des six ETMs étudiés dans les sols amendés.
- ✓ Quelle que soit la Mafor épandue, les concentrations mesurées en zinc, chrome, cadmium, nickel et plomb dans les vers de terre ne montrent pas de différences avec les concentrations dans les vers de terre témoins.
- ✓ La concentration en cuivre augmente dans les vers de terre exposés dans un sol amendé en boue d'épuration indépendamment de la dose d'épandage reçue mais les différences observées sont relativement faibles.
- ✓ Les facteurs de bioaccumulation obtenus pour les six ETMs se présentent dans l'ordre suivant $Cd \gg Zn > Cu > Pb = Ni = Cr$ avec des FBA supérieurs à 1 pour le zinc et compris entre 16,19 et 38,42 dans toutes les conditions pour le cadmium.
- ✓ Lors des bioessais *in situ*, la bioaccumulation des ETMs dans les vers de terre suit les mêmes tendances que celles observées pour les bioessais en laboratoire lors des tests de reproduction.

7.3.2.2 Plantes

Les concentrations en ETMs ont été mesurées dans les parties aériennes et racinaires de la luzerne cultivée, *Medicago sativa*, exposée durant 28 jours et uniquement dans les parties aériennes de la moutarde, *Sinapis alba*, exposée durant 21 jours à des sols amendés en Mafors lors du test d'émergence et de croissance des plantes (**Tableaux 19 et 20**).

Les plantes ont la capacité d'accumuler les ETMs dans des organes de stockage grâce à des transports spécifiques. Notre étude met en évidence des concentrations en ETMs nettement plus importantes dans les parties racinaires de la luzerne que dans ses parties aériennes. D'après la littérature, les racines des plantes sont des organes de stockage pour piéger les ETMs et éviter leur exportation vers les parties aériennes plus sensibles aux ETMs où de nombreux processus physiologiques réalisés pourraient être détériorés (Sbartai et al., 2012 ; Jarvis et al., 1976). L'étude de Zribi et al (2015) identifie les parties racinaires comme le lieu préférentiel de stockage du zinc.

Parmi les ETMs bioaccumulés, certains sont qualifiés d'oligo-éléments (zinc et cuivre) car nécessaires à la croissance des plantes. Le zinc joue un rôle important dans les processus de photosynthèse, de détoxification et de métabolisation des protéines (Alloway, 2008). Cependant, d'autres ETMs « non essentiels » peuvent se bioaccumuler et provoquer des effets écotoxicités. Dans des conditions sans amendement, nos travaux montrent une bioaccumulation relativement faible dans les parties racinaires de la luzerne du zinc et du cuivre ($51,63 \pm 6,18$ et $30,22 \pm 1,30$ mg.kg⁻¹ MS respectivement), viennent ensuite le chrome et le nickel ($16,78 \pm 2,14$ et $9,66 \pm 0,58$ mg.kg⁻¹ MS respectivement), et à plus faible concentration le plomb et le cadmium ($6,10 \pm 0,65$ et $1,07 \pm 0,06$ mg.kg⁻¹ MS respectivement) (**Tableau 19**). Les deux espèces de plantes présentent des concentrations en ETMs similaires dans les parties aériennes à l'exception de la concentration en zinc qui est légèrement plus élevée dans la moutarde (**Tableaux 19 et 20**). Les concentrations en zinc et cuivre mesurées dans les parties aériennes chez la luzerne (20 mg Zn.kg⁻¹ et 8 Cu.kg⁻¹) sont identiques aux concentrations retrouvées dans l'étude d'Orman et al. (2014).

Tableau 19. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg⁻¹ MS) dans les parties aériennes et racinaires de la luzerne cultivée *Medicago sativa* exposée pendant 28 jours lors du test d'émergence et de croissance des plantes à différentes teneurs en Mafors.

Matrice	Condition	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg ⁻¹ MS)	Zn		Cu		Cr		Cd		Ni		Pb	
			Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA
Partie aérienne	Sol de référence	0	20,68 ± 0,98 a	0,31	8,45 ± 0,61 ab	0,66	2,45 ± 0,32 a	0,05	0,14 ± 0,02 ab	0,61	1,60 ± 0,10 a	0,07	0,53 ± 0,02 a	0,05
	Sol amendé en boue	10	28,73 ± 4,02 a	0,38	7,57 ± 0,65 ab	0,62	1,54 ± 0,21 ab	0,03	0,22 ± 0,03 a	1,03	0,87 ± 0,06 b	0,02	0,17 ± 0,03 ab	0,01
		20	54,78 ± 4,44 b	0,74	8,82 ± 0,88 ab	0,63	1,52 ± 0,21 ab	0,03	0,42 ± 0,05 c	2,01	1,28 ± 0,10 ab	0,03	0,41 ± 0,04 ab	0,03
	Sol amendé en fumier	10	20,61 ± 2,10 a	0,28	9,56 ± 0,04 a	0,86	1,33 ± 0,08 b	0,02	0,13 ± 0,01 b	0,61	0,96 ± 0,06 b	0,02	0,27 ± 0,01 ab	0,02
		20	18,83 ± 6,60 a	0,30	8,80 ± 0,60 ab	0,73	1,66 ± 0,19 ab	0,03	0,20 ± 0,01 ab	0,94	1,04 ± 0,29 b	0,03	0,18 ± 0,02 ab	0,01
	Sol amendé en lisier	10	22,11 ± 3,66 a	0,30	6,76 ± 0,24 b	0,59	1,81 ± 0,11 ab	0,03	0,18 ± 0,03 ab	0,92	1,02 ± 0,10 b	0,02	0,22 ± 0,02 ab	0,01
20		22,56 ± 1,26 a	0,34	8,04 ± 0,27 ab	0,69	1,47 ± 0,32 ab	0,03	0,17 ± 0,02 ab	0,82	0,91 ± 0,04 b	0,03	0,17 ± 0,02 b	0,01	
Partie racinaire	Sol de référence	0	51,63 ± 6,18 a	0,78	30,22 ± 1,30 a	2,36	16,78 ± 2,14 ab	0,32	1,07 ± 0,06 a	4,65	9,66 ± 0,58 a	0,40	6,10 ± 0,65 a	0,52
	Sol amendé en boue	10	100,68 ± 6,26 b	1,34	16,78 ± 0,33 b	1,36	13,44 ± 0,66 bcd	0,23	1,97 ± 0,08 b	9,22	9,72 ± 0,58 a	0,23	3,30 ± 0,21 bc	0,22
		20	298,03 ± 32,41 c	4,03	28,39 ± 5,68 ab	2,02	12,56 ± 1,02 cd	0,21	3,61 ± 0,21 c	17,24	11,73 ± 1,00 a	0,30	3,04 ± 0,27 b	0,21
	Sol amendé en fumier	10	48,00 ± 3,68 a	0,66	23,19 ± 0,52 ab	2,08	17,85 ± 1,32 a	0,31	1,42 ± 0,05 ad	6,62	10,83 ± 1,36 a	0,25	3,64 ± 0,18 bc	0,25
		20	38,460 ± 9,13 a	0,61	27,08 ± 0,34 ab	2,26	16,14 ± 1,08 ac	0,28	3,19 ± 0,19 e	15,02	9,58 ± 0,12 a	0,25	1,95 ± 0,1 d	0,14
	Sol amendé en lisier	10	60,59 ± 4,86 ab	0,82	24,91 ± 0,81 ab	2,19	17,92 ± 0,67 a	0,30	1,41 ± 0,13 ad	7,21	11,1 ± 0,44 a	0,27	4,0 ± 0,17 c	0,27
20		57,85 ± 6,08 a	0,88	18,81 ± 2,74 ab	1,62	10,37 ± 0,55 d	0,19	1,69 ± 0,03 bd	8,19	6,39 ± 0,37 b	0,18	1,32 ± 0,12 d	0,10	

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-types. Chaque lettre indique un groupe statique identique (p < 0,05). Les valeurs de FBA > 1 sont affichées en gras.

Tableau 20. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg⁻¹ MS) dans les parties aériennes de la moutarde *Sinapis alba* exposée pendant 21 jours lors du test d'émergence et de croissance des plantes à différentes teneurs en Mafors.

Matrice	Condition	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg ⁻¹ MS)	Zn		Cu		Cr		Cd		Ni		Pb	
			Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA	Plantes	FBA
Partie aérienne	Sol de référence	0	50,45 ± 6,95 a	0,76	7,64 ± 0,67 a	0,60	4,59 ± 0,24 ab	0,09	0,62 ± 0,01 a	2,70	2,58 ± 0,64 a	0,11	0,39 ± 0,04 ac	0,03
	Sol amendé en boue	10	93,05 ± 1,95 b	1,24	7,89 ± 0,42 a	0,64	2,93 ± 0,50 ab	0,05	0,91 ± 0,02 b	4,26	1,56 ± 0,24 ab	0,04	0,21 ± 0,02 b	0,01
		20	187,05 ± 11,33 c	2,53	8,61 ± 0,31 a	0,61	2,31 ± 0,15 a	0,04	1,35 ± 0,04 c	6,45	1,27 ± 0,05 ab	0,03	0,28 ± 0,02 bc	0,02
	Sol amendé en fumier	10	47,50 ± 4,37 a	0,65	7,83 ± 0,02 a	0,70	2,89 ± 0,08 ab	0,05	0,9 ± 0,08 b	4,19	1,11 ± 0,12 b	0,03	0,36 ± 0,01 abc	0,02
		20	53,07 ± 9,77 a	0,85	8,24 ± 1,08 a	0,69	5,32 ± 0,10 ab	0,09	0,98 ± 0,08 bd	4,61	1,72 ± 0,12 ab	0,05	0,3 ± 0,02 abc	0,02
	Sol amendé en lisier	10	50,19 ± 2,67 a	0,68	7,52 ± 0,46 a	0,66	5,71 ± 0,51 b	0,10	1,1 ± 0,05 d	5,62	2,48 ± 0,08 a	0,06	0,47 ± 0,01 a	0,03
		20	61,90 ± 11,02 a	0,94	8,00 ± 0,72 a	0,69	5,46 ± 1,25 ab	0,10	1,02 ± 0,09 bd	4,94	1,58 ± 0,32 ab	0,05	0,36 ± 0,15 abc	0,03

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-types. Chaque lettre indique un groupe statique identique (p < 0,05). Les valeurs de FBA > 1 sont affichées en gras.

Les données présentées dans les **Tableaux 21** et **22** mettent en évidence une augmentation de la concentration de certains ETMs dans les parties aériennes de la luzerne et la moutarde, et dans les parties racinaires de la luzerne. Cette augmentation varie en fonction du type d'amendement et de sa teneur ajoutée dans le sol. Dans un premier temps, nous constatons l'absence de variation de concentrations en ETMs dans les plantes exposées aux sols amendés en fumier et en lisier de vache. En effet, quel que soit l'ETM considéré (à l'exception du cadmium) et les teneurs en amendements d'origine agricole, les concentrations dans les parties aériennes et racinaires sont proches des concentrations mesurées sur les plantes cultivées dans le sol de référence non amendé. Seul le cadmium augmente dans les parties racinaires de la luzerne et dans les parties aériennes de la moutarde exposées aux plus fortes teneurs en fumier de vache et lisier de vache.

Dans un second temps, nous observons l'augmentation de la concentration de certains ETMs dans les plantes en croissance sur les sols amendés en boue d'épuration. C'est le cas du zinc et, dans une moindre mesure du cadmium. Pour les autres ETMs, l'amendement du sol en boue d'épuration ne conduit pas à l'augmentation de leurs concentrations dans les plantes, celles-ci étant équivalentes aux concentrations mesurées dans les plantes exposées au sol de référence non amendé. Ces concentrations en zinc et cadmium tendent à augmenter en fonction de la teneur en boue d'épuration ajoutée au sol. L'augmentation du zinc est observée à la fois dans les parties aériennes de la luzerne et la moutarde mais également dans les parties racinaires de la luzerne. Pourtant, les concentrations en zinc dans les sols n'ont pas augmenté avec l'amendement en boue d'épuration. Les travaux d'Orman et al. (2014) mentionnent également une augmentation de la concentration en zinc chez la luzerne exposée à un sol amendé en boue d'épuration à des doses où la concentration en ETMs n'augmentait pas dans les sols amendés. Le zinc présenterait des fractions mobiles et biodisponibles dans les boues d'épuration et serait donc accumulé à de plus grandes concentrations dans la luzerne et la moutarde (Orman et al., 2014 ; Aşik and Katkat, 2010). De plus, la matière organique de la boue d'épuration a montré des fractions facilement assimilables et biodégradables par les organismes. Leur biodégradation peut entraîner des modifications physicochimiques importantes du sol (diminution du pH) favorisant leur bioaccumulation et une remobilisation des ETMs piégés dans la matière organique. Les racines des plantes sont également connues pour modifier les paramètres physicochimiques

et biologiques dans la rhizosphère pouvant influencer la mobilité des polluants dans cette zone (Stengel and Gelin, 1998).

L'utilisation du FBA est souvent pratiquée pour évaluer la capacité des plantes à accumuler les ETMs (Liu et al., 2008). Nos résultats présentent des FBA différents selon l'amendement en Mafors reçu dans les sols. En premier, l'amendement en Mafors n'a pas modifié les FBA du chrome, du nickel et du plomb qui présentent des FBA inférieures à 1 voire nulles. Le FBA du cuivre n'est également pas influencé par le sol amendé à ces différentes Mafors mais il présente des valeurs supérieures à 1 dans les racines de la luzerne. En second, les FBA du zinc et du cadmium présentent deux résultats distincts. Nous observons une augmentation du FBA du zinc seulement dans les conditions d'exposition à la boue d'épuration. Ce FBA augmente avec la dose d'épandage jusqu'à atteindre, à la plus forte teneur en boue d'épuration, une valeur de 4,03 dans les parties racinaires de la luzerne et de 2,53 dans les parties aériennes de la moutarde. En ce qui concerne le cadmium, les FBA sont supérieurs à 1 dans les parties racinaires de la luzerne quelles que soient les conditions de culture testées avec des FBA compris entre 4,65 et 17,24. Ces FBA sont plus élevées dans les parties racinaires lorsque la luzerne est exposée à la boue d'épuration et au fumier de vache. On détecte également des FBA supérieurs à 1 dans les parties aériennes de la luzerne dans les sols amendés en boue d'épuration. Chez la moutarde, les FBA du cadmium sont supérieurs à 1 dans les parties aériennes pour toutes les conditions testées avec des valeurs beaucoup plus élevées que les témoins lorsque les sols sont amendés, quelle que soit la Mafor et la teneur testée.

Points clés à retenir

- ✓ Les concentrations en ETMs sont plus élevées dans les parties racinaires que les parties aériennes chez la luzerne.
- ✓ L'épandage des Mafors d'origine agricole ne montre pas une augmentation de la concentration en ETMs dans les plantes, à l'exception du cadmium qui augmente dans les parties racinaires de la luzerne et dans les parties aériennes de la moutarde aux plus fortes doses d'épandage.
- ✓ L'exposition des plantes à un sol amendé en boue d'épuration conduit à une augmentation importante de la concentration en zinc dans les parties aériennes et racinaires de la luzerne et dans les parties racinaires de la moutarde. Une concentration plus importante en cadmium est également mise en évidence dans la luzerne et dans les parties aériennes de la moutarde.
- ✓ Les FBA du zinc sont supérieurs à 1 dans les parties racinaires chez la luzerne et dans les parties aériennes chez la moutarde lorsque les deux plantes sont exposées à la boue d'épuration. Le cuivre présente un FBA supérieur à 1 dans toutes les conditions d'exposition dans les parties racinaires de la luzerne. Pour le cadmium, les FBA sont supérieurs à 1 dans les parties racinaires de la luzerne pour toutes les conditions d'exposition en raison de faibles concentrations dans les sols amendés. Toutefois, ces FBA montrent des valeurs plus élevées dans un sol amendé en boue d'épuration et en fumier de vache.

7.4 Synthèse et conclusion

L'utilisation de la bioaccumulation en écotoxicologie permet d'apporter une meilleure évaluation du transfert des polluants. Son étude nécessite l'acquisition des concentrations en polluants dans les sols et dans les organismes. Dans le cadre de nos travaux, les Mafors étudiées sont amendées dans les sols à des teneurs faibles pour se rapprocher au plus près des conditions réalistes. Ainsi, à ces faibles doses d'épandage, les mesures en ETMs ne montrent pas d'augmentation des concentrations dans les sols après un épandage, quelle que soit la Mafor testée. Toutefois, les concentrations de quelques résidus de médicaments sont susceptibles d'augmenter en fonction des teneurs apportées en boue d'épuration et des polluants suivis, comme le diméthyl-didécyl ammonium, l'ofloxacine, la ciprofloxacine et la chlorhexidine.

Les données obtenues sur la bioaccumulation des résidus de médicaments n'ont pas mis en évidence une évolution des concentrations dans les vers de terre. Les limites de détection des techniques analytiques sont encore trop élevées pour garantir la robustesse de l'analyse des résidus de médicaments dans les tissus de vers de terre. Concernant les données sur les ETMs, l'épandage de Mafors agricoles ne conduit pas à leur bioaccumulation dans les vers de terre et les plantes. Toutefois, l'exposition à la boue d'épuration conduit à une légère augmentation du cuivre dans les vers de terre et une augmentation du zinc et du cadmium dans les plantes.

Pour approfondir ces analyses, il serait intéressant de mesurer les fractions facilement extractibles des ETMs dans les sols amendés et ainsi de comparer la fraction la plus mobilisable, voire disponible, aux concentrations mesurées dans les organismes terrestres.

Conclusion générale de la thèse et perspectives

L'épandage des Mafors en tant que fertilisants sur les sols agricoles suscite de nombreuses interrogations quant au transfert des polluants dans l'environnement et à leur innocuité sur les organismes terrestres.

Cette thèse avait pour objectif principal de développer une **approche expérimentale** afin d'évaluer les effets écotoxiques de l'épandage sur sol agricole de trois Mafors : une boue d'épuration urbaine, un fumier de vache et un lisier de vache. La démarche expérimentale s'est principalement axée sur l'analyse des **caractéristiques physicochimiques** des Mafors sélectionnées et le développement de **bioessais en laboratoire** sur deux organismes terrestres, les **plantes** et les **vers de terre**.

Les Mafors ont été caractérisées sur le plan **agronomique** et **écotoxicologique** en analysant les teneurs en nutriments et en polluants. La boue d'épuration s'est distinguée des deux autres Mafors pour ses propriétés fertilisantes élevées, la diversité des contaminants présents et avec des concentrations élevées pour certains résidus de médicaments et ETMs. Les contaminants détectés et quantifiés dans la boue d'épuration comprennent ceux couramment recherchés : les **éléments traces métalliques**, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polychlorobiphényles ; et quelques émergents (les **résidus de médicaments** et les retardateurs de flamme bromés). Les analyses en résidus de médicaments ont permis d'élargir la base de données sur les classes de médicaments détectées et quantifiées dans les Mafors grâce au développement des techniques analytiques dans le cadre du programme RISMEAU.

Au cours de l'évaluation écotoxique des Mafors, la méthodologie s'est développée à travers la durée d'exposition des organismes du sol lors de bioessais en laboratoire. Dans un premier temps, les « **effets à court terme** » ont été analysés à l'aide de bioessais normés sur les microorganismes, les plantes et les vers de terre. La mise en place de cette batterie de bioessais a permis d'évaluer, à plusieurs niveaux trophiques, l'écotoxicité des Mafors. Les effets mesurés au cours de ces tests dépendent de l'organisme d'essai, du substrat d'essai, du type de Mafors et de la dose d'épandage appliquée dans les sols. Leurs écotoxicités ont ainsi pu être mises en évidence après de courtes expositions (< 14 jours) sur les plantes et les

vers de terre. Malgré la présence de contaminants variés et à fortes concentrations, la boue d'épuration présente une écotoxicité plus faible par rapport aux deux amendements agricoles et améliore la croissance des organismes exposés. Pour les deux Mafors d'origine agricole, le lisier est apparu comme le plus écotoxique sur les organismes d'essais. Toutefois, il est important de noter que ces effets écotoxiques pour les trois Mafors sont apparus seulement à des doses d'épandage élevées, doses non représentatives des pratiques agricoles.

Dans un second temps, l'application de tests « **à long terme** » a permis d'évaluer à plus faibles doses l'impact des Mafors sur les organismes exposés à des durées d'exposition plus longues. Avec ces doses d'épandage plus réalistes, l'application de ces tests à long terme met en évidence un **effet reprotoxique** sur les vers de terre exposés à des sols amendés en boue d'épuration et en lisier de vache. Cet effet reprotoxique est apparu à une teneur en Mafors identiques ($20 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MS}$) et a provoqué une inhibition de la reproduction de plus de 70 % pour les vers de terre exposés à ces deux Mafors. En plus de cette inhibition, les vers de terre montraient **une perturbation de leurs réserves énergétiques**. Toutefois, les résultats soulignent une fois de plus l'amélioration des propriétés fertilisantes du sol amendé en boue d'épuration. Les résultats obtenus durant ces bioessais mettent en avant la nécessité de mettre en place **plusieurs tests d'écotoxicité terrestre sur plusieurs modèles biologiques** et de croiser les résultats obtenus pour mieux évaluer l'impact de l'épandage de Mafors sur les écosystèmes agricoles. Le **test de reproduction sur les vers de terre** s'est montré efficace pour évaluer l'écotoxicité des Mafors.

Une deuxième méthode expérimentale a été développée avec le **test préliminaire d'encagement de vers de terre** pour évaluer l'écotoxicité des Mafors. Ce test préliminaire a fourni des résultats prometteurs pour améliorer la représentativité de l'étude écotoxicologique de l'épandage de Mafors. Ce nouveau bioessai *in situ* nécessitera encore un développement approfondi avant d'être opérationnel.

Enfin, le **transfert des polluants** a été évalué dans les vers de terre et les plantes afin d'identifier les polluants facilement **biodisponibles** dans les sols amendés. Cette évaluation a porté sur les éléments traces métalliques et les résidus de médicaments. L'analyse des vers de terre n'a pas mis en évidence le transfert des résidus de médicaments et une plus forte

bioaccumulation des éléments traces métalliques dans un sol amendé en Mafors. La détection et la quantification des résidus de médicaments dans les vers de terre nécessitent la poursuite du développement des procédures analytiques. Concernant les plantes, les mesures révèlent une augmentation de la concentration en zinc, oligo-élément important pour la croissance des plantes, dans leurs tissus lors de l'exposition à des sols amendés en boue d'épuration.

À partir des différents bioessais réalisés et des résultats acquis au cours des expérimentations, cette thèse aura permis le développement d'une démarche expérimentale dans le but d'évaluer l'écotoxicité sur les organismes terrestres à la suite d'un épandage de Mafors. Cette étude propose également une première estimation des **doses d'épandage limites** à ne pas dépasser pour garantir l'innocuité des Mafors vis-à-vis des organismes terrestres. Ces doses d'épandage limites se situent à 50 g.kg⁻¹ MS pour le fumier de vache et à 10 g.kg⁻¹ MS pour la boue d'épuration et le lisier de vache.

Suites à cette étude, les **perspectives** qui en découlent sont nombreuses. Les principales voies envisagées sont les suivantes :

(1) Dans notre étude, nous nous sommes focalisés principalement sur l'observation des impacts des Mafors sur le ver de terre à travers les marqueurs individuels et la bioaccumulation. Toutefois, les biomarqueurs sub-individuels sont également pertinents à être étudiés tels que le test de génotoxicité (dommage à l'ADN) et de biotransformation (activité enzymatique de détoxification). Ces biomarqueurs ont déjà prouvé leur sensibilité et donneraient de nouvelles informations sur l'écotoxicité des Mafors (Parelho et al., 2018).

(2) Les mesures de polluants dans les Mafors et les sols amendés ont été effectuées dans cette étude seulement sur les fractions dites « pseudo-totales ». La réalisation d'extraction chimiques simples et/ou séquentielles nous permettrait de mettre en avant notamment la fraction réellement biodisponible dans les matrices et susceptible d'être accumulée par les organismes.

(3) L'utilisation de nouvelles espèces de vers de terre présente l'intérêt d'améliorer la représentativité des effets écotoxiques des Mafors et de faire un « screening » plus large de leurs impacts. L'espèce *Aporrectodea caliginosa* est susceptible d'être utilisée dans ce type

de bioessais. Les partenaires du projet RISMEAU ont réalisé des bioessais en laboratoire sur cette espèce pour évaluer l'écotoxicité des Mafors, identiques à cette thèse.

(4) Il pourrait être également utile d'évaluer les impacts des épandages à d'autres échelles trophiques, en utilisant des organismes tels que les gastéropodes et les arthropodes. Les escargots présentent déjà des bioessais en laboratoire et d'encagement *in situ* (Louzon et al., 2022 ; Baroudi et al., 2020). De plus, les escargots et les collemboles ont déjà été utilisés dans les bioessais en laboratoire pour évaluer l'écotoxicité des Mafors (Courtois et al., 2021a ; Domene et al., 2011, 2008 ; Moreira et al., 2008).

(5) En pratique, les sols agricoles font office d'un épandage répétitif de Mafors sur des périodes longues. Pour une meilleure représentativité des effets écotoxiques, l'étude de sols agricoles amendés est nécessaire. Le projet RISMEAU étudie en parallèle le comportement des résidus de médicaments dans des sols recevant un épandage régulier de Mafors compartimentés par des lysimètres. Les sols issus de ces lysimètres, ayant donc subis plusieurs épandages, vont faire l'étude de bioessais en laboratoire dans le but d'évaluer leur écotoxicité sur les organismes terrestres. On peut également envisager de travailler sur des sols ayant reçus plusieurs années d'amendements organiques en prélevant des vers de terre *in situ* (« test moutarde »), d'encager nos vers de terre modèles sur site, ou d'utiliser ce sol *in vitro* pour en évaluer l'écotoxicité et le transfert potentiel de contaminants. Enfin, les données acquises pourraient être utilisées dans des modèles soit de prédiction de transfert ou d'évaluation du risque (type TERRASYS[®]), soit de chimie (type modèle BLM). Il pourrait également être effectué une prospection plus en détail du rôle de la matière organique et des interactions microbiennes qui sont des éléments clés de la mobilité potentielle des contaminants dans les Mafors comme le projet MEPSOM (Modélisation multi-échelle et propriétés émergentes de la dégradation microbienne des matières organiques dans le sol) porté par l'équipe ECOSYS de l'INRAE dans le cadre d'une ANR.

Bibliographie

Cette liste prend en compte les références citées dans le manuscrit, les articles et les annexes.

- Abiven, S., Menasseri, S., Chenu, C., 2009. The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability—A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.015>
- Acevedo-Barrios, R., Sabater-Marco, C., Olivero-Verbel, J., 2018. Ecotoxicological assessment of perchlorate using *in vitro* and *in vivo* assays. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 13697–13708. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1565-6>
- Achparaki, M., Thessalonikeos, E., Tsoukali, H., Mastrogianni, O., Zaggelidou, E., Chatzinikolaou, F., Vasiliades, N., Raikos, N., 2012. Heavy metals toxicity. *Aristotle University Medical Journal* 39, 29–34. <https://core.ac.uk/download/pdf/267932602.pdf>
- ADEME, 2021. Le guide « La méthanisation en 10 questions : une énergie prometteuse issue des matières organiques ». Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. <https://librairie.ademe.fr/produire-autrement/5026-la-methanisation-en-10-questions-9791029718694.html>
- ADEME, 2020. Déchets chiffres-clés : L'essentiel 2020. Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. <https://librairie.ademe.fr/dechets-economie-circulaire/4596-dechets-chiffres-cles-l-essentiel-2020.html>
- ADEME, 2018. Matières fertilisantes organiques : Gestion et épandage. Guide des bonnes pratiques. Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. <https://librairie.ademe.fr/dechets-economie-circulaire/1505-matieres-fertilisantes-organiques-gestion-et-epandage.html>
- ADEME, 2015a. Le compostage - Fiche technique. Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. <https://librairie.ademe.fr/dechets-economie-circulaire/2651-compostage-le-fiche-technique.html>
- ADEME, 2015b. La méthanisation - Fiche technique. Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. <https://librairie.ademe.fr/dechets-economie-circulaire/3258-methanisation-fiche-technique.html>
- ADEME, 2014. Substances “émergentes” dans les boues et composts de boues de stations d'épurations d'eaux usées collectives - Caractérisation et évaluation des risques sanitaires. Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. <https://librairie.ademe.fr/dechets-economie-circulaire/2883-substances-emergentes-dans-les-boues-et-composts-de-boues-de-stations-d-epurations-d-eaux-usees-collectives.html>
- Agrawal, S.B., Singh, A., Sharma, R.K., Agrawal, M., 2009. Bioaccumulation of heavy metals in vegetables: a threat to human health. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology* 1, 13–23. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0712/TAET_1\(1&2\)/TAET_1\(2\)13-23o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0712/TAET_1(1&2)/TAET_1(2)13-23o.pdf)
- Agreste, 2014. Enquête Pratiques culturelles 2011 - Grandes cultures et prairies. Agreste. <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/Dos21/detail/>
- Agreste, 2011. Recensement agricole 2010. Un élevage bovin orienté vers des fromages de qualité. Agreste. https://www.haute-savoie.gouv.fr/content/download/2857/14039/file/ra2010_Haute-Savoie.pdf
- Aladesanmi, O.T., Oroboade, J.G., Osisiogu, C.P., Osewole, A.O., 2019. Bioaccumulation factor of selected heavy metals in Zea mays. *Journal of Health and Pollution* 9, 191207. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191207>
- Alavi, N., Babaei, A.A., Shirmardi, M., Naimabadi, A., Goudarzi, G., 2015. Assessment of oxytetracycline and tetracycline antibiotics in manure samples in different cities of Khuzestan Province, Iran. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 17948–17954. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5002-9>
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Aznar, R., Tadeo, J.L., 2014. Determination of selected pharmaceutical compounds in biosolids by supported liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1336, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.020>

- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S.T., Qureshi, S.R., Wang, M.-Q., 2021. Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological Risks and human health implications. *Toxics* 9, 42. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Alloway, B.J., 2012. Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability (No. Ed. 3). Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7>
- Alloway, B.J., 2008. Zinc in soils and crop nutrition (No. Ed. 2). IZA Publications. International Zinc Association, Brussels. <https://www.topsoils.co.nz/wp-content/uploads/2014/09/Zinc-in-Soils-and-Crop-Nutrition-Brian-J.-Alloway.pdf>
- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J., Morais, M.-C., Cunha-Queda, C., 2015. Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Management* 40, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.027>
- 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. *Environment International* 33, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.006>
- AMORCE, 2019. Quelles solutions pour valoriser les boues d'épuration ? - Série technique. AMORCE. <https://amorce.asso.fr/publications/quelles-solutions-pour-valoriser-les-boues-d-epuration-eat05>
- Andaluri G, Suri RP, Kumar K (2012). Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environmental Monitoring and Assessment* 184:1197-1205. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2032-8>
- Andre, J., Charnock, J., Sturzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., Hodson, M.E., 2009. Accumulated metal speciation in earthworm populations with multigenerational exposure to metalliferous soils: cell fractionation and high-energy synchrotron analyses. *Environmental Science & Technology* 43, 6822–6829. <https://doi.org/10.1021/es900275e>
- Ankley, G.T., Benoit, D.A., Balogh, J.C., Reynoldson, T.B., Day, K.E., Hoke, R.A., 1994. Evaluation of potential confounding factors in sediment toxicity tests with three freshwater benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 627–635. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130412>
- ANSES, 2020. Antibiorésistance et environnement - État et causes possibles de la contamination des milieux en France, Rapport d'expertise collective. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>
- Antolín, M.C., Muro, I., Sánchez-Díaz, M., 2010. Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* 68, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.11.001>
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Gonçalves, F., 2004. Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Environmental Pollution* 127, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.08.015>
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008. *In situ* bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 620–631. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.007>
- Artuso, N., Kennedy, T.F., Connery, J., Grant, J., Schmidt, O., 2011. Effects of biosolids at varying rates on earthworms (*Eisenia fetida*) and springtails (*Folsomia candida*). *Applied and Environmental Soil Science* 2011, 10. <https://doi.org/10.1155/2011/519485>
- Aşık, B.B., Katkat, A.V., 2010. Evaluation of Waste Water Sludge for Possible Agricultural Use. *Environmental Engineering and Management Journal* 9, 819–826. <https://doi.org/10.30638/eemj.2010.109>
- Aydın, S., Ulvi, A., Bedük, F., Aydın, M.E., 2022. Pharmaceutical residues in digested sewage sludge: Occurrence, seasonal variation and risk assessment for soil. *Science of The Total Environment* 817, 152864. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152864>

- Bagner, A.J., Jensen, J., Krogh, P.H., 2000. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere* 40, 751–757. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00449-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00449-X)
- Baize, D., 2000. Teneurs totales en « métaux lourds » dans les sols français : résultats généraux du programme ASPITET. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA*, Paris : Institut national de la recherche agronomique Délégation permanente à l'environnement, 40, 39–54. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01203415/>
- Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y., 2009. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures. *Waste Management* 29, 1416–1423. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.08.022>
- Barber, R.S., Braude, R., Mitchell, K.G., 1965. Studies on various potential growth stimulants for growing pigs with particular reference to their activity in supplementing that of copper sulphate. *British Journal of Nutrition* 19, 575–579. <https://doi.org/doi:10.1079/BJN19650051>
- Baroudi, F., Alam, J.A., Fajloun, Z., Millet, M., 2020. Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. *Ecological Indicators* 113, 106240. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106240>
- Barré, P., McKenzie, B.M., Hallett, P.D., 2009. Earthworms bring compacted and loose soil to a similar mechanical state. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 656–658. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.12.015>
- Barrera, I., Andrés, P., Alcañiz, J.M., 2001. Sewage Sludge Application on Soil: Effects on Two Earthworm Species. *Water, Air, and Soil Pollution* 129, 319–332. <https://doi.org/10.1023/A:1010335816237>
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., Soulas, G., 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et Gestion des Sols*, Association Française pour l'Etude des Sols, 3, 279–295. <https://hal.inrae.fr/hal-02698024>
- Bart, S., Amossé, J., Lowe, C.N., Mougin, C., Péry, A.R.R., Pelosi, C., 2018. *Aporrectodea caliginosa*, a relevant earthworm species for a posteriori pesticide risk assessment: current knowledge and recommendations for culture and experimental design. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 33867–33881. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2579-9>
- Bartlett, M.D., Briones, M.J., Neilson, R., Schmidt, O., Spurgeon, D., Creamer, R.E., 2010. A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. *European Journal of Soil Biology* 46, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.11.006>
- Barton, M.D., 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews* 13, 279–299. <https://doi.org/10.1079/095442200108729106>
- Beaumelle, L., Hedde, M., Vandenbulcke, F., Lamy, I., 2017. Relationships between metal compartmentalization and biomarkers in earthworms exposed to field-contaminated soils. *Environmental Pollution* 224, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.078>
- Becker, L., Scheffczyk, A., Förster, B., Oehlmann, J., Princz, J., Römbke, J., Moser, T., 2011. Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. *Journal of Soils and Sediments* 11, 238–248. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0282-7>
- Benckiser, G., 1997. *Fauna in soil ecosystems: recycling processes, nutrient fluxes, and agricultural production* (No. Ed. 1). CRC Press, New York. <https://doi.org/10.1201/9781482273571>
- Bertrand-Krajewski, J.-L., Bournique, R., Lecomte, V., Pernin, N., Wiest, L., Bazin, C., Bouchez, A., Brelot, E., Cournoyer, B., Chonova, T., Dagot, C., Majo, P.D., Gonzalez-Ospina, A., Klein, A., Labanowski, J., Lévi, Y., Perrodin, Y., Rabello-Vargas, S., Reuilly, L., Roch, A., Wahl, A., 2022. SIPIBEL observatory: Data on usual pollutants (solids, organic matter, nutrients, ions) and micropollutants (pharmaceuticals, surfactants, metals), biological and ecotoxicity indicators in hospital and urban wastewater, in treated effluent and sludge from wastewater treatment plant, and in surface and groundwater. *Data in Brief* 40, 107726. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107726>
- Bharti, R., Sharma, R., 2021. Effect of heavy metals: An overview. *Materials Today: Proceedings* 51, 880-885. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.278>
- Bhat, S.A., Singh, J., Vig, A.P., 2018. Earthworms as Organic Waste Managers and Biofertilizer Producers. *Waste and Biomass Valorization* 9, 1073–1086. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9899-8>

- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., Zappalà, L., 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere* 87, 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.082>
- Bliefert, C., Perraud, R., 2007. *Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets* (No. Ed. 2). De Boeck Superieur, Paris.
<https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804159450-chimie-de-l-environnement>
- Bloem, E., Albiñ, A., Elving, J., Hermann, L., Lehmann, L., Sarvi, M., Schaaf, T., Schick, J., Turtola, E., Ylivainio, K., 2017. Contamination of organic nutrient sources with potentially toxic elements, antibiotics and pathogen microorganisms in relation to P fertilizer potential and treatment options for the production of sustainable fertilizers: A review. *Science of The Total Environment* 607–608, 225–242.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.274>
- Blott, S.J., Pye, K., 2001. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surface Processes and Landforms* 26, 1237–1248.
<https://doi.org/10.1002/esp.261>
- Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Pérès, G., Tondoh, J.E., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* 64, 161–182. <https://doi.org/10.1111/ejss.12025>
- Bonanomi, G., d'Ascoli, R., Scotti, R., Gaglione, S.A., Caceres, M.G., Sultana, S., Scelza, R., Rao, M.A., Zoina, A., 2014. Soil quality recovery and crop yield enhancement by combined application of compost and wood to vegetables grown under plastic tunnels. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 192, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.029>
- Bottinelli, N., Capowicz, Y., 2021. Earthworm ecological categories are not functional groups. *Biology and Fertility of Soils* 57, 329–331. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01517-1>
- Bouallegue, M., 2011. Des métaux dans les boues de stations d'épuration ? Conséquences, origines et prévention. AgroParisTech, Montpellier. <https://www.pseau.org/outils/biblio/resume.php?d=5459>
- Bouché, M.B., 1977. Stratégies lombriciennes. *Ecological Bulletins* 25, 122–132.
<https://www.jstor.org/stable/20112572>
- Bouché, M.B., 1972. *Lombriciens de France. Ecologie et systématique*. INRA Editions. *Annales de Zoologie*. 72-2.
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02859798>
- Bourdat-Deschamps, M., Ferhi, S., Bernet, N., Feder, F., Crouzet, O., Patureau, D., Montenach, D., Moussard, G.D., Mercier, V., Benoit, P., Houot, S., 2017. Fate and impacts of pharmaceuticals and personal care products after repeated applications of organic waste products in long-term field experiments. *Science of The Total Environment* 607–608, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.240>
- Bourioug, M., Alaoui-Sehmer, L., Laffray, X., Benbrahim, M., Aleya, L., Alaoui-Sossé, B., 2015. Sewage sludge fertilization in larch seedlings: effects on trace metal accumulation and growth performance. *Ecological Engineering* 77, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.01.031>
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>
- Brown, G.G., Callahan Jr, M.A., Niva, C.C., Feijoo, A., Sautter, K.D., James, S.W., Fragoso, C., Pasini, A., Schmelz, R.M., 2013. Terrestrial oligochaete research in Latin America: the importance of the Latin American meetings on oligochaete ecology and taxonomy. *Applied Soil Ecology* 69, 2–12.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.006>
- Bundy, J.G., Sidhu, J.K., Rana, F., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Wren, J.F., Stürzenbaum, S.R., Morgan, A.J., Kille, P., 2008. "Systems toxicology" approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC Biology* 6, 1–21.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-25>
- Burtelow, A.E., Bohlen, P.J., Groffman, P.M., 1998. Influence of exotic earthworm invasion on soil organic matter, microbial biomass and denitrification potential in forest soils of the northeastern United States. *Applied Soil Ecology* 9, 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00075-4)

- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part: Comparative Pharmacology* 100, 3–6. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90110-f](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90110-f)
- Cang, L., Wang, Y., Zhou, D., Dong, Y., 2004. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China. *Journal of Environmental Sciences* 16, 371–374. PMID: 15272705
- Capowiez, Y., Decaëns, T., Hedde, M., Mardsen, C., Jouquet, P., Marchan, D.F., Nahmani, J., Pélosi, C., Bottinelli, N., 2022. Faut-il continuer à utiliser les catégories écologiques de vers de terre définies par Marcel Bouché il y a 50 ans ? : une vision historique et critique. *Etude et Gestion des Sols, Association Française pour l'Etude des Sols* 29, 51–58. <https://hal-univ-avignon.archives-ouvertes.fr/hal-03744197>
- Capowiez, Y., Rault-Léonardon, M., Mazzia, C., Lhoutelier, C., Houot, S., 2009. Étude des effets des apports de produits résiduels organiques sur la macrofaune lombricienne en conditions de grandes cultures. *Etude et gestion des sols Association Française pour l'Etude des Sols* 16, 175–185. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01192277>
- Capowiez, Y., Sammartino, S., Michel, E., 2014. Burrow systems of endogeic earthworms: Effects of earthworm abundance and consequences for soil water infiltration. *Pedobiologia* 57, 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.04.001>
- Caracciolo, A.B., Topp, E., Grenni, P., 2015. Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 106, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>
- Carballo, M., Esperón, F., Sacristán, C., González, M., Vázquez, B., Aguayo, S., de la Torre, A., 2013. Occurrence of tetracycline residues and antimicrobial resistance in gram negative bacteria isolates from cattle farms in Spain. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4, 295-303. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.42A040>
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1309–1319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.007>
- Carter, L.J., Garman, C.D., Ryan, J., Dowle, A., Bergström, E., Thomas-Oates, J., Boxall, A.B., 2014. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil–earthworm systems. *Environmental Science & Technology* 48, 5955–5963. <https://doi.org/10.1021/es500567w>
- Carter, L.J., Ryan, J.J., Boxall, A.B., 2016. Effects of soil properties on the uptake of pharmaceuticals into earthworms. *Environmental Pollution* 213, 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.044>
- Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment international* 94, 736–757. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Černá, T., Ezechiáš, M., Semerád, J., Grasserová, A., Cajthaml, T., 2022. Evaluation of estrogenic and antiestrogenic activity in sludge and explanation of individual compound contributions. *Journal of Hazardous Materials* 423, 127108. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127108>
- Chakraborty, A., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., Ghosh, S., 2011. Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 47, 227–233. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0509-1>
- Chang, A.C., Warneke, J.E., Page, A.L., Lund, L.J., 1984. Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. *Journal of Environmental Quality* 13, 87–91. <https://doi.org/10.2134/jeq1984.00472425001300010016x>
- Chassin, P., Baize, D., Cambier, P., Sterckeman, T., 1996. Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. Impact à moyen et à long terme. *Etude et Gestion des Sols, Association Française pour l'Etude des Sols* 3-4, 297–306. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02698218/>

- Chen, Y., Zhang, H., Luo, Y., Song, J., 2012. Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: a case study in East China. *Chinese Science Bulletin* 57, 606–614. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4830-3>
- Chevillot, F., Guyot, M., Desrosiers, M., Cadoret, N., Veilleux, É., Cabana, H., Bellenger, J.-P., 2018. Accumulation and sublethal effects of triclosan and its transformation product methyl-triclosan in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to environmental concentrations in an artificial soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 1940–1948. <https://doi.org/10.1002/etc.4156>
- Cheviron, N., Grondin, V., Marraud, C., Poiroux, F., Bertrand, I., Abadie, J., Pandard, P., Riah-Anglet, W., Dubois, C., Malý, S., 2022. Inter-laboratory validation of an ISO test method for measuring enzyme activities in soil samples using colorimetric substrates. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 29348–29357. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17173-3>
- Clarke, B.O., Porter, N.A., Marriott, P.J., Blackbeard, J.R., 2010. Investigating the levels and trends of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl in sewage sludge. *Environment International* 36, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.01.004>
- Coelho, C., Foret, C., Bazin, C., Leduc, L., Hammada, M., Inácio, M., Bedell, J.P., 2018. Bioavailability and bioaccumulation of heavy metals of several soils and sediments (from industrialized urban areas) for *Eisenia fetida*. *Science of the Total Environment* 635, 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.213>
- Coelho, C.F.M., 2019. Transfer and effects of brominated flame retardants (BFRs) on three plant species and one earthworm species in anthroposols. Thèse de doctorat. Université de Lyon. English. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02420943>.
- Collivignarelli, M.C., Abbà, A., Frattarola, A., Carnevale Miino, M., Padovani, S., Katsoyiannis, I., Torretta, V., 2019. Legislation for the Reuse of Biosolids on Agricultural Land in Europe: Overview. *Sustainability* 11, 6015. <https://doi.org/10.3390/su11216015>
- Contreras-Ramos, S.M., Alvarez-Bernal, D., Dendooven, L., 2009. Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with sewage sludge or vermicompost. *Applied Soil Ecology* 41, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.11.008>
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology* 35, 115–134. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)00116-3)
- Cortez, J., Billes, G., Bouché, M.B., 2000. Effect of climate, soil type and earthworm activity on nitrogen transfer from a nitrogen-15-labelled decomposing material under field conditions. *Biology and Fertility of Soils* 30, 318–327. <https://doi.org/10.1007/s003740050010>
- Courtois, P., de Vaufleury, A., Grosser, A., Lors, C., Vandenbulcke, F., 2021a. Transfer of sulfidized silver from silver nanoparticles, in sewage sludge, to plants and primary consumers in agricultural soil environment. *Science of The Total Environment* 777, 145900. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145900>
- Courtois, P., Rorat, A., Lemiere, S., Guyoneaud, R., Attard, E., Longepierre, M., Rigal, F., Levard, C., Chaurand, P., Grosser, A., Grobelak, A., Kacprzak, M., Lors, C., Richaume, A., Vandenbulcke, F., 2021b. Medium-term effects of Ag supplied directly or via sewage sludge to an agricultural soil on *Eisenia fetida* earthworm and soil microbial communities. *Chemosphere* 269, 128761. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128761>
- Cucina, M., De Nisi, P., Sordi, S., Adani, F., 2021. Sewage Sludge as N-Fertilizers for Crop Production Enabling the Circular Bioeconomy in Agriculture: A Challenge for the New EU Regulation 1009/2019. *Sustainability* 13, 13165. <https://doi.org/10.3390/su132313165>
- Cucina, M., Ricci, A., Zadra, C., Pezzolla, D., Tacconi, C., Sordi, S., Gigliotti, G., 2019. Benefits and risks of long-term recycling of pharmaceutical sewage sludge on agricultural soil. *Science of The Total Environment* 695, 133762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133762>

- Daghrir, R., Drogui, P., 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters* 11, 209–227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
- Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J.H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F., Nahmani, J., Lavelle, P., 2004. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.09.001>
- De Liguoro, M., Cibir, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C., 2003. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52, 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00284-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00284-4)
- De Vaufléury, A., Cœurassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.-M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 25, 797–806. <https://doi.org/10.1897/04-560R.1>
- De Vaufléury, A., Gimbert, F., 2013. Bioaccumulation, bioamplification des polluants dans la faune terrestre - Un outil pour la biosurveillance des écosystèmes : Un outil pour la biosurveillance des écosystèmes. EDP sciences, ADEME. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00926217>
- Desjardins, T., Charpentier, F., Pashanasi, B., Pando-Bahuon, A., Lavelle, P., Mariotti, A., 2003. Effects of earthworm inoculation on soil organic matter dynamics of a cultivated ultisol: the 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia* 47, 835–841. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00268>
- Díaz-Cruz, M.S., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22, 340–351. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4)
- Díaz-Cruz, M.S., García-Galán, M.J., Guerra, P., Jelic, A., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M.J., Petrovic, M., Barceló, D., Petrovic, M., Barceló, D., 2009. Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28, 1263–1275. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.003>
- Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S., 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *Journal of Environmental Quality* 37, 1245–1253. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0399>
- Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S., 2007. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of environmental quality* 36, 1224–1230. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0266>
- Domene, X., Ramírez, W., Mattana, S., Alcaniz, J.M., Andrés, P., 2008. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. *Environmental Pollution* 155, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.12.001>
- Domene, X., Solà, L., Ramírez, W., Alcañiz, J.M., Andrés, P., 2011. Soil bioassays as tools for sludge compost quality assessment. *Waste Management* 31, 512–522. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.10.013>
- Dominguez, J., Edwards, C.A., 2010. Biology and Ecology of Earthworms Species used for Vermicomposting. In: Edwards, C. A., Arancon, N.Q., Sherman, R.L. (Eds.), *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Waste and Environmental Management*. CRC Press, Boca Raton, pp. 25–37. ISBN-10: 9781032237121
- Dong, L., Gao, J., Xie, X., Zhou, Q., 2012. DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 89, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.010>
- Duarte-Davidson, R., Jones, K.C., 1996. Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludge applied to agricultural soils: II. The potential for transfers to plants and grazing animals. *Science of the Total Environment* 185, 59–70. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05042-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05042-5)
- Durães, N., Novo, L.A., Candeias, C., Da Silva, E.F., 2018. Distribution, transport and fate of pollutants, in: Duarte, A.C., Cachada, A., Rocha-Santos, T.A. (Eds.), *Soil Pollution: From Monitoring to Remediation*. Elsevier/Academic Press, pp. 29–57. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-02243-X>
- EC, 1986. European Commission. 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, 6-12. <http://data.europa.eu/eli/dir/1986/278/oj>

- Eden, M., Gerke, H.H., Houot, S., 2017. Organic waste recycling in agriculture and related effects on soil water retention and plant available water: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 37, 11. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0419-9>
- Edwards, C.A., 1997. *Earthworm ecology* (No. Ed. 1). CRC press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781482285246>
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and ecology of earthworms* (No. Ed. 3). Chapman & Hall, London. ISBN-10: 0412561603
- Edwards, Clive A., 1988. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms, in: Edwards, C. A., Neuhauser, E.F. (Eds.), *Earthworms in Waste and Environmental Management*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 21–31.
- Fan, Z., Wu, S., Chang, H., Hu, J., 2011. Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: comparison to estrogens. *Environmental Science & Technology* 45, 2725–2733. <https://doi.org/10.1021/es103429c>
- FDT, 1996. Essais des eaux - Dosage de dix éléments métalliques (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Ag, Cd, Pb) par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme. Méthodes de dosage directe et après complexation et extraction. FDT 90-112. Association Française de Normalisation. Paris. France.
- Fent, K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205, 223–240. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.060>
- Figueroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A., 2010. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere* 79, 786–793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.017>
- Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak, M.J., 2017. The presence of contaminations in sewage sludge – The current situation. *Journal of Environmental Management* 203, 1126–1136. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.068>
- Filser, J., Wiegmann, S., Schröder, B., 2014. Collembola in ecotoxicology—Any news or just boring routine? *Applied Soil Ecology* 83, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.007>
- Flack, F.M., Hartenstein, R., 1984. Growth of the earthworm *Eisenia foetida* on microorganisms and cellulose. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 491–495. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90057-9)
- Flegel, M., Schrader, S., 2000. Importance of food quality on selected enzyme activities in earthworm casts (*Dendrobaena octaedra*, Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1191–1196. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00035-3)
- Foged, H., Flotats Ripoll, X., Bonmatí Blasi, A., Palatsi Civit, J., Magrí Aloy, A., Schelde, K.M., 2012. Inventory of manure processing activities in Europe. Technical Report No. I concerning “Manure Processing Activities in Europe” to the European Commission, Directorate-General Environment. <http://hdl.handle.net/2117/18943>
- Gabriel, M.C., Williamson, D.G., 2004. Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. *Environmental Geochemistry and Health* 26, 421–434. <https://doi.org/10.1007/s10653-004-1308-0>
- Gaillot, B., Lavarde, P., 2015. Les épandages sur terres agricoles des matières fertilisantes d'origine résiduaire - Mission prospectives sur les modalités d'encadrement et de suivi réglementaire. Conseil général de l'environnement et du développement durable et Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux. https://agriculture.gouv.fr/sites/default/files/cgaaer_14074_2015_rapport.pdf
- Gao, Y., Sun, X., Sun, Z., Zhao, N., Li, Y., 2008. Toxic effects of enrofloxacin on growth rate and catalase activity in *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26, 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.004>
- Gao, Y., Sun, Z., Sun, X., Bao, Y., 2007. Toxic effect of olaquinox antibiotic on *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology* 43, S252–S255. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.047>

- Garg, V.K., Yadav, Y.K., Sheoran, A., Chand, S., Kaushik, P., 2006. Livestock excreta management through vermicomposting using an epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Environmentalist* 26, 269–276. <https://doi.org/10.1007/s10669-006-8641-z>
- Gill, M., 2014. Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of advanced Research* 2, 1043–1055.
- Głąb, T., Żabiński, A., Sadowska, U., Gondek, K., Kopeć, M., Mierzwa–Hersztek, M., Tabor, S., 2018. Effects of co-composted maize, sewage sludge, and biochar mixtures on hydrological and physical qualities of sandy soil. *Geoderma* 315, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.11.034>
- Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W., 2002. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* 74, 5455–5462. <https://doi.org/10.1021/ac025762m>
- Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A.C., Giger, W., 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science & Technology* 37, 3243–3249. <https://doi.org/10.1021/es0264448>
- Gomes, A.R., Justino, C., Rocha-Santos, T., Freitas, A.C., Duarte, A.C., Pereira, R., 2017. Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazard Substances and Environmental Engineering* 52, 992–1007. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1328946>
- Gomiero, T., Pimentel, D., Paoletti, M.G., 2011. Is There a Need for a More Sustainable Agriculture? *Critical Reviews in Plant Sciences* 30, 6–23. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.553515>
- González, V., Díez-Ortiz, M., Simón, M., van Gestel, C.A., 2013. Assessing the impact of organic and inorganic amendments on the toxicity and bioavailability of a metal-contaminated soil to the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 8162–8171. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1773-z>
- Goss, M.J., Tubeileh, A., Goorahoo, D., 2013. Chapter Five - A Review of the Use of Organic Amendments and the Risk to Human Health, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 275–379. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407686-0.00005-1>
- Gothwal, R., Shashidhar, T., 2015. Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean - Soil, Air, Water* 43, 479–489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>
- Gottschall, N., Topp, E., Metcalfe, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., Lapen, D.R., 2012. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* 87, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.018>
- Grieshaber, C.A., Cope, W.G., Kwak, T.J., Penland, T.N., Heise, R.J., Mac Law, J., 2021. Survival and Contaminants in Imperiled and Common Riverine Fishes Assessed with an In Situ Bioassay Approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40, 2206–2219. <https://doi.org/10.1002/etc.5104>
- Gros, M., Mas-Pla, J., Boy-Roura, M., Geli, I., Domingo, F., Petrović, M., 2019. Veterinary pharmaceuticals and antibiotics in manure and slurry and their fate in amended agricultural soils: Findings from an experimental field site (Baix Empordà, NE Catalonia). *Science of The Total Environment* 654, 1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.061>
- Guironnet, A., 2021. Développements méthodologiques autour du couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse, pour la quantification de composés vétérinaires présents à l'état de traces dans des matrices complexes environnementales. Thèse de doctorat. Université de Lyon. Français. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03716251>.
- Guironnet, A., Sanchez-Cid, C., Vogel, T.M., Wiest, L., Vulliet, E., 2021. Aminoglycosides analysis optimization using ion pairing liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and application on wastewater samples. *Journal of Chromatography A* 1651, 462133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462133>

- Gunadi, B., Edwards, C., 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. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00196>
- Gunadi, B., Edwards, C.A., Blount IV, C., 2003. The influence of different moisture levels on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle and pig manure solids. *European Journal of Soil Biology* 39, 19–24. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(02)00005-5)
- Guo, T., Lou, C., Zhai, W., Tang, X., Hashmi, M.Z., Murtaza, R., Li, Y., Liu, X., Xu, J., 2018. Increased occurrence of heavy metals, antibiotics and resistance genes in surface soil after long-term application of manure. *Science of the Total Environment* 635, 995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.194>
- Gutser, R., Ebertseder, T., Weber, A., Schraml, M., Schmidhalter, U., 2005. Short-term and residual availability of nitrogen after long-term application of organic fertilizers on arable land. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 439–446. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520510>
- Hammoudani, Y.E., Dimane, F., Ouarghi, H.E., 2019. Characterization of sewage sludge generated from wastewater treatment plant in relation to agricultural use. *Environmental and Water Sciences, Public Health & Territorial Intelligence* 3, 47–52. <https://doi.org/10.48421/IMIST.PRSM/ewash-ti-v3i1.15085>
- Hamscher, G., Abu-Quare, A., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H., 2000. Determination of tetracyclines and tylosin in soil and water samples from agricultural areas in lower Saxony, in: *Proceedings of the Euroresidue IV Conference*, Veldhoven, Netherlands. pp. 8–10.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., 2005. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 861–868. <https://doi.org/10.1897/04-182R.1>
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H., 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 1509–1518. <https://doi.org/10.1021/ac015588m>
- Hanna, K., 2004. Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse de doctorat. Institut national de sciences appliquées. Français. <http://docinsa.insa-lyon.fr/these/2004/hanna/these.pdf>
- Harms, K., Bauer, J., 2011. Detection and occurrence of antibiotics and their metabolites in pig manure in Bavaria (Germany), in: Montforts, M.H.M.M., Keen, P.L. (Eds.), *Antimicrobial Resistance in the Environment*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 291–307. ISBN: 978-0-470-90542-5
- Hassine, A.I.H., 2014. Evaluation de l'activité oestrogénique de contaminants et développement d'un bio-récepteur d'affinité pour la détection d'une xéno-hormone. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. Français. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01087277/>
- Heger, Z., Michalek, P., Guran, R., Havelkova, B., Kominkova, M., Cernei, N., Richtera, L., Beklova, M., Adam, V., Kizek, R., 2015. Exposure to 17 β -Oestradiol induces oxidative stress in the non-oestrogen receptor invertebrate species *Eisenia fetida*. *Public Library of Science One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145426>
- Heikens, A., Peijnenburg, W., Hendriks, A.J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* 113, 385–393. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00179-2)
- Helling, B., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2000. Effects of the fungicide copper oxochloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 108–116. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1880>
- Hernandez-Soriano, M.C., 2012. *Soil Health and Land Use Management*. IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/2516>
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Abbott Chalew, T.E., Halden, R.U., Hundal, L.S., 2011. Persistence of triclocarban and triclosan in soils after land application of biosolids and bioaccumulation in *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 556–563. <https://doi.org/10.1002/etc.416>

- Ho, Y.B., Zakaria, M.P., Latif, P.A., Saari, N., 2013. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. *Bioresource Technology* 131, 476–484.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.194>
- Hoese, A., Clay, S.A., Clay, D.E., Oswald, J., Trooien, T., Thaler, R., Carlson, C.G., 2009. Chlortetracycline and tylosin runoff from soils treated with antimicrobial containing manure. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 44, 371–378.
<https://doi.org/10.1080/03601230902801075>
- Hojati, S., Nourbakhsh, F., 2009. Distribution of β -Glucosidase activity within aggregates of a soil amended with organic fertilizers. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4, 179–186.
<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=da71a3135386c6bc3f473bb77450fd629f3b105d>
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York. ISBN 1-85166-312-6
- Hossain, M.Z., Von Fragstein, P., Von Niemsdorff, P., Heß, J., 2017. Effect of different organic wastes on soil properties and plant growth and yield: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica* 48, 224–237.
- Hou, J., Wan, W., Mao, D., Wang, C., Mu, Q., Qin, S., Luo, Y., 2015. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4545–4554.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3632-y>
- Houot, S., Cambier, P., Benoit, P., Bodineau, G., Deschamps, M., Jaulin, A., Lhoutellier, C., Barriuso, E., 2009. Effet d'apports de composts sur la disponibilité de micropolluants métalliques et organiques dans un sol cultivé. *Etude et Gestion des Sols, Association Française pour l'Etude des sols* 16, 255–274.
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01192194/>
- Houot, S., Pons, M.-N., Pradel, M., Tibi, A., Aubry, C., Augusto, L., Barbier, R., Benoit, P., Brugère, H., Caillaud, M.A., Casellas, M., Chatelet, A., Dabert, P., Mareschal, S. de, Doussan, I., Etrillard, C., Fuchs, J., Générumont, S., Giamberini, L., Hélias, A., Jardé, E., Perchec, S.L., Lupton, S., Marron, N., Menasseri-Aubry, S., Mollier, A., Morel, C., Mougou, C., Nguyen, C., Parnaudeau, V., Patureau, D., Pourcher, A.-M., Rychen, G., Savini, I., Smolders, E., Topp, E., Vieublé, L., Viguié, C., 2014. Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier (report). Ministère de l'Agriculture.
<https://doi.org/10.15454/2jrt-ec49>
- Hu, X., Shi, W., Wei, S., Zhang, X., Yu, H., 2021. Identification of (anti-) androgenic activities and risks of sludges from industrial and domestic wastewater treatment plants. *Environmental Pollution* 268, 115716.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115716>
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution* 158, 2992–2998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.023>
- Huang, H., Zhang, S., Christie, P., Wang, S., Xie, M., 2010. Behavior of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in the soil–plant system: uptake, translocation, and metabolism in plants and dissipation in soil. *Environmental Science & Technology* 44, 663–667. <https://doi.org/10.1021/es901860r>
- Huang, R., Wen, B., Pei, Z., Shan, X.-Q., Zhang, S., Williams, P.N., 2009. Accumulation, subcellular distribution and toxicity of copper in earthworm (*Eisenia fetida*) in the presence of ciprofloxacin. *Environmental Science & Technology* 43, 3688–3693. <https://doi.org/10.1021/es900061t>
- Huguier, P., Manier, N., Chabot, L., Bauda, P., Pandard, P., 2015. Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: Towards a proposal of a suitable test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.017>
- Iglesias, M., Marguá, E., Camps, F., Hidalgo, M., 2018. Extractability and crop transfer of potentially toxic elements from mediterranean agricultural soils following long-term sewage sludge applications as a fertilizer replacement to barley and maize crops. *Waste Management* 75, 312–318.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.01.024>

- INERIS, 2007. Base scientifique de l'évaluation des risques sanitaires relatifs aux agents pathogènes (Convention ADEME : Evaluation des risques sanitaires des filières d'épandage des boues de stations d'épuration). Institut national de l'environnement industriel et des risques. <https://www.ineris.fr/fr/base-scientifique-evaluation-risques-sanitaires-relatifs-agents-pathogenes-convention-ademe>
- ISO, 2020a. Qualité du sol - Détermination des effets toxiques des polluants sur la germination et les premiers stades de croissance des végétaux supérieurs. ISO 18763. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2020b. Qualité du sol - Essai d'évitement pour contrôler la qualité des sols et les effets des produits chimiques sur le comportement - Partie 1 : Essai avec des vers de terre (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2018a. Sols, biodéchets traités et boues - Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie liquide à haute performance. ISO 16181. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2018b. Qualité du sol - Mesure de l'activité enzymatique dans des échantillons de sol en utilisant des substrats colorimétriques. ISO 20130. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2015a. 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 11268-2. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2015b. 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 11268-1. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2013. 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 11269-2. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2005. Qualité du sol - Détermination du pH. ISO 10390. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2004. Qualité de l'eau - Dosage des éléments traces par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite. ISO 15586. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 2002. Qualité de l'eau - Détermination de l'indice de demande chimique en oxygène (ST-DCO) - Méthode à petite échelle en tube fermé. ISO 15705. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 1995. Qualité du sol - Détermination de la conductivité électrique spécifique. ISO 11265. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- ISO, 1994. Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau. Méthode gravimétrique. ISO 11465. Organisation International de normalisation, Genève, Suisse.
- Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., 2006. Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 1164–1174. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0261-9>
- Jager, T., Fleuren, R.H., Hogendoorn, E.A., De Korte, G., 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environmental Science & Technology* 37, 3399–3404. <https://doi.org/10.1021/es0340578>
- Jamieson, B.G., Ferraguti, M., 2006. Non-leech clitellata, in: Jamieson, B.G. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Annelida*. CRC Press, Boca Raton, pp. 235–392. <https://doi.org/10.1201/9781482280159>
- Jamil, M., Qasim, M., Umar, M., 2006. Utilization of Sewage Sludge as Organic Fertiliser in Sustainable Agriculture. *Journal of Applied Sciences* 6, 531–535. <https://doi.org/10.3923/jas.2006.531.535>
- Jarvis, S.C., Jones, L.H.P., Hopper, M.J., 1976. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots, in: Ducker, A. (Ed.), In: Drucker H, Wildung RE (Eds) *Biological implications of metals in the environment*, Richland, Washington. Technical Information Center, Energy Research and Development Administration, pp. 179–191.

- Jenne, E.A., Luoma, S.N., 1977. Forms of trace elements in soils, sediments, and associated waters: an overview of their determination and biological availability, In: Drucker H, Wildung RE (Eds) Biological implications of metals in the environment, Richland, Washington. Technical Information Center, Energy Research and Development Administration, pp. 110–143.
- Jesus, F.T., Oliveira, R., Silva, A., Catarino, A.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Domingues, I., 2013. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology* 22, 1348–1358. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1121-6>
- Jimenez, J., Aemig, Q., Doussiet, N., Steyer, J.-P., Houot, S., Patureau, D., 2015. A new organic matter fractionation methodology for organic wastes: Bioaccessibility and complexity characterization for treatment optimization. *Bioresource Technology* 194, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.037>
- Jimenez, J., Gonidec, E., Rivero, J.A.C., Latrille, E., Vedrenne, F., Steyer, J.-P., 2014. Prediction of anaerobic biodegradability and bioaccessibility of municipal sludge by coupling sequential extractions with fluorescence spectroscopy: towards ADM1 variables characterization. *Water Research* 50, 359–372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.048>
- Jimenez, J., Lei, H., Steyer, J.-P., Houot, S., Patureau, D., 2017. Methane production and fertilizing value of organic waste: Organic matter characterization for a better prediction of valorization pathways. *Bioresource Technology* 241, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.176>
- Jin, C., Chen, Q., Sun, R., Zhou, Q., Liu, J., 2009. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. *Ecotoxicology* 18, 878–885. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0349-7>
- Jones, A.D., Bruland, G.L., Agrawal, S.G., Vasudevan, D., 2005. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 761–770. <https://doi.org/10.1897/04-037R.1>
- Juste, C., Chassin, P., Gomez, A., Linères, M., Mocquot, B., 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. <https://hal.inrae.fr/view/index/identifiant/hal-02849231>
- Justino, C.I., Duarte, K.R., Freitas, A.C., Panteleitchouk, T.S., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A., 2016. Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.014>
- Kader, M.A., Yeasmin, S., Solaiman, Z.M., De Neve, S., Sleutel, S., 2017. Response of hydrolytic enzyme activities and nitrogen mineralization to fertilizer and organic matter application in subtropical paddy soils. *European Journal of Soil Biology* 80, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.03.004>
- Karçı, A., Balçioğlu, İ.A., 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of The Total Environment* 407, 4652–4664. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.047>
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B., 2004. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1136–1144. <https://doi.org/10.1897/03-374>
- Kelessidis, A., Stasinakis, A.S., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management* 32, 1186–1195. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.01.012>
- Khaliq, A., Abbasi, M.K., 2015. Improvements in the physical and chemical characteristics of degraded soils supplemented with organic–inorganic amendments in the Himalayan region of Kashmir, Pakistan. *CATENA* 126, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.11.015>
- Kim, K.-R., Owens, G., Kwon, S.-I., So, K.-H., Lee, D.-B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air, & Soil Pollution* 214, 163–174. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0412-2>

- Kinney, C.A., Campbell, B.R., Thompson, R., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Hay, A.G., 2012. Earthworm bioassays and seedling emergence for monitoring toxicity, aging and bioaccumulation of anthropogenic waste indicator compounds in biosolids-amended soil. *Science of The Total Environment* 433, 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.097>
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Bossio, J.P., Benotti, M.J., 2008. Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environmental Science & Technology* 42, 1863–1870. <https://doi.org/10.1021/es702304c>
- Kızılkaya, R., 2004. Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecological Engineering* 22, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2004.04.002>
- Knight, J.A., Anderson, S., Rawle, J.M., 1972. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chemistry* 18, 199–202. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.3.199>
- Kodešová, R., Klement, A., Golovko, O., Fér, M., Kočárek, M., Nikodem, A., Grabic, R., 2019. Soil influences on uptake and transfer of pharmaceuticals from sewage sludge amended soils to spinach. *Journal of Environmental Management* 250, 109407. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109407>
- Kominko, H., Gorazda, K., Wzorek, Z., 2022. Effect of sewage sludge-based fertilizers on biomass growth and heavy metal accumulation in plants. *Journal of Environmental Management* 305, 114417. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114417>
- Kończak, M., Oleszczuk, P., 2018. Application of biochar to sewage sludge reduces toxicity and improve organisms growth in sewage sludge-amended soil in long term field experiment. *Science of The Total Environment* 625, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.118>
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W., Wang, P., McKenna, B.A., Lombi, E., 2019. Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International* 132, 105078. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I. *Chemosphere* 75, 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barceló, D., 2004. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23, 790–798. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.007>
- Kwak, J.I., An, Y.-J., 2021. Assessing potential indicator of endocrine-disrupting property of chemicals using soil invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 245, 109036. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109036>
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions (introduction). *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Elsevier Mason SAS. <https://hal.inrae.fr/hal-02842428>
- Lahive, E., Matzke, M., Durenkamp, M., Lawlor, A.J., Thacker, S.A., Pereira, M.G., Spurgeon, D.J., Unrine, J.M., Svendsen, C., Lofts, S., 2017. Sewage sludge treated with metal nanomaterials inhibits earthworm reproduction more strongly than sludge treated with metal metals in bulk/salt forms. *Environmental Science: Nano* 4, 78–88. <https://doi.org/10.1039/C6EN00280C>
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.014>
- Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., Kyriacou, A., 2006. Quality assessment of composts in the Greek market: The need for standards and quality assurance. *Journal of Environmental Management* 80, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.08.011>
- Lavelle, P., Barois, I., Blanchart, E., Brown, G., Decaëns, T., Fragoso, C., Jimenez, J.J., Kajondo, K.K., Moreno, A., Pashanasi, B., 2000. Earthworms as a resource in tropical agroecosystems., in: Subba Rao, N.S.,

- Dommergues, Y.R. (Eds.), *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry (Volume II)*. Science Publishers, Inc., Enfield, pp. 163–181. ISBN-10: 1578080177
- Lavelle, P., Spain, A., 2001. *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, Boston. ISBN-10: 1402004907
- Lazcano, C., Zhu-Barker, X., Decock, C., 2021. Effects of organic fertilizers on the soil microorganisms responsible for N₂O emissions: A review. *Microorganisms* 9, 983. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050983>
- Leal, R.M.P., Alleoni, L.R.F., Tornisiello, V.L., Regitano, J.B., 2013. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere* 92, 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>
- Lécrivain, N., Frossard, V., Aurenche, V., Cottin, N., Clément, B., 2017. Ecological risk assessment of Lake Bourget (France, Savoie) littoral sediment contaminated by heavy metals, PAHs and PCBs through chemical analyses, biomarkers, laboratory and in situ bioassays, in: *14th International Conference on Sustainable Use and Management of Soil, Sediment and Water Resources (AquaConSoil 2017)*, Lyon, France. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01591120/>
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Inc., Sydney.
- Lemière, B., Seguin, J.J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, P., Saada, A., Darmendrail, D., Conil, P., Bodéan, F., Fauconnier, D., 2001. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes, Applications dans un contexte d'Évaluation Détaillée de Risques pour les ressources en eau. BRGM éditions. <https://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-50662-FR.pdf>
- Lemtiri, A., Colinet, G., Alabi, T., Cluzeau, D., Zirbes, L., Haubruge, É., Francis, F., 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, Presses Agronomiques de Gembloux* 18, 121-133. <https://hal-univ-rennes1.archives-ouvertes.fr/hal-01084235>
- Leppänen, M.T., Kukkonen, J.V., 1998. Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbricus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377, 183–194. <https://doi.org/10.1023/A:1003252520704>
- Li, D., Hockaday, W.C., Masiello, C.A., Alvarez, P.J.J., 2011. Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1732–1737. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.019>
- Li, L., Xu, Z., Wu, J., Tian, G., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. *Bioresource Technology* 101, 3430–3436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.085>
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., Cai, Y., 2013. Occurrence and removal of antibiotics in a municipal wastewater reclamation plant in Beijing, China. *Chemosphere* 92, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.040>
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., Cai, Y., 2012. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere* 89, 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.079>
- Li, X.-W., Xie, Y.-F., Li, C.-L., Zhao, H.-N., Zhao, H., Wang, N., Wang, J.-F., 2014. Investigation of residual fluoroquinolones in a soil–vegetable system in an intensive vegetable cultivation area in Northern China. *Science of the Total Environment* 468, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.057>
- Li, Y., Hu, Y., Ai, X., Qiu, J., Wang, X., 2015. Acute and sub-acute effects of enrofloxacin on the earthworm species *Eisenia fetida* in an artificial soil substrate. *European Journal of Soil Biology* 66, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.11.004>
- Li, Y., Zhang, X., Li, W., Lu, X., Liu, B., Wang, J., 2013. The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 2211–2220. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2702-1>

- Li, Y.-X., Wei, L.I., Juan, W.U., Xu, L.-C., Su, Q.-H., Xiong, X., 2007. Contribution of additives Cu to its accumulation in pig feces: study in Beijing and Fuxin of China. *Journal of Environmental Sciences* 19, 610–615. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60101-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60101-6)
- Liesch, A.M., Weyers, S.L., Gaskin, J.W., Das, K.C., 2010. Impact of two different biochars on earthworm growth and survival. *Annals of Environmental Science* 4, 1–9. <https://openjournals.neu.edu/aes/journal/article/view/v4art1>
- Lin, D., Zhou, Q., Xu, Y., Chen, C., Li, Y., 2012. Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. *Environmental Pollution* 171, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.020>
- Lindberg, R.H., Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A., 2006. Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science & Technology* 40, 1042–1048. <https://doi.org/10.1021/es0516211>
- Liu, X., Gao, Y., Khan, S., Duan, G., Chen, A., Ling, L., Zhao, L., Liu, Z., Wu, X., 2008. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. *Journal of Environmental Sciences* 20, 1469–1474. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62551-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62551-6)
- Loehr, R.C., Webster, M.T., 1996. Performance of long-term, field-scale bioremediation processes. *Journal of Hazardous Materials* 50, 105–128. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(96\)01797-9](https://doi.org/10.1016/0304-3894(96)01797-9)
- Louzon, M., Pauget, B., Gimbert, F., Morin-Crini, N., Wong, J.W., Zaldibar, B., Natal-da-Luz, T., Neuwirthova, N., Thiemann, C., Sarrazin, B., 2022. In situ and ex situ bioassays with *Cantareus aspersus* for environmental risk assessment of metal (loid) and PAH-contaminated soils. *Integrated Environmental Assessment and Management* 18, 539–554. <https://doi.org/10.1002/ieam.4480>
- Loyon, L., 2017. Overview of manure treatment in France. *Waste Management* 61, 516–520. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.040>
- Lukkari, T., Aatsinki, M., Väisänen, A., Haimi, J., 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology* 30, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.02.001>
- Lupwayi, N.Z., Zhang, Y., Hao, X., Thomas, B.W., Eastman, A.H., Schwinghamer, T.D., 2019. Linking soil microbial biomass and enzyme activities to long-term manure applications and their nonlinear legacy. *Pedobiologia* 74, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2019.04.001>
- Lynch, J.M., De Leij, F.A., 2001. Rhizosphere. eLS. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403.pub2>
- Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110, 375–391. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00162-7)
- Mailler, R., Gasperi, J., Patureau, D., Vulliet, E., Delgenes, N., Danel, A., Deshayes, S., Eudes, V., Guerin, S., Moilleron, R., 2017. Fate of emerging and priority micropollutants during the sewage sludge treatment: case study of Paris conurbation. Part 1: contamination of the different types of sewage sludge. *Waste Management* 59, 379–393. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.010>
- Makridis, C., Svarnas, C., Rigas, N., Gougoulas, N., Roka, L., Leontopoulos, S., 2012. Transfer of heavy metal contaminants from animal feed to animal products. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2, 149–154.
- Malmborg, J., Magnér, J., 2015. Pharmaceutical residues in sewage sludge: Effect of sanitization and anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management* 153, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.041>
- Marinussen, M.P., Van der Zee, S.E., de Haan, F.A., 1997. Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 17–26. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.1482>

- Markowicz, A., Bondarczuk, K., Cycoń, M., Sułowicz, S., 2021. Land application of sewage sludge: Response of soil microbial communities and potential spread of antibiotic resistance. *Environmental Pollution* 271, 116317. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116317>
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants (No. Ed. 2). Academic Press, London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057187-4.50024-2>
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials* 239, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>
- Martinez, V.G., Reddy, P.K., Zoran, M.J., 2006. Asexual reproduction and segmental regeneration, but not morphallaxis, are inhibited by boric acid in *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae). *Hydrobiologia* 564, 73–86. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1709-9>
- Mayer, L.M., Chen, Z., Findlay, R.H., Fang, J., Sampson, S., Self, R.F., Jumars, P.A., Quet el, C., Donard, O.F., 1996. Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science & Technology* 30, 2641–2645. <https://doi.org/10.1021/es960110z>
- McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water Research* 44, 658–668. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.032>
- McCray, J.E., Bai, G., Maier, R.M., Brusseau, M.L., 2001. Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures. *Journal of Contaminant Hydrology* 48, 45–68. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(00\)00173-X](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(00)00173-X)
- McLaughlin, M.J., Hamon, R.E., McLaren, R.G., Speir, T.W., Rogers, S.L., 2000. A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Soil Research* 38, 1037–1086. <https://doi.org/10.1071/SR99128>
- Mejias, C., Mart ın, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2021. Occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in sewage sludge and soil: A review on their distribution and environmental risk assessment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 30, e00125. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00125>
- Melin, V.E., Potineni, H., Hunt, P., Griswold, J., Siems, B., Werre, S.R., Hrubec, T.C., 2014. Exposure to common quaternary ammonium disinfectants decreases fertility in mice. *Reproductive Toxicology* 50, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.07.071>
- Meng, X., Zeng, B., Wang, P., Li, J., Cui, R., Ren, L., 2022. Food waste anaerobic biogas slurry as fertilizer: Potential salinization on different soil layer and effect on rhizobacteria community. *Waste Management* 144, 490–501. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.04.003>
- Moinard, V., Redondi, C., Eti evant, V., Savoie, A., Duchene, D., Pelosi, C., Houot, S., Capowiez, Y., 2021. Short- and long-term impacts of anaerobic digestate spreading on earthworms in cropped soils. *Applied Soil Ecology* 168, 104149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104149>
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International* 35, 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008>
- Monteiro, S.C., Boxall, A.B., 2009. Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2546–2554. <https://doi.org/10.1897/08-657.1>
- Moolman, L., Van Vuren, J.H.J., Wepener, V., 2007. Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.017>
- Moreira, R., Sousa, J.P., Canhoto, C., 2008. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. *Bioresource Technology* 99, 8382–8389. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.046>
- Morgan, A.J., Morris, B., 1982. The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry* 75, 269–285. <https://doi.org/10.1007/BF00496017>

- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1999. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology* 13, 9–20. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00012-8)
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1998. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environmental Pollution* 99, 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00193-0)
- Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiya, K., Shinohara, R., 2011. Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. *Chemosphere* 84, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.048>
- Muller, M., Jimenez, J., Antonini, M., Dudal, Y., Latrille, E., Vedrenne, F., Steyer, J.-P., Patureau, D., 2014. Combining chemical sequential extractions with 3D fluorescence spectroscopy to characterize sludge organic matter. *Waste management* 34, 2572–2580. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.028>
- Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Gordon, A.W., Christie, P., 2015. Responses of earthworm species to long-term applications of slurry. *Applied Soil Ecology* 96, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.07.005>
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145, 402–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.009>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655–670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>
- Navarro, I., de la Torre, A., Sanz, P., Pro, J., Carbonell, G., Martínez, M. de los Á., 2016. Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworm in biosolid amended soils. *Environmental Research* 149, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.004>
- Ndegwa, P.M., Thompson, S.A., Das, K.C., 2000. Effects of stocking density and feeding rate on vermicomposting of biosolids. *Bioresource Technology* 71, 5–12. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00055-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00055-3)
- Neuhauser, E.F., Hartenstein, R., Kaplan, D.L., 1980. Growth of the Earthworm *Eisenia Foetida* in Relation to Population Density and Food Rationing. *Oikos* 35, 93–98. <https://doi.org/10.2307/3544730>
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of The Total Environment* 311, 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00139-6)
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2010. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1484–1489. <https://doi.org/10.1002/etc.188>
- Nogueira, T.A.R., Franco, A., He, Z., Braga, V.S., Firme, L.P., Abreu-Junior, C.H., 2013. Short-term usage of sewage sludge as organic fertilizer to sugarcane in a tropical soil bears little threat of heavy metal contamination. *Journal of Environmental Management* 114, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.09.012>
- Obriot, F., Stauffer, M., Goubard, Y., Cheviron, N., Peres, G., Eden, M., Revallier, A., Vieublé-Gonod, L., Houot, S., 2016. Multi-criteria indices to evaluate the effects of repeated organic amendment applications on soil and crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 232, 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.004>
- OECD, 2010. Test No. 317: Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OCDE Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264090934-en>
- OECD, 2000. Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OCDE Publishing, Paris. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948317.pdf>

- Oleszczuk, P., 2008. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.04.006>
- Oleszczuk, P., Hollert, H., 2011. Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. *Chemosphere* 83, 502–509. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.061>
- Orman, S., Ok, H., Kaplan, M., 2014. Application of Sewage Sludge for Growing Alfalfa, Its Effects on the Macro-Micronutrient Concentration, Heavy Metal Accumulation, and Translocation. *Ekoloji Dergisi* 23, 10–19. <https://doi.org/10.5053/ekoloji.2014.902>
- Östman, M., Lindberg, R.H., Fick, J., Björn, E., Tysklind, M., 2017. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Research* 115, 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.011>
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Rozanov, A.B., 2009. The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology* 41, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.11.006>
- Pan, M., Chu, L.M., 2017. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of the Total Environment* 599, 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214>
- Pan, M., Chu, L.M., 2016. Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Science of the Total Environment* 545, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.040>
- Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., Chen, M., 2011. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere* 84, 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.022>
- Pannu, M.W., O'Connor, G.A., Toor, G.S., 2012. Toxicity and bioaccumulation of biosolids-borne triclosan in terrestrial organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 646–653. <https://doi.org/10.1002/etc.1721>
- Parelho, C., dos santos Rodrigues, A., Bernardo, F., do Carmo Barreto, M., Cunha, L., Poeta, P., Garcia, P., 2018. Biological endpoints in earthworms (*Amyntas gracilis*) as tools for the ecotoxicity assessment of soils from livestock production systems. *Ecological Indicators* 95, 984–990. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.045>
- Parente, C.ET., Oliveira da Silva, E., Sales Júnior, S.F., Hauser-Davis, R.A., Malm, O., Correia, F.V., Saggiaro, E.M., 2021. Fluoroquinolone-contaminated poultry litter strongly affects earthworms as verified through lethal and sub-lethal evaluations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207, 111305. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111305>
- Park, J., Cho, K.H., Ligaray, M., Choi, M.-J., 2019. Organic matter composition of manure and its potential impact on plant growth. *Sustainability* 11, 2346. <https://doi.org/10.3390/su11082346>
- Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandenbulcke, F., 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34, 199–228. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>
- Pelosi, C., Lebrun, M., Beaumelle, L., Cheviron, N., Delarue, G., Nelieu, S., 2016. Sublethal effects of epoxiconazole on the earthworm *Aporrectodea icterica*. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 3053–3061. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4845-4>
- Perron, V., Hébert, M., 2007. Caractérisation des Boues d'Épuration Municipales. Partie II : Éléments Traces Métalliques. *Vecteur Environnement* 42–46. http://www.mddep.gouv.qc.ca/matieres/articles/caract_boues2.pdf
- Peysson, W., Vulliet, E., 2013. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1290, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057>
- Picó, Y., Andreu, V., 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and bioanalytical chemistry* 387, 1287–1299. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0843-1>

- Pino, M.R., Val, J., Mainar, A.M., Zuriaga, E., Español, C., Langa, E., 2015. Acute toxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Science of the Total Environment* 518, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.080>
- Pivato, A., Raga, R., Vanin, S., Rossi, M., 2014. Assessment of compost quality for its environmentally safe use by means of an ecotoxicological test on a soil organism. *Journal of Material Cycles and Waste Management* 16, 763–774. <https://doi.org/10.1007/s10163-013-0216-8>
- Pramanik, P., Chung, Y.R., 2011. Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: Documentation of cellulase isozymes in vermicompost. *Waste Management* 31, 1169–1175. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.12.017>
- Puckowski, A., Mioduszewska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., Stepnowski, P., 2016. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 127, 232–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.049>
- Rabølle, M., Spliid, N.H., 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715–722. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00442-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00442-7)
- Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research* 43, 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>
- Rahman, Z., Singh, V.P., 2019. The relative impact of toxic heavy metals (THMs)(arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment* 191, 1–21. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7528-7>
- Ramade, F., 2002. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement (No. Ed. 2). Dunod, Paris. ISBN-10 : 2100066706
- Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Mixtures of environmental pollutants: effects on microorganisms and their activities in soils, in: Whitacre, D. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol 211. Springer, New York, pp. 63–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8011-3_3
- Rastetter, N., Gerhardt, A., 2017. Toxic potential of different types of sewage sludge as fertiliser in agriculture: ecotoxicological effects on aquatic, sediment and soil indicator species. *Journal of Soils and Sediments* 17, 106–121. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1468-4>
- Redeker, E.S., Van Campenhout, K., Bervoets, L., Reijnders, H., Blust, R., 2007. Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environmental Pollution* 148, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.031>
- Reed, S.C., Crites, R.W., Middlebrooks, E.J., 1995. *Natural systems for waste management and treatment* (No. Ed. 2). McGraw-Hill, New York. ISBN-10: 0071346627
- Reichenberg, F., Mayer, P., 2006. Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1239–1245. <https://doi.org/10.1897/05-458R.1>
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 2004. Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems, in: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology* (No. Ed. 2). CRC press, Boca Raton, pp. 299–320. ISBN: 9780849318191
- Reinecke, A.J., Viljoen, S.A., 1990. The influence of feeding patterns on growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils* 10, 184–187. <https://doi.org/10.1007/BF00336133>
- Renaud, M., Chelinho, S., Alvarenga, P., Mourinha, C., Palma, P., Sousa, J.P., Natal-da-Luz, T., 2017. Organic wastes as soil amendments - Effects assessment towards soil invertebrates. *Journal of Hazardous Materials* 330, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.052>

- Revy, P.S., Jondreville, C., Dourmad, J.-Y., Nys, Y., 2003. Le zinc dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel et risque potentiel pour l'environnement. *Production animals*, Institut National de la Recherche Agronomique 16, 3-18. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02680081/>
- Rolsky, C., Kelkar, V., Driver, E., Halden, R.U., 2020. Municipal sewage sludge as a source of microplastics in the environment. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 14, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.12.001>
- Romero, J., Feijóo, C.G., Navarrete, P., 2012. Antibiotics in aquaculture - use, abuse and alternatives, in: Carvalho, E.D., David, G.S., Silva, R.J. (Eds.), *Health and Environment in Aquaculture*. IntechOpen, London, pp. 159–198. DOI: 10.5772/28157
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 15, 241–248. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150303>
- Ruan, T., Liang, D., Song, S., Song, M., Wang, H., Jiang, G., 2015. Evaluation of the *in vitro* estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere* 124, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.017>
- Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D.R., Topp, E., 2012. Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Science of the Total Environment* 431, 233–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.017>
- Sassman, S.A., Sarmah, A.K., Lee, L.S., 2007. Sorption of tylosin A, D, and A-aldol and degradation of tylosin a in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1629–1635. <https://doi.org/10.1897/07-007R.1>
- Satchell, J.E., 1967. Lumbricidae, in: Burges, A., Raw, F. (Eds.), *Soil Biology*. Academic Press, London, New York, pp. 259–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395699-6.X5001-9>
- Šauer, P., Bořík, A., Golovko, O., Grabic, R., Staňová, A.V., Valentová, O., Stará, A., Šandová, M., Kroupová, H.K., 2018. Do progestins contribute to (anti-) androgenic activities in aquatic environments? *Environmental Pollution* 242, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.104>
- Sbartai, H., Djebar, M.R., Sbartai, I., Berrabbah, H., 2012. Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.). *Comptes Rendus Biologies* 335, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.08.001>
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M., 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71, 1832–1839. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.003>
- Schroll, R., Bierling, B., Cao, G., Dörfler, U., Lahaniati, M., Langenbach, T., Scheunert, I., Winkler, R., 1994. Uptake pathways of organic chemicals from soil by agricultural plants. *Chemosphere* 28, 297–303. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90126-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90126-0)
- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., Rao, M.A., 2015. Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15, 333–352. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000031>
- Selim, Sh.M., Zayed, M.S., Atta, H.M., 2012. Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *Nature and Science* 10, 69–77.
- Senesi, N., Loffredo, E., 2009. The role of soil organic matter in limiting organic pollution in soils with focus on endocrine disruptor compounds, in: Bahadir, A.M., Duca, G. (Eds.), *The Role of Ecological Chemistry in Pollution Research and Sustainable Development*. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer, Dordrecht., pp. 165–174. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2903-4_18
- Sherman, R.L., 2003. Raising earthworms successfully. North Carolina Cooperative Extension Service, Raleigh.
- Siddique, J., Khan, A., Hussain, I., Akhter, S., 2005. Growth and Reproduction of Earthworm (*Eisenia fetida*) in Different Organic Media. *Pakistan Journal of Zoology* 37, 211-4.

- Sidhu, H., O'Connor, G., Ogram, A., Kumar, K., 2019. Bioavailability of biosolids-borne ciprofloxacin and azithromycin to terrestrial organisms: microbial toxicity and earthworm responses. *Science of The Total Environment* 650, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.004>
- Sims, R.C., Sorensen, D.L., Sims, J., McLean, J.E., Mahmood, R., Dupont, R.R., 1984. Review of In-Place Treatment Techniques for Contaminated Surface Soils-Volume 2: Background Information for In Situ Treatment. National Technical Information Service. Utah State University, Logan.
- Singh, R.P., Singh, P., Ibrahim, M.H., Hashim, R., 2012. Land application of sewage sludge: physicochemical and microbial response, in: Whitacre, D. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol 211. Springer, New York, pp. 41–61. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0668-6_3
- Sizmur, T., Hodson, M.E., 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? – A review. *Environmental pollution* 157, 1981–1989. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.02.029>
- Smith, P. et al, Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Md., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smith, S.R., 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment International* 35, 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.06.009>
- Snyder, B.A., Boots, B., Hendrix, P.F., 2009. Competition between invasive earthworms (*Amyntas corticis*, Megascolecidae) and native North American millipedes (*Pseudopolydesmus erasus*, Polydesmidae): effects on carbon cycling and soil structure. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.023>
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Spaan, K., Haigis, A.-C., Weiss, J., Legradi, J., 2019. Effects of 25 thyroid hormone disruptors on zebrafish embryos: A literature review of potential biomarkers. *Science of The Total Environment* 656, 1238–1249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.071>
- Spargo, J.T., Cavigelli, M.A., Mirsky, S.B., Maul, J.E., Meisinger, J.J., 2011. Mineralizable soil nitrogen and labile soil organic matter in diverse long-term cropping systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 90, 253–266. <https://doi.org/10.1007/s10705-011-9426-4>
- Springett, J.A., 1983. Effect of five species of earthworm on some soil properties. *Journal of Applied Ecology* 20, 865–872. <https://doi.org/10.2307/2403131>
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Applied Soil Ecology* 11, 227–243. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00150-4)
- Stengel, P., Gelin, S., 1998. *Sol: Interface Fragile*. Editions Quae, Paris. ISBN13: 978-2-7380-0786-5
- Strauch, D., 1987. Hygiene of animal waste management, in: Strauch, D. (Ed.), *Animal Production and Environmental Health*. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 155–202. CABI: 19882277461
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D., Adam, V., 2018. Zinc, zinc nanoparticles and plants. *Journal of Hazardous Materials* 349, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.040>
- Świątek, Z.M., Bednarska, A.J., 2019. Energy reserves and respiration rate in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to zinc in nanoparticle or ionic form. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 24933–24945. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05753-3>
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Aquaculture Feed and Food Safety: the role of the food and agriculture organization and the Codex Alimentarius. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1140, 50–59. <https://doi.org/10.1196/annals.1454.003>

- Tarnow, P., Tralau, T., Luch, A., 2019. Chemical activation of estrogen and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways and their interaction in toxicology and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 15, 219–229. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1569627>
- Tella, M., Doelsch, E., Letourmy, P., Chataing, S., Cuoq, F., Bravin, M.N., Saint Macary, H., 2013. Investigation of potentially toxic heavy metals in different organic wastes used to fertilize market garden crops. *Waste Management* 33, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.07.021>
- Thangarajan, R., Bolan, N.S., Tian, G., Naidu, R., Kunhikrishnan, A., 2013. Role of organic amendment application on greenhouse gas emission from soil. *Science of the Total Environment* 465, 72–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.031>
- Thiele-Brun, S., Peters, D., 2007. Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforschung Volkenrode* 57, 13–23. https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/bitv/dk038105.pdf
- Tidona, S., Van Gestel, C.A.M., Morais, P.V., Sousa, J.P., 2009. The use of Collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. *Chemosphere* 77, 1526–1533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.056>
- Treonis, A.M., Austin, E.E., Buyer, J.S., Maul, J.E., Spicer, L., Zasada, I.A., 2010. Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology* 46, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.017>
- Urionabarrenetxea, E., Garcia-Velasco, N., Zaldibar, B., Soto, M., 2022. Impacts of sewage sludges deposition on agricultural soils: Effects upon model soil organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 255, 109276. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109276>
- Urra, J., Alkorta, I., Garbisu, C., 2019. Potential benefits and risks for soil health derived from the use of organic amendments in agriculture. *Agronomy* 9, 542–565. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090542>
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- van den Berg, P., Huerta-Lwanga, E., Corradini, F., Geissen, V., 2020. Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils. *Environmental Pollution* 261, 114198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114198>
- Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2014. Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Science of the Total Environment* 500, 250–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>
- Van Gestel, C.A.M., Dirven-van Breemen, E.M., Baerselman, R., 1993. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Science of The Total Environment* 134, 585–597. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80061-0)
- Van Vliet, P.C.J., Didden, W.A.M., Van der Zee, S., Peijnenburg, W., 2006. Accumulation of heavy metals by enchytraeids and earthworms in a floodplain. *European Journal of Soil Biology* 42, S117–S126. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.09.005>
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* 389, 416–428. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.06.005>
- Vijver, M.G., Vink, J.P., Miermans, C.J., van Gestel, C.A., 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00245-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00245-6)
- Villanneau, E.J., Saby, N.P.A., Orton, T.G., Jolivet, C.C., Boulonne, L., Caria, G., Barriuso, E., Bispo, A., Briand, O., Arrouays, D., 2013. First evidence of large-scale PAH trends in French soils. *Environmental Chemistry Letters* 11, 99–104. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0401-y>
- Vodounnou, D.S.J.V., Kpogue, D.N.S., Tossavi, C.E., Mennsah, G.A., Fiogbe, E.D., 2016. Effect of animal waste and vegetable compost on production and growth of earthworm (*Eisenia fetida*) during vermiculture.

- International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture 5, 87–92.
<https://doi.org/10.1007/s40093-016-0119-5>
- Vodyanitskii, Y.N., 2013. Contamination of soils with heavy metals and metalloids and its ecological hazard (analytic review). *Eurasian Soil Science* 46, 793–801. <https://doi.org/10.1134/S1064229313050153>
- Wang, C., Rong, H., Liu, H., Wang, X., Gao, Y., Deng, R., Liu, R., Liu, Y., Zhang, D., 2018. Detoxification mechanisms, defense responses, and toxicity threshold in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to ciprofloxacin-polluted soils. *Science of the Total Environment* 612, 442–449.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.120>
- Wen, B., Huang, R., Wang, P., Zhou, Y., Shan, X., Zhang, S., 2011. Effect of complexation on the accumulation and elimination kinetics of cadmium and ciprofloxacin in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Science & Technology* 45, 4339–4345. <https://doi.org/10.1021/es104034g>
- Wilcke, D.E., 1953. Über die vertikale Verteilung der Lumbriciden im Boden. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 41, 372–385. <https://doi.org/10.1007/BF00407428>
- Wu, J., Ren, Z., Zhang, C., Motelica-Heino, M., Deng, T., Wang, H., Dai, J., 2020. Effects of soil acid stress on the survival, growth, reproduction, antioxidant enzyme activities, and protein contents in earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Science and Pollution Research* 27, 33419–33428.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04643-y>
- Wu, Q., Pan, C.-G., Wang, Y.-H., Xiao, S.-K., Yu, K.-F., 2021. Antibiotics in a subtropical food web from the Beibu Gulf, South China: Occurrence, bioaccumulation and trophic transfer. *Science of the Total Environment* 751, 141718. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141718>
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Notices* 2011, 1–20.
<https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- Xiong, X., Yanxia, L., Wei, L., Chunye, L., Wei, H., Ming, Y., 2010. Copper content in animal manures and potential risk of soil copper pollution with animal manure use in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling* 54, 985–990. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.02.005>
- Xu, J., Wu, L., Chang, A.C., 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* 77, 1299–1305.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.063>
- Yang, J.-F., Ying, G.-G., Liu, S., Zhou, L.-J., Zhao, J.-L., Tao, R., Peng, P.-A., 2012. Biological degradation and microbial function effect of norfloxacin in a soil under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 47, 288–295. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.638886>
- Yasmin, S., D'Souza, D., 2010. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. *Applied and Environmental Soil Science* 2010, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/678360>
- Žaltauskaitė, J., Kniūpiūtė, I., Praspaliauskas, M., 2022. Earthworm *Eisenia fetida* potential for sewage sludge amended soil valorization by heavy metal remediation and soil quality improvement. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127316. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127316>
- Žaltauskaitė, J., Vaisiūnaitė, R., Sujetovienė, G., Dagiliūtė, R., 2016. Sewage sludge toxicity: comparison of plants and soil invertebrates response. *Desalination and Water Treatment* 86, 320–326.
<https://doi.org/10.5004/dwt.2017.21392>
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., Anderson, T.A., 2009. Uptake, bioaccumulation, and biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and its reduced metabolites (MNX and TNX) by the earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* 76, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.021>
- Zhang, H., Ding, W., Yu, H., He, X., 2015. Linking organic carbon accumulation to microbial community dynamics in a sandy loam soil: result of 20 years compost and inorganic fertilizers repeated application experiment. *Biology and Fertility of Soils* 51, 137–150. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0957-0>

- Zhang, W., Li, J., Liu, K., Lin, K., 2015. The behavior and toxicological effects of decabromodiphenyl ether (BDE209) in a soil–earthworm system. *Science of The Total Environment* 537, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.022>
- Zhao, L., Dong, Y.H., Wang, H., 2010. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of The Total Environment* 408, 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.014>
- Zhao, Y., Yan, Z., Qin, J., Xiao, Z., 2014. Effects of long-term cattle manure application on soil properties and soil heavy metals in corn seed production in Northwest China. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 7586–7595. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2671-8>
- Zhou, W., Kornegay, E.T., Lindemann, M.D., Swinkels, J., Welten, M.K., Wong, E.A., 1994. Stimulation of growth by intravenous injection of copper in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 72, 2395–2403. <https://doi.org/10.2527/1994.7292395x>
- Zirbes, L., Mescher, M., Vrancken, V., Wathelet, J.-P., Verheggen, F.J., Thonart, P., Haubruge, E., 2011. Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. *Public Library of Science One* 6, e21927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021927>
- Zribi, K., Nouairi, I., Slama, I., Talbi-Zribi, O., Mhadhbi, H., 2015. *Medicago sativa* - *Sinorhizobium meliloti* symbiosis promotes the bioaccumulation of zinc in nodulated roots. *International Journal of Phytoremediation* 17, 49–55. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.828017>
- Zuo, W., Gu, C., Zhang, W., Xu, K., Wang, Y., Bai, Y., Shan, Y., Dai, Q., 2019. Sewage sludge amendment improved soil properties and sweet sorghum yield and quality in a newly reclaimed mudflat land. *Science of The Total Environment* 654, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.127>

ANNEXES

ANNEXE A

Tableau A.1. Concentrations en résidus de médicaments dans les boues d'épuration.

Classes	Composés	Pays	Effluents	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de MS)			Références
				Moyenne \pm EC	min	max	
Antibiotique Fluoroquinolone							
	Ciprofloxacine	Espagne	Boue brute non traitée	1400			(Picó and Andreu, 2007)
		Suède	Boue brute non traitée		5700	7700	(Lindberg et al., 2006)
		France	Boue brute non traitée	12858 \pm 9269	3247	39442	(Mailler et al., 2017)
		Suisse	Boue brute non traitée	2200 \pm 400	1700	2700	(Golet et al., 2003)
		Espagne	Boue secondaire digérée	2130			(Picó and Andreu, 2007)
		Suède	Boue secondaire digérée		5500	6300	(Lindberg et al., 2006)
		Suisse	Boue secondaire digérée	3100 \pm 400	2500	3500	(Golet et al., 2003)
		France	Boue secondaire digérée	19215 \pm 14718	4510	38456	(Mailler et al., 2017)
		USA	Boue secondaire traitée * ²	6858 \pm 2348		10800	(McClellan and Halden, 2010)
	Chine	Boue secondaire traitée * ³	110	20,4	235	(W. Li et al., 2013)	
	Norfloxacine	Suède	Boue brute non traitée		4700	5800	(Lindberg et al., 2006)
		Suisse	Boue brute non traitée	2100 \pm 200	1700	2300	(Golet et al., 2003)
		France	Boue brute non traitée	6049 \pm 3098	2333	10785	(Mailler et al., 2017)
		Suède	Boue secondaire digérée		5900	6700	(Lindberg et al., 2006)
		Suisse	Boue secondaire digérée	2900 \pm 400	2300	3300	(Golet et al., 2003)
		France	Boue secondaire digérée	6639 \pm 2499	2831	9086	(Mailler et al., 2017)
		USA	Boue secondaire traitée * ²	289 \pm 74		418	(McClellan and Halden, 2010)
		Chine	Boue secondaire traitée * ³	5462	1830	9852	(W. Li et al., 2013)
	Ofloxacine	Espagne	Boue d'épuration * ¹			454,7	(Radjenović et al., 2009)
		France	Boue brute non traitée	6712 \pm 3770	2637	16619	(Mailler et al., 2017)
		France	Boue secondaire digérée	8743 \pm 4587	3119	14269	(Mailler et al., 2017)
		USA	Boue secondaire traitée * ²	5446 \pm 1941		8140	(McClellan and Halden, 2010)
		Chine	Boue secondaire traitée * ³	3400	1006	6090	(W. Li et al., 2013)
	Enrofloxacine	Espagne	Boue brute non traitée	2030			(Picó and Andreu, 2007)
		Espagne	Boue secondaire digérée	2420			(Picó and Andreu, 2007)
		USA	Boue secondaire traitée * ²			28,6	(McClellan and Halden, 2010)
		Chine	Boue secondaire traitée * ³	15,2	3,21	26,6	(W. Li et al., 2013)
	Antibiotique Sulfonamide						
	Sulfaméthoxazole	France	Boue brute non traitée	106,7 \pm 159,2	1,4	388,1	(Mailler et al., 2017)
		USA	Boue secondaire traitée * ²			3,3	(McClellan and Halden, 2010)
		Chine	Boue secondaire traitée * ³	9,13	1,03	26,0	(W. Li et al., 2013)
		Espagne	Boue mixte digérée		19	112	(Nieto et al., 2010)
	Sulfathiazole	Espagne	Boue mixte digérée		23	37	(Nieto et al., 2010)
	Sulfapyridine	Chine	Boue secondaire traitée * ³	16,4	10,2	27,7	(W. Li et al., 2013)
		Espagne	Boue mixte digérée		7	38	(Nieto et al., 2010)
	Sulfadiazine	Chine	Boue secondaire traitée * ³	37,8	17,1	67,4	(W. Li et al., 2013)
Antibiotique Tétracycline							
	Tétracycline	USA	Boue secondaire traitée * ²	1914 \pm 691		2790	(McClellan and Halden, 2010)
	Chlortétracycline	USA	Boue secondaire traitée * ²	43,5		23,4 \pm 16,9	(McClellan and Halden, 2010)

	Épitétracycline	USA	Boue secondaire traitée *2	2376 ± 517		3040	(McClellan and Halden, 2010)
Antibiotiques Macrolide							
	Tylosine	Espagne	Boue mixte digérée		1074	1958	(Nieto et al., 2010)
	Roxithromycine	Espagne	Boue mixte digérée		337	1446	(Nieto et al., 2010)
	Azithromycine	Espagne	Boue d'épuration *1			299,6	(Radjenović et al., 2009)
		France	Boue brute non traitée	349,6	87,6	586,5	(Mailler et al., 2017)
	Érythromycine-H2O	USA	Boue secondaire traitée *2	81,5 ± 52,3		183	(McClellan and Halden, 2010)
		Chine	Boue secondaire traitée *3	7,24	0	28,6	(W. Li et al., 2013)
Antibiotique Diaminopyridine							
	Triméthoprime	Espagne	Boue mixte digérée		9	15	(Nieto et al., 2010)
		USA	Boue secondaire traitée *2	26 ± 21,5		60,5	(McClellan and Halden, 2010)
Antiépileptique							
	Carbamazépine	France	Boue brute non traitée	189,5 ± 162,4	13,7	420,8	(Mailler et al., 2017)
		Espagne	Boue mixte digérée		15	42	(Nieto et al., 2010)
		France	Boue secondaire digérée	374,6	71,3	549,9	(Mailler et al., 2017)
		Espagne	Boue secondaire digérée		18,4	30,8	(Martín et al., 2012)
		USA	Boue secondaire digérée	68	15	1200	(Kinney et al., 2008)
		USA	Boue secondaire traitée *2	163 ± 56,4		238	(McClellan and Halden, 2010)
	Fluoxétine	USA	Boue secondaire digérée	370	100	4700	(Kinney et al., 2008)
		USA	Boue secondaire traitée *2	171 ± 46,6		258	(McClellan and Halden, 2010)
Anti-inflammatoire							
	Ibuprofène	Espagne	Boue d'épuration *1	741,1			(Radjenović et al., 2009)
		Espagne	Boue secondaire digérée		1020	1274	(Martín et al., 2012)
		Espagne	Boue mixte digérée		44	114	(Nieto et al., 2010)
		Espagne	Boue secondaire séchée		21 ± 2	444 ± 12	(Albero et al., 2014)
		USA	Boue secondaire traitée *2	246 ± 121		359	(McClellan and Halden, 2010)
	Acide salicylique	Espagne	Boue secondaire séchée		126 ± 24	1111 ± 34	(Albero et al., 2014)
		Espagne	Boue secondaire digérée		12,8	48	(Martín et al., 2012)
	Diclofénac	Espagne	Boue d'épuration *1	380,7			(Radjenović et al., 2009)
		Espagne	Boue mixte digérée		26	83	(Nieto et al., 2010)
		Espagne	Boue secondaire séchée		34 ± 4	627 ± 69	(Albero et al., 2014)
		France	Boue secondaire digérée		35	133	(Peysson and Vulliet, 2013)
	Fénoprofène	Espagne	Boue secondaire séchée		50 ± 3	70 ± 1	(Albero et al., 2014)
	Naproxène	Espagne	Boue secondaire séchée		12 ± 1	23 ± 7	(Albero et al., 2014)
	Kétoprofène	Espagne	Boue d'épuration *1			336,3	(Radjenović et al., 2009)
Analgésique							
	Paracétamol	France	Boue brute non traitée	90,9 ± 72,3	11,5	258,5	(Mailler et al., 2017)
		France	Boue secondaire digérée	87,6	5,9	225,4	(Mailler et al., 2017)
		Espagne	Boue secondaire séchée		24 ± 1	290 ± 37	(Albero et al., 2014)
		Espagne	Boue mixte digérée		174	419	(Nieto et al., 2010)
	Tramadol	France	Boue brute non traitée	372,3 ± 437,3	17,7	1661,4	(Mailler et al., 2017)
		France	Boue secondaire digérée		3,1	9,0	(Mailler et al., 2017)
Bêtabloquant							
	Propranolol	France	Boue brute non traitée	356,4 ± 346,2	18,0	886,4	(Mailler et al., 2017)
		France	Boue secondaire digérée		20,0	192,8	(Mailler et al., 2017)
		Espagne	Boue secondaire		8,58	32,5	(Martín et al., 2012)
		Espagne	Boue mixte digérée		9	26	(Nieto et al., 2010)

Autres							
Antihypertensif	Allopurinol	Espagne	Boue secondaire séchée		3,6 ± 0,2	7,8 ± 2,2	(Albero et al., 2014)
Hypolipémiant	Gemfibrozil	Espagne	Boue secondaire séchée		37 ± 2	67 ± 3	(Albero et al., 2014)
	Fénofibrate	Espagne	Boue secondaire séchée		13 ± 1	302 ± 18	(Albero et al., 2014)
Antidépresseur	Amitriptyline	Espagne	Boue secondaire séchée		27 ± 3	177 ± 14	(Albero et al., 2014)
Antihistaminique	Diphenhydramine	USA	Boue secondaire digérée	340	32	22000	(Kinney et al., 2008)
Antiarythmique	Vérapamil	France	Boue brute non traitée	424,0 ± 517,5	40,0	1654,2	(Mailler et al., 2017)
		France	Boue secondaire digérée		139,3	408,9	(Mailler et al., 2017)
Biocide *	Miconazole	France	Boue brute non traitée	278,0 ± 488,7	51,5	1381,6	(Mailler et al., 2017)
		France	Boue secondaire digérée	415,0	218,3	560,8	(Mailler et al., 2017)
	Triclosan	USA	Boue secondaire traitée * ²	12640 ± 3816		19700	(McClellan and Halden, 2010)
		USA	Boue secondaire digérée	10200	1170	32900	(Kinney et al., 2008)
	Triclocarban	USA	Boue secondaire traitée * ²	36060 ± 8049		48100	(McClellan and Halden, 2010)
	Thiabendazole	USA	Boue secondaire traitée * ²	110 ± 131		370	(McClellan and Halden, 2010)

*¹ Type de boue non spécifié ; *² traitement non spécifié ; *³ traitement multiple ;

Tableau A.2. Concentrations en résidus de médicaments dans les effluents d'élevage.

Classes/ Familles	Composés	Pays	Effluents	Concentration ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS)			Références
				Moyenne \pm EC	min	max	
Antibiotiques Fluoroquinolones							
Ciprofloxacine	Japon	Fumier de vache		2,2	12	(Motoyama et al., 2011)	
		Fumier de porc			6,4	(Motoyama et al., 2011)	
		Fumier de cheval		4,1	43	(Motoyama et al., 2011)	
		Fumier de porc/canard		100	4300	(Hu et al., 2010)	
		Fumier de porc	2010	640	33980	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	3440	490	29590	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	3780	680	45590	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	530	280	840	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de poulet	1030	330	2940	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de porc	490	310	960	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de vache	50 \pm 2,4			(Gros et al., 2019)	
Norfloxacine	Chine	Fumier de porc	2090	560	5500	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	1840	1230	2760	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	4680	850	225450	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	850	430	1760	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de poulet	2720	500	9520	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de porc	1100	410	3180	(Y. Li et al., 2013)	
Ofloxacine	Chine	Fumier de porc/canard		230	15700	(Hu et al., 2010)	
		Fumier de porc			98200	(Chen et al., 2012)	
Enrofloxacin	Chine	Fumier de porc	2090	480	33260	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	6790	1720	46700	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	4650	330	1420760	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	1180	460	4170	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de poulet	3330	330	15430	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de porc	870	360	2220	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de vache	18 \pm 6,5			(Gros et al., 2019)	
Fleroxacin	Chine	Fumier de porc	2230	1080	7460	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	2220	2220	2220	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	3110	760	99430	(Zhao et al., 2010)	
Lomefloxacin	Chine	Fumier de porc	2020	770	44160	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	1900	610	5530	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	1470	660	7030	(Zhao et al., 2010)	
Danofloxacin	Chine	Fumier de porc	910	80	2920	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	1230	410	3060	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	720	80	2480	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de porc	1130	510	2510	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de vache	2630	2630	2630	(Zhao et al., 2010)	
		Fumier de poulet	1400	410	12380	(Zhao et al., 2010)	
Difloxacin	Chine	Fumier de vache	160	160	160	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de poulet	690	130	1250	(Y. Li et al., 2013)	
		Fumier de porc	140	140	140	(Y. Li et al., 2013)	
Antibiotiques Sulfonamides							

Sulfaméthoxazole	Chine	Fumier de porc/canard		230	5700	(Hu et al., 2010)
	Allemagne	Fumier de porc	50	50	50	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc		230	5700	(Chen et al., 2012)
	Chine	Fumier de porc	300			(Pan et al., 2011)
	Chine	Fumier de porc	510	230	840	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	780	120	2800	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	460	220	1020	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	2230	250	7110	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	1070	210	2160	(Y. Li et al., 2013)
Sulfaméthazine	Allemagne	Fumier de porc	120	50	38000	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc		3300	24800	(Chen et al., 2012)
	Chine	Fumier de porc	300		28700	(Pan et al., 2011)
	USA	Fumier de vache	10800			(Dolliver et al., 2008)
N4-acetyl-sulfaméthazine	Allemagne	Fumier de porc	100	50	27000	(Harms and Bauer, 2011)
Sulfathiazole	Allemagne	Fumier de porc	70	50	100	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc	300			(Pan et al., 2011)
Sulfadiazine	Allemagne	Fumier de porc	780	50	5000	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc			7100	(Chen et al., 2012)
	Danemark	Fumier de porc			2100	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
	Chine	Fumier de porc	210	90	800	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	150	30	3120	(Zhao et al., 2010)
Sulfamérazine	Allemagne	Fumier de porc	700	50	900	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc	140	140	140	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	90	90	90	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	230	100	660	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	110	100	110	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	520	140	890	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	140	130	150	(Y. Li et al., 2013)
Sulfadiméthoxine	Allemagne	Fumier de porc	190	50	600	(Harms and Bauer, 2011)
	Danemark	Fumier de porc			2100	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
	Chine	Fumier de porc	400			(Pan et al., 2011)
Sulfaméthizole	Chine	Fumier de porc	700			(Pan et al., 2011)
Sulfaguanidine	Chine	Fumier de porc	90	30	1550	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	100	50	250	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	100	10	570	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	210	160	300	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	230	140	400	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	630	150	1900	(Y. Li et al., 2013)
Sulfanilamide	Chine	Fumier de porc	40	40	40	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	90	20	1590	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	80	80	80	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	810	90	1530	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	110	100	120	(Y. Li et al., 2013)
Sulfadimidine	Chine	Fumier de porc	210	60	1730	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	140	100	180	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	430	90	6040	(Zhao et al., 2010)

Sulfamonométhoxine	Chine	Fumier de porc	200	70	4080	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	60	60	60	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	300	80	900	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	220	140	300	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	400	140	960	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	1140	120	4840	(Y. Li et al., 2013)
Sulfachloropyridazine	Chine	Fumier de porc	820	90	3510	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	360	360	360	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	460	200	710	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	210	150	260	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	300	270	330	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	850	130	2130	(Y. Li et al., 2013)

Antibiotiques Tétracyclines

Tétracycline	Allemagne	Fumier liquide de porc		3200	4000	(Hamscher et al., 2002)
	Japon	Fumier de vache			1,2	(Motoyama et al., 2011)
	Japon	Fumier de porc		4,5	15	(Motoyama et al., 2011)
	Japon	Fumier de cheval		4,2	8,8	(Motoyama et al., 2011)
	Chine	Fumier de porc/canard		110	43500	(Hu et al., 2010)
	Allemagne	Fumier de porc	680	100	46000	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc			98200	(Chen et al., 2012)
	Danemark	Fumier de porc		91	1600	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
	Chine	Fumier de vache	1080	430	2690	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	1830	540	4570	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	5290	320	30550	(Y. Li et al., 2013)
	Iran	Fumier de vache		50	5360	(Alavi et al., 2015)
Iran	Fumier de poulet		50	1110	(Alavi et al., 2015)	
Chlortétracycline	Allemagne	Fumier liquide de porc	100			(Hamscher et al., 2002)
	Chine	Fumier de porc	879600			(Bao et al., 2009)
	Chine	Fumier de poule	94710			(Bao et al., 2009)
	USA	Lisier de porc	108000			(Hoese et al., 2009)
	Allemagne	Lisier de vache	11			(Hamscher et al., 2000)
	Allemagne	Lisier de porc	1435			(Hamscher et al., 2000)
	Japon	Fumier de vache			1,3	(Motoyama et al., 2011)
	Japon	Fumier de porc		240	280	(Motoyama et al., 2011)
	Japon	Fumier de cheval			2,6	(Motoyama et al., 2011)
	Chine	Fumier de porc/canard		140	26800	(Hu et al., 2010)
	Allemagne	Fumier de porc	340	100	50800	(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc			139400	(Chen et al., 2012)
	Danemark	Fumier de porc		1100	15700	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
	Chine	Fumier de porc	1150	160	21060	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	2220	240	27590	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	1090	160	17680	(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	1040	610	1940	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	1290	570	3110	(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	3190	680	22340	(Y. Li et al., 2013)
	Espagne	Fumier de vache	320 ± 160	20	500	(Carballo et al., 2013)

		USA	Fumier de vache	1500			(Dolliver et al., 2008)
Oxytétracycline	Japon	Fumier de vache				1	(Motoyama et al., 2011)
	Japon	Fumier de porc				13	(Motoyama et al., 2011)
	Japon	Fumier de cheval				2,9	(Motoyama et al., 2011)
	Chine	Fumier de porc/canard		80	183500		(Hu et al., 2010)
	Allemagne	Fumier de porc	140	100	900		(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc				354000	(Chen et al., 2012)
	Danemark	Fumier de porc				1500	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
	Turquie	Fumier de volaille/vache	200				(Karcı and Balcıoğlu, 2009)
	Chine	Fumier de porc	2690	150	59060		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	1240	320	59590		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	1550	270	10560		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	5100	210	10370		(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	6450	960	13390		(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	11810	730	56810		(Y. Li et al., 2013)
	Iran	Fumier de vache		50	5360		(Alavi et al., 2015)
	Iran	Fumier de poulet		47	13770		(Alavi et al., 2015)
	Espagne	Fumier de vache	5390 ± 3670	700	10000		(Carballo et al., 2013)
Italie	Fumier de vache	871700				(De Liguoro et al., 2003)	
Épitétracycline	Danemark	Fumier de porc		61	990		(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
Métacycline	Chine	Fumier de porc	640	200	5430		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	440	240	960		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	590	140	5860		(Zhao et al., 2010)
Doxitétracycline	Espagne	Fumier de vache	20	20	20		(Carballo et al., 2013)
Doxycycline	Allemagne	Fumier de porc	380	100	700		(Harms and Bauer, 2011)
	Chine	Fumier de porc				37200	(Chen et al., 2012)
	Danemark	Fumier de porc		550	3100		(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
	Chine	Fumier de porc	790	230	13500		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de vache	680	440	1050		(Zhao et al., 2010)
	Chine	Fumier de poulet	3390	920	10910		(Zhao et al., 2010)
Antibiotiques Macrolides							
Tylosine	USA	Lisier de porc	300				(Hoese et al., 2009)
	Chine	Fumier de vache	250	220	280		(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de poulet	280	230	340		(Y. Li et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	690	230	1880		(Y. Li et al., 2013)
	USA	Fumier de vache	3700				(Dolliver et al., 2008)
	Italie	Fumier de vache	115500				(De Liguoro et al., 2003)
Antibiotiques Lincosamides							
Lyncomycine	Chine	Fumier de porc/canard		120	3800		(Hu et al., 2010)
Antibiotiques Phénicolés							
Chloramphenicol	Chine	Fumier de porc/canard		140	15300		(Hu et al., 2010)
Antiépileptique							
Carbamazépine	Japon	Fumier de poulet		3	15		(Motoyama et al., 2011)

Tableau A.3. Concentrations en résidus de médicaments dans les sols agricoles amendés par différents types de Mafors à des doses d'épandage agronomiques.

Mafors épandues	Composés	Pays	Durée après épandage	Profondeur (cm)	Concentration ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS)			Références
					Moyenne \pm EC	min	max	
Boue d'épuration	Ciprofloxacine	Suisse	8 mois	0 - 2,5		350	400	(Golet et al., 2002)
		Suisse	21 mois	0 - 2,5		270	280	(Golet et al., 2002)
		Suisse	5 mois	0 - 2,5	450			(Golet et al., 2003)
		Suisse	21 mois	0 - 2,5	270			(Golet et al., 2003)
		Suisse	21 mois	2,5 - 5	110			(Golet et al., 2003)
		Suisse	21 mois	5 - 7,5	80			(Golet et al., 2003)
		France	Régulier	0 - 29		< LOQ	8,7	(Bourdat-Deschamps et al., 2017)
	Norfloxacine	Suisse	8 mois	0 - 2,5		290	320	(Golet et al., 2002)
		Suisse	21 mois	0 - 2,5		270	300	(Golet et al., 2002)
		Suisse	5 mois	0 - 2,5	350			(Golet et al., 2003)
		Suisse	21 mois	0 - 2,5	300			(Golet et al., 2003)
		Suisse	21 mois	2,5 - 5	100			(Golet et al., 2003)
		Suisse	21 mois	5 - 7,5	60			(Golet et al., 2003)
		France	Régulier	0 - 29		< LOQ	9,4	(Bourdat-Deschamps et al., 2017)
	Ofloxacine	France	Régulier	0 - 29		5,3	8,6	(Bourdat-Deschamps et al., 2017)
	Triclosan	USA	1 mois	0 - 25	160			(Kinney et al., 2008)
		USA	5 mois	0 - 25	96			(Kinney et al., 2008)
		Canada	6 mois	0 - 30	98			(Gottschall et al., 2012)
	Triclocarban	Canada	6 mois	0 - 30	44			(Gottschall et al., 2012)
		Canada	12 mois	0 - 30	22			(Gottschall et al., 2012)
Carbamazépine	France	Régulier	0 - 29		<LOQ	0,46	(Bourdat-Deschamps et al., 2017)	
	Canada	12 mois	0 - 30	30			(Gottschall et al., 2012)	
Miconazole	Canada	6 mois	0 - 30	5			(Gottschall et al., 2012)	
	Canada	12 mois	0 - 30	127			(Gottschall et al., 2012)	
2-hydroxy-ibuprofène	Canada	12 mois	0 - 30	174			(Gottschall et al., 2012)	
Lisier	Ciprofloxacine	Chine	Régulier	0 - 15		0,8	30,1	(Hu et al., 2010)
	Enrofloxacine	Espagne	2 mois	0 - 30	122,36			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	28,70			(Gros et al., 2019)
	Ofloxacine	Chine	Régulier	0 - 15		0,6	1,6	(Hu et al., 2010)
	Oxytétracycline	Chine	Régulier	0 - 15		124	2683	(Hu et al., 2010)
		Chine	Régulier	0 - 5	25,50	17,78	42,22	(Guo et al., 2018)
		Espagne	2 mois	0 - 30	39,01			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	32,06			(Gros et al., 2019)
	Tétracycline	Allemagne	Régulier	0 - 10	140	86	227	(Hamscher et al., 2005)
		Allemagne	1 mois	0 - 10	56,4 \pm 20,1			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	7 mois	0 - 10	43,4 \pm 22,2			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	13 mois	0 - 10	86,2 \pm 15,3			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	Régulier	10 - 20	180	92	295	(Hamscher et al., 2005)
		Allemagne	1 mois	10 - 20	100,5 \pm 68,8			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	7 mois	10 - 20	94,2 \pm 40,3			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	13 mois	10 - 20	198,7 \pm 84,0			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	Régulier	20 - 30	162	35	235	(Hamscher et al., 2005)
		Allemagne	1 mois	20 - 30	90,5 \pm 35,4			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	7 mois	20 - 30	59,0 \pm 21,7			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	13 mois	20 - 30	171,7 \pm 65,4			(Hamscher et al., 2002)
		Chine	Régulier	0 - 15		2,5	105	(Hu et al., 2010)
	Chine	Régulier	0 - 5	16,71	4,24	40,46	(Guo et al., 2018)	
	Chlortétracycline	Chine	Régulier	0 - 5	203,11	25,88	460,80	(Guo et al., 2018)
		Allemagne	Régulier	0 - 10	6	4	7	(Hamscher et al., 2005)
		Allemagne	1 mois	0 - 10	4,6 \pm 1,1			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	7 mois	0 - 10	5,1 \pm 1,4			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	13 mois	0 - 10	6,1 \pm 2,0			(Hamscher et al., 2002)
		Allemagne	Régulier	0 - 15		33,1	1079	(Hu et al., 2010)
		Allemagne	Régulier	10 - 20	7	5	12	(Hamscher et al., 2005)
		Allemagne	1 mois	10 - 20	4,7 \pm 0,3			(Hamscher et al., 2002)
Allemagne		7 mois	10 - 20	6,0 \pm 1,2			(Hamscher et al., 2002)	
Allemagne		13 mois	10 - 20	7,1 \pm 3,4			(Hamscher et al., 2002)	
Allemagne		Régulier	20 - 30	13	5	39	(Hamscher et al., 2005)	
Allemagne		1 mois	10 - 20	4,8 \pm 1,2			(Hamscher et al., 2002)	
Allemagne		7 mois	10 - 20	5,0 \pm 1,0			(Hamscher et al., 2002)	

		Allemagne	13 mois	10 - 20	5,8 ± 3,2			(Hamscher et al., 2002)
	Sulfaméthoxazole	Chine	Régulier	0 - 15		0,03	0,9	(Hu et al., 2010)
	Flubendazole	Espagne	2 mois	0 - 30	0,61			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	0,45			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	30 - 60	0,07			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	30 - 60	0,03			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	60 - 90	0,04			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	60 - 90	< LOD			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	90 - 120	0,05			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	90 - 120	< LOD			(Gros et al., 2019)
	Tiamuline	Espagne	2 mois	0 - 30	0,31			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	0,13			(Gros et al., 2019)
	Flunixin	Espagne	2 mois	0 - 30	0,09			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	0,07			(Gros et al., 2019)
Fumier	Enrofloxacin	Chine	Régulier	0 - 15	18,6	0,1	167,0	(Li et al., 2014)
		Espagne	2 mois	0 - 30	151,50			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	133,10			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	30 - 60	38,54			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	30 - 60	17,05			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	60 - 90	19,78			(Gros et al., 2019)
	Espagne	7 mois	60 - 90	2,34			(Gros et al., 2019)	
	Norfloxacin	Chine	Régulier	0 - 15	55,7	0,4	288,3	(Li et al., 2014)
	Ciprofloxacin	Chine	Régulier	0 - 15	104,4	2,4	651,6	(Li et al., 2014)
	Oxytétracycline	Espagne	2 mois	0 - 30	75,20			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	28,31			(Gros et al., 2019)
	Tétracycline	Espagne	2 mois	0 - 30	10,25			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	0 - 30	3,02			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	30 - 60	1,80			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	30 - 60	0,63			(Gros et al., 2019)
		Espagne	2 mois	60 - 90	1,39			(Gros et al., 2019)
		Espagne	7 mois	60 - 90	< LOD			(Gros et al., 2019)
	Triclosan	USA	1 mois	0 - 25	69			(Kinney et al., 2008)

Tableau A.4. Concentrations en ETMs dans différents Mafors (effluents d'élevage et boue d'épuration).

Types de Mafors	ETM	Pays	Effluents	Concentration (mg.kg ⁻¹ MS)			Références
				Moyenne ± EC	min	max	
Boue d'épuration	Cu	Pologne	Boue secondaire activée	145,43 ± 37,38			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	731 ± 9			(Iglesias et al., 2018)
		France	Boue secondaire digérée	843,8 ± 61,2			(Bouriou et al., 2015)
		Suède	Boue secondaire digérée	323	110	640	(Östman et al., 2017)
	Zn	Pologne	Boue secondaire activée	2510,36 ± 615,99			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	1280 ± 1			(Iglesias et al., 2018)
		France	Boue secondaire digérée	592,8 ± 32,4			(Bouriou et al., 2015)
		Suède	Boue secondaire digérée	720	396	1500	(Östman et al., 2017)
	Cd	Pologne	Boue secondaire activée	1,10 ± 0,24			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	1,9 ± 0,1			(Iglesias et al., 2018)
		France	Boue secondaire digérée	1,8 ± 0,6			(Bouriou et al., 2015)
		Suède	Boue secondaire digérée	2,10	0,59	37	(Östman et al., 2017)
	Ni	Pologne	Boue secondaire activée	19,11 ± 9,02			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	46 ± 7			(Iglesias et al., 2018)
		Suède	Boue secondaire digérée	17,3	7,3	36	(Östman et al., 2017)
	Pb	Pologne	Boue secondaire activée	32,21 ± 5,86			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	112 ± 21			(Iglesias et al., 2018)
		France	Boue secondaire digérée	15,9 ± 4,5			(Bouriou et al., 2015)
		Suède	Boue secondaire digérée	45	10,9	560	(Östman et al., 2017)
	Cr	Pologne	Boue secondaire activée	140,62 ± 22,55			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	70 ± 4			(Iglesias et al., 2018)
	Ag	Pologne	Boue secondaire activée	11,53 ± 1,43			(Courtois et al., 2021b)
		Espagne	Boue secondaire digérée	1,34 ± 0,07			(Iglesias et al., 2018)
		Suède	Boue secondaire digérée	1,98	0,72	3,26	(Östman et al., 2017)
Hg	Espagne	Boue secondaire digérée	0,8 ± 0,3			(Iglesias et al., 2018)	
	Suède	Boue secondaire digérée	1,45	0,19	10	(Östman et al., 2017)	
Effluents d'élevage	Cu	Chine	Fumier de porc	1400			(Li et al., 2007)
		Turquie	Fumier de vache	21,20			(Karcı and Balcıoğlu, 2009)
		Turquie	Fumier de volaille	50,82 ± 12,15			(Karcı and Balcıoğlu, 2009)
		Chine	Fumier de vache		26	36	(Zhao et al., 2014)
		Grèce	Fumier de vache	26,02 ± 16,2			(Makridis et al., 2012)
		Grèce	Fumier de porc	155,13 ± 9,13			(Makridis et al., 2012)
		Grèce	Fumier de mouton	20,16 ± 11,3			(Makridis et al., 2012)
		France	Fumier de vache	200 ± 100			(Tella et al., 2013)
		Chine	Fumier de vache		5,578	112,9	(Xiong et al., 2010)
		Chine	Fumier de porc	399	35,7	1726,3	(Cang et al., 2004)
		Chine	Fumier de volaille	89,14	20,7	569,7	(Cang et al., 2004)
		Chine	Fumier de vache	45,99	22,7	91,0	(Cang et al., 2004)
	Zn	Turquie	Fumier de vache	68,10			(Karcı and Balcıoğlu, 2009)
		Turquie	Fumier de volaille	544,68 ± 135,12			(Karcı and Balcıoğlu, 2009)
		Chine	Fumier de vache		39	48	(Zhao et al., 2014)
		Grèce	Fumier de vache	93,98 ± 41,5			(Makridis et al., 2012)

	Grèce	Fumier de porc	122 ± 80,1			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de mouton	144,56 ± 5,78			(Makridis et al., 2012)
	France	Fumier de vache	500 ± 200			(Tella et al., 2013)
	Chine	Fumier de porc	505,9	113,6	1505,6	(Cang et al., 2004)
	Chine	Fumier de vache	185,52	98,9	305,9	(Cang et al., 2004)
	Chine	Fumier de volaille	417	175,3	964,7	(Cang et al., 2004)
Cd	Turquie	Fumier de vache	0			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Turquie	Fumier de volaille	0,48 ± 1,18			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Chine	Fumier de vache		0,6	0,9	(Zhao et al., 2014)
	Grèce	Fumier de vache	0,01			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de porc	0,41 ± 0,4			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de mouton	0,01			(Makridis et al., 2012)
	France	Fumier de vache	1,6 ± 0,7			(Tella et al., 2013)
Ni	Turquie	Fumier de vache	29,80			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Turquie	Fumier de volaille	8,93 ± 2,12			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Grèce	Fumier de vache	13,47 ± 7,9			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de porc	5,70 ± 5,1			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de mouton	24,71 ± 17,1			(Makridis et al., 2012)
	France	Fumier de vache	30 ± 10			(Tella et al., 2013)
Pb	Turquie	Fumier de vache	0,60			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Turquie	Fumier de volaille	0,58 ± 0,99			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Chine	Fumier de vache		4,8	5,6	(Zhao et al., 2014)
	Grèce	Fumier de vache	7,98 ± 6,9			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de porc	9,86 ± 11,5			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de mouton	17,05 ± 6,7			(Makridis et al., 2012)
	France	Fumier de vache	200 ± 100			(Tella et al., 2013)
Cr	Turquie	Fumier de vache	21,20			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Turquie	Fumier de volaille	10,62 ± 5,30			(Karcı and Balcıođlu, 2009)
	Chine	Fumier de vache		2,2	6,2	(Zhao et al., 2014)
	Grèce	Fumier de vache	30,30 ± 29,2			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de porc	18,40 ± 23,4			(Makridis et al., 2012)
	Grèce	Fumier de mouton	37,20 ± 24,6			(Makridis et al., 2012)
	France	Fumier de vache	80 ± 20			(Tella et al., 2013)
Hg	Chine	Fumier de porc	0,033	0,0002	0,118	(Cang et al., 2004)
	Chine	Fumier de vache	0,039	0,0002	0,073	(Cang et al., 2004)
	Chine	Fumier de volaille	0,024	0,0012	0,077	(Cang et al., 2004)

ANNEXE B

Tableau B.1. Profil de fractionnement du sol de référence (en % de COT) et du crottin de cheval (en % de la DCO).

Types de matrice	Fractions extraites	Proportion de la DCO / COT (%)	Ratio de complexité
Sol de référence *	SPOM	26,85	1,4
	REOM	41,80	2,4
	SEOM	28,28	2,8
	PEOM	3,74	9,0
	NEOM	-0,66	-
Crottin de cheval	SPOM	9,69	1,1
	REOM	4,00	2,6
	SEOM	8,86	1,1
	PEOM	50,88	4,6
	NEOM	26,57	-

Matière organique particulaire très facilement extractible (SPOM). Matière organique particulaire facilement extractible (REOM). Matière organique particulaire lentement extractible (SEOM) Matière organique particulaire peu extractible (PEOM). Matière organique non extraite (NEOM).

Les ratios de complexité sont calculés à partir des spectres de fluorescence (cf. figure C.1 de l'ANNEXE C, page 262). D'après le modèle de régression prédictif développé par Jimenez et al. (2017), le carbone minéralisable atteint une valeur de 28,5 % dans le crottin de cheval biologique et le potentiel biométhanogène atteint une valeur de 239 NmLCH₄.gMV⁻¹ dans le crottin de cheval biologique.

* Les fractions obtenues à partir du sol de référence sont caractérisées par la mesure du carbone organique totale (taille du compartiment extrait versus total).

Tableau B.2. Suivi météorologique durant le test de reproduction *in situ* des vers de terre *E. fetida* et quantité d'eau apportée au dispositif expérimental.

Jour	Météo Bron (69)				Arrosage/Chambre		
	Tmin	Tmax	Précipitation	Ensoleillement	T	Lisier	Boue
	°C	°C	mm	h/min	mL	mL	mL
09-juin-21	17	27,4	0,2	8 h 24	-	-	-
10-juin-21	16	28,9	0	13 h 36	-	-	-
11-juin-21	16,5	30,1	0	13 h 55	325	325	325
12-juin-21	18,3	29,8	0	14 h 06	-	-	-
13-juin-21	19,6	29,3	0	14 h 48	-	-	-
14-juin-21	16	31,6	0	14 h 49	400	300	300
15-juin-21	18,9	31,6	0	14 h 20	400	300	300
16-juin-21	17,3	34	0	12 h 45	400	300	300
17-juin-21	23,1	30,1	0	3 h 30	300	100	100
18-juin-21	20,3	32,3	0,4	10 h 41	500	400	300
19-juin-21	20,9	31,3	0	8 h 24	-	-	-
20-juin-21	16,9	29,5	14,2	5 h 12	-	-	-
21-juin-21	16,5	29	5,8	4 h 28	200	100	-
22-juin-21	16	25,7	0,8	7 h 42	200	-	-
23-juin-21	15,5	25,8	2,8	6 h 25	300	-	-
24-juin-21	15,4	21,6	0	5 h 00	-	-	-
25-juin-21	13,3	22,5	0	8 h 15	400	300	50
26-juin-21	12	28,3	0	12 h 36	-	-	-
27-juin-21	17,6	30,4	0	8 h 00	-	-	-
28-juin-21	18,1	22,9	2	1 h 22	100	100	-
29-juin-21	17,6	24,6	0,8	4 h 36	100	100	-
30-juin-21	12	23,5	0,8	5 h 34	200	100	100
01-juil-21	14,5	26,3	0	9 h 48	300	200	100
02-juil-21	13,5	28,5	0	11 h 59	400	300	100
03-juil-21	19,8	23,6	2,8	1 h 37	-	-	-
04-juil-21	16,8	25,8	7,4	3 h 14	-	-	-
05-juil-21	18	29,8	2	8 h 39	100	100	-
06-juil-21	14,7	20,1	36	0 h 12	-	-	-

Tableau B.3. Limite de détection (LD) et de quantification (LOQ) des méthodes d'analyses sur les résidus de médicaments suivis dans les vers de terre (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS).

Résidus de médicaments	LD	LOQ
3-amino-5-méthylisoxazole	77,03	231,09
5-Hydroxythiabendazole	0,25	0,76
Acétyl-sulfaméthoxazole	1,25	3,76
Albendazole-2-aminosulfone	0,21	0,64
Anhydroérythromycine	0,25	0,76
Bromacil	0,99	2,96
Chlorhexidine	61,98	185,93
Ciprofloxacine	10,05	30,16
Diméthyl-didécyl ammonium	60,33	180,98
Desméthyl-ofloxacine	12,71	38,13
Doramectine	3171,12	9513,35
Épitétracycline	226,06	678,17
Éprinomectine	103,02	309,07
Érythromycine	0,19	0,57
Flubendazole	0,28	0,83
Hydroxy-flubendazole	0,25	0,76
Hydroxy-levamisole	12,71	38,13
Kétoprofène	1,01	3,04
Levamisole	1,01	3,03
Méthamidophos	2907,28	8721,83
Ofloxacine	9,91	29,72
Oxfendazole	0,19	0,58
Pyrantel	10,23	30,70
Pyriméthamine	0,21	0,62
Sulfaguanidine	582,09	1746,28
Sulfaméthoxazole	9,84	29,51
Sulfathiazole	597,76	1793,28
Sulfoxaflor	0,96	2,89
Tébuconazole	0,21	0,63
Tétracycline	59,62	178,87
Thiabendazole	0,20	0,61
Triclosan	4,77	14,30
Triméthoprime	0,20	0,61

ANNEXE C

Tableau C.1. Paramètres physicochimiques du sol de référence et du sol artificiel ISO utilisés durant les tests d'écotoxicité.

Types de sols		Sol de référence	Sol artificiel ISO
	Humidité (%)	4,63 ± 0,24	1,66 ± 0,29
	pH	6,61 ± 0,04	6,31 ± 0,04
	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	48,4 ± 0,17	392,43 ± 25,46
	CEC (meq.kg^{-1})	77,33 ± 3,79	85,67 ± 12,86
	CRE (%)	31,59 ± 4,11	45,00 ± 2,18
Statut organique (g.kg^{-1} MS)			
	Carbone organique	9,17 ± 0,45	38,40 ± 6,32
	Matière organique	15,77 ± 0,75	66,03 ± 10,91
	Azote total	1,13 ± 0,12	0,97 ± 0,23
	Rapport C/N	7,33 ± 0,58	40,00 ± 3,46
Éléments fertilisants (g.kg^{-1} MS)			
	Phosphore Olsen	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00
	Potassium	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,00
	Calcium	1,33 ± 0,46	5,75 ± 6,46
	Magnésium	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,02
Éléments traces métalliques (mg.kg^{-1} MS)			
	Zn	66,54 ± 2,30	29,03 ± 0,00
	Cu	12,81 ± 0,07	2,66 ± 0,22
	Cd	0,23 ± 0,01	0,03 ± 0,00
	Cr	52,94 ± 0,47	2,51 ± 0,13
	Pb	11,74 ± 0,07	3,08 ± 0,10
	Ni	24,05 ± 0,30	0,98 ± 0,01
Résidus de médicaments ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS)			
	3-amino-5-méthylisoxazole	<LD	<LD
	5-Hydroxythiabenzazole	<LD	<LD
	Acétyle-sulfaméthoxazole	<LD	<LD
	Albendazole-2-aminosulfone	<LD	<LD
	Anhydroérythromycine	<LD	<LD
	Bromacil	<LD	<LD
	Chlorhexidine	15,6	<LD
	Ciprofloxacine	<LD	<LD
	Diméthyl-didécyl ammonium	<LOQ	<LD
	Desméthyl-ofloxacine	<LD	<LD
	Doramectine	<LD	<LD
	Épitétracycline	<LD	<LD
	Éprinomectine	<LD	<LD
	Érythromycine	<LD	<LD
	Flubendazole	<LD	<LD
	Hydroxy-flubendazole	<LD	<LD
	Hydroxy-levamisole	<LD	<LD
	Kétoprofène	<LD	<LD
	Levamisole	<LD	<LD
	Méthamidophos	<LD	<LD
	Ofloxacine	<LD	<LD
	Oxfendazole	<LD	<LD
	Pyrantel	<LD	<LD
	Pyriméthamine	<LOQ	<LD
	Sulfaguandine	<LD	<LD
Sulfaméthoxazole	<LD	<LD	
Sulfathiazole	<LD	<LD	
Sulfoxaflor	<LD	<LD	

	Tébuconazole	<LD	<LD
	Tétracycline	<LD	<LD
	Thiabendazole	<LD	<LD
	Triclosan	<LD	<LD
	Triméthoprième	<LD	<LD
Hydrocarbures polycycliques aromatiques ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS)			
	Acénaphthène	<LOQ	ND
	Anthracène	0,23 \pm 0,03	ND
	Benz[a]anthracène	1,69 \pm 0,14	ND
	Benzo[b]fluoranthène	4,25 \pm 0,26	ND
	Benzo[k]fluoranthène	1,29 \pm 0,07	ND
	Benzo[ghi]pérylène	2,49 \pm 0,63	ND
	Benzo[a]pyrène	2,13 \pm 0,20	ND
	Chrysène	3,19 \pm 0,36	ND
	Dibenz[a,h]anthracène	0,68 \pm 0,11	ND
	Fluoranthène	4,11 \pm 0,23	ND
	Fluorène	0,11 \pm 0,01	ND
	Indeno[1,2,3-cd]pyrène	2,01 \pm 0,52	ND
	Naphtalène	<LOQ	ND
	Phénanthrène	2,66 \pm 0,13	ND
	Pyrène	3,49 \pm 0,21	ND
Polychlorinated dibenzodioxins ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS)			
	Σ 7 PCDDs	0,017	0,001
Polychlorinated dibenzofurans ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS)			
	Σ 10 PCDFs	0,002	0,001
Polychlorinated biphenyl ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS)			
	Σ 4 PCBno	0,001	0,008
	Σ 8 PCBmdio	0,026	0,731
	Σ 6 PCBNDL	0,169	5,018
Retardateurs de flamme bromés ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS)			
	Σ 9 PBDE	0,051	0,052
	Σ 3 PBE	<LD	<LD
	Σ 3 HBCDD	0,065	0,066

Valeurs moyennes ($n = 3$) et \pm écart-type. LD = Limite de détection, LOQ = Limite de quantification, ND = Non déterminé (cf. **Tableau 10**, page 108 et **Tableau 11** page 110 du chapitre 4.5.4).

Tableau C.2. Paramètres physicochimiques du crottin de cheval biologique utilisé dans les élevages et des trois Mafors étudiées durant les tests d'écotoxicité.

Types de sols		Crottin de cheval	Boue d'épuration	Fumier de vache	Lisier de vache
	Humidité (%)	5,25 ± 0,60	53,97 ± 0,44	82,39 ± 0,50	78,07 ± 3,14
	pH	7,82 ± 0,01	6,86 ± 0,02	8,82 ± 0,05	9,83 ± 0,08
	CE (µS.cm ⁻¹)	2,07 ± 0,06	3,25 ± 0,12	6,70 ± 0,03	7,87 ± 0,02
	CRE (%)	295,22 ± 12,53	266,51 ± 21,89	319,1 ± 9,43	307,6 ± 22,90
Statut organique (g.kg⁻¹ MS)					
	Carbone organique	402,86 ± 15,28	374,74 ± 10,58	371,57 ± 3,23	412,71 ± 15,85
	Matière organique	836,33 ± 3,51	764,00 ± 2,65	705,33 ± 11,37	787,00 ± 14,93
	Azote total	13,44 ± 0,30	74,39 ± 1,14	27,48 ± 1,02	30,09 ± 4,95
	Azote Ammoniacal	0,16 ± 0,04	5,03 ± 0,09	3,81 ± 0,06	6,90 ± 8,86
	Azote organique	13,35 ± 0,33	69,36 ± 1,20	23,67 ± 0,99	23,19 ± 3,91
	Rapport C/N	29,85 ± 1,69	5,04 ± 0,07	13,53 ± 0,55	13,90 ± 1,61
Éléments fertilisants (g.kg⁻¹ MS)					
	P	2,43 ± 0,14	25,73 ± 2,02	4,66 ± 0,17	6,48 ± 0,17
	P ₂ O ₅	5,56 ± 0,33	58,92 ± 4,63	10,67 ± 0,40	14,84 ± 0,40
	K	10,65 ± 0,41	7,24 ± 0,14	33,84 ± 3,64	46,21 ± 3,74
	K ₂ O	12,77 ± 0,50	8,69 ± 0,17	40,60 ± 4,36	55,46 ± 4,48
	Ca	7,18 ± 0,37	30,21 ± 1,95	24,63 ± 2,08	23,74 ± 2,26
	CaO	10,05 ± 0,53	42,29 ± 2,73	34,49 ± 2,90	33,24 ± 3,17
	Mg	1,61 ± 0,05	5,24 ± 0,45	6,74 ± 0,37	7,76 ± 0,36
	MgO	2,68 ± 0,08	8,70 ± 0,75	11,19 ± 0,61	12,87 ± 0,60
Éléments traces métalliques (mg.kg⁻¹ MS)					
	Zn	90,13 ± 3,03	483,43 ± 9,48	67,83 ± 1,61	165,79 ± 17,69
	Cu	6,95 ± 0,04	208,41 ± 1,78	17,86 ± 0,75	23,88 ± 0,70
	Cd	0,18 ± 0,01	0,87 ± 0,02	2,58 ± 0,12	0,13 ± 0,01
	Cr	6,60 ± 0,03	26,71 ± 0,05	20,01 ± 3,28	4,61 ± 0,22
	Pb	2,42 ± 0,15	14,93 ± 0,78	0,20 ± 0,02	0,74 ± 0,05
	Ni	3,71 ± 0,22	11,69 ± 0,35	9,21 ± 0,93	2,45 ± 0,05
Résidus de médicaments (µg.kg⁻¹ MS)					
	3-amino-5-méthylisoxazole	<LD	55,9 ± 14,0	28,0 ± 1,0	10,30
	5-Hydroxythiabenzazole	<LD	<LD	<LD	<LD
	Acétyle-sulfaméthoxazole	<LD	<LD	<LD	<LD
	Albendazole-2-aminosulfone	<LD	2,5 ± 0,6	0,47	0,1 ± 0,0
	Anhydroérythromycine	<LD	<LD	<LD	<LD
	Bromacil	<LD	<LD	<LD	<LD
	Chlorhexidine	<LD	2066,7 ± 517,0	<LD	<LD
	Ciprofloxacine	<LD	129,0 ± 32,0	<LD	<LD
	Diméthyl-didécyl ammonium	<LD	36936,4 ± 9234,0	<LOQ	<LOQ
	Desméthyl-ofloxacine	<LD	37,7 ± 9,4	<LOQ	<LOQ
	Doramectine	<LD	<LD	<LD	<LD
	Épitétracycline	<LD	30,5 ± 7,6	1,3 ± 0,4	2,8 ± 0,9
	Éprinomectine	<LD	<LD	<LD	<LD
	Érythromycine	<LD	<LD	<LD	<LD
	Flubendazole	<LD	17,5 ± 4,4	<LD	<LD
	Hydroxy-flubendazole	<LD	1,6 ± 0,4	<LOQ	<LOQ
	Hydroxy-levamisole	<LD	<LD	<LD	<LD
	Kétoprofène	<LD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Levamisole	<LD	8,5 ± 2,1	<LD	<LD
	Méthamidophos	<LD	<LD	<LD	<LD
	Ofloxacine	<LD	957,7 ± 239,4	<LD	<LD
	Oxfendazole	<LD	<LOQ	<LD	<LD
	Pyrantel	<LOQ	6,6 ± 1,7	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,6
	Pyriméthamine	<LD	<LD	<LOQ	<LOQ
	Sulfaguandine	<LD	<LD	<LD	<LD

	Sulfaméthoxazole	<LD	<LD	<LD	<LD
	Sulfathiazole	<LD	<LD	<LD	<LD
	Sulfoxaflor	<LD	<LD	<LD	<LD
	Tébuconazole	<LD	<LD	<LD	<LD
	Tétracycline	<LD	24,2 ± 6,0	1,2 ± 0,4	2,9 ± 2,9
	Thiabendazole	<LD	1,83	<LOQ	<LOQ
	Triclosan	<LD	21,4 ± 5,3	<LD	<LD
	Triméthoprime	<LD	<LOQ	<LD	<LD
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg.kg⁻¹ MS)					
	Acénaphène	1,26 ± 0,13	0,34 ± 0,06	2,86 ± 0,25	0,75 ± 0,16
	Anthracène	2,45 ± 0,20	1,14 ± 0,03	6,57 ± 0,16	1,88 ± 0,40
	Benzo[a]anthracène	1,75 ± 0,12	6,36 ± 0,15	2,85 ± 0,43	0,26 ± 0,12
	Benzo[b]fluoranthène	3,58 ± 0,15	17,64 ± 1,61	6,13 ± 0,40	0,41 ± 0,35
	Benzo[k]fluoranthène	2,11 ± 0,43	6,32 ± 0,15	2,95 ± 1,19	<LOQ
	Benzo[ghi]pérylène	2,07 ± 0,20	10,48 ± 0,24	6,03 ± 0,36	0,33 ± 0,12
	Benzo[a]pyrène	2,01 ± 0,26	9,82 ± 0,25	3,97 ± 0,13	0,48 ± 0,06
	Chrysène	4,53 ± 0,29	20,16 ± 0,18	10,81 ± 1,25	0,74 ± 0,06
	Dibenz[a,h]anthracène	1,15 ± 0,24	0,51 ± 0,04	0,29 ± 0,08	0,78 ± 0,24
	Fluoranthène	25,44 ± 3,17	25,52 ± 1,45	14,06 ± 2,84	11,07 ± 1,02
	Fluorène	4,16 ± 0,22	19,53 ± 0,03	14,64 ± 0,25	4,81 ± 0,19
	Indeno[1,2,3-cd]pyrène	1,58 ± 0,33	8,43 ± 0,67	1,92 ± 0,68	1,01 ± 1,14
	Naphtalène	5,32 ± 0,67	ND	ND	6,37 ± 0,7
	Phénanthrène	34,76 ± 1,58	74,09 ± 3,90	25,59 ± 0,30	8,69 ± 2,22
	Pyrène	14,31 ± 0,92	42,24 ± 0,84	31,03 ± 1,11	2,61 ± 0,48
Polychlorinated dibenzodioxins (µg.kg⁻¹ MS)					
	Σ 7 PCDDs	0,132	0,397	0,030	0,003
Polychlorinated dibenzofurans (µg.kg⁻¹ MS)					
	Σ 10 PCDFs	0,001	0,028	0,002	0,001
Polychlorinated biphenyl (µg.kg⁻¹ MS)					
	Σ 4 PCBno	0,023	0,220	0,009	0,004
	Σ 8 PCBmdio	0,361	4,655	0,204	0,082
	Σ 6 PCBNDL	1,804	19,716	0,770	0,293
Retardateurs de flamme bromés (µg.kg⁻¹ MS)					
	Σ 9 PBDE	0,05	0,05	0,05	0,05
	Σ 3 PBE	<LD	<LD	<LD	<LD
	Σ 3 HBCDD	0,132	28,87	2,81	0,06

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-type. LD = Limite de détection, LOQ = Limite de quantification, ND = Non déterminé (cf. **Tableau 10**, page 108 et **Tableau 11** page 110 du chapitre 4.5.4).

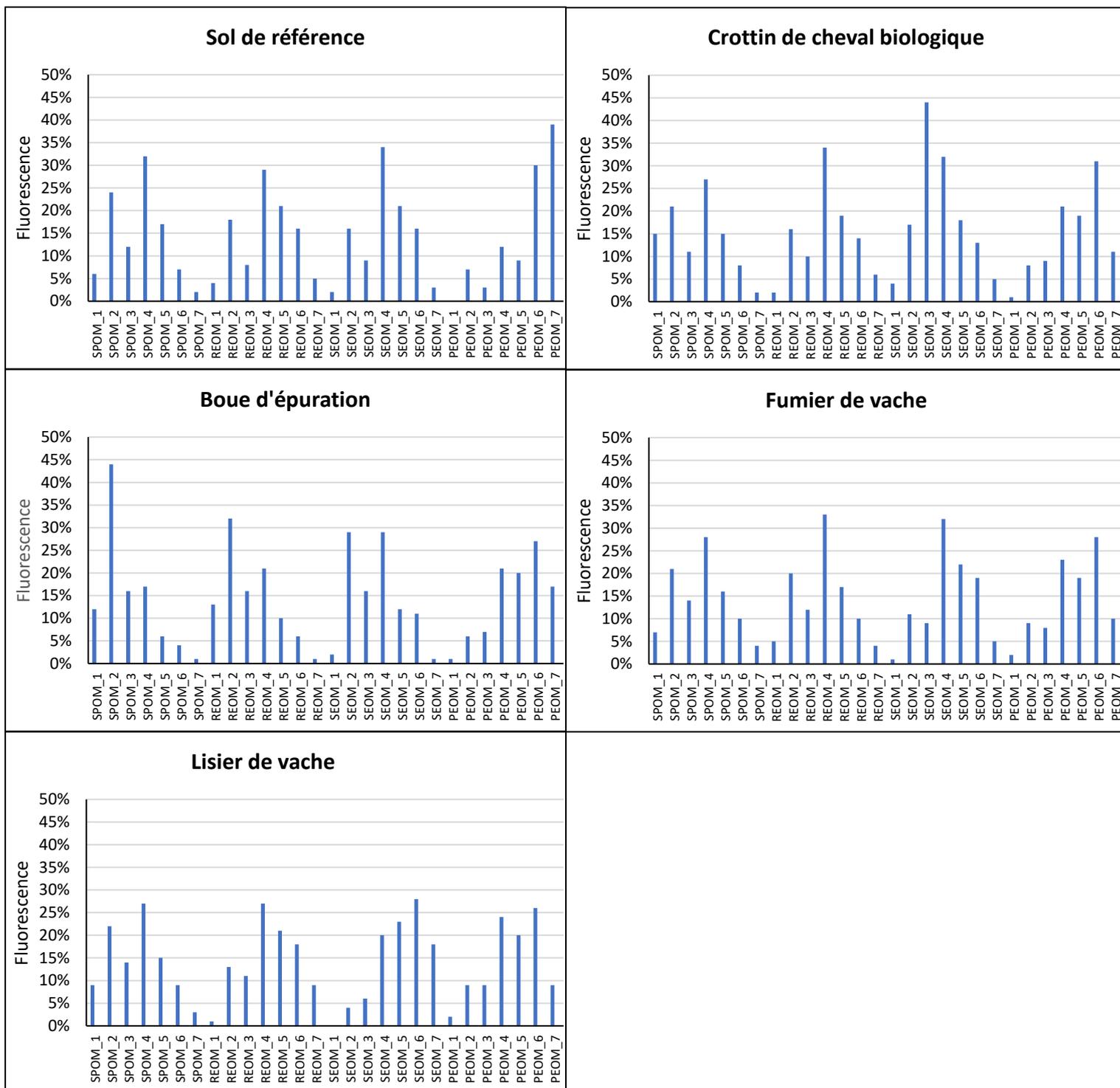


Figure C.1. Spectre de fluorescence des fractions extraites des différentes matrices étudiées. Matière organique particulare très facilement extractible (SPOM). Matière organique particulare facilement extractible (REOM). Matière organique particulare lentement extractible (SEOM) Matière organique particulare peu extractible (PEOM).

Tableau C.3. Taux de germination obtenus lors du test d'émergence et de croissance des plantes de la luzerne cultivée *M. sativa* et de la moutarde blanche *Sinapis alba* exposées à différentes teneurs en Mafors.

Plantes	Mafors	Teneur en Mafors dans le sol (g.kg ⁻¹ MS)	Taux de germination moyen (%)
Luzerne	Boue d'épuration	0	73,78 ± 7,34
		10	82,67 ± 4,00
		20	70,67 ± 9,24
	Fumier de vache	0	73,78 ± 7,34
		10	77,78 ± 11,65
		20	76,44 ± 5,55
	Lisier de vache	0	73,78 ± 7,34
		10	95,56 ± 7,58
		20	84,00 ± 9,24
Moutarde	Boue d'épuration	0	77,33 ± 14,85
		10	95,11 ± 10,69
		20	93,33 ± 5,81
	Fumier de vache	0	77,33 ± 14,85
		10	89,78 ± 3,85
		20	92,44 ± 2,04
	Lisier de vache	0	77,33 ± 14,85
		10	82,22 ± 2,04
		20	84,44 ± 4,07

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-type.

ANNEXE D

Des perturbateurs endocriniens dans les Mafors étudiées ?

Introduction et objectifs

L'exposition des organismes à des perturbateurs endocriniens peut altérer la fonction des gonades, diminuer la production de spermatozoïdes et réduire l'éclosion des œufs chez les organismes du sol, les poissons, les oiseaux, les reptiles et les mammifères (Kwak and An, 2021 ; Spaan et al., 2019 ; Tarnow et al., 2019 ; Acevedo-Barrios et al., 2018). Dans notre étude, les Mafors contiennent en partie des déchets organiques issus des déjections humaines (boue d'épuration) et animales (fumier et lisier). Ces Mafors sont alors susceptibles de contenir également des hormones pouvant conduire à des perturbations du système endocrinien des organismes du sol (Černá et al., 2022). En effet, les hormones (œstrogènes et androgènes) sont détectées avec des quantités variables dans les boues d'épuration et dans les sols amendés en boue d'épuration (Fan et al., 2011 ; Nieto et al., 2010 ; Kuster et al., 2004). Cependant, de nombreux autres polluants organiques et inorganiques ont également des actions œstrogéniques et androgéniques sur les organismes (Hassine, 2014). Ces Mafors sont donc susceptibles de perturber les activités endocriniennes des organismes du sol. Chez les vers de terre, une activité œstrogénique et androgénique de ces échantillons peut générer une inhibition de leur reproduction (Kwak and An, 2021). L'utilisation du test YES-YAS permet d'évaluer les activités œstrogéniques et androgéniques des Mafors ainsi que leur effet antagoniste sur des levures modifiées génétiquement (Chapitre 4.6.1, page 111).

Résultats et discussion

L'étude des activités œstrogéniques et androgéniques s'est portée sur les éluviats et les extraits organiques issus des Mafors. Les éluviats contiennent des composés facilement extractibles et biodisponibles provenant des matrices étudiées. Les résultats de l'exposition des levures modifiées à des concentrations en éluviats du sol de référence et de Mafors sont présentés dans le **tableau D.1**. Le sol de référence ne présente aucune activité endocrinienne.

Les résultats mettent en évidence une activité endocrinienne des éluutriats issus des trois Mafors étudiées, mimant à la fois une activité œstrogénique et une activité androgénique. L'activité œstrogénique obtenue est principalement agoniste et apparaît à une concentration en éluatriat de 5 % pour la boue d'épuration et le lisier de vache, et à une concentration plus faible de 1,58 % pour le fumier de vache. Une activité antagoniste à l'œstrogène est observée seulement dans les éluutriats du lisier de vache à une concentration de 1,58 %. Les trois Mafors montrent une activité œstrogénique équivalente à la 17 β -œstradiol comprise entre 14,4 et 65,9 ng.g⁻¹ MS. Ces valeurs sont similaires à celles retrouvées dans la littérature sur les boues d'épuration (Černá et al., 2022 ; Ruan et al., 2015). L'étude de Černá et al. (2022) identifie les œstrogènes naturellement présents dans les boues d'épuration comme la cause principale de l'activité endocrinienne dans ces matrices. Cette forte activité œstrogénique retrouvée dans ces trois Mafors peut conduire à un dérèglement du cycle de reproduction des organismes terrestres (Kwak and An, 2021). Une réduction de la quantité d'ovocytes matures et une diminution de la reproduction sont observées chez les vers de terre (Kwak and An, 2021 ; Acevedo-Barríos et al., 2018 ; Heger et al., 2015). Mais, dans un contexte d'épandage agricole, la dose d'épandage agronomique de ces Mafors est faible et conduit à une forte dilution dans le sol récepteur. D'après les mêmes travaux cités précédemment, une faible activité agoniste à l'œstrogène dans le milieu peut stimuler la reproduction des organismes terrestres. En revanche, l'activité antagoniste à l'œstrogène détectée dans l'éluatriat du lisier conduit à une inhibition du cycle de reproduction des organismes terrestres.

Tableau D.1. Équivalent en concentration d'agonistes de référence (YES et YAS) ou d'antagonistes de référence (Anti-YES et Anti-YAS) pour les éluutriats d'amendements organiques et du sol de référence.

	Activité œstrogénique (ng.L ⁻¹)				Activité androgénique (ng.L ⁻¹)			
	YES		Anti-YES		YAS		Anti-YAS	
	LOEC (% v/v)	Équivalent en 17 β -œstradiol pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)	LOEC (% v/v)	Équivalent en 4-hydroxytamoxifène pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)	LOEC (% v/v)	Équivalent en 5 α -dihydrotestostérone pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)	LOEC (% v/v)	Équivalent en flutamide pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)
Sol de référence	-	-	-	-	-	-	-	-
Boue d'épuration	5	14,4 \pm 0,2	-	-	-	-	5	5,6 \pm 2,1 .10 ⁶
Fumier de vache	1,58	65,9 \pm 11,4	-	-	-	-	1,58	6,2 \pm 4,9 .10 ⁶
Lisier de vache	5	22,4 \pm 0,9	1,58	1,7 \pm 0,3 .10 ⁵	-	-	5	1,7 \pm 1,4 .10 ⁶

Valeurs moyennes (n = 3) et \pm écart-type. 1 % v/v d'éluatriat est équivalent à 1 g.L⁻¹ MS.
LOEC = Concentration minimale avec effets observés

Dans un second temps, l'activité androgénique des Mafors est analysée dans les éluutriats. Les résultats sur les trois Mafors étudiées mettent en évidence des effets antagonistes uniquement sur l'androgène. Ils sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature pour les boues d'épuration (Hu et al., 2021). D'après Šauer et al. (2018), seule la présence d'hormones stéroïdiennes pourrait générer des effets agonistes à l'androgène. L'activité antagoniste à l'androgène est détectée à une concentration en éluatriat de 5 % pour la boue d'épurationnet le lisier de vache et de 1,58 % pour le fumier de vache, se traduisant par une inhibition de l'activité androgénique. Cette forte activité androgénique est susceptible d'inhiber la reproduction des invertébrés du sol. Chez les vers de terre, cette forte activité antagoniste à l'androgène peut générer une inhibition de l'ovogenèse et de la spermatogenèse (Kwak and An, 2021).

Les Mafors présentent des matrices complexes riches en matière organique pouvant séquestrer de nombreux composés difficilement extractibles à l'eau. Les extraits organiques représentent le potentiel global de l'activité endocrine de ces Mafors avec des composés à la fois facilement extractibles et biodisponibles, et des composés fortement séquestrés dans la matière. Les résultats des activités œstrogéniques et androgéniques dans les extraits organiques des Mafors sont présentés dans le **Tableau D.2**. L'activité androgénique obtenue sur les extraits organiques est identique et à des concentrations similaires aux résultats obtenus sur les éluutriats. En revanche, les extraits organiques mettent en évidence une activité antagoniste à l'œstrogène sur la boue d'épuration (0,03 %) et le fumier de vache (0,5 %). L'activité antagoniste à l'œstrogène apparaît à une très faible concentration en boue d'épuration identique au lisier de vache dans l'éluatriat ce qui se traduit par un impact négatif potentiel sur la reproduction des organismes terrestres. L'activité antagoniste à l'œstrogène détectée dans le fumier n'apparaît qu'à une concentration relativement élevée de l'extrait organique du fumier.

Tableau D.2. Équivalent en concentration d'agonistes de référence (YES et YAS) ou d'antagonistes de référence (Anti-YES et Anti-YAS) pour des extraits organiques d'amendements organiques et du sol de référence.

	Activité œstrogéniques (ng.L ⁻¹)				Activité androgénique (ng.L ⁻¹)			
	YES		Anti-YES		YAS		Anti-YAS	
	LOEC (% v/v)	Équivalent en 17β-estradiol pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)	LOEC (% v/v)	Équivalent en 4-hydroxytamoxifène pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)	LOEC (% v/v)	Équivalent en 5α-dihydrotestostérone pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)	LOEC (% v/v)	Équivalent en flutamide pour 1 % v/v (ng.L ⁻¹)
Sol de référence	-	-	-	-	-	-	-	-
Boue d'épuration	-	-	0,03	1,1 ± 0,5 .10 ⁷	-	-	0,03	8,9 ± 0,9 .10 ⁷
Fumier de vache	0,05	1,4 ± 0,4 .10 ³	0,5	2,2 ± 3,7 .10 ⁵	-	-	0,05	7,3 ± 2,2 .10 ⁷
Lisier de vache	0,02	9,1 ± 1,7 .10 ³	-	-	-	-	0,02	3,3 ± 0,4 .10 ⁷

Valeurs moyennes (n = 3) et ± écart-type. 1 % v/v de l'extrait est équivalent à 100 g.L⁻¹ MS.
LOEC = Concentration minimale avec effets observés

Conclusion

Le test YES-YAS permet d'évaluer rapidement si l'échantillon environnemental étudié présente des activités endocriniennes (œstrogènes et androgènes). Dans notre étude, une activité endocrinienne élevée est détectée dans les trois Mafors sélectionnées. Ces activités endocriniennes se traduisent principalement par un mimétisme de l'activité œstrogénique et une inhibition de l'activité androgénique sur les élutriats des trois Mafors avec des activités plus élevées observées sur le fumier de vache. En revanche, l'activité antagoniste à l'œstrogène se retrouve principalement à des concentrations similaires dans le lisier de vache sur les élutriats et dans la boue d'épuration sur les extraits organiques ce qui induit un risque potentiellement plus élevé sur la reproduction des organismes terrestres. Ces trois Mafors représentent donc un risque environnemental impactant potentiellement le cycle de reproduction des organismes dans le sol receveur. En perspective, il serait intéressant d'identifier l'origine de cette activité endocrine en cherchant à identifier, voire doser, les principales hormones connues pour être retrouvées dans les Mafors. De plus, la réalisation de ces tests sur des sols amendés à des doses réalistes en Mafors fournirait des données intéressantes sur l'activité endocrinienne qui pourraient ou non expliquer certains effets sur la reproduction des organismes terrestres.

ANNEXE E

Tableau E.1. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg⁻¹ MS) dans les vers de terre exposés à des sols amendés à 20 g.kg⁻¹ MS en Mafors pendant 28 jours lors du test de reproduction n° 2.

Condition	Zn		Cu		Cr		Cd		Ni		Pb	
	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA
Sol artificiel ISO	85,56 ± 6,92 a	5,59	8,56 ± 0,96 a	3,32	3,06 ± 0,45 a	0,58	2,54 ± 0,38 a	59,43	1,35 ± 0,05 a	4,90	0,59 ± 0,04 a	0,18
Sol de référence	93,66 ± 4,86 a	1,38	10,90 ± 0,41 a	0,83	10,12 ± 1,91 bc	0,16	6,37 ± 0,68 bc	32,71	5,10 ± 0,59 ab	0,17	2,09 ± 0,54 b	0,11
Boue	90,16 ± 6,10 a	1,19	17,30 ± 1,39 b	1,03	5,85 ± 1,73 ad	0,09	5,14 ± 0,76 b	17,95	3,17 ± 0,46 ab	0,10	0,95 ± 0,25 ab	0,05
Fumier	92,31 ± 4,80 a	1,36	12,75 ± 0,75 ac	0,96	8,26 ± 2,22 bd	0,13	7,65 ± 0,68 c	38,42	4,38 ± 0,91 ab	0,13	1,50 ± 0,82 ab	0,09
Lisier	85,20 ± 1,64 a	1,24	13,43 ± 1,07 c	1,01	11,89 ± 0,39 c	0,20	5,64 ± 0,79 b	32,47	6,75 ± 0,64 b	0,22	2,09 ± 0,50 b	0,12

Valeurs moyennes (n = 4) et ± écart-types. Chaque lettre indique un groupe statique identique (p < 0,05). Les valeurs de FBA > 1 sont affichées en gras.

Tableau E.2. Concentrations moyennes d'ETMs (mg.kg⁻¹ MS) dans les vers de terre exposés à des sols amendés à 10 g.kg⁻¹ MS en Mafors pendant 28 jours lors du test de reproduction *in situ*.

Condition	Zn		Cu		Cr		Cd		Ni		Pb	
	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA	Vers de terre	FBA
Sol de référence	91,21 ± 9,39 a	1,25	10,13 ± 0,80 a	0,70	2,00 ± 0,08 a	0,03	4,08 ± 0,55 a	16,19	0,66 ± 0,79 a	0,04	1,70 ± 0,12 a	0,05
Boue	98,23 ± 4,57 a	1,45	15,33 ± 0,78 b	1,06	2,58 ± 0,37 a	0,04	4,45 ± 0,57 a	18,75	0,32 ± 0,12 a	0,02	1,73 ± 0,15 a	0,06
Lisier	96,27 ± 9,23 a	1,23	14,97 ± 0,95 b	0,93	2,12 ± 0,91 a	0,03	4,67 ± 0,36 a	17,80	0,43 ± 0,47 a	0,03	1,74 ± 0,42 a	0,06

Valeurs moyennes (n = 5) et ± écart-types. Chaque lettre indique un groupe statique identique (p < 0,05). Les valeurs de FBA > 1 sont affichées en gras.



FOLIO ADMINISTRATIF

THÈSE DE L'INSA LYON, MEMBRE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

NOM : ROQUES

DATE de SOUTENANCE : 27 janvier 2023

Prénoms : Olivier, Clément

TITRE : Impacts de l'épandage agricole de matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sur les organismes terrestres

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2023ISAL0003

École doctorale : Chimie, Procédé, Environnement

Spécialité : Environnement

RÉSUMÉ : Les matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafors) sont utilisées dans l'agriculture comme amendement organique du sol pour améliorer sa structure, sa fertilité et son activité biologique. En France, les effluents d'élevage représentent la grande majorité des Mafors épandues, suivis des boues urbaines et industrielles ainsi que des composts. Toutefois, l'épandage des Mafors peut présenter un risque de contaminations biologiques et chimiques des sols agricoles. La valorisation des Mafors par épandage nécessite donc de maîtriser les risques environnementaux qu'elle génère, et plus particulièrement les risques écotoxicologiques. L'objectif de cette étude est de mettre en place une démarche expérimentale pour évaluer les potentiels d'effets écotoxicologiques associés à l'épandage de Mafors. Pour cela, une batterie de bioessais en laboratoire est mise en place pour évaluer l'écotoxicité de trois Mafors, sélectionnées pour leur représentativité des épandages agricoles en France (une boue d'épuration, un fumier et un lisier de vache) sur trois organismes terrestres (ver de terre, plantes et microorganismes). L'évaluation écotoxicologique comprend une analyse chimique et des tests de toxicité aiguë (activité enzymatique, germination, létalité) sur les organismes terrestres. Une absence d'écotoxicité aiguë est avérée à des doses d'épandage réalistes en Mafors, probablement masqué par un effet bénéfique observé par l'ajout de matière organique dans le sol amendé. La méthodologie est complétée par la conception et la réalisation de tests de toxicité chronique faisant intervenir des paramètres biologiques plus sensibles à de faibles contaminations (croissance des plantes et reproduction des vers de terre). L'écotoxicité chronique des Mafors s'est manifestée seulement par des effets reprotoxiques et des perturbations des réserves énergétiques des vers de terre exposés à des sols amendés en boue d'épuration et en lisier de vache à des doses d'épandage réalistes (20 g.kg⁻¹ MS). Des effets agronomiques positifs sont observés sur les plantes exposées à des sols amendés en boue d'épuration. En complément, le transfert potentiel de polluants (éléments traces métalliques et résidus de médicaments) présents dans les sols amendés est suivi et les résultats ne mettent pas en évidence une bioaccumulation dans les vers de terre.

MOTS-CLÉS : Amendement organique, bioaccumulation, bioessais, écotoxicologie, *Eisenia fetida*, éléments traces métalliques, *Medicago sativa*, microorganismes, résidus de médicaments, *Sinapis alba*, tests de toxicité aiguë et chronique.

Laboratoires de recherche : Laboratoire DEEP (EA 7429), INSA Lyon et Laboratoire LEHNA (UMR 5023, équipe IAPHY), ENTPE.

Directeurs de thèse :

Bayard, Rémy - Maître de conférences-HDR (INSA Lyon)

Bedell, Jean-Philippe - Directeur de recherche (ENTPE)

Président de jury : Gourdon, Rémy - Professeur des universités (INSA Lyon)

Composition du jury :

Garnier, Patricia - Directrice de recherche (INRAE Versailles)

Capowiez, Yvan - Chargé de recherche (INRAE Avignon)

Pérès, Guénola - Maître de conférences (Institut Agro Rennes-Angers)

Lebeau, Thierry - Professeur des universités (Université de Nantes)

Bayard, Rémy - Maître de conférences-HDR (INSA Lyon)

Bedell, Jean-Philippe - Directeur de recherche (ENTPE)

Invité : Perceval, Olivier - Docteur, Chef de Service (OFB)