



HAL
open science

Effets des composés organiques sur la faune du sol. Perturbation des communautés et recolonisation des substrats pollués

Jean-François Ponge

► **To cite this version:**

Jean-François Ponge. Effets des composés organiques sur la faune du sol. Perturbation des communautés et recolonisation des substrats pollués. 2004. hal-00538698

HAL Id: hal-00538698

<https://hal.science/hal-00538698>

Preprint submitted on 23 Nov 2010

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.

Public Domain

Effets des composés organiques sur la faune du sol. Perturbation des communautés et recolonisation des substrats pollués

**Effects of carbon compounds on soil fauna. Community disturbance and
recolonization of polluted substrates**

Jean-François PONGE

Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR 7179

26 août 2004

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| 1. <u>OBJECTIF DU PROJET</u> | 2 |
| 2. <u>SITE D'ÉTUDE</u> | 4 |
| 3. <u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u> | |
| <i>Analyses chimiques du sol</i> | 7 |
| <i>Analyse des horizons de surface</i> | 7 |
| <i>Analyse du peuplement de Collemboles</i> | 7 |
| <i>Expérience de colonisation en milieu naturel</i> | 8 |
| <i>Expérience de colonisation forcée en microcosmes</i> | 8 |
| <i>Etude de l'attraction/répulsion des Collemboles face à un composé organique toxique: le phénanthrène</i> | 9 |
| <i>Tests écotoxicologiques basés sur le comportement des Collemboles</i> | 12 |
| <i>Etude de l'impact de la faune sur la dégradation microbienne des HAPs dans un sol de cokerie</i> | 10 |
| 4. <u>RÉSULTATS</u> | |
| <i>Les composants des horizons de surface d'un site pollué par des composés organiques</i> | 14 |
| <i>Caractéristiques chimiques des horizons de surface</i> | 17 |
| <i>Le peuplement de Collemboles</i> | 19 |
| <i>Inoculation de la faune provenant d'un humus acide</i> | 21 |
| <i>Mobilité des Collemboles sous l'effet du phénanthrène</i> | 23 |
| <i>Tests écotoxicologiques utilisant le comportement d'évitement des Collemboles</i> | 25 |
| 5. <u>DISCUSSION</u> | 36 |
| 6. <u>PERSPECTIVES</u> | 38 |
| 7. <u>RÉFÉRENCES</u> | 39 |

1. OBJECTIF DU PROJET

Dans le cadre de la gestion des sites pollués, l'ADEME soutient des programmes de recherche dans le domaine de l'écotoxicité, visant à mettre en œuvre la méthode décrite dans le guide du Ministère concernant les évaluations détaillées des risques pour les écosystèmes. L'annexe technique de ce guide fait référence à des outils multiples parfois difficiles à utiliser. C'est la raison pour laquelle l'outil expérimental qui est développé dans le cadre de ce projet pourra être proposé comme un outil de l'annexe technique de ce guide.

L'objectif de ce programme est de développer un dispositif expérimental permettant de démontrer sans ambiguïté l'impact direct des polluants sur les animaux du sol. Le dispositif développé au cours de ce programme de recherche consiste à travailler sur une communauté d'individus, les Collemboles, au lieu d'espèces isolées, afin de gagner en représentativité dans le cadre d'une évaluation des risques environnementaux. Les Collemboles (Fig. 1), microarthropodes, sont particulièrement abondants dans les sols, diversifiés en espèces, faciles à élever et très mobiles: ils constituent un modèle qui pourra être étendu par la suite à d'autres groupes de la faune du sol (vers de terre, enchytréides, acariens).



Figure 1. *Folsomia candida*, Collembole utilisé couramment dans les tests écotoxicologiques (norme ISO 11267)

Il s'agit de développer une nouvelle approche destinée à évaluer les risques environnementaux causés par les hydrocarbures. Les tests normalisés actuels portant sur divers organismes du sol (vers de terre, collemboles, enchytréides, carabes, escargots) ne prennent en compte que des modifications de croissance et de reproduction dans des conditions spécifiques: les animaux sont soumis à des doses croissantes de produit, on mesure au bout d'un temps t les effectifs des populations ou la croissance des individus. Les espèces sélectionnées pour ces tests sont faciles à élever, ont des comportements relativement reproductibles d'une souche à l'autre (Chenon et al. 2000), mais on peut se poser la question de leur représentativité. *Eisenia fetida*, choisie pour représenter les vers de terre (norme ISO 11268), est une espèce inféodée aux tas de composts situés à proximité des habitations humaines (Bouché 1972), de même *Folsomia candida*, représentant les Collemboles, fréquente surtout les pots de fleurs et les jardins potagers, mais très peu les milieux naturels (Ponge 1980).

Parallèlement à la diversification des tests écotoxicologiques, l'introduction d'aspects comportementaux tels que les mouvements d'évitement et le recours à des communautés devraient permettre de mieux s'adapter à la réalité du terrain, où les polluants agissent sur des ensembles complexes constitués, pour les milieux terrestres, par les interactions entre végétation, faune et microflore, et non sur des espèces isolées de leur contexte écologique.

On remarquera par ailleurs l'extrême rareté des études consacrées à l'influence des hydrocarbures sur les peuplements animaux et les réseaux trophiques du sol, en conditions de terrain. Deux études sont connues à ce jour, l'une traitant des effets d'une application de fuel et d'essence sur les nématodes, enchytréides, acariens et collemboles en milieu forestier (Pirhonen & Huhta 1984), l'autre des effets d'une pollution industrielle par le créosote sur les nématodes, acariens et collemboles d'un

site boisé (Blakely et al. 2002). Toutes deux concluent à une perturbation des réseaux trophiques du sol, ne s'expliquant pas par des effets directs de toxicité.

Une collaboration avec le Centre National de Recherches sur les Sites et Sols Pollués (CNRSSP, Douai) a été engagée à l'occasion du présent projet. Elle porte sur les dosages d'hydrocarbures dans les sols, sur la partie microbiologique du projet (utilisation de la faune pour la dégradation des hydrocarbures dans les sols), et sur l'utilisation de trois sols de cokeries qui font l'objet d'une batterie de tests écotoxicologiques et de la mise en route et du suivi d'un traitement pilote de dépollution.

2. SITE D'ÉTUDE

Les investigations nécessitent un échantillonnage de différentes espèces de collemboles sur site pollué. Un site pollué par des hydrocarbures a été choisi pour les investigations sur le terrain. L'étude se déroule sur l'emplacement de l'ancienne raffinerie de Merkwiler-Pechelbronn, dans le département du Bas-Rhin, en Alsace (Fig. 2). Cette usine, située à une altitude de 170 mètres, a vu se succéder des activités de raffinage pendant deux siècles, jusqu'à son abandon total vers 1960.



Figure 2. Plan de situation du site de Merkwiler-Péchébronn (carte IGN au 1/25 000e)

Deux stations, sous couvert forestier, ont été choisies sur ce site pour mener notre étude, l'une étant polluée par des hydrocarbures (P) et l'autre choisie comme station témoin non polluée (T). Ces deux stations, quoique situées à courte distance l'une de l'autre (environ 15 m), correspondent à des sondages considérés respectivement comme "contaminés" (sondage SS6) et "propres" (sondage D77) dans le rapport effectué par la Société DAMES & MOORE pour le compte de l'ADEME (Ref. 25673-002-412), en date du 21/12/98. Des prélèvements ont été réalisés, conservés en récipients de verre à -20°C , sur lesquels le CNRSSP (Douai) a dosé les 16 HAP de la liste EPA.

La station polluée (P), située au nord de la raffinerie, se caractérise par la présence d'une épaisse plaque de goudron noir de consistance pâteuse, d'environ 4 x 4 m, située sous une couche de matière

organique accumulée, mal incorporée (Fig. 3). Sur cette station, la strate arborescente se compose de *Acer campestre*, *Betula pendula* et *Quercus robur*, la strate arbustive de *Fraxinus excelsior*, *Rubus fruticosus* et *Salix capraea*, la strate sous-arbustive de *Hedera helix*, la strate herbacée (discontinue) de *Geranium robertianum*, *Carex pilosa*, *Solidago canadensis*, *Taraxacum officinale* et de graminées et la strate muscinale de *Hylocomium splendens* (Fig. 4).

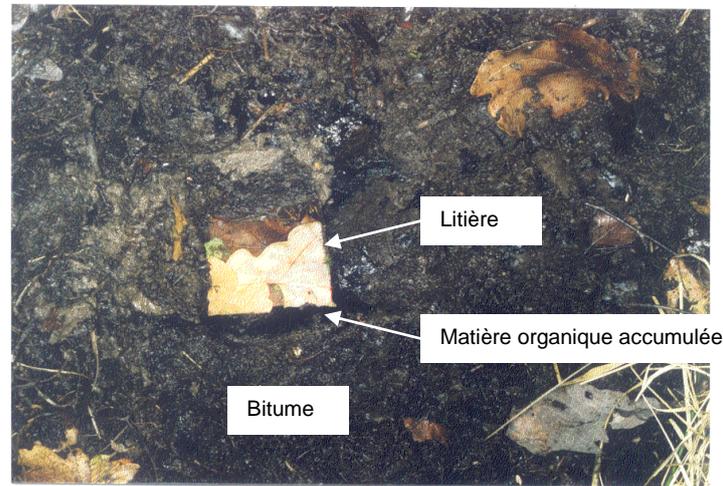


Figure 3. Station polluée. Décapage de la litière, sauf sur la surface (5 x 5 cm) destinée à l'étude micromorphologique, faisant apparaître la couche de bitume sous-jacente. La litière représente une couche de 3 à 4 cm qui s'accumule au-dessus de la couche de bitume



Figure 4. Station polluée. Vue du sous-étage arbustif et de la végétation herbacée

La station témoin (T) est située 15 mètres au sud de la zone polluée. La strate arborescente y est composée de *Acer campestre*, *Prunus avium* et *Quercus robur*, la strate arbustive de *Acer pseudoplatanus*, *Carpinus betulus*, *Cornus mas*, *Cornus sanguinea*, *Crataegus monogyna*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Prunus avium*, *Rosa canina* et de *Rubus fruticosus*, la strate sous-arbustive de *Hedera helix*, la strate herbacée de *Arum maculatum*, *Carex pilosa*, *Fragaria vesca*, *Geranium robertianum*, *Geum urbanum*, *Melica uniflora*, *Potentilla reptans*, *Stachys sylvatica*, *Solidago canadensis* et de *Taraxacum officinale* et la strate muscinale de *Eurhynchium striatum* (Fig. 5). La litière y repose sur un horizon organo-minéral profond structuré par les vers de terre, surmonté par une couche de turricules (Fig. 6).



Figure 5. Station témoin. Vue du sous-étage arbustif et de la végétation herbacée



Figure 6. Station témoin. Profil d'humus échantillonné, après excavation du sol laissant intact un bloc de 5 x 5 cm en surface sur 6,5 cm de profondeur

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Analyses chimiques du sol

La mesure du pH eau ainsi que du pH KCl a été réalisée au laboratoire sur des échantillons de sol séchés, récupérés après l'extraction des microarthropodes. La différence entre les valeurs de pH mesurées dans l'eau et dans le chlorure de potassium, qui déplace les ions adsorbés sur les colloïdes du sol, permet d'estimer l'acidité d'échange ou acidité potentielle du sol, le pH eau mesurant l'acidité immédiate du sol. La préparation des suspensions de sol s'est déroulée selon la norme ISO 10390 et la mesure a été réalisée à l'aide du pH-mètre Accumet Research AR 10.

Trois échantillons ont été prélevés sur le site en avril 2003 pour une analyse des 16 HAP de la liste EPA (Environmental Protection Agency, USA) sur un échantillon de sol témoin, un échantillon de sol provenant du site pollué et un échantillon du bitume sous-jacent. Chaque échantillon a été déposé dans une fiole en verre et congelé en attendant l'analyse, effectuée par le CNRSSP. Le dosage utilise la chromatographie de haute précision en phase liquide (HPLC), dans un système automatique ASE 200 DIONEX à détection UV, après passage en solution dans un mélange à parties égales de dichloro-méthane et d'acétone. Ce mélange a été remplacé par l'acétonitrile pour l'analyse du goudron.

Analyse des horizons de surface

L'analyse micromorphologique mise au point par Bernier & Ponge (1994) permet de décrire et de quantifier les composants des horizons holorganiques (uniquement composés de matière organique) et hémorganiques (composés de matière organique et de matière minérale) du sol, pour en déduire les principes essentiels de son fonctionnement biologique. En octobre 2002, un profil de sol, de 10 cm de profondeur et d'une surface de 25 cm², a été prélevé sur la station polluée et la station témoin. Les profils ont directement été séparés en micro-couches sur la base d'une variation visible entre des couches homogènes. Après une fixation dans l'éthanol, au laboratoire chaque micro-couche a été disposée dans une boîte de Pétri, recouverte d'alcool puis observée à la loupe binoculaire afin de reconnaître les composants de la matrice du sol (feuilles, agrégats, goudron...) et définir les catégories morphologiques (feuilles intactes, squelettisées, brunes...). Un film plastique transparent, préalablement quadrillé de points, a ensuite été disposé sur l'échantillon. A chaque point, à l'aide d'un réticule (cible) situé dans l'un des oculaires de la loupe, la catégorie morphologique a été déterminée puis notée. Cette méthode permet de connaître le pourcentage relatif en volume des catégories les unes par rapport aux autres au sein de chaque micro-couche, et ainsi de connaître l'évolution de chaque catégorie à l'intérieur d'un même profil et entre profils. Les catégories ainsi définies peuvent ensuite être éventuellement regroupées pour simplifier la présentation des résultats.

Analyse du peuplement de Collemboles

Après avoir prélevé 5 carottes de sol par site en octobre 2002, les microarthropodes ont été extraits par la méthode dite de Berlese-Tullgren, méthode basée sur l'utilisation du comportement de fuite des animaux vis à vis de la lumière et de la dessiccation du sol. Une fois collectés dans l'éthanol, les Collemboles sont montés entre lame et lamelle dans une goutte de chloral-lactophénol, solution rendant transparents les animaux, puis déterminés à l'espèce à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Les critères morphologiques utilisés pour l'identification de ces animaux reposent sur l'anatomie des organes externes (pattes, furca) et sur la disposition des soies (chétotaxie) sur les différentes parties du corps. Plusieurs ouvrages sont utilisés, en particulier Gisin (1960), Zimdars & Dunger (1994), Bretfeld (1999) et Potapow (2001), ainsi que de nombreuses publications spécialisées venant compléter ces monographies.

Expérience de colonisation en milieu naturel

L'un des objectifs de notre étude était d'utiliser des communautés naturellement mieux adaptées à la pollution des sols pour réhabiliter les sites et sols pollués. Cet objectif est basé sur l'hypothèse selon laquelle la faune acidophile (inféodée aux sols à $\text{pH} < 5$) serait plus tolérante vis-à-vis des produits organiques persistants, et des polluants en général, et pourrait être utilisée pour recoloniser des sols pollués (Chauvat & Ponge 2002, Ponge et al. 2002a). Cette hypothèse a cependant été invalidée par la suite, en ce qui concerne la pollution par les métaux lourds (Garnier & Ponge 2004, Gillet & Ponge 2004).

Le site acide (**A**) choisi dans cette expérience est situé 4,5 kilomètres au nord de l'ancienne raffinerie de Merkviller-Pechelbronn, à une altitude de 340 mètres. La station de prélèvement est située sur une pente d'environ 20%, sous une chênaie-hêtraie à humus de forme dysmoder (Fig. 7). Sur ce site, en octobre 2002, la litière a été collectée puis homogénéisée avant d'être transportée sur la station polluée le jour même. Sur la station polluée, après avoir délimité un carré d'une surface de 1 m², la litière acide a été épandue en couche mince homogène à la surface du sol, le dessèchement de l'inoculum contraignant ainsi les animaux acidophiles à le quitter et à coloniser le sol pollué sous-jacent.

Avant l'inoculation de sol acide, 5 carottes de sol ont été prélevées dans la zone à inoculer et sur le site acide afin de définir, après extraction, quelles sont les espèces de Collemboles vivant sur ces deux sites. Six mois plus tard, en avril 2003, dans le but d'établir si les Collemboles acidophiles ont bien colonisé le site pollué, 5 carottes de sol ont été collectées dans la placette inoculée et la station témoin ainsi que la station acide ont été rééchantillonnés.



Figure 7. Vue de la chênaie-hêtraie sur moder de Pfaffenbronn, ayant servi à l'inoculation de faune sur le site pollué

Expérience de colonisation forcée en microcosmes

L'expérience de colonisation forcée consiste à recréer l'expérience de colonisation de faune acidophile en conditions de température, d'humidité et de lumière contrôlées, dans des microcosmes. Cette expérience a été mise en place en novembre 2002 et a duré six mois.

Chaque microcosme est une boîte en polystyrène de dimensions Lxlxh: 115x85x40 mm. Chaque boîte est remplie avec du sol pollué, tamisé à 1 cm, collecté sur la station polluée (P) de la raffinerie de Merkviller-Pechelbronn, avec sa faune originale.

Le dispositif d'inoculation consiste à recréer le dispositif d'extraction de la faune du sol, pendant 10 jours, en plaçant sous un entonnoir de Berlesse, à la place d'un tube contenant de l'éthanol, un

microcosme afin d'y introduire les animaux vivants (Fig. 8). Sur la grille des entonnoirs est placé un volume de sol, acide (A) ou témoin (T), équivalent au volume des microcosmes.

Trois combinaisons d'inoculation ont été réalisées, avec pour chacune 10 répétitions:

- Faune du sol acide dans les microcosmes
- Faune du sol témoin dans les microcosmes
- Microcosmes sans inoculation de faune

A la fin des inoculations, les microcosmes sont placés dans une chambre à 15 °C, à l'obscurité pendant six mois. Toutes les deux semaines, l'humidité est maintenue constante par pesée et ajout d'eau déionisée. Six mois après le début de l'expérience (mai 2003), pour déterminer si la faune inoculée a survécu à la pollution et s'est développée, la faune a été extraite dans 15 microcosmes (5 microcosmes par combinaison), puis les Collemboles ont été déterminés à l'espèce.

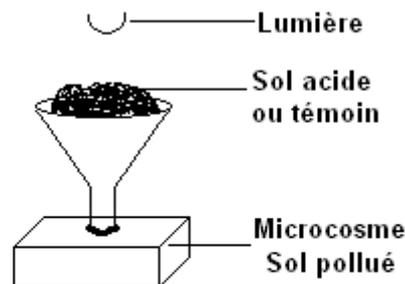


Figure 8. Dispositif d'inoculation de faune dans l'expérience d'inoculation forcée

Etude de l'attraction/répulsion des Collemboles face à un composé organique toxique: le phénanthrène

Le phénanthrène est un hydrocarbure polycyclique aromatique à 3 cycles, présent dans le pétrole brut et la houille, ainsi que leurs dérivés industriels et leurs lessivats (Verschuere 2001). Il est toxique pour de nombreux invertébrés à des doses inférieures à 1 mg/L, donc en-dessous de sa teneur dans l'eau à saturation qui est de 1,6 mg/L à 15°C (Verschuere 2001). Il n'est pas classé dans la catégorie des substances cancérigènes pour l'homme, contrairement à la plupart des HAPs renfermant plus de 3 cycles de carbone, mais provoque des désordres au niveau des systèmes de reproduction ainsi que des attaques des systèmes immunitaires chez la plupart des organismes étudiés (Grundy et al. 1996). Faiblement toxique vis-à-vis des cultures cellulaires de vertébrés à sa concentration de saturation, sa toxicité se révèle à plus forte concentration, dans des solvants non aqueux (Schirmer et al. 1998). Il se dégrade relativement vite dans les sols, sa demi-vie se situant entre 3 à 9 semaines (Smith et al. 1999, Verschuere 2001, Fang et al. 2001, Miles & Doucette 2001, Carlstrom & Tuovinen 2003). De nombreux organismes bactériens et fongiques naturellement présents dans le sol sont capables de le solubiliser (Toren et al. 2003) et de le métaboliser (Lloyd-Jones et al. 1999, Balashova et al. 1999, Lisowska & Długoński 2003). Cependant, les phénomènes de sorption fréquents avec les HAPs à petit nombre de molécules montrent qu'une part importante se fixe irréversiblement sur les colloïdes du sol et échappe ainsi à la biodégradation (Theng et al. 2001, Nam & Kim 2002, Lu et al. 2003) ainsi qu'à l'extraction par les solvants habituels (Käcker et al. 2001, Kottler et al. 2001, Xing 2001, Carlstrom & Tuovinen 2003). Nous avons choisi ce composé en raison de son fort impact sur l'environnement, en particulier sur les invertébrés du sol (Crouau et al. 1999), les risques faibles encourus par sa manipulation par le personnel du laboratoire, sa solubilité dans l'eau suffisante pour atteindre des effets perceptibles en solution aqueuse, et le risque relativement faible de le voir persister sous une forme biodisponible dans l'environnement.

La station choisie pour cette expérience est située dans le parc du laboratoire, sous couvert forestier. Il s'agit d'une rendzine à humus de forme eumull présentant une fertilité élevée.

Le dispositif expérimental mis en place le 30 avril 2003 est constitué de 10 blocs renfermant chacun 8 pièges rectangulaires, de dimensions Lxlxh: 75x105x55 mm, et de deux pièges circulaires, de dimensions dxh: 85x100 mm. Ces pièges directionnels sont fermés à l'une de leurs extrémités par un tissu en soie laissant passer les solutions du sol mais pas la faune et couverts à l'autre extrémité par un grillage de 2 mm de maille laissant le libre passage à la faune. Pour étudier les mouvements horizontaux de fuite ou d'attraction de la faune vis-à-vis du phénanthrène, les pièges rectangulaires sont placés dans le sol par paires, dans le sens de la hauteur, autour d'un cercle d'une surface de 1/4 m² (Fig. 9), la partie supérieure du cube dépassant la surface du sol sur 1 à 2 cm. Pour étudier les mouvements verticaux de la faune, deux pièges cylindriques sont placés au centre du cercle dans le sol et dans le sens de la hauteur, la partie supérieure des cylindres affleurant la surface du sol. Chaque bloc est distant l'un de l'autre de 2 m perpendiculairement à la pente et de 4 m parallèlement à la pente (3%).

Une semaine après la mise en place du dispositif, 5 blocs sont arrosés régulièrement de 5 L d'une solution aqueuse saturée de phénanthrène (1,6 mg/L à 15°C), et 5 blocs témoins sont arrosés de 5 L d'eau déionisée. Une semaine plus tard, l'ensemble des pièges sont retirés du sol afin de réaliser une extraction de la faune arthropodienne par la méthode de Berlese-Tullgren. Cet intervalle de temps a été jugé suffisant pour permettre une exposition des animaux au toxique au cours de leurs déplacements, soit par l'intermédiaire des solutions du sol (absorption par le tube ventral des collemboles) soit par la consommation de substrat (biomasse microbienne, matière organique humifiée, argiles) susceptible de le renfermer.

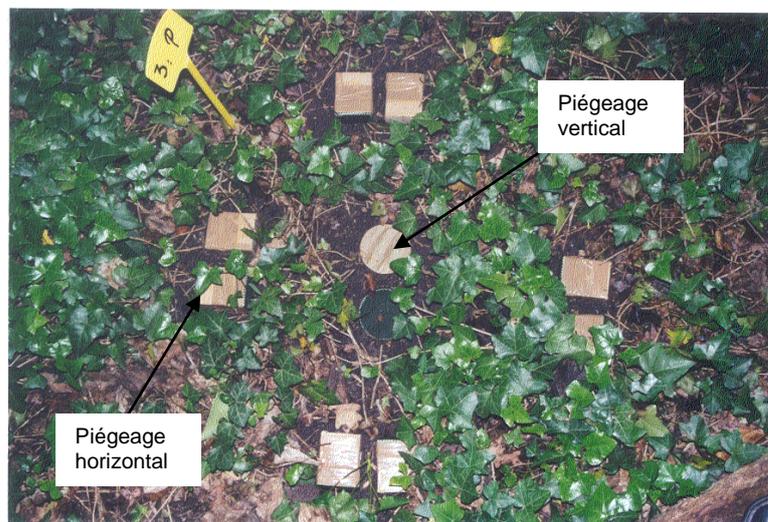


Figure 9. Vue aérienne du dispositif permettant d'étudier l'attraction et la répulsion des Collemboles face à un composé organique: le phénanthrène

Cette expérience, qui n'a pas donné les résultats escomptés en raison d'une concentration trop faible en phénanthrène dans la solution aqueuse saturée, a été refaite en utilisant le même sol, homogénéisé à l'état frais, et placé dans des enceintes en verre (aquariums) de 60 x 30 x 30 cm, en utilisant les mêmes pièges que précédemment. Le phénanthrène, sous sa forme solide, a été appliqué en couche mince à la surface du sol humide. Cette seconde expérience a été conduite pendant une semaine en février 2004. Dans chacun des 10 aquariums utilisés, ont été installées une paire de pièges rectangulaires (mouvements horizontaux) et une paire de pièges circulaires (mouvements verticaux). La figure 10 montre la répartition de ces deux types de pièges dans les enceintes expérimentales, avant le remplissage final.



Figure 10. Mise en place des pièges dans les aquariums

Après insertion des pièges, l'installation a été recouverte de sol frais, en laissant toutefois dépasser 1 cm à la partie supérieure des pièges rectangulaires, afin de récupérer les animaux se déplaçant en surface (Fig. 11).



Figure 11. Vue générale des aquariums une fois les pièges recouverts

On procède ensuite à l'épandage du phénanthrène sur cinq aquariums, les cinq autres servant de témoins, l'ensemble des 10 aquariums étant disposé de façon aléatoire dans un enceinte climatique à 20°C. Dix grammes de phénanthrène à 90% sous forme de cristaux sont répartis à la surface du sol. Cette surface correspond à la moitié de la surface des aquariums, du côté contenant les pièges cylindriques (30 cm x 30 cm). Le phénanthrène ainsi étalé vient également affleurer les pièges

rectangulaires. Aucun contact direct n'existe cependant entre les pièges et le polluant, une distance d'un centimètre environ les séparant, soit horizontalement soit verticalement.

Tests écotoxicologiques basés sur le comportement des Collemboles

Il s'agit de la mise au point de nouveaux tests destinés à enrichir la palette des tests écotoxicologiques utilisant la faune du sol (Cortet et al. 1999). Le comportement d'évitement ou d'attraction des Collemboles vis-à-vis d'un composé donné a été mis en évidence (Sadaka-Laulan et al. 1998, Salmon & Ponge 2001) dans des dispositifs permettant aux animaux introduits de choisir entre deux secteurs d'une boîte de Pétri (Fig. 12).

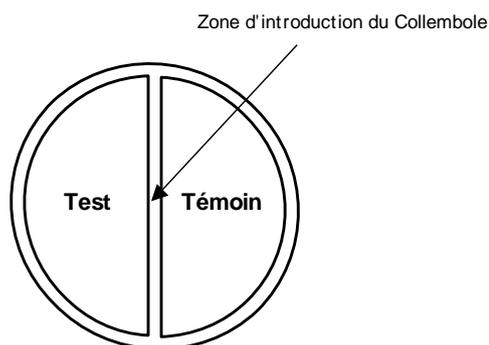


Figure 12. Dispositif utilisé pour mesurer le degré d'évitement ou d'attraction d'un composé-test par un Collembole

Le secteur test est constitué par un demi-disque de papier filtre en fibre de verre imprégné d'une solution du produit à tester, ou bien uniformément recouvert par une mince couche du sol pollué à tester. Le secteur témoin est constitué par un demi-disque du même papier filtre imprégné d'une solution aqueuse, ou bien uniformément recouvert d'une mince couche de sol témoin. Les animaux à tester sont introduits dans la zone séparant les deux demi-disques de papier filtre, et leur position est suivie dans le temps à intervalles réguliers. Afin d'éviter une interférence avec les phénomènes d'agrégation observés chez les Collemboles, ceux-ci sont introduits individuellement dans chaque boîte de Pétri. On dispose les boîtes sous un éclairage uniforme après avoir testé l'absence de gradient lumineux susceptible d'interférer avec les résultats (Salmon & Ponge 1998). La position des animaux dans l'un ou l'autre des deux secteurs est notée à intervalles de temps réguliers et les scores sont totalisés pour chacun des deux secteurs sur l'ensemble des observations effectuées. Le nombre de répétitions a été fixé à 20. Un test des signes ou bien un test t pairé, permettant de comparer sur l'ensemble des 20 boîtes le nombre de préférences obtenues pour chacun des deux secteurs, est utilisé (Sokal & Rohlf 1995). Le diamètre des boîtes de Pétri, le temps total et la fréquence des observations sont modulés en fonction de la taille et des capacités de déplacement des animaux, très variables d'une espèce à l'autre.

Les résultats de ces tests à court terme (une demi-journée par test, temps de préparation inclus) sont comparés à des tests de survie et de reproduction en conditions contrôlées, portant sur une durée d'un mois. Pour réaliser ces tests, des individus adultes ou sub-adultes (individus de grande taille) sont introduits sur le sol à tester (au préalable réhumidifié puis tassé) ou sur du sable de Fontainebleau imbibé d'une solution aqueuse du composé à tester, dans des boîtes en polystyrène de 5 cm de diamètre et 3 cm de hauteur. Une petite quantité de bouse de vache séchée et broyée (fournie par l'INERIS) est ajoutée, afin d'offrir aux animaux un complément alimentaire, le tassement du sol (nécessaire pour la surveillance de l'élevage) ne permettant pas aux animaux d'accéder à la microflore édaphique. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité à 20°C et réhumidifiées hebdomadairement.

Etude de l'impact de la faune sur la dégradation microbienne des HAPs dans un sol de cokerie

Le dispositif expérimental mis en place est destiné à tester l'hypothèse selon laquelle l'action conjointe de la faune et de la microflore peut favoriser la dégradation des hydrocarbures, et donc contribuer à la remédiation des sols soumis à ce type de pollution. L'expérience a été appliquée à un sol de cokerie, fortement pollué par les hydrocarbures, dont la toxicité et l'effet répulsif ont été mis en évidence auparavant sur le Collembole *Folsomia candida*. Ce sol a été utilisé à une dilution telle qu'il n'affecte pas, pendant la durée de l'expérience (deux mois), la croissance des populations de l'espèce introduite, mais provoque une répulsion, dont on pourra tester la disparition ou la réduction en fin d'expérience. Le test comportemental présenté ci-dessus est utilisé dans ce cas en début et en fin d'expérience comme test de toxicité en parallèle avec les tests de croissance et de reproduction.

L'expérience, menée à Brunoy d'avril à mai 2004, consiste à laisser évoluer, à température et humidité constantes et contrôlées, un sol pollué par les hydrocarbures (sol de cokerie), en présence de sa microflore naturelle avec ajout ou non d'une population de *F. candida*. Le sol, fourni par le CNRSSP et au préalable conservé au congélateur, est décongelé, puis réhumidifié et aéré, afin d'offrir des conditions de vie favorables à l'espèce animale introduite. *F. candida* est un Collembole souterrain se nourrissant principalement de micro-organismes et contribuant activement à leur transport dans les interstices du sol (Fountain & Hopkin 2005). On émet l'hypothèse que la mise en contact avec leur substrat des bactéries dégradant potentiellement les hydrocarbures sera facilitée par la dissémination de germes et la bio-turbation induites par l'activité locomotrice et alimentaire de *F. candida*.

Le sol est placé, sans être tassé, dans des boîtes en polystyrène cylindriques de 5 cm de diamètre et 3 cm de hauteur. Un espace d'environ 1 cm est ménagé dans la partie supérieure de chaque boîte. Cinq réplicats sont réalisés avec la microflore seule (sol réhumidifié mais non stérilisé), cinq autres avec ajout de 10 individus adultes ou sub-adultes de *F. candida*. Le dispositif utilisé est identique à celui des tests de survie et de reproduction, à cette différence près que le sol est non tassé et qu'aucun complément alimentaire n'est ajouté. Le comptage des populations de *F. candida* est réalisé en fin d'expérience, après avoir noyé le sol dans l'éthanol pour tuer puis faire flotter les animaux. Ce même dispositif (5+5 réplicats avec ou sans ajout de faune) est quadruplé afin de suivre en parallèle l'évolution de la microflore, réaliser les analyses chimiques (dosages des 16 HAPs de la liste EPA), et récupérer du sol pour effectuer les tests écotoxicologiques en fin d'expérience.

4. RÉSULTATS

Les composants des horizons de surface d'un site pollué par des composés organiques

L'analyse micromorphologique de la station témoin et de la station polluée a permis de mettre en évidence 161 catégories différentes du type «feuille entière brun foncé», «masse goudronneuse» ou encore «déjections holorganiques de vers de terre brun clair». La répartition de ces catégories dans les différentes micro-couches étudiées permet de déterminer le mode de transformation de la matière organique, sous l'influence des processus microbiens et de sa consommation par la faune (Ponge 1991), et sa redistribution dans les horizons de surface sous l'influence de l'activité des organismes fouisseurs (Ponge 1999). Il s'agit donc d'une caractérisation des réseaux trophiques du sol, qui ne nécessite pas le recours à un échantillonnage lourd et coûteux en temps et en personnel. Elle permet de détecter les atteintes portées à l'intégrité des réseaux trophiques du sol sous l'influence du développement de la végétation (Bernier & Ponge 1994, Peltier et al. 2001, Frak & Ponge 2002, Loranger et al. 2003, Sadaka & Ponge 2003, Vaçulik et al. 2003) ou de pollutions agricoles (Topoliantz et al. 2000) et industrielles (Gillet & Ponge 2002). Le manque de répétitions est compensé par la stabilité des réseaux trophiques du sol à l'échelle des facteurs qui les gouvernent, quantité et qualité de la litière, micro-climat, topographie (Ponge et al. 2002b, Sadaka & Ponge 2003).

La station témoin se caractérise par un mésomull avec un horizon OL (= feuilles entières) d'une épaisseur de 2,7 cm, recouvrant un horizon A grumeleux et la station polluée se caractérise par un humus de type hémimoder avec un horizon OL de 0,7 cm d'épaisseur surmontant un horizon OF (=feuilles fragmentées mêlées de boulettes fécales) de 0,9 cm d'épaisseur situé au-dessus d'un horizon A compact. L'observation à l'oeil sur le terrain montre donc déjà que l'on est en présence d'une perturbation notable de l'activité des organismes fouisseurs (vers de terre) sous l'influence de la pollution. Par contre la présence dans la zone polluée d'un humus appartenant à la famille des moder (plus actif que le mor) montre que l'activité des organismes décomposeurs et détritvovres semble à première vue peu perturbée.

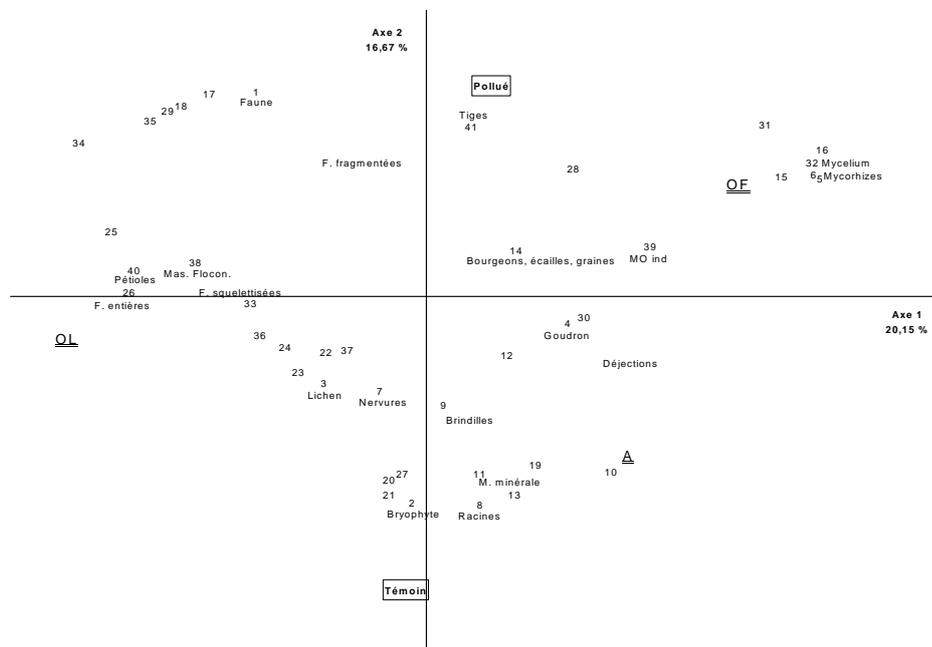


Figure 13. Analyse des correspondances. Projection des catégories regroupées dans le plan des deux premiers axes factoriels

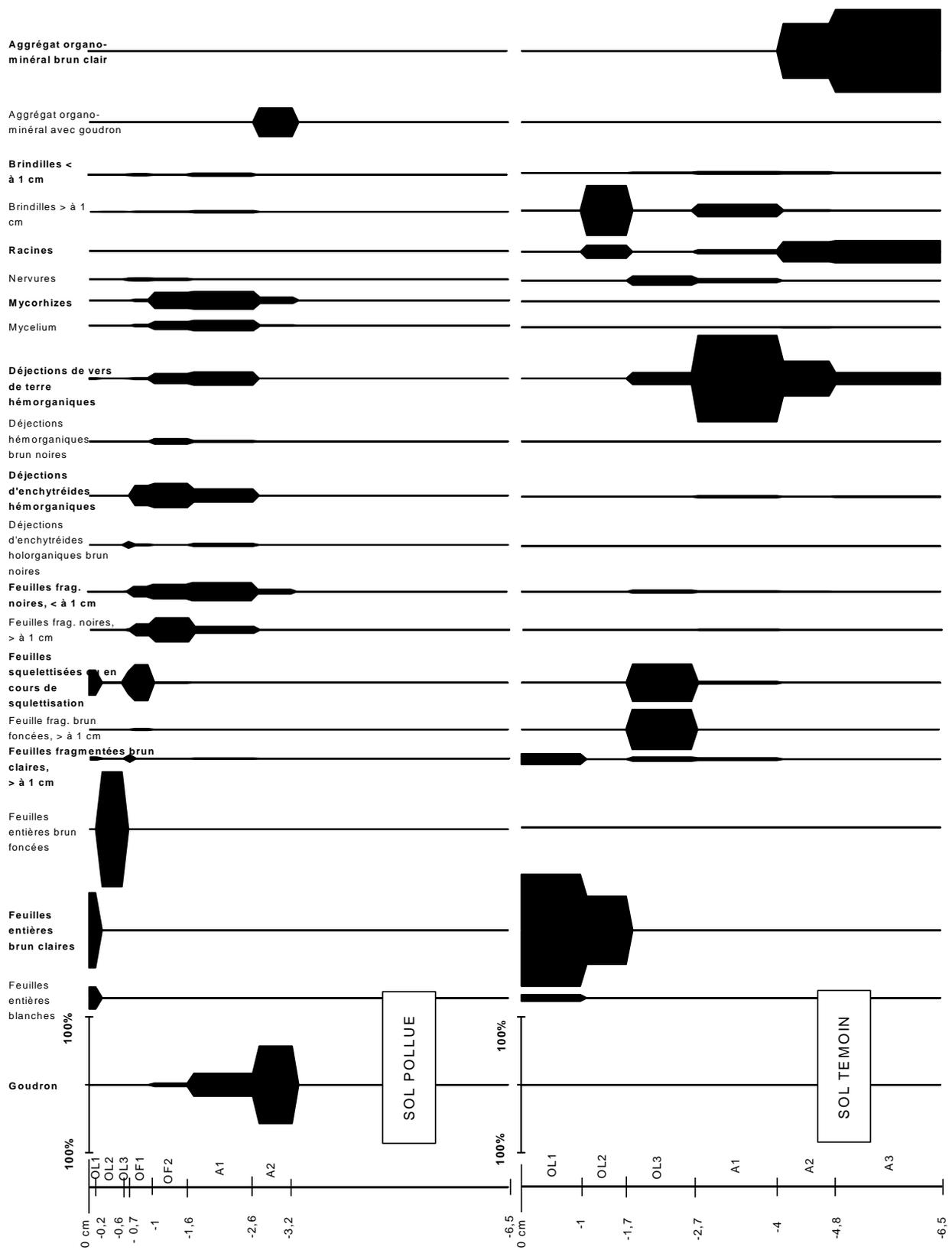


Figure 14. Analyse micromorphologique. Distribution des composants solides des horizons de surface des deux sols étudiés sur le site de Merkwiller

L'axe 1 de l'analyse factorielle des correspondances (AFC) menée sur les données micromorphologiques (Fig. 13) correspond à la stratification verticale des profils. L'axe 2 différencie la station témoin de la station polluée. Le profil de la station témoin est caractérisé par la présence de bryophytes, de racines et de matière minérale alors que la station polluée se caractérise par la présence de feuilles fragmentées, de tiges, de mycélium et de mycorhizes. Que ce soit sur la station témoin ou polluée, l'analyse multivariée met en évidence un horizon OL, assez semblable entre les deux stations, caractérisé par la présence de feuilles entières et de pétioles. L'horizon OF se caractérise par la présence de mycélium et de mycorhizes. Cet horizon, uniquement présent sur la station polluée, caractérise le fonctionnement de celle-ci: L'horizon A, très différent entre les deux stations, se caractérise par la présence de matière minérale et de racines dans la station témoin, de goudron dans la station polluée.

La représentation graphique analytique (Fig. 14) met en évidence de façon plus détaillée la différence de fonctionnement entre les deux stations. Dans la station polluée, la dégradation des feuilles se fait par une fragmentation de plus en plus fine avec la profondeur et par un assombrissement de la couleur qui passe du blanc ou brun clair au brun foncé, brun-noir puis noir. Dans la station témoin, les feuilles entières brun-clair sont majoritaires en OL1 et OL2 et se transforment par squelettisation et fragmentation en OL3. Parallèlement, dans cette station les déjections de vers de terre apparaissent en OL3 pour devenir majoritaires en A1 alors que dans la station polluée ce sont les déjections hémorganiques d'enchytréides qui sont majoritaires dans l'horizon OF2. La station polluée se caractérise aussi par la présence d'un important réseau de mycélium alors que celui-ci est quasiment absent de la station témoin. Notons aussi la présence de mycorhizes (ecto-mycorhizes, présentant un renflement du cortex racinaire) sur la station polluée alors que la station témoin se caractérise par la présence de racines sans traces visibles de mycorhization (probablement endo-mycorhizes).

L'analyse micromorphologique du sol nous a également permis de mettre en évidence la présence de goudron dans les déjections de vers de terre et d'enchytréides sur la station polluée.

Ces résultats, qui ont fait l'objet d'un article scientifique (Gillet & Ponge, soumis) ne doivent pas être considérés uniquement sous l'angle descriptif. Comme de nombreuses publications l'ont déjà montré (Bernier & Ponge 1994, Peltier et al. 2001, Frak & Ponge 2002, Gillet & Ponge 2002; Loranger et al. 2003, Sadaka & Ponge 2003), l'analyse micromorphologique des horizons de surface permet d'aborder la connaissance des réseaux trophiques du sol sous l'angle du fonctionnement biologique. La mise en évidence des acteurs principaux et du degré de transformation des composants de la litière au cours des horizons successifs (traduisant son évolution dans le temps), permet de définir les voies principales de transformation de la matière organique et d'élaboration de la structure du sol. Dans le cas présent, on constate un contraste marqué entre le fonctionnement de l'humus de la station témoin, dominé par l'action des vers de terre, et celui de la station polluée, dominé par les enchytréides. Ces deux groupes d'annélides oligochètes s'opposent fondamentalement, notamment en ce qui concerne leurs relations avec le niveau trophique du sol et le mode de nutrition des végétaux (Ponge 2003). Les formes d'humus caractérisées par chacun de ces deux taxons, respectivement appelées mull et moder, constituent deux stratégies de l'écosystème terrestre, associées à deux niveaux distincts de fertilité et de diversité biologique. En association avec les vers de terre, on trouve une végétation diversifiée, riche en plantes herbacées (en particulier vernaies), avec un système racinaire peu dense, non ou peu mycorhizé (mycorhizes à vésicules et arbuscules) mais réparti sur l'ensemble de l'horizon A. L'activité microbienne est essentiellement bactérienne, elle a lieu principalement au sein des agrégats résultant de l'incorporation de la matière organique à la matière minérale réalisée par les vers anéciques et endogés. En association avec les enchytréides, la végétation est réduite aux espèces tolérant un moindre niveau trophique (manifesté par une acidité plus élevée), le système racinaire, très superficiel, est très dense et fortement mycorhizé, en liaison avec un mycélium abondant. L'activité microbienne est essentiellement le fait des champignons. Cette seconde stratégie permet à l'écosystème (en particulier aux écosystèmes forestiers) de se maintenir malgré une faible disponibilité en nutriments. Ces derniers, peu accessibles via l'altération minérale, et renfermés en moins grande quantité dans la litière, sont conservés au sein même de celle-ci, où ils sont captés par les champignons mycorhiziens, et transférés vers la plante au fur et à mesure de leur libération sous l'action de la petite faune détritivore et des champignons décomposeurs. Cette dualité a été seulement très récemment reconnue, en grande partie grâce au développement de ces techniques micromorphologiques, associées à un échantillonnage exhaustif de la faune du sol (Ponge et al. 1997).

Par rapport au phénomène qui détermine les variations observées dans le fonctionnement biologique, la pollution par les hydrocarbures, on constate que celle-ci ne provoque pas l'appauvrissement des réseaux trophiques observé précédemment dans le cas des métaux lourds (Gillet & Ponge 2002), où la forme d'humus passait du mull au mor (absence quasi totale d'activité de la faune). On se trouve ici à un niveau d'impact intermédiaire, caractérisé par un humus de type hémimoder (Brêthes et al. 1995). L'activité des vers de terre semble réduite, au profit des enchytréides, mais on remarquera la présence de bitume au sein même des déjections de ces deux groupes d'animaux. Le bitume est donc ingéré par certains animaux du sol, et ne constitue donc pas une barrière infranchissable à l'activité de la faune. Le développement des champignons est associé à la densification en surface du système racinaire des arbres (ici le chêne, dominant). Malgré l'existence d'un sol riche sur le site (se traduisant par la luxuriance et la diversité de la végétation: forêt multi-strates, tapis herbacé continu et diversifié, flore vernale abondante), la pollution par les hydrocarbures génère très localement des conditions environnementales se rapprochant de ce que l'on observe dans les sols forestiers acides. Ce rapprochement s'explique par un ralentissement de la circulation des nutriments, associé à une simplification des réseaux trophiques du sol causé par une perte importante de biodiversité locale (Ponge 2003). Il peut également (ceci reste à démontrer) être lié aux caractéristiques propres à la pollution locale par rapport à la pollution diffuse, c'est-à-dire l'existence de larges zones non ou peu touchées par la pollution, dans lesquelles les organismes moins tolérants sont susceptibles de se rassembler, au moins saisonnièrement (par exemple en été lorsque les polluants sont plus concentrés).

Caractéristiques chimiques des horizons de surface

L'analyse comparative du pH eau et du pH KCl du sol entre la station témoin et la station polluée n'a mis en évidence aucune différence significative entre les deux stations, avec un pH eau proche de la neutralité et un pH KCl légèrement supérieur à 6 (Fig. 15). La station ayant servi à l'expérience d'inoculation de sol acide (située à l'intérieur de la tache de pollution) ne présente pas, avant l'inoculation, de différence significative avec aucune des deux autres stations. Par contre, l'inoculum acide provenant de la chênaie-hêtraie de Pfaffenbronn présente un pH beaucoup plus bas, situé entre 4 et 5 pour le pH eau, entre 3 et 4 pour le pH KCl, en rapport avec son humus de forme moder. On remarquera la faible variabilité de l'inoculum, qui résulte d'un processus d'homogénéisation, contrairement aux prélèvements effectués sur les stations de terrain.

L'acidité d'échange liée aux colloïdes du sol, calculée par différence entre le pH eau et le pH KCl, est significativement plus forte sur la station témoin que sur la station polluée (Fig. 16). Cette différence indique la présence sur le site témoin d'un plus grand nombre de micro-sites occupés par des protons. Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène: une humification moins poussée de la matière organique sur le site pollué, ou bien une occultation des sites d'échange en raison de la capacité de sorption de la matière organique du sol vis-à-vis des HAPs (Käcker et al. 2002, Nam & Kim 2002). La station ayant servi à l'inoculation présente bien les mêmes caractéristiques, à ce point de vue, que la station polluée, toutes deux étant situées à l'intérieur de la tache de pollution. Par contre, l'inoculum acide présente une acidité d'échange plus élevée que la station témoin, en raison de l'abondance de la matière organique humifiée dans les humus de forme moder (Ponge 2003). On remarquera que la couleur relativement claire des agrégats organo-minéraux présents dans l'horizon A de la station témoin indique une minéralisation rapide de la matière organique, favorisée par la mise en contact de la matière organique et de la matière minérale réalisée par les vers de terre, et la stimulation de l'activité microbienne qui en résulte.

La composition du bitume, restreinte aux 16 HAPs de la liste EPA, a été analysée par chromatographie liquide de haute précision ou HPLC (Tableau 1). Parmi les quatre composés extractibles, l'analyse montre la nette dominance du phénanthrène. Il faut remarquer cependant que l'ensemble des HAPs extraits et dosés par cette méthode représente une très faible part (267 µg/g) des composés présents dans le bitume. Seulement 7 HAPs ont pu être dosés sur le sol de la station polluée, en raison d'une trop faible quantité de matière solide obtenue après tamisage à 2 mm (Tableau 1). La mauvaise décomposition de la matière organique sur la station polluée est principalement responsable de ce faible rendu du tamisage. On remarque la dominance du pyrène (1,5 µg/g) et du benzo(ghi)pérylène (1,1 µg/g), la somme des 7 HAPs dosables étant de 6 µg/g. Ces valeurs, assez faibles contrairement à notre attente, sont cependant nettement plus élevées que dans la station témoin (0,9 µg/g). Par rapport au témoin, on observe 10 fois plus de pyrène et de

benzo(ghi)pérylène dans le sol de la station polluée. Les valeurs observées dans le sol témoin de Merkwiller-Péchelbronn ont été comparées à celles obtenues dans le sol du parc du laboratoire (chênaie-charmaie à mercuriale, à pH 7), qui présente de nombreuses caractéristiques communes avec la station témoin, et peut donc servir de référence comme sol non pollué (Tableau 1). On observe des teneurs tout à fait comparables, ce qui valide notre station témoin, qui s'avère bien exempte de pollution par les hydrocarbures (la pollution de ce site est très localisée, par taches).

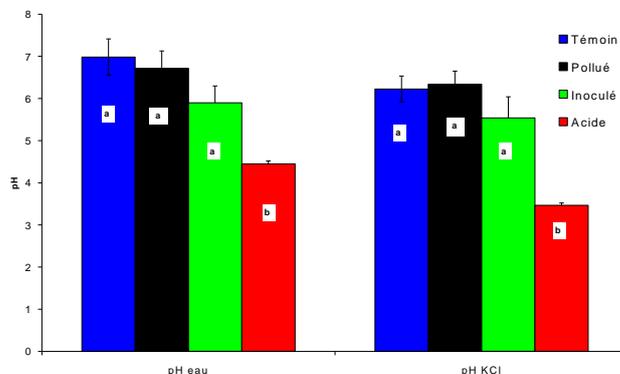


Figure 15. Mesure du pH eau et du pH KCl dans les horizons A des stations étudiées (5 répétitions). La barre d'erreur correspond à l'erreur-type affectée à chaque moyenne. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes (U-test de Mann-Whitney), pour chacune des deux variables étudiées

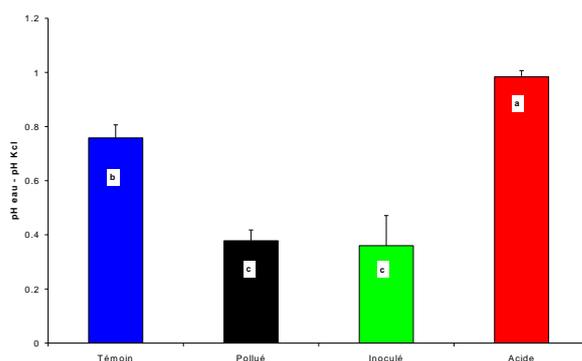


Figure 16. Mesure de la différence entre le pH eau et le pH KCl dans les horizons A des stations étudiées (5 répétitions). La barre d'erreur correspond à l'erreur-type affectée à chaque moyenne. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes (U-test de Mann-Whitney), pour chacune des deux variables étudiées.

| | Sol du laboratoire | Sol témoin, Pechelbronn | Soil pollué, Pechelbronn | Bitume, Pechelbronn |
|------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| Naphthalène | 0,064±0,005 | 0,096±0,003 | 0,493±0,022 | 52,7±1,0 |
| Acénaphthylène | < 0,03 | < 0,04 | | |
| Acénaphthène | 0,023±0,000 | 0,038±0,002 | | |
| Fluorène | < 0,02 | < 0,02 | | |
| Phénanthrène | 0,119±0,019 | 0,102±0,006 | 0,776±0,048 | 151,1±2,8 |
| Anthracène | 0,024±0,008 | 0,025±0,001 | | |
| Fluoranthrène | 0,230±0,024 | 0,238±0,020 | 0,655±0,012 | |
| Pyrène | 0,152±0,014 | 0,178±0,020 | 1,551±0,136 | |
| Benzo(a)anthracène | 0,080±0,009 | 0,107±0,011 | 0,633±0,033 | |
| Chrysène | 0,105±0,013 | 0,108±0,005 | 0,694±0,051 | 35,7±0,4 |
| Benzo(b)fluoranthrène | < 0,02 | < 0,02 | | |
| Benzo(k)fluoranthrène | 0,048±0,004 | 0,057±0,004 | | |
| Benzo(a)pyrène | 0,147±0,011 | 0,157±0,019 | | |
| Dibenzo(a,h)anthracène | 0,016±0,001 | 0,023±0,003 | | |
| Benzo(ghi)perylène | 0,074±0,003 | 0,103±0,012 | 1,146±0,031 | 27,2±2,0 |
| Indeno(123cd)pyrène | 0,083±0,006 | 0,130±0,008 | | |
| Σ 16 HAPs | 1,165±0,094 | 1,363±0,102 | | |

Tableau 1. Dosage des 16 HAPs de la liste EPA dans les sols du site de Merkwiller et dans le sol (non pollué) du parc du laboratoire. Les valeurs indiquées sont la moyenne de trois répétitions, suivie par leur erreur-type

Le peuplement de Collemboles

La perte de biodiversité sous l'influence de la pollution locale par les hydrocarbures, suspectée à l'issue de l'analyse micromorphologique, peut être mise en évidence au sein même des principaux groupes de la faune du sol, par exemple le groupe des Collemboles. Deux études, l'une portant sur la pollution par les métaux lourds (Gillet & Ponge 2003), l'autre sur l'intensification de l'usage du sol (Ponge et al. 2003), ont montré précédemment des phénomènes identiques. L'étude du peuplement de Collemboles, échantillonné en octobre 2002 sur le site de l'ancienne raffinerie de Merkviller-Pechelbronn (Gillet & Ponge soumis), nous montre que le nombre d'espèces moyen par échantillon est significativement plus faible sur la station polluée par rapport à la station témoin, avec en moyenne 3,6 espèces en P contre 13,2 espèces en T. Ce résultat est confirmé par l'indice de Shannon, indice de biodiversité prenant en compte à la fois le nombre d'espèces par échantillon et le nombre d'individus par espèce, qui présente une valeur significativement plus faible sur le site pollué. L'équitabilité, elle aussi plus faible sur le site pollué, met aussi en évidence une répartition hétérogène du nombre d'individus par espèces sur la station polluée. En effet, sur cette station, deux espèces prédominent, *Proisotoma minuta* et *Parisotoma notabilis*. Cependant, aucune différence significative d'abondance totale (nombre d'individus par m²) n'a été mise en évidence entre la station polluée (10186 ind/m²) et la station témoin (18640 ind/m²). On remarquera là une analogie avec l'étude sur la pollution métallicole effectuée par Gillet & Ponge (2003): la chute de biodiversité observée profite à quelques espèces plus tolérantes, dont les effectifs s'accroissent.

L'analyse du peuplement au niveau spécifique (Fig. 17) met en évidence quatre espèces communes aux deux stations: *Folsomia candida* (FCA), *Parisotoma notabilis* (PNO), *Sminthurides malmgreni* (SMA) et *Sminthurinus aureus* (SAU). *Proisotoma minuta* (PMI), uniquement présente sur la station polluée, semble être l'espèce la plus tolérante à la pollution par les hydrocarbures, puisqu'elle est significativement plus abondante dans cette station. Parallèlement, *Folsomia manolachei* (FMA), *Isotomiella minor* (IMI), *Lepidocyrtus lanuginosus* (LLA), *Megalothorax minimus* (MMI), *Mesaphorura florae* (MFL), *Mesaphorura hylophila* (MHY), *Mesaphorura macrochaeta* (MMA), *Pseudosinella alba* (PAL), *Sminthurinus aureus* (SAU) et *Xenylla tullbergi* (XTU) semblent être les espèces les plus sensibles à la pollution, car elles sont absentes de la station polluée.

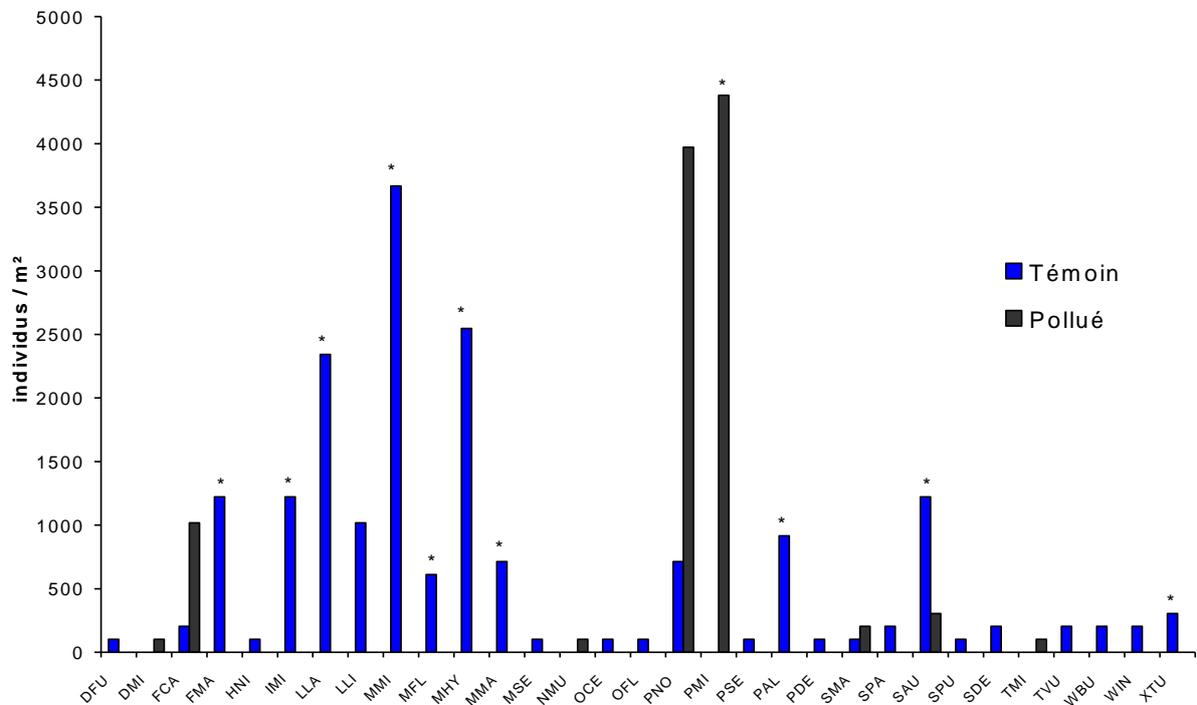


Figure 17. Distribution des différentes espèces de Collemboles dans le sol pollué et le sol témoin du site de Pechelbronn. Les astérisques indiquent les espèces présentant des densités significativement différentes entre les deux stations (test de Mann-Whitney, $P < 0.05$)

L'observation des contenus intestinaux des principales espèces de Collemboles (Fig. 18) permet de préciser l'influence (directe ou indirecte) de la pollution par les hydrocarbures sur la disponibilité en ressources alimentaires pour les animaux du sol. Lorsque la même espèce est présente dans les deux stations, témoin et polluée, comme chez *Parisotoma notabilis*, *Folsomia candida* et *Sminthurinus aureus*, on remarque l'importance plus grande prise par le matériel fongique, en particulier le mycélium hyalin ou mélanisé, dans la station polluée. Cette modification du régime alimentaire des Collemboles s'effectue au détriment des bactéries, sauf chez *Folsomia candida*, qui en consomme en quantité similaire dans les deux stations. On remarque également une diversité plus grande du régime alimentaire de *Sminthurinus aureus*, qui consomme des micro-algues, du pollen, de l'humus, des bactéries, des spores et du mycélium de champignons dans la station témoin, alors qu'il ne consomme que du mycélium de champignon dans la station polluée. Le petit nombre de spécimens de cette espèce récoltés sur la station polluée rend cependant délicate une conclusion définitive relativement à une raréfaction des ressources sur la station polluée. Le phénomène majeur observé est le développement de la microflore fongique, qui se traduit par une consommation accrue de mycélium, cette ressource étant en plus grande abondance dans le sol. Ce phénomène mériterait d'être confirmé par une étude des communautés microbiennes des deux stations comparées. Des études préalables (Ponge 2000a) ont cependant montré que les contenus intestinaux des Collemboles reflétaient bien la distribution des ressources alimentaires, et pouvaient être considérés comme un bon indicateur de la localisation de la microflore présente dans le sol.

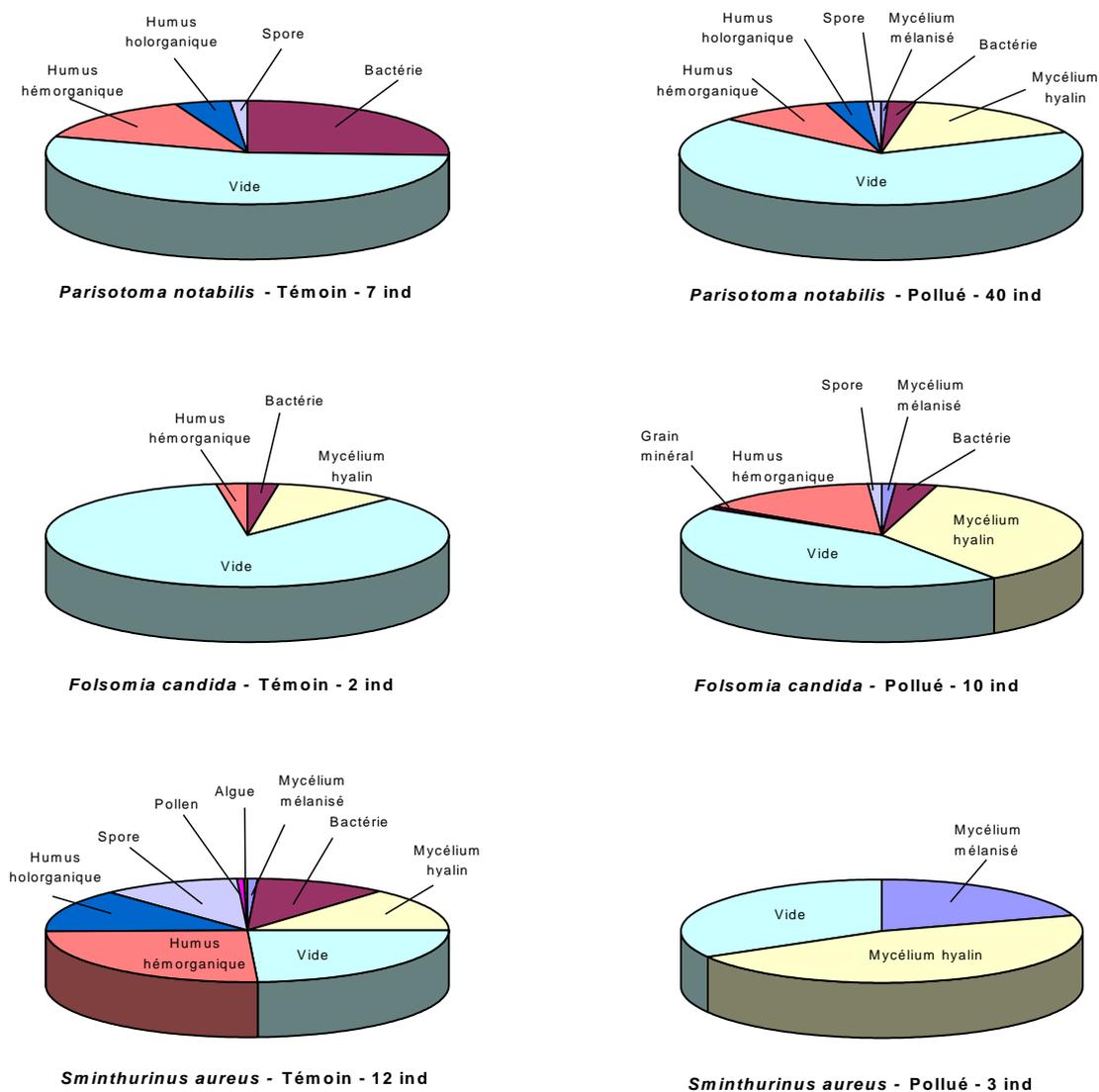


Figure 18. Régime alimentaire de trois espèces de Collemboles présentes sur les stations témoin et polluée du site de Merwiller-Péchelbronn, d'après l'observation microscopique des contenus intestinaux

Inoculation de la faune provenant d'un humus acide

Le tableau 2 montre la composition en Collemboles de l'humus acide inoculé sur la station polluée. Il montre une dominance de l'isotomide *Folsomia quadrioculata*. Cette espèce est absente du site de Merkwiller, seule l'espèce voisine *Folsomia manolachei* ayant été observée (Fig. 17), ce qui a été confirmé lors de l'échantillonnage de la station témoin effectué en avril 2003. La seconde espèce par ordre d'importance est l'isotomide *Isotomiella minor*, présente sur le site de Merkwiller (Fig. 17). La troisième espèce est le tullbergiide *Mesaphorura yosii*, espèce acidophile (Ponge 2003), absente du site sur lequel a été réalisée l'inoculation.

| | Nb total d'individus inoculés | Station polluée 30/10/02 | Station polluée 24/04/03 |
|--|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Arrhopalites sp.</i> | 14±9 | | |
| <i>Ceratophysella armata</i> | 6±6 | | |
| <i>Ceratophysella denticulata</i> | 93±23 | | |
| <i>Dicyrtomina minuta</i> | | 102±102 | |
| <i>Folsomia candida</i> | 15±9 | 1019±772 | |
| <i>Folsomia quadrioculata</i> | 494±66 | | |
| <i>Isotomiella minor</i> | 368±106 | | |
| <i>Mesaphorura jarmilae</i> | 28±14 | | |
| <i>Mesaphorura macrochaeta</i> | 213±43 | | 102±102 |
| <i>Mesaphorura yosii</i> | 242±66 | | |
| <i>Micranurida pygmaea</i> | 84±52 | | |
| <i>Neanura muscorum</i> | 29±14 | 102±102 | |
| <i>Paratullbergia callipygos</i> | 203±24 | | |
| <i>Parisotoma notabilis</i> | 15±9 | 4074±3344 | 204±204 |
| <i>Pogonognathellus flavescens</i> | | | 102±102 |
| <i>Proisotoma minima</i> | 57±49 | | |
| <i>Proisotoma minuta</i> | | 4380±1314 | 1630±1024 |
| <i>Protaphorura lata</i> | 62±19 | | |
| <i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i> | 215±79 | | |
| <i>Pseudachorutes parvulus</i> | 14±14 | | |
| <i>Pseudosinella huetheri</i> | 6±6 | | |
| <i>Sminthurides malmgreni</i> | | 102±102 | 2546±925 |
| <i>Sminthurides parvulus</i> | | 102±102 | 306±306 |
| <i>Sminthurinus aureus</i> | | 306±204 | 1120±690 |
| <i>Sphaeridia pumilis</i> | 28±21 | | 102±102 |
| <i>Superodontella nana</i> | 8±8 | | |
| <i>Tomocerus minor</i> | | 102±102 | |
| <i>Willemia anophthalma</i> | 197±68 | | |
| <i>Xenylla tullbergi</i> | 332±88 | | |

Tableau 2. Inoculation d'humus acide sur le terrain. Composition du peuplement de Collemboles inoculé sur la station polluée le 30 octobre 2002, du peuplement en place à cette date sur la placette polluée avant inoculation et du peuplement présent après six mois d'expérience. Les valeurs indiquées sont les abondances moyennes par m² et les erreurs-types de 5 répétitions

On remarque qu'à l'exception de *Mesaphorura macrochaeta* et *Sphaeridia pumilis*, et si l'on ne tient pas compte des espèces présentes à la fois dans l'inoculum et sur le site (*Folsomia candida*, *Neanura muscorum*, *Parisotoma notabilis*), aucune des espèces introduites n'a été retrouvée par carottage au bout de six mois. On peut donc en déduire, soit que les animaux ont fui la zone inoculée, soit n'ont eu aucune descendance et sont morts. Nous n'avons aucune preuve tangible que les individus appartenant aux espèces *Mesaphorura macrochaeta* et *Sphaeridia pumilis*, retrouvés sur la placette inoculée au bout de six mois, proviennent bien de l'inoculum, car ces deux espèces étaient présentes sur la station témoin le 30/10/02 et ont été à nouveau retrouvées sur ce site le 24/4/03. On ne peut donc pas conclure que l'inoculation d'humus acide permet d'introduire de nouvelles espèces, tolérantes vis-à-vis de la pollution par les hydrocarbures.

| | Inoculum (sol acide) | Inoculum (sol témoin) | Sol pollué (sans inoculation) | Soil pollué (inoculation sol acide) | Sol pollué (inoculation sol témoin) |
|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---|---|
| <i>Ceratophysella armata</i> | 0.2±0.2 | | | | |
| <i>Ceratophysella denticulata</i> | 1.4±0.7 | | 0.2±0.2 | | |
| <i>Folsomia candida</i> | 0.2±0.2 | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Folsomia manolachei</i> | | 1.4±0.4 | | | |
| <i>Folsomia quadrioculata</i> | 16.8±2.9 | | | | |
| <i>Heteromurus nitidus</i> | | 1.0±0.3 | | | |
| <i>Isotomiella minor</i> | 8.2±1.2 | 0.4±0.4 | 1.0±1.0 | | |
| <i>Isotomurus fucicolus</i> | | 1.6±0.7 | | | |
| <i>Lepidocyrtus lanuginosus</i> | | 9.6±2.3 | | | 0.4±0.4 |
| <i>Megalothorax minimus</i> | | 6.0±2.2 | | | |
| <i>Mesaphorura florae</i> | | 3.4±0.9 | 0.4±0.2 | | |
| <i>Mesaphorura hylophila</i> | | 1.0±1.0 | | | |
| <i>Mesaphorura macrochaeta</i> | 4.4±1.2 | 1.2±0.7 | 0.2±0.2 | 0.2±0.2 | 0.4±0.4 |
| <i>Mesaphorura yosii</i> | 3.2±1.1 | | | | |
| <i>Micranurida pygmaea</i> | 1.2±0.4 | | | | |
| <i>Micranurida sensillata</i> | | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Neanura muscorum</i> | 0.2±0.2 | | | | |
| <i>Orchesella quinquefasciata</i> | | 0.4±0.2 | | | |
| <i>Orchesella villosa</i> | | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Paratullbergia callipygos</i> | 5.2±1.7 | | | | |
| <i>Parisotoma notabilis</i> | 2.4±1.1 | 2.4±0.9 | | 1.6±1.6 | |
| <i>Proisotoma minima</i> | 2.2±2.0 | | | | |
| <i>Proisotoma minuta</i> | | | 413.2±412.5 | 659.6±256.6 | 656.8±351.9 |
| <i>Protaphorura lata</i> | 3.2±1.0 | | | | |
| <i>Protaphorura pseudovanderdrifti</i> | 5±0.8 | | | | |
| <i>Pseudisotoma sensibilis</i> | | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Pseudosinella alba</i> | | 1.8±0.5 | | | 0.2±0.2 |
| <i>Pseudosinella decipiens</i> | | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Sminthurides malmgreni</i> | | | 3.6±3.6 | | 0.6±0.2 |
| <i>Sminthurides parvulus</i> | | 4.4±1.4 | | | |
| <i>Sminthurinus aureus</i> | | 2.2±1.1 | | | 0.6±0.4 |
| <i>Sminthurinus signatus</i> | | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Sphaeridia pumilis</i> | | 0.6±0.4 | | | 3.8±3.8 |
| <i>Willemia anophthalma</i> | 5.4±2.3 | | | | |
| <i>Xenylla grisea</i> | | 0.2±0.2 | | | |
| <i>Xenylla tullbergi</i> | 7.4±4.4 | 0.8±0.6 | | | |
| <i>Xenyllodes armatus</i> | 0.2±0.2 | | | | |

Tableau 3. Colonisation forcée en microcosmes. Composition du peuplement de Collembolés dans l'inoculum acide, l'inoculum provenant de la station témoin et le sol pollué après inoculation (six mois). Les valeurs indiquées représentent le nombre moyen de Collembolés par boîte et leur erreur-type (5 répétitions)

L'inoculation forcée dans des microcosmes, réalisée en parallèle avec l'expérience de terrain (Tableau 3), montre que, parmi les espèces provenant du sol acide, seule *Parisotoma notabilis* a colonisé les microcosmes renfermant du sol pollué, d'où cette espèce était absente. Cependant, en raison de la présence de cette espèce dans le site de Merkwiler, y compris dans la station polluée (Tableau 2, Fig. 15), on ne peut pas conclure sur sa provenance acide. Plusieurs espèces en provenance du sol témoin, *Lepidocyrtus lanuginosus*, *Pseudosinella alba*, *Sminthurinus aureus* et *Sphaeridia pumilis*, ont colonisé le sol pollué. À l'exception de *Sminthurinus aureus* (Figs. 17 et 18, Tableau 2), ces espèces n'ont jamais été retrouvées dans la station polluée. On peut donc conclure qu'elles ont effectivement colonisé le sol pollué, dans les conditions de l'expérience. On peut cependant se poser la question de leur absence dans la station polluée, située à une courte distance de la station témoin, alors qu'il s'agit d'espèces de surface à grande mobilité (Ponge 1980, 1993).

Les expériences de colonisation effectuées, tant sur le terrain qu'au laboratoire, n'ont donc pas démontré la possibilité d'une inoculation de sol acide pour restaurer la biodiversité des peuplements animaux du sol et, par là-même, contribuer à la dépollution. On peut raisonnablement penser que l'élévation brutale de pH (Fig. 15) auquel les animaux introduits ont été soumis a constitué un stress auquel ils n'ont pu résister. La même hypothèse a été invoquée pour expliquer l'échec d'expériences

similaires effectuées sur des sols pollués par des métaux lourds (Garnier & Ponge, 2004; Gillet & Ponge, 2004).

Mobilité des Collemboles sous l'effet du phénanthrène

L'application de phénanthrène sur le terrain en solution aqueuse saturée (1,6 mg/l) n'a pas eu, au bout d'une semaine, d'effet sur le déplacement vertical ou horizontal des Collemboles (Tableau 4).

| | EAU | | | | | | | | | | PHENANTHRENE | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------|------|------|----|-----|----|-----|----|-------|----|--------------|----|------|----|-----|----|-----|----|-------|----|
| | Milieu | | Nord | | Est | | Sud | | Ouest | | Milieu | | Nord | | Est | | Sud | | Ouest | |
| | A | R | A | R | A | R | A | R | A | R | A | R | A | R | A | R | A | R | A | R |
| <i>Allacma fusca</i> | | | | | 1 | | | 1 | | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Arrhopalites caecus</i> | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| <i>Arrhopalites sp</i> | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | 1 | | |
| <i>Ceratophysella denticulata</i> | 19 | 2055 | 18 | 73 | 21 | 16 | 18 | 40 | 59 | 19 | 6 | 18 | 1 | 5 | 17 | 10 | 11 | 2 | 7 | 3 |
| <i>Deuterominthurus sp</i> | 3 | | | 1 | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | | |
| <i>Dicyrtoma fusca</i> | 3 | 3 | 1 | 1 | 5 | 2 | 2 | 2 | 7 | 3 | 3 | 4 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Dicyrtoma minuta</i> | | | | 1 | 2 | 2 | | 1 | | 1 | 3 | 5 | 2 | 2 | 1 | | 2 | | 1 | 3 |
| <i>Entomobrya multifasciata</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| <i>Entomobrya sp</i> | | | | 2 | | 1 | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | |
| <i>Folsomia manolachei</i> | 17 | 13 | 39 | 30 | 26 | 17 | 18 | 25 | 12 | 12 | 68 | 86 | 48 | 71 | 51 | 53 | 34 | 28 | 23 | 22 |
| <i>Friesea truncata</i> | | | 1 | | 1 | | | | | | 6 | 4 | 6 | 7 | 3 | 2 | 1 | 3 | 6 | 3 |
| <i>Heteromurus major</i> | 6 | 3 | 2 | 6 | | 1 | | 4 | 1 | 3 | 11 | 7 | | 6 | 1 | 4 | 3 | 5 | 4 | |
| <i>Heteromurus nitidus</i> | 8 | | 1 | 6 | 5 | 4 | 3 | 6 | 8 | 8 | 1 | | 3 | 7 | 4 | 8 | 3 | 3 | 9 | 3 |
| <i>Isotoma violacea</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| <i>Isotomiella minor</i> | 46 | 49 | 45 | 38 | 64 | 67 | 9 | 43 | 66 | 66 | 31 | 34 | 29 | 36 | 16 | 25 | 11 | 14 | 15 | 12 |
| <i>Kalaphorura burmeisteri</i> | 3 | 4 | 20 | 5 | 4 | 15 | 3 | 5 | 13 | 21 | 12 | 5 | 8 | 47 | 9 | 7 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| <i>Lepidocyrtus curvicolis</i> | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | 1 | | 1 | | | | |
| <i>Lepidocyrtus cyaneus</i> | | | | | | | | 4 | | | | | | | | | 1 | | | |
| <i>Lepidocyrtus lanuginosus</i> | 7 | 4 | 15 | 14 | 4 | 5 | 5 | 7 | 12 | 23 | 18 | 20 | 23 | 16 | 11 | 31 | 15 | 17 | 19 | 15 |
| <i>Lepidocyrtus lignorum</i> | | | | | 12 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| <i>Megalothorax incertus</i> | 2 | 2 | | 1 | | | 6 | 5 | 6 | 6 | | | | | 1 | | 1 | | | |
| <i>Megalothorax minimus</i> | 15 | 3 | 3 | 7 | 4 | 13 | 13 | 14 | 7 | 15 | 14 | 2 | 2 | 7 | 4 | 3 | 7 | | 12 | 4 |
| <i>Mesaphorura hylophila</i> | | | | | 2 | | | | | | | | | 1 | 2 | | | 2 | | |
| <i>Mesaphorura italica</i> | | | | | 2 | | | | | | 2 | 1 | 2 | 1 | | | | 1 | | |
| <i>Mesaphorura jevanica</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| <i>Mesaphorura macrochaeta</i> | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | |
| <i>Mesaphorura sp</i> | | | | | | | | | 1 | 1 | | | | | | | 1 | | | |
| <i>Micranurida sensillata</i> | | | | | 1 | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | 3 |
| <i>Monobella grassei</i> | | | | | | | | | | | | | 3 | | 1 | | | | | |
| <i>Neanura muscorum</i> | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| <i>Oncopodura crassicornis</i> | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| <i>Onychiurus jubilaris</i> | | | 2 | | 2 | | 1 | 4 | 1 | 2 | 7 | 2 | | 3 | 3 | 5 | 2 | | 4 | 1 |
| <i>Onychiurus pseudogranulosus</i> | 20 | 28 | 12 | 19 | 29 | 18 | 13 | 7 | 9 | 10 | 43 | 78 | 32 | 60 | 35 | 24 | 11 | 20 | 31 | 29 |
| <i>Orchesella sp</i> | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | |
| <i>Orchesella villosa</i> | | 2 | | 1 | 3 | | 1 | 1 | | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | |
| <i>Paratullbergia callipygos</i> | | | 1 | | | | | | 1 | | | | 1 | | | | | | 3 | 3 |
| <i>Parisotoma notabilis</i> | 2 | 1 | | 15 | 4 | 3 | 11 | 4 | 3 | 5 | 15 | 29 | 9 | 13 | 13 | 5 | 8 | 15 | 8 | 13 |
| <i>Pseudachorutes parvulus</i> | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | | | 1 |
| <i>Pseudosinella alba</i> | 21 | 2 | 6 | 19 | 9 | 9 | 19 | 25 | 17 | 20 | 27 | 2 | 21 | 23 | 22 | 15 | 18 | 18 | 12 | 9 |
| <i>Pseudosinella decipiens</i> | 13 | | 5 | 5 | 1 | 6 | 7 | 6 | 4 | 3 | 7 | | 11 | 17 | 5 | 4 | 6 | 3 | 18 | 6 |
| <i>Seira domestica</i> | | | 1 | 1 | 2 | 9 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sminthurinus aureus</i> | | | 1 | 1 | 1 | | 1 | | | 1 | | | 1 | | 1 | | 4 | 1 | 2 | 2 |
| <i>Sphaeridia pumilis</i> | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Stenaphorura denisi</i> | 8 | 11 | 11 | 9 | 12 | 7 | 6 | 8 | 5 | 4 | 4 | 10 | 5 | 5 | 4 | 10 | 12 | 3 | 4 | 4 |
| <i>Tomocerus botanicus</i> | | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| <i>Wankeliella pongei</i> | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 1 | | | | | | | |
| <i>Willemia buddenbrocki</i> | | | | | 2 | | | | | | | 2 | | | 1 | | 1 | | | 1 |

Tableau 4. Réaction des peuplements de Collemboles à une application de phénanthrène en solution aqueuse (1,6 mg/l), comparée à une application équivalente d'eau déionisée. A = attraction. R = répulsion

On n'observe aucune différence significative entre les boîtes destinées à mesurer l'attraction (ouvertes dans la direction opposée au phénanthrène) et celles destinées à mesurer la répulsion (ouvertes en direction du phénanthrène). Un dosage des 16 HAP de la liste EPA effectué en fin d'expérience (Tableau 5) ne montre aucune différence entre les placettes arrosées avec du phénanthrène et celles arrosées avec de l'eau. On en conclut que le phénanthrène appliqué, soit a disparu au bout d'une semaine (ce qui est peu probable), soit s'est dilué d'une façon telle que sa teneur ne dépasse pas le bruit de fond habituellement rencontré dans les sols.

| | PHENANTHRENE | EAU |
|------------------------|--------------|-------------|
| Naphthalène | 0.071±0.007 | 0.064±0.005 |
| Acénaphthylène | < 0,04 | < 0,03 |
| Acénaphthène | 0.024±0.002 | 0.023±0.000 |
| Fluorène | < 0,02 | < 0,02 |
| Phénanthrène | 0.111±0.014 | 0.119±0.019 |
| Anthracène | 0.022±0.009 | 0.024±0.008 |
| Fluoranthrène | 0.189±0.017 | 0.230±0.024 |
| Pyrène | 0.123±0.007 | 0.152±0.014 |
| Benzo(a)anthracène | 0.070±0.010 | 0.080±0.009 |
| Chrysène | 0.100±0.013 | 0.105±0.013 |
| Benzo(b)fluoranthrène | < 0,02 | < 0,02 |
| Benzo(k)fluoranthrène | 0.043±0.003 | 0.048±0.004 |
| Benzo(a)pyrène | 0.136±0.022 | 0.147±0.011 |
| Dibenzo(a,h)anthracène | 0.015±0.001 | 0.016±0.001 |
| Benzo(ghi)pérylène | 0.066±0.003 | 0.074±0.003 |
| Indeno(123cd)pyrène | 0.073±0.005 | 0.083±0.006 |
| Σ 16 HAPs | 1.043±0.073 | 1.165±0.094 |

Tableau 5. Dosage des 16 HAPs de la liste EPA dans les placettes utilisées pour l'expérience de terrain portant sur le comportement d'attraction/répulsion des peuplements de Collemboles vis-à-vis du phénanthrène

Cette expérience a été refaite en février 2004, en épandant directement le phénanthrène cristallisé à la surface du sol, dans des aquariums (Gass 2004). Les résultats, après une semaine d'expérience, ne montrent pas d'effet du phénanthrène, ni en ce qui concerne la densité totale de Collemboles, ni en ce qui concerne la richesse spécifique des peuplements, que ce soit dans les pièges rectangulaires (mouvements horizontaux) ou dans les pièges circulaires (mouvements verticaux). Cependant, des effets de l'épandage de phénanthrène ont pu être mis en évidence chez certaines espèces.

L'espèce dominante du peuplement, *Folsomia manolachei*, vivant dans le sol proprement dit (pas de différences d'effectifs entre pièges rectangulaires et circulaires), montre un déficit significatif de piégeage vers le bas par rapport au piégeage vers le haut ($P < 1\%$), et ce seulement en présence de phénanthrène (Fig. 19).

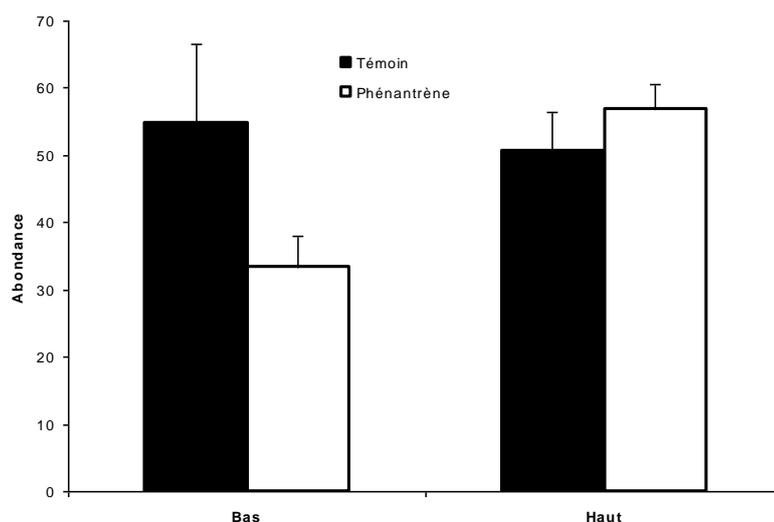


Fig. 19. Abondance de *Folsomia manolachei* dans les pièges circulaires (Bas = piégeage vers le bas; Haut = piégeage vers le haut)

Les mouvements horizontaux de *Lepidocyrtus lanuginosus*, espèce très abondante vivant surtout en surface, sont affectés négativement par la présence de phénanthrène à la surface du sol. Le contraste entre les deux types de piège, indiquant bien que cette espèce vit surtout en surface, est significatif tant en présence qu'en absence de phénanthrène (Fig. 20). Par contre, ce contraste est significativement réduit en présence de phénanthrène ($P < 5\%$), les effectifs observés dans les pièges rectangulaires étant inférieurs à ceux du témoin, alors que ceux des pièges circulaires sont légèrement supérieurs.

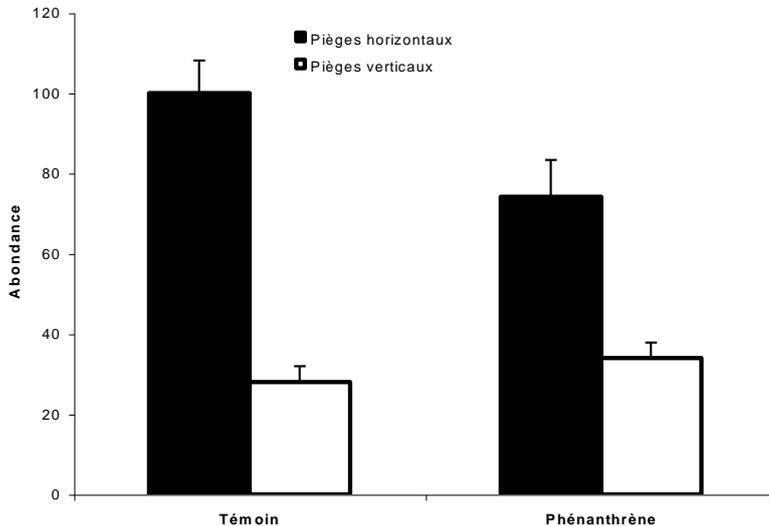


Fig. 20. Abondance de *Lepidocyrtus lanuginosus* dans les pièges rectangulaires (mouvements horizontaux) et circulaires (mouvements verticaux) en présence et en absence de phénanthrène

Ces deux résultats indiquent des déficits de mouvement, soit verticaux (cas de *Folsomia manolachei*) soit horizontaux (cas de *Lepidocyrtus lanuginosus*) lorsque les animaux ont été en contact avec le phénanthrène. Des effets paralysants du phénanthrène ont pu être également mis en évidence lors des tests comportementaux (voir ci-dessous). Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence d'effets attractifs ou répulsifs du phénanthrène sur les peuplements naturels de Collemboles.

Tests écotoxicologiques utilisant le comportement d'évitement des Collemboles

Ces tests concernent le sol pollué et le bitume en provenance du site de Péchelbronn, le phénanthrène, le naphthalène et trois sols de cokeries fournis par le CNRSSP. Des essais préliminaires, destinés à mettre au point la méthode (nombre de répétitions, fréquence des observations) sur l'espèce *Folsomia candida* et le phénanthrène en solution (Bourlette 2004), ont montré que la souche en provenance d'un humus de type mull (parc du laboratoire, pH 7) était repoussée par le composé à la concentration de 0,16 mg/l, alors que la souche provenant d'un humus de type moder (forêt de Sénart, pH 4) était indifférente (Fig. 21). La comparaison avec un test de reproduction effectué sur un mois montre que ce composé, à cette même concentration, n'exerce aucun effet toxique sur *Folsomia candida*.

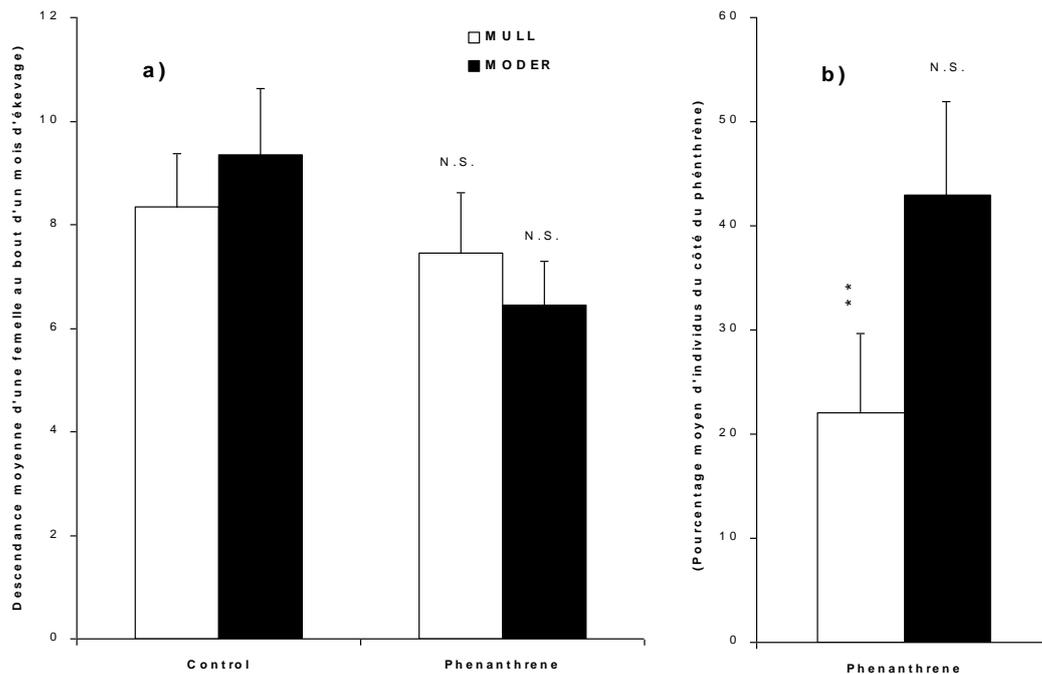


Figure 21. Comparaison des tests de reproduction (a) et d'évitement (b) utilisant le phénanthrène en solution aqueuse à 0,16 mg/l et l'espèce *Folsomia candida*. N.S. = non significatif (test de Mann-Whitney pour la reproduction, test des signes pour l'évitement). ** = significatif au seuil de 1% (test des signes). Une femelle introduite par boîte dans les tests de reproduction et d'évitement, 20 réplicats

Ces résultats sont cependant à considérer avec précaution. L'intervalle de temps entre la date de préparation de la solution-mère (4 juillet 2003) et son emploi dans le test ci-dessus (16 juillet 2003) était de 12 jours. Le manque de cohérence entre les résultats obtenus avec des séries de dilution de la solution saturée de phénanthrène (Bourlette 2004) nous ont amenés à penser que le phénanthrène pouvait se transformer au cours de la période de stockage à 15°C et que ses produits de dégradation pouvaient avoir une toxicité plus élevée que le produit d'origine. Ceci a été vérifié au cours d'un test de reproduction et de survie utilisant deux solutions saturées de phénanthrène, l'une préparée à partir d'une solution-mère fraîche, l'autre à partir de la même solution-mère conservée 48 jours à 15°C (Bourlette 2004). On observe une réduction d'effectif par rapport au témoin seulement lorsque la solution-mère de phénanthrène a été conservée un certain temps avant d'être utilisée. Par la suite, tous les tests utilisant des HAPs ont été réalisés avec des solutions fraîchement préparées. On a pu vérifier (Boitaud 2004) que des solutions saturées de phénanthrène fraîchement préparées n'exerçaient également aucun effet répulsif sur *Folsomia candida*, alors qu'un tel effet était observé après 30 jours de conservation. Ce résultat, bien que négatif, laisse planer un doute sur le bien fondé de tests de reproduction et de survie (d'une durée généralement comprise entre un et trois mois) portant sur des composés dont les produits de dégradation, non contrôlés au cours de l'expérience, peuvent s'avérer plus nocifs que le produit effectivement testé. Les tests comportementaux ne présentent pas un tel biais.

Les tests utilisant *Folsomia candida* ont également porté sur le sol pollué du site de Pêchebron, le goudron sous-jacent, le sol témoin du site de Pêchebron et un sol mixte préparé en mélangeant sol pollué et sol témoin à parts égales (Bourlette 2004). Trois souches de *F. candida* ont été comparées, l'une provenant du sol témoin (mull), l'autre du sol pollué (hémimoder), la troisième du sol acide (moder) de Pfaffenbron ayant servi à l'expérience d'inoculation.

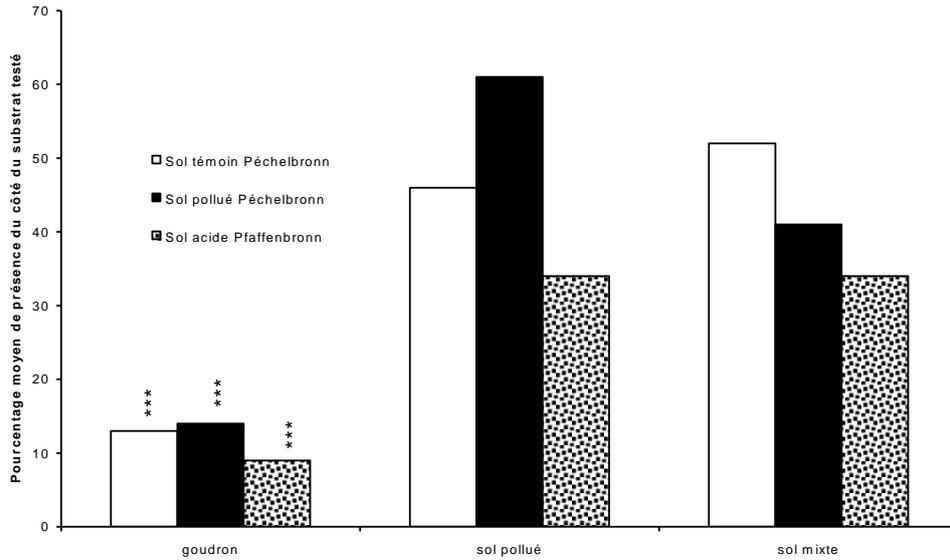


Figure 22. Tests comportementaux. Pourcentage moyen de présence de trois souches de *Folsomia candida* sur le goudron, le sol pollué et le sol mixte (mélange témoin/pollué) du site de Pêchebronn. *** = effet hautement significatif au seuil de 1‰ (test t païré, 20 répétitions)

Les tests comportementaux montrent que seul le goudron produit un effet répulsif, quelque soit la souche de *F. candida* considérée. Les tests de survie/reproduction montrent des résultats plus contrastés (Fig. 23). Le goudron s'avère nocif dans tous les cas: aucune reproduction n'a été observée et les effectifs ont considérablement baissé au cours de l'expérience, quelque soit la souche considérée. Sur le sol témoin, le sol pollué et le sol mixte, les femelles introduites se sont toujours multipliées. Une augmentation significative des effectifs par rapport au témoin a pu, de façon inattendue, être mise en évidence sur le sol pollué, avec les souches en provenance du sol témoin et du sol acide, mais pas avec celle en provenance du sol pollué. Une réduction des effectifs par rapport au témoin a par contre été observée sur le sol mixte, avec la souche en provenance du sol pollué et une augmentation avec celle provenant du sol acide.

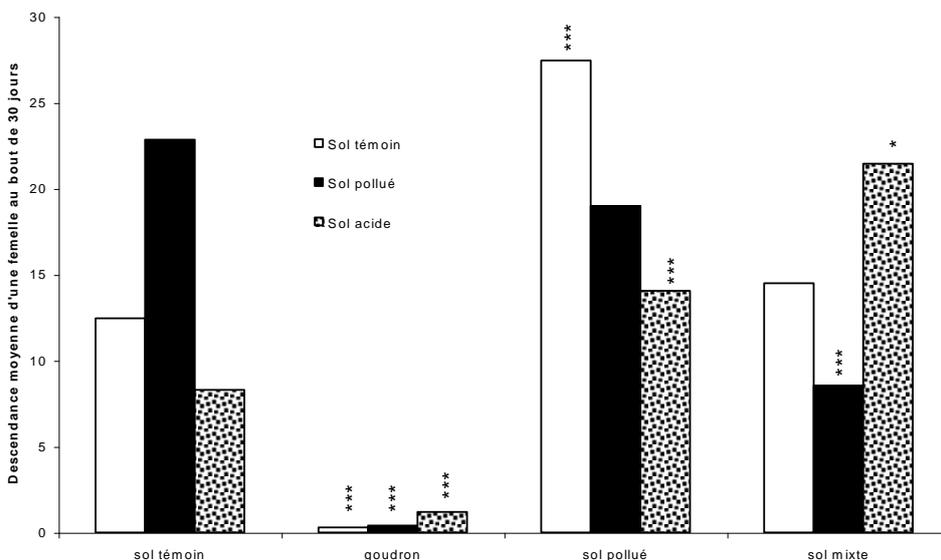


Figure 23. Effectifs de trois souches de *Folsomia candida* au bout de 30 jours (1 femelle introduite en début d'expérience, 20 répétitions) sur le sol témoin, le goudron, le sol pollué et le sol mixte du site de Pêchebronn

Trois sols pollués par les hydrocarbures (nommés sols A, B, C), en provenance de cokeries et fournis par le CNRSSP, ont été testés de façon similaire, sur un certain nombre de souches de *F. candida*. Les caractéristiques physico-chimiques de ces trois sols figurent dans le Tableau 6.

| | Texture | 16 HAPs (ppm) | Zn (ppm) | Pb (ppm) | Cu (ppm) | Cd (ppm) | CN ⁻ (ppm) | C organique (%) |
|--------------|---------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|-----------------|
| Sol A | sable limoneux | 2895 | | | | | 0,8 | 9 |
| Sol B | limon léger sableux | 3687 | 514 | 345 | 126 | 5 | 44,2 | 44,2 |
| Sol C | limon moyen léger | 701 | 75 | 35 | 48 | < 4 | 6,7 | 9,2 |

Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques des trois sols de cokerie étudiés

Les sols A et B présentent à la fois une pollution organique, métallique et cyanhydrique, le sols B étant le plus pollué des deux, alors que seule une pollution organique a pu être mise en évidence dans le sol C. Chacun de ces trois sols possède son témoin, collecté dans le même site mais dans une zone non affectée par la pollution.

Les tests de comportement ainsi que les tests de reproduction et de survie ont été effectués en diluant chacun de ces sols avec le sol témoin, selon la gamme suivante:

- 0,35%
- 1%
- 5%
- 10%
- 50%
- 100%

Cette gamme de dilution a été choisie car elle avait été utilisée par un autre laboratoire pour des tests de reproduction portant sur le ver de terre *Eisenia fetida*.

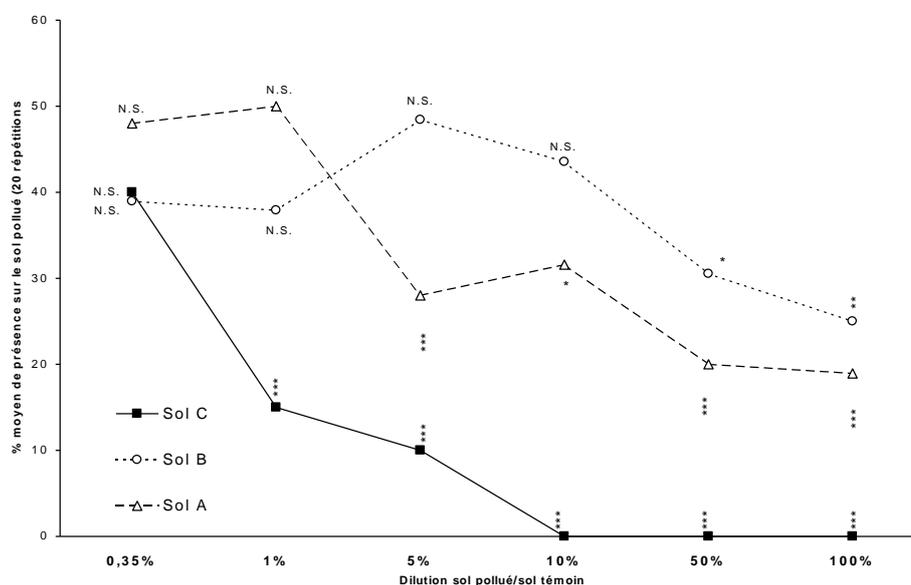


Figure 24. Tests comportementaux. Réaction d'évitement de *Folsomia candida* (souche en provenance du sol neutre de Brunoy) vis-à-vis de trois sols de cokeries pollués par les hydrocarbures. Les effets significatifs (tests t paillés) sont indiqués par * (P < 5%), ** (P < 1%), *** (P < 1‰)

La comparaison de ces trois sols a été effectuée sur la souche en provenance du sol du laboratoire (sol neutre à humus de forme mull). La figure 24 montre des différences de réaction de cette souche vis-à-vis des trois sols comparés. Le sol C, bien que dépourvu de pollution métallique et cyanhydrique, s'avère le plus répulsif. Dès la concentration de 10% (dilution de ce sol dans le sol témoin), la totalité des animaux a fui le secteur pollué au profit du secteur témoin. Une répulsion

significative a lieu dès 1%, l'effet augmentant ensuite avec la concentration (Fig. 24). Le sol B montre un effet répulsif significatif à partir de 5% de dilution, mais cet effet n'est jamais total, même sur le sol non dilué. Le sol C montre un effet répulsif significatif seulement à la concentration de 50% et cet effet, bien que significatif, reste faible même sur le sol pur. Les trois sols peuvent donc être classés dans l'ordre suivant C > B > A en ce qui concerne le degré de répulsivité vis-à-vis de la souche de *F. candida* étudiée.

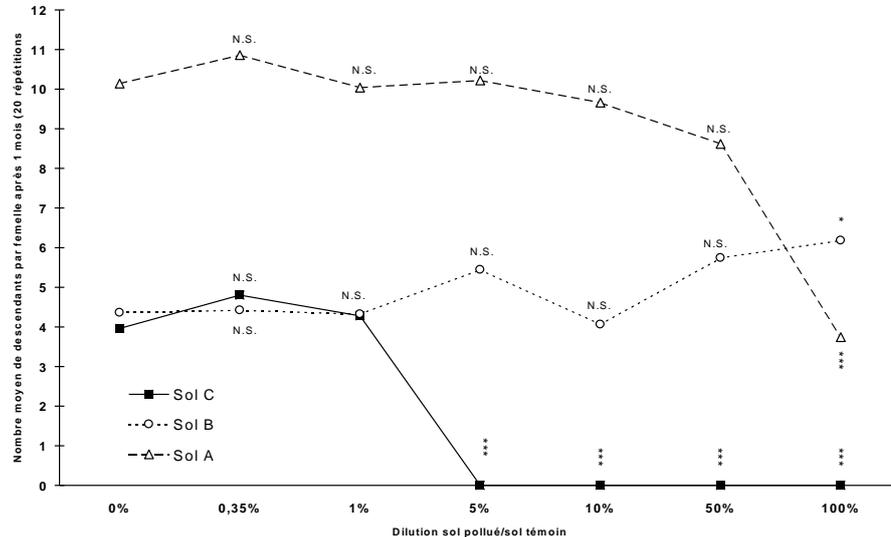


Figure 25. Effectifs de *Folsomia candida* (10 femelles introduites) au bout de 30 jours de contact avec trois sols de cokeries, à six degrés de dilution dans leur sol témoin. Les tests (tests t non paires) ont porté sur la comparaisons avec les sols témoins respectifs. N.S. = non significatif. * = P < 5%. *** = P < 0.001

La croissance des populations de *F. candida* sur les sols B et C montre, lorsque la concentration croit, un plateau, ne présentant aucune différence significative avec le témoin, suivi d'une chute des effectifs à partir d'une valeur seuil. Cette valeur (LOEC = Lowest Effect Concentration) varie de 5% pour le sol C à 100% pour le sol B. La mortalité est totale avec le sol C, dès la valeur seuil de 5%, alors que seule la reproduction est affectée avec le sol B. Le sol A, par contre, ne montre aucun effet dépressif sur les populations de *F. candida*, quelle que soit la concentration, et même un effet stimulant lorsque'il est utilisé pur. Le classement des sols en fonction de leur toxicité est le même que précédemment: C > B > A. On remarquera que les sols témoins ne présentent pas la même qualité par rapport à la reproduction de *F. candida*, celui du sol A, comparé à ceux des sols B et C, autorisant l'apparition de deux fois plus d'individus au bout de 30 jours d'expérience. On remarquera également que la réponse de l'animal, en termes de survie et de reproduction, est du type "tout ou rien", contrairement aux tests comportementaux, qui présentent des réponses progressives en fonction des concentrations testées (Fig. 24).

Des essais similaires ont été effectués, sur le sol C uniquement (Martínez Aldaya et al. soumis), pour comparer la réponse de 5 souches de *F. candida*:

- 1 sol neutre (pollué) de Péchelbronn (hémimoder)
- 2 sol neutre (non pollué) de Péchelbronn (mull)
- 3 sol neutre de Brunoy (mull)
- 4 sol acide de Brunoy (moder)
- 5 sol acide de Pfaffenbronn (moder)

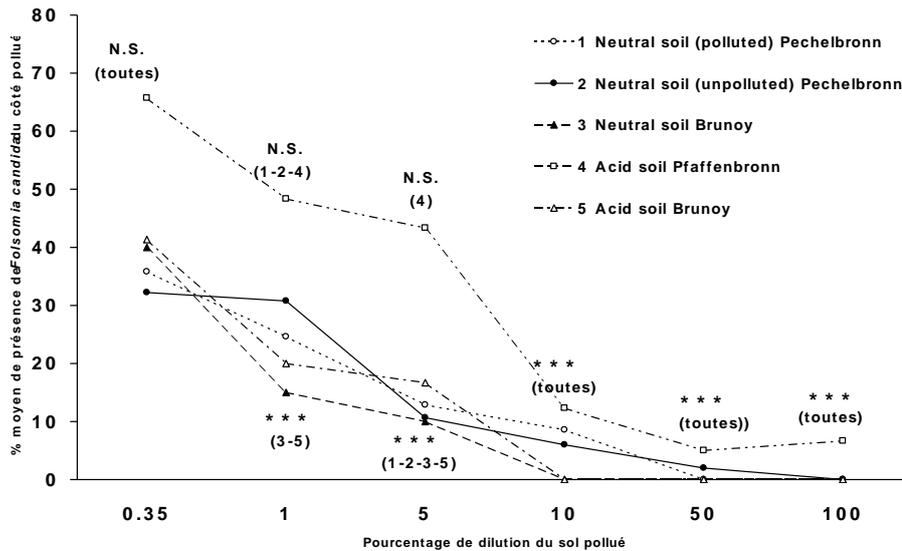


Figure 26. Tests comportementaux. Réaction d'évitement de *Folsomia candida* (5) vis-à-vis d'un sol de cokerie pollué par les hydrocarbures (sol C). Les effets significatifs (tests t pairés) sont indiqués par *** ($P < 1\%$)

Toutes les souches montrent une réaction d'évitement significative, à partir d'un seuil (LOEC) variant selon les souches. Selon ce test, elles peuvent être classées dans l'ordre suivant, en fonction de leur sensibilité: 3-5>1-2>4. Aucune relation n'a pu être mise en évidence avec l'écologie (acidité du sol et pollution) des femelles à l'origine des lignées comparées, les animaux en provenance d'un sol acide ou pollué n'étant pas moins sensibles que ceux en provenance d'un sol neutre et non pollué. Cependant, la provenance géographique semble avoir une certaine importance, les souches alsaciennes, en particulier Pfaffenbronn, étant moins sensibles que les couches franciliennes, quelques soient les caractéristiques du sol de provenance. Cette étude, bien que limitée géographiquement, semble mettre le doigt sur des différences biogéographiques en ce qui concerne la tolérance de *F. candida* vis-à-vis des hydrocarbures.

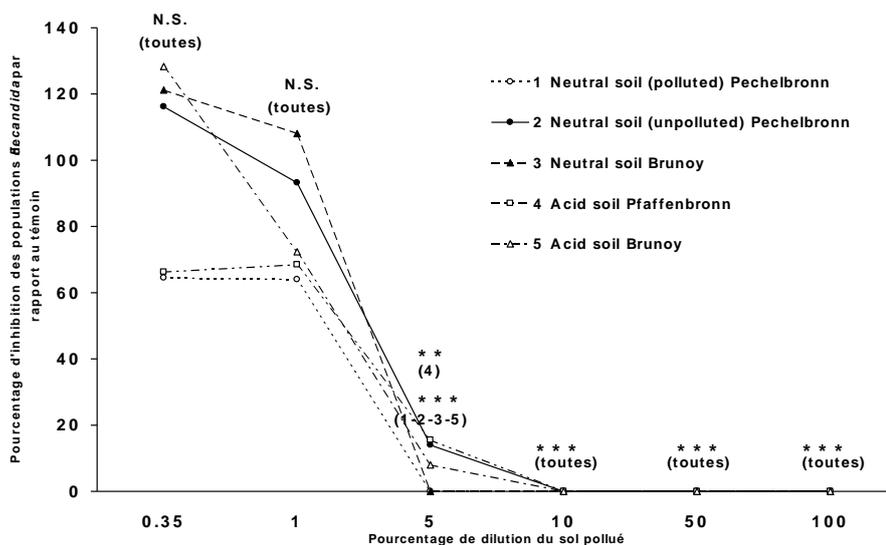


Figure 27. Tests de reproduction et de survie. Inhibition des populations de 5 souches de *Folsomia candida* (% par rapport au témoin) élevées pendant 30 jours sur un sol de cokerie pollué par les hydrocarbures (sol C). Les effectifs de population ont été comparés au témoin par des tests t non pairés. ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

Comme dans les tests portant sur la comparaison entre les trois types de sol, on n'observe pas d'effet progressif. À partir d'un certain seuil de concentration (le même pour les 5 souches), on observe un

effondrement des populations, correspondant à la mortalité de tout ou partie des 10 femelles introduites, ainsi qu'à l'absence de reproduction. Des différences entre souches apparaissent au niveau du degré atteint par ce phénomène, à la valeur seuil uniquement. Au-delà de ce seuil, tous les individus introduits sont morts et n'ont eu aucune descendance. Par rapport au test de reproduction et de survie, les 5 souches comparées ne présentent pas de différences, alors que des différences très nettes apparaissent au niveau des tests comportementaux.

D'une manière générale, les tests comportementaux portant sur *Folsomia candida* s'avèrent très discriminants, tant en ce qui concerne les trois sols étudiés que les 5 souches comparées. Les tests de reproduction et de survie ne s'avèrent discriminants qu'en ce qui concerne les sols, pas les souches. Les tests comportementaux s'avèrent donc particulièrement sensibles, mais peu robustes par rapport à la provenance géographiques des animaux, ce qui peut être considéré comme un handicap si une norme est déposée sur l'espèce *Folsomia candida*, sans spécification de provenance.

Des comparaisons ont été effectuées entre plusieurs espèces de Collemboles, représentant un éventail assez large de positions taxinomiques au sein de ce groupe, et conjuguant pour la même espèce, lorsque cela était possible, une origine "acide" ou "neutre" (Boitaud 2004). On a choisi le naphthalène en lieu et place du phénanthrène, en raison de sa solubilité plus grande dans l'eau. Des essais préliminaires ont montré que les animaux montraient une réaction d'évitement assez forte vis-à-vis de ce composé, connu pour affecter à faible dose la consommation d'oxygène des insectes (Van Brummelen et al. 1998) et tuer ces derniers à forte dose (Newell et al. 1987). Il constitue le composant majeur de la naphthaline, couramment utilisée pour éloigner les insectes des meubles destinés au rangement du linge domestique.

Quatre concentrations ont été comparées: 0,003 mg.L⁻¹, 0,03 mg.L⁻¹, 0,3 mg.L⁻¹, et 30 mg.L⁻¹. Le tableau 7 indique les espèces testées ainsi que leur provenance écologique et géographique.

| Espèce | Famille | Acidité | Humus | Origine |
|--------------------------------|----------------|---------|-------|--------------|
| <i>Arrhopalites caecus</i> | Arrhopalitidae | Neutre | Mull | Brunoy |
| <i>Folsomia candida</i> | Isotomidae | Neutre | Mull | Brunoy |
| <i>Folsomia candida</i> | Isotomidae | Acide | Moder | Pfaffenbronn |
| <i>Isotomiella minor</i> | Isotomidae | Acide | Moder | Brunoy |
| <i>Isotomiella minor</i> | Isotomidae | Acide | Moder | Pfaffenbronn |
| <i>Mesaphorura floriae</i> | Onychiuridae | Neutre | Mull | Péchelbronn |
| <i>Mesaphorura macrochaeta</i> | Onychiuridae | Acide | Moder | Pfaffenbronn |
| <i>Mesaphorura yosii</i> | Onychiuridae | Acide | Moder | Brunoy |
| <i>Mesaphorura yosii</i> | Onychiuridae | Acide | Moder | Pfaffenbronn |
| <i>Parisotoma notabilis</i> | Isotomidae | Neutre | Mull | Péchelbronn |
| <i>Parisotoma notabilis</i> | Isotomidae | Acide | Moder | Pfaffenbronn |
| <i>Proisotoma minima</i> | Isotomidae | Acide | Moder | Brunoy |
| <i>Proisotoma minima</i> | Isotomidae | Acide | Moder | Pfaffenbronn |

Tableau 7. Liste des espèces comparées dans les tests écotoxicologiques utilisant le naphthalène

Le tableau 8 rassemble les résultats des tests comportementaux. On constate que toutes les souches, à l'exception de quatre d'entre elles, montrent une sensibilité au naphthalène à la plus forte concentration (30 mg.L⁻¹), sous la forme d'un évitement partiel du produit, les pourcentages d'individus présents sur le disque pollué étant inférieurs ou égaux à 32 %. Les espèces ne montrant pas de sensibilité pour le naphthalène sont: *F. candida* (SN Brunoy et SA Pfaffenbronn), *H. nitidus* (SN Pechelbronn) et *P. minima* (SA Brunoy). Plusieurs espèces sont également sensibles à la solution mère de naphthalène diluée à 1/100. Seuls *F. candida* (SN Brunoy), *M. yosii* (SA Brunoy) et *P. notabilis* (SN Pechelbronn) montrent un comportement d'évitement du polluant pour la solution diluée à 1/1000. Aucune espèce n'est sensible à la solution de naphthalène diluée à 1/10 000.

| Espèce | Souche | 0,003 mg.L ⁻¹ | 0,030 mg.L ⁻¹ | 0,300 mg.L ⁻¹ | 30 mg.L ⁻¹ |
|-----------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>H. nitidus</i> | SN Pechelbronn | - | - | - | 48,00 ± 10,60 |
| <i>F. candida</i> | SN Brunoy | 47,00 ± 9,98 | 33,00 ± 7,44 | 43,00 ± 9,43 | 37,00 ± 8,98 |
| <i>F. candida</i> | SA Pfaffenbronn | 49,00 ± 8,64 | 40,00 ± 7,68 | 44,00 ± 8,16 | 52,00 ± 7,73 |
| <i>I. minor</i> | SA Pfaffenbronn | 42,00 ± 8,07 | 44,00 ± 9,47 | 31,00 ± 7,88 | 32,00 ± 7,46 |
| <i>P. notabilis</i> | SA Pfaffenbronn | 49,00 ± 7,88 | 46,00 ± 9,30 | 40,00 ± 7,11 | 30,00 ± 8,27 |
| <i>P. notabilis</i> | SN Pechelbronn | 37,00 ± 9,87 | 30,00 ± 7,33 | 26,00 ± 8,96 | 28,00 ± 8,00 |
| <i>P. minima</i> | SA Brunoy | 49,00 ± 7,47 | 48,00 ± 8,75 | 32,00 ± 8,13 | 33,00 ± 7,15 |
| <i>P. minima</i> | SA Pfaffenbronn | 58,00 ± 7,80 | 53,00 ± 8,86 | 51,00 ± 8,88 | 37,00 ± 8,62 |
| <i>M. floriae</i> | SN Pechelbronn | 50,00 ± 7,75 | 42,00 ± 7,66 | 20,00 ± 6,96 | 31,00 ± 7,18 |
| <i>M. macrochaeta</i> | SA Pfaffenbronn | 51,00 ± 7,61 | 51,00 ± 9,78 | 31,00 ± 6,72 | 29,00 ± 5,52 |
| <i>M. yosii</i> | SA Brunoy | 52,00 ± 8,51 | 18,00 ± 5,96 | 28,00 ± 8,87 | 24,00 ± 8,16 |
| <i>M. yosii</i> | SA Pfaffenbronn | 36,00 ± 8,03 | 43,00 ± 9,21 | 32,00 ± 8,00 | 13,00 ± 5,48 |
| <i>A. caecus</i> | SN Brunoy | 53,00 ± 8,62 | 41,25 ± 8,37 | 25,56 ± 7,64 | 22,00 ± 6,94 |

Tableau 8. Tests comportementaux portant sur plusieurs espèces de Collembolés mises en présence de naphthalène à des concentrations variées. Les valeurs sur fond coloré correspondent à un évitement significatif du naphthalène (test t païré, au seuil de 5%, 20 répétitions). Les valeurs indiquées sont les moyennes des pourcentages de présence des animaux du côté pollué, suivies de leur erreur-type

À l'exception des souches non sensibles au naphthalène et de *F. candida* en provenance du sol neutre de Brunoy, on observe un accroissement de l'effet d'évitement en fonction de la concentration en naphthalène, qui indique la progressivité de l'effet mesuré. La provenance écologique (acidité du sol) n'explique pas les différences observées entre espèces. Par exemple *Heteromurus nitidus*, espèce intolérante à l'acidité (Ponge 1993, Salmon & Ponge 1999), fait partie des quelques espèces indifférentes au naphthalène à la plus forte concentration, alors que *Measphorura yosii*, espèce inféodée aux sols acides (Ponge 1993), montre une sensibilité très forte, en particulier la souche de Brunoy, sensible à 0,03 mg.L⁻¹. Cependant, on remarquera que, parmi les deux souches de *P. notabilis* utilisées, l'une en provenance d'un sol acide, l'autre d'un sol neutre, la première souche s'avère beaucoup moins sensible que la seconde (30 mg.L⁻¹ et 0,03 mg.L⁻¹ pour la LOEC, respectivement). La comparaison des deux souches de *F. candida* est plus délicate, car la sensibilité de la souche en provenance du sol neutre de Brunoy à la concentration de 0,03 mg.L⁻¹ (confirmée par un second essai avec une autre solution et d'autres individus) n'est pas retrouvée à des concentrations plus élevées.

Les tests de survie et de reproduction montrent des résultats contrastés, sans qu'il apparaisse une continuité réelle entre le niveau de concentration du polluant testé et l'effet produit (Tableau 9). En particulier, on notera que la concentration la plus faible utilisée (0,003 mg.L⁻¹) montre des effets inhibiteurs globalement plus importants que la concentration de 0,03 mg.L⁻¹, et que ces effets n'apparaissaient pas dans les tests d'évitement. Comme dans les tests comportementaux, *H. nitidus* s'avère indifférent au naphthalène, à la plus forte concentration (les autres concentrations n'ont pas pu être testées, par manque d'effectifs suffisants pour cette espèce). Certaines espèces sont stimulées dans leur capacité de reproduction, par rapport au témoin, y compris à la plus forte concentration: tel est le cas de *Mesaphorura floriae* (sol neutre Pechelbronn) et de *Proisotoma minima* (sol acide, Pfaffenbronn). Il faut souligner que la durée des tests (30 jours pour toutes les espèces) n'a pas permis à certaines d'entre elles de se reproduire (*H. nitidus*, *I. minor*, *P. notabilis* et *A. caecus*), les taux de reproduction les plus élevés étant toujours observés pour *F. candida*. La durée des tests de reproduction devrait donc être augmentée, et éventuellement varier selon les espèces, si l'on souhaite étendre ce type de test à d'autres représentants du groupe des Collembolés.

| Espèce | Souche | 0,003 mg.L ⁻¹ | 0,03 mg.L ⁻¹ | 0,3 mg.L ⁻¹ | 30 mg.L ⁻¹ |
|-----------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>I. nitidus</i> | SN Pechelbronn | - | - | - | 85,71 ± 24,05 |
| <i>I. candida</i> | SN Brunoy | 30,83 ± 9,24 * | 68,38 ± 9,57 * | 49,80 ± 8,11 ** | 54,55 ± 9,99 ** |
| <i>I. candida</i> | SA Pfaffenbronn | 134,68 ± 8,65 | 72,83 ± 6,69 | 155,49 ± 14,69 ** | 117,92 ± 7,28 |
| <i>I. minor</i> | SA Pfaffenbronn | 90,32 ± 14,96 | 148,39 ± 20,02 | 93,55 ± 15,64 | 51,61 ± 9,41 |
| <i>I. notabilis</i> | SA Pfaffenbronn | 28,57 ± 12,11 * | 103,57 ± 41,26 | 64,29 ± 14,51 | 117,86 ± 43,60 |
| <i>I. notabilis</i> | SN Pechelbronn | 179,17 ± 52,95 | 400,00 ± 58,71 | 79,17 ± 20,20 *** | 58,33 ± 23,20 |
| <i>I. minima</i> | SA Brunoy | 75,67 ± 5,05 ** | 69,73 ± 10,42 * | 75,67 ± 6,70 ** | 87,24 ± 2,75 ** |
| <i>I. minima</i> | SA Pfaffenbronn | 99,57 ± 5,69 | 87,01 ± 5,45 | 91,34 ± 11,46 | 130,74 ± 11,38 * |
| <i>I. floriae</i> | SN Pechelbronn | 170,21 ± 24,95 ** | 121,28 ± 18,61 | 110,64 ± 14,89 | 212,77 ± 26,49 *** |
| <i>I. macrochaeta</i> | SA Pfaffenbronn | 74,47 ± 13,87 | 80,85 ± 17,02 | 146,81 ± 19,44 | 117,02 ± 9,52 |
| <i>I. yosii</i> | SA Brunoy | 37,50 ± 3,95 *** | 123,33 ± 18,52 | 70,00 ± 13,61 | 27,50 ± 2,12 *** |
| <i>I. yosii</i> | SA Pfaffenbronn | 139,71 ± 15,94 * | 123,53 ± 12,61 | 100,00 ± 17,80 | 89,71 ± 9,70 |
| <i>I. caecus</i> | SN Brunoy | 95,65 ± 16,26 | 82,61 ± 21,08 | 21,74 ± 6,87 ** | 82,61 ± 8,14 |

Tableau 9. Tests de reproduction et de survie portant sur plusieurs espèces de Collembolles mises en présence de naphthalène à des concentrations variées pendant 30 jours (10 individus dans chaque boîte, 5 répétitions). Les valeurs indiquées sont les moyennes des pourcentages par rapport au témoin, suivies de leur erreur-type. Les valeurs sur fond coloré correspondent à des effectifs différant significativement du témoin (test t non païré, au seuil de 5%)

Impact de l'activité faunique (*Folsomia candida*) sur la microflore naturelle et le niveau de pollution d'un sol pollué par les hydrocarbures

Il s'agit du sol C, dont les principales caractéristiques physico-chimiques figurent dans le Tableau 6. Les 16 HAPs de la liste EPA ont été dosés en début et en fin d'expérience sur le sol dilué à 1% dans son sol témoin. Les résultats figurent dans le Tableau 10.

| | Départ | T + 2 mois (sans faune) | T + 2 mois (avec faune) |
|-----------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|
| Naphthalène | 0,33 ± 0,02 b | 0,39 ± 0,01 ab | 0,46 ± 0,05 a |
| Acénaphthylène | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 |
| Acénaphthène | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 |
| Fluorène | 0,20 ± 0,01 a | 0,10 ± 0,01 b | 0,11 ± 0,01 b |
| Phénanthrène | 1,07 ± 0,03 a | 0,49 ± 0,05 b | 0,48 ± 0,03 b |
| Anthracène | 0,55 ± 0,02 a | 0,13 ± 0,01 b | 0,24 ± 0,11 ab |
| Fluoranthène | 3,48 ± 0,19 a | 0,90 ± 0,09 b | 0,94 ± 0,07 b |
| Pyrène | 1,88 ± 0,11 a | 0,59 ± 0,06 b | 0,61 ± 0,05 b |
| Benzo(a)anthracène | 0,74 ± 0,05 a | 0,46 ± 0,04 b | 0,45 ± 0,03 b |
| Chrysène | 0,67 ± 0,04 a | 0,43 ± 0,04 b | 0,41 ± 0,03 b |
| Benzo(b)fluoranthène | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 |
| Benzo(k)fluoranthène | 0,24 ± 0,01 | 0,22 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 |
| Benzo(a)pyrène | 0,48 ± 0,03 a | 0,39 ± 0,04 ab | 0,37 ± 0,02 b |
| Dibenzo(ah)anthracène | 0,07 ± 0,00 b | 0,26 ± 0,01 a | 0,25 ± 0,01 a |
| Benzo(ghi)pérylène | 0,32 ± 0,01 b | 0,40 ± 0,03 a | 0,38 ± 0,01 a |
| Indéno(123-cd)pyrène | 0,32 ± 0,02 a | 0,28 ± 0,03 ab | 0,27 ± 0,01 b |
| Σ16 HAPs | 10,39 ± 0,55 a | 5,07 ± 0,43 b | 5,21 ± 0,43 b |

Tableau 10. Dosage des 16 HAPs de la liste EPA dans le sol de cokerie (sol C) utilisé dans l'expérience portant sur l'action conjuguée de la faune et de la microflore. Les moyennes (mg.kg⁻¹) sont suivies de leur erreur-type (5 répétitions). Les dosages ont été réalisés dans 5 boîtes indépendantes, avant et après l'expérience (2 mois), ce ne sont donc pas des mesures répétées sur le même échantillon. Les groupes homogènes (test de Mann-Whitney) sont indiqués par des lettres

On constate que la quantité d'HAPs extractibles a diminué de moitié au cours de l'expérience, que l'on soit ou non en présence de *F. candida*. La plupart des molécules ont diminué en quantité, en particulier les trois dominantes, fluoranthène, pyrène et phénanthrène, cependant on notera que les quantités de dibenzo(ah)anthracène et de benzo(ghi)pérylène, ainsi que, dans une moindre mesure,

de naphthalène, ont augmenté. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les boîtes avec et sans faune ajoutée.

Le Tableau 11 montre les résultats relatifs à la microflore bactérienne et fongique et à la microflore dégradant les principaux HAPs. On constate que le nombre de bactéries et surtout de champignons a diminué au cours des deux mois de l'expérience, que l'on soit en présence ou en absence de la faune. Cette baisse a affecté la microflore dégradant le phénanthrène et le fluorène. Au contraire, les germes dégradant le pyrène, le deuxième HAP extractible en termes de concentration dans le sol C, ont vu leurs effectifs centupler. Ces résultats peuvent expliquer la baisse de concentration en pyrène observée au cours de l'expérience (Tableau 10), mais ils n'expliquent pas la baisse observée en ce qui concerne le fluorène, fluoranthène, le phénanthrène et l'anthracène.

| | Départ | T + 2 mois (sans faune) | T + 2 mois (avec faune) |
|------------------------------|--|--|---|
| Bactéries | $8,32 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$ a | $4,43 \cdot 10^7 \pm 0,4 \cdot 10^7$ b | $3,26 \cdot 10^7 \pm 0,6 \cdot 10^7$ b |
| Champignons | $2,38 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ a | $0,68 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^6$ b | $0,66 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^6$ b |
| Microflore dégradante | | | |
| Naphthalène | $3,90 \cdot 10^7 \pm 0,6 \cdot 10^7$ | | $3,68 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^7$ |
| Phénanthrène | $6,60 \cdot 10^6 \pm 0,7 \cdot 10^6$ a | $2,89 \cdot 10^6 \pm 0,7 \cdot 10^6$ b | $3,35 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$ ab |
| Fluorène | $9,80 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^4$ a | $0,90 \cdot 10^4 \pm 0,1 \cdot 10^4$ b | $0,90 \cdot 10^4 \pm 0,1 \cdot 10^4$ b |
| Fluoranthène | $9,86 \cdot 10^4 \pm 2,8 \cdot 10^4$ | $9,00 \cdot 10^4 \pm 1,3 \cdot 10^4$ | $8,17 \cdot 10^4 \pm 2,7 \cdot 10^4$ |
| Pyrène | $9,00 \cdot 10^3 \pm 1,3 \cdot 10^3$ b | $1,97 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^6$ a | $1,03 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ a |
| Anthracène | $1,41 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^6$ | $1,63 \cdot 10^6 \pm 0,4 \cdot 10^6$ | $1,02 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6$ |

Tableau 11. Numération de la microflore bactérienne, fongique et dégradante. Les moyennes de 5 répétitions (5 boîtes indépendantes) sont figurées, accompagnées de leur erreur-type. Les lettres indiquent des groupes homogènes (tests de Mann-Whitney)

Un test comportemental a été réalisé en fin d'expérience, et comparé aux résultats obtenus en l'absence d'incubation (Figs. 24 et 26). Les résultats de ces tests figurent au Tableau 12. Le test comportemental en fin d'expérience a été répété une seconde fois, en raison du caractère surprenant du résultat obtenu.

| | Départ | T + 2 mois (sans faune) | T + 2 mois (avec faune) |
|---------------|--------|-------------------------|-------------------------|
| Test 1 | 15 *** | 74 *** | 38 N.S. |
| Test 2 | | 88 *** | 58 N.S. |

Tableau 12. Test comportemental en fin d'expérience. Pourcentages de présence de *Folsomia candida* du côté du sol pollué, par comparaison avec le sol témoin (20 répétitions, test t pairé). *** = $P < 0,001$; N.S. = non significatif. Deux tests successifs ont été effectués en fin d'expérience

On constate que, si l'effet répulsif du sol C a bien disparu après deux mois d'incubation en présence de sa microflore naturelle, que la faune soit présente ou non, un effet attractif est apparu, mais uniquement en absence de la faune. Ce résultat, bien que confirmé avec un autre lot de sol et d'autres animaux, est doublement surprenant, car on pouvait s'attendre, d'une part à un effet stimulant de la faune sur la capacité de la microflore à dégrader les HAPs, d'autre part à un effet attractif du sol ayant été en contact pendant deux mois avec des animaux, en raison de l'accumulation probable de phéromones d'attraction déposées par les Collembolles adultes (Verhoef et al. 1977). Des composés attractifs (probablement des dérivés du pyrène, étant donné le développement important de la microflore dégradant cet HAP) sont donc apparus à l'occasion de l'atténuation naturelle de la pollution du sol C, mais pas en présence de *F. candida*. Un examen approfondi de la littérature portant sur les dérivés du pyrène et leur possible métabolisation ou fixation par *F. candida* est nécessaire, pour tenter de trouver une explication plausible à ce phénomène.

Le sol C, en fin d'expérience, a également été testé pour sa capacité à assurer une croissance et une reproduction normales des populations de *F. candida*. Que le sol C ait été en présence ou non de la faune pendant les deux mois de l'expérience, il permet une croissance normale des populations de *F. candida*. On observe, au bout d'un mois d'élevage sur le substrat récupéré en fin d'expérience, respectivement $9,1 \pm 0,4$ et $9,3 \pm 0,3$ individus en moyenne par femelle introduite. Ces deux chiffres ne diffèrent pas entre eux significativement (10 répétitions, test t non pairé, $P = 0,36$).

Si cette expérience a montré un effet atténuateur certain de la microflore (Tableau 10), aucune réduction de la quantité de HAPs et aucune stimulation de la microflore, totale ou dégradante, n'a été mise en évidence sous l'action de *F. candida*.

On peut rapprocher les résultats obtenus, montrant que l'effet répulsif du sol C disparaît au bout de plusieurs mois d'incubation avec sa microflore naturelle, des tests comportementaux effectués avec le sol C au bout de 6 mois d'une expérience pilote menée par le CNRSSP. Il s'agit d'une méthode de dépollution par la microflore naturelle, par mise en andain du sol pollué pendant 6 mois. Le sol C, après 6 mois d'atténuation naturelle en andain, montre une perte notable de sa nocivité environnementale de départ, si l'on se base sur le caractère indicateur du comportement de répulsion de *F. candida* (Figure 28).

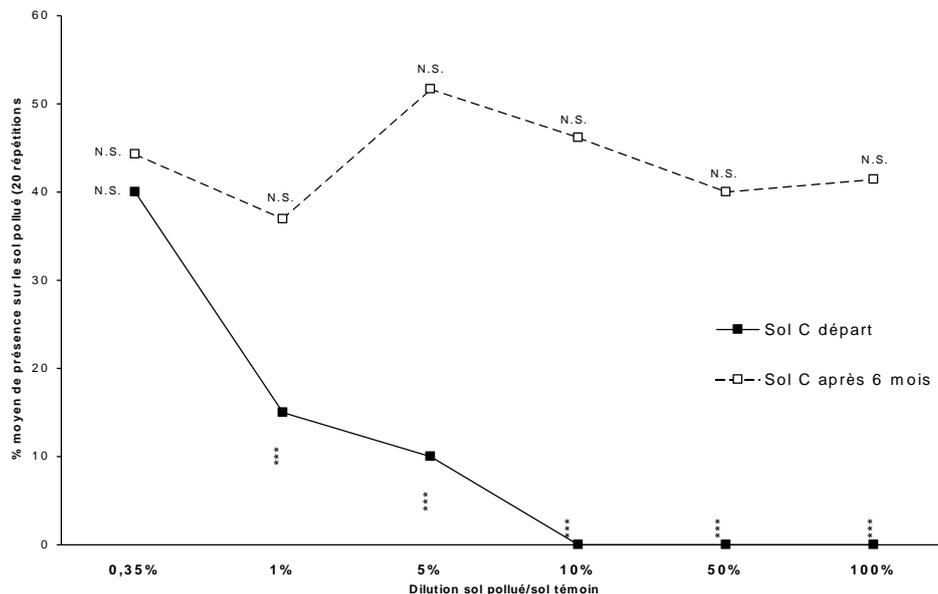


Figure 28. Test comportemental utilisant *F. candida* sur le sol C, au départ et après 6 mois de mise en andain (expérience pilote CNRSSP). Le côté renfermant le sol pollué, à six dilutions successives, est comparé au côté renfermant le sol témoin (test t pairé, 20 répétitions)

Au bout de 6 mois d'atténuation naturelle de la pollution, le sol C a perdu totalement, quelle que soit la dilution, son pouvoir répulsif vis-à-vis de *F. candida*.

5. DISCUSSION

L'étude du fonctionnement d'un écosystème contaminé par des composés organiques persistants a mis en évidence un impact de la pollution sur la composition du peuplement de Collemboles et plus généralement sur le fonctionnement de l'écosystème.

Sur la **station polluée**, l'analyse micromorphologique met en évidence une faible dégradation de la matière organique (hémimoder), basée essentiellement sur l'activité de la microflore fongique et des enchytréides. L'activité bactérienne serait réduite voire inhibée sur cette station par la présence du polluant, ainsi que l'activité des pourritures blanches qui semblent absentes de ce site ou en tout cas fortement inhibées (absence de blanchiment du matériel foliaire).

L'humification sur cette station est plus ou moins bloquée, l'acidité d'échange y est plus faible que sur la station témoin, cependant l'activité de la faune a pu être mise en évidence, notamment au travers de l'observation d'un nombre important de boulettes fécales d'enchytréides et d'une fragmentation de la matière organique. L'observation de bitume dans les déjections de ces animaux indique une consommation d'hydrocarbures lourds par la faune.

La pollution du sol par les hydrocarbures modifie la composition et la richesse du peuplement de Collemboles. Sur la station polluée la diminution du nombre d'espèces met en évidence la toxicité du milieu pour les espèces les plus sensibles. Cependant quelques espèces, en nombre réduit, ont été favorisées par la présence du polluant, observation renforcée par une équitabilité plus faible sur la station polluée. Le développement d'une espèce en particulier, ici *Proisotoma minuta*, sur un site pollué, est un phénomène ayant déjà été observé lors d'une étude menée sur un site pollué par des micro-polluants métalliques (Gillet & Ponge 2002). Dans cette dernière étude *Mesaphorura macrochaeta* était de loin l'espèce la plus abondante sur la station fortement contaminée. En disparaissant, les espèces les plus sensibles à la pollution libèrent une niche écologique par conséquent disponible pour les espèces tolérantes. De plus, l'augmentation du nombre d'habitats potentiels et l'augmentation de la quantité de nourriture disponible résultant de l'accumulation de matière organique favorisent le développement de *Proisotoma minuta*, observée en grand nombre dans les composts à base de boues de stations d'épuration (observations personnelles JF PONGE).

Sur la **station témoin**, la dégradation très rapide de la matière organique serait basée sur l'activité de la microflore bactérienne, étant donnée l'absence d'un réseau de mycélium développé dans le sol. Cependant le recyclage rapide de la matière organique sur ce site ne permet pas de mettre en évidence la présence ou l'absence de pourritures blanches.

Sur cette station, le recyclage de la matière organique est rapide. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une importante activité d'incorporation par les vers de terre et la présence d'un peuplement de Collemboles plus diversifié que sur la station polluée. L'étude du pH du sol a permis de mettre en évidence la présence d'un complexe absorbant plus développé sur ce site, la présence d'un plus grand nombre d'accepteurs de protons et donc une humification plus poussée de la matière organique.

Les observations des contenus intestinaux des Collemboles récoltés sur ces deux stations confirment l'existence d'un fonctionnement totalement différent du compartiment microbien, la microflore bactérienne étant plus abondante dans la station témoin, la station polluée étant caractérisée par l'abondance des champignons.

La **colonisation d'un site pollué par des organismes acidophiles**, censés être plus tolérants vis-à-vis de la pollution, s'avère cependant impossible, comme nos expériences d'inoculation sur le terrain et au laboratoire l'ont montré. Les études menées par ailleurs sur la pollution par les métaux lourds (Gillet & Ponge 2004, Garnier & Ponge 2004) aboutissent aux mêmes conclusions. Une réflexion s'avère indispensable sur les effets du niveau d'acidité du sol par rapport au processus d'adaptation aux polluants. Cependant, il faut remarquer que les essais écotoxicologiques menés sur un éventail d'espèces de Collemboles ne montrent pas non plus une relation entre le niveau d'acidité du sol d'origine et la capacité des espèces à tolérer la pollution par les hydrocarbures.

Les résultats les plus marquants de la présente étude concernent l'intérêt des **tests comportementaux** utilisant des animaux du sol pour quantifier les risques environnementaux causés

par la présence d'un polluant dans le sol. L'attraction, la répulsion ou l'indifférence vis-à-vis d'un composé potentiellement toxique peut s'avérer décisive pour la survie des espèces, comme l'on montré les travaux expérimentaux de Tranvik & Eijsackers (1989). Une espèce capable de détecter à distance une substance potentiellement toxique va pouvoir (par un simple jeu probabiliste) se mettre hors de portée (et donc de toxicité) du polluant. Ce faisant, elle va abandonner localement le site, créant ainsi des taches d'où est exclu le fonctionnement normal des réseaux trophiques du sol. Lorsque ce phénomène frappe des organismes tels que les vers de terre, dont l'évitement des polluants a pu être démontré par ailleurs (Hund-Rinke et al. 2003), les réactions d'évitement peuvent conduire à la disparition locale de fonctions importantes telles que l'incorporation de la matière organique à la matière minérale ou la formation d'agrégats stables, modifiant ainsi durablement le reste de l'écosystème (Lavelle 1997, Ponge 2003). Lorsqu'il touche des groupes tels que les Collemboles, dont le rôle régulateur de la microflore est connu (Newell et al. 1987), malgré nos résultats négatifs à ce sujet, les conséquences portent sur l'équilibre des populations microbiennes, en particulier le contrôle des agents pathogènes (Ponge & Charpentier 1981, Klironomos & Kendrick 1995).

Comme dans toute expérimentation au laboratoire, se pose le problème de **l'application au terrain**, notamment en matière de risques environnementaux. Les tests multiples utilisant un éventail d'espèces de Collemboles ont montré une grande variété de sensibilités au sein du groupe des Collemboles. *Folsomia candida*, comme *Heteromurus nitidus* (deux espèces sur lesquelles un grand nombre de travaux de laboratoire ont été réalisés), s'avèrent peu voire pas du tout sensibles au naphthalène, alors que de nombreuses autres espèces le sont. Parmi celles-ci, le cas de *Paristoma notabilis*, *Isotomiella minor* et *Mesaphorura macrochaeta* mérite d'être signalé car ces trois espèces, toutes trois fuyant le naphthalène à la concentration de 0,3 mg.L⁻¹, constituent le groupe majeur de tous les peuplements de Collemboles en climat tempéré, quel que soit le type de sol (Ponge 2003). Parmi celles-ci, *Mesaphorura macrochaeta* pourrait être sélectionnée pour des tests de routine plus représentatifs des Collemboles, en raison de la facilité particulière de son élevage conjuguée à sa forte représentativité, bien meilleure que *Folsomia candida*, espèce pratiquement absente des sols naturels.

6. PERSPECTIVES

Au-delà du présent contrat, les résultats obtenus laissent penser qu'une normalisation des tests comportementaux utilisant les Collemboles pourrait être entreprise. Une publication en cours (Martínez Aldaya et al., soumis) fait le point sur la signification écologique des tests comportementaux utilisant des animaux du sol, en se basant sur les résultats acquis au cours du présent projet. Une telle opération nécessite le concours de plusieurs laboratoires travaillant dans des conditions identiques, sous le contrôle de l'Agence Française de Normalisation. Yves CROUAU (Université de Toulouse) pourrait être contacté à ce sujet, ainsi que Jérôme CORTET (Université d'Aix-Marseille).

Au-delà de l'aspect technique représenté par la mise au point de nouveaux tests, la présente étude a mis le doigt sur un certain nombre de phénomènes inattendus, qui pourraient faire l'objet de développements dans les années à venir. Le problème de l'adaptation des espèces, voire des populations, aux polluants, en particulier aux polluants organiques, est posé. Des variations géographiques dans le comportement de certaines espèces "banales" (*Folsomia candida*, *Paristoma notabilis*) indiquent une plasticité génétique très grande au sein des espèces. Cela recoupe les connaissances acquises sur l'adaptation des Collemboles à la pollution par les métaux lourds, notamment les travaux de Posthuma (1990). Cette variation est à relier à l'existence de la parthénogénèse, très commune chez beaucoup de Collemboles, qui maintient un taux élevé de diversité phénotypique au sein des populations, mais tend à isoler celles-ci face à une forte pression de sélection, telle qu'on peut l'observer dans les sites pollués.

Enfin, si l'introduction d'espèces acidophiles pour reconstituer la biodiversité dans les sites pollués doit être abandonnée, il n'en reste pas moins que l'on connaît très peu de choses de la capacité des organismes du sol à s'accommoder (ou s'acclimater) face à des conditions particulières, telles que la pollution ou l'acidification des sols. Les tests écotoxicologiques, basés sur des organismes maintenus en élevage en conditions "optimales", de même que les expériences d'introduction brutale dans des écosystèmes entièrement nouveaux, ne permettent pas l'expression des capacités naturelles d'accommodation des organismes. Des expériences comparatives sur des animaux naïfs et non naïfs, ainsi que des essais d'habituation à des conditions progressivement changeantes, devraient permettre d'établir la gamme de conditions environnementales que des populations naturelles peuvent subir sans avoir nécessairement recours à la sélection ou à la recombinaison génétique. Ces deux dernières stratégies sont toutes deux coûteuses écologiquement puisque faisant appel à l'effort de reproduction et à une forte mortalité au sein des populations. On peut suspecter qu'un groupe très ancien tel que les Collemboles (Ponge 2000b) a inscrit dans son patrimoine génétique de nombreuses crises écologiques "majeures" qu'il a pu surmonter jusqu'à aujourd'hui. Des recherches de ce type s'inscrivent également dans l'avenir de notre équipe CNRS (UMR 5176) qui va s'orienter, lors de son prochain renouvellement, vers un regroupement autour du problème de l'adaptation.

7. RÉFÉRENCES

- BALASHOVA (N.V.), KOSHELEVA (I.A.), GOLOVCHENKO (N.P.) & BORONIN (A.M.), 1999. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia*. *Process Biochemistry* 35: 291-296.
- BERNIER (N.) & PONGE (J.F.), 1994. Humus form dynamics during the sylvogenetic cycle in a mountain spruce forest. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 183-220.
- BLAKELY (J.K.), NEHER (D.A.) & SPONGBERG (A.L.), 2002. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Applied Soil Ecology* 21: 71-88.
- BOITAUD (L.), 2004. Un test comportemental mis en place sur plusieurs espèces de collemboles pour mieux évaluer la toxicité des polluants organiques dans les sols. Mémoire de fin d'études, École Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux, 32 pp.
- BOUCHÉ (M.B.), 1972. Lombriciens de France. Écologie et systématique. INRA, Paris.
- BOURLETTE (C.), 2004. Emploi de *Folsomia candida* (Hexapode: Collembole) pour la mise au point d'un test comportemental d'écotoxicité des sols. Mémoire de maîtrise, Université Pierre-et-Marie Curie, Paris, 31 pp.
- BRETFELD (G.), 1999. Synopses on Palaearctic Collembola. II. Symphypleona. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz* 71: 1-318.
- BRÊTHES (A.), BRUN (J.J.), JABIOL (B.), PONGE (J.F.) & TOUTAIN (F.), 1995. Classification of forest humus forms: a French proposal. *Annales des Sciences Forestières* 52: 535-546.
- CARLSTROM (C.J.) & TUOVINEN (O.H.), 2003. Mineralization of phenanthrene and fluoranthene in yardwaste compost. *Environmental Pollution* 124: 81-91.
- CHENON (P.), ROUSSET (A.) & CROUAU (Y.), 2000. Genetic polymorphism in nine clones of a parthenogenetic collembolan used in ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology* 14: 103-110.
- CHAUVAT (M.) & PONGE (J.F.), 2002. Colonization of heavy metal-polluted soils by collembola: preliminary experiments in compartmented boxes. *Applied Soil Ecology* 21: 91-106.
- CORTET (J.), GOMOT-DE VAUFLERY (A.), POINSOT-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.
- CROUAU (Y.), CHENON (P.) & GISCLARD (C.), 1999. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Applied Soil Ecology* 12: 103-111.
- FANG (C.), RADOSEVICH (M.) & FUHRMANN (J.J.), 2001. Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 671-678.
- FOUNTAIN (M.T.) & HOPKIN (S.P.), 2005. *Folsomia candida* (Collembola): a "standard" soil arthropod. *Annual Review of Entomology* 50: 201-222.
- FRAK (E.) & PONGE (J.F.), 2002. The influence of altitude on the distribution of subterranean organs and humus components in *Vaccinium myrtillus* carpets. *Journal of Vegetation Science* 13: 17-26.
- GARNIER (S.) & PONGE (J.F.), 2004. Acid-tolerant Collembola cannot colonize metal-polluted soils at neutral pH. *Applied Soil Ecology* 26: 201-208.

- GASS (F.), 2004. Réactions de la faune du sol à l'épandage d'hydrocarbures. Mémoire de maîtrise, Université Pierre-et-Marie Curie, Paris, 29 pp.
- GILLET (S.) & PONGE (J.F.), 2002. Humus forms and metal pollution in soil. *European Journal of Soil Science* 53: 529-539.
- GILLET (S.) & PONGE (J.F.), 2003. Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution. *Applied Soil Ecology* 22: 127-138.
- GILLET (S.) & PONGE (J.F.), 2004. Are acid-tolerant Collembola able to colonise metal-polluted soil? *Applied Soil Ecology* 26: 219-231.
- GILLET (S.), & PONGE (J.F.), soumis. The accumulation of organic matter over an old tar deposit.
- GILLET (S.), & PONGE (J.F.), soumis. Species assemblages and diets of Collembola in the organic matter accumulated over an old tar deposit.
- GISIN (H.), 1960. Collembolenfauna Europas. Museum d'Histoire Naturelle, Genève.
- GRUNDY (M.M.), RATCLIFFE (N.A.) & MOORE (M.N.), 1996. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 42: 187-190.
- HUND-RINKE (K.), ACHAZI (R.), RÖMBKE (J.) & WARNECKE (D.), 2003. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: results of a laboratory comparison test. *Journal of Soils and Sediments* 3: 7-12.
- KÄCKER (T.), HAUPT (E.T.K.), GARMS (C.), FRANCKE (W.) & STEINHART (H.), 2002. Structural characterisation of humic acid-bound PAH residues in soil by ¹³C-CPMAS-NMR-spectroscopy: evidence of covalent bonds. *Chemosphere* 48: 117-131.
- KLIRONOMOS (J.N.) & KENDRICK (B.), 1995. Relationships among microarthropods, fungi, and their environment. *Plant & Soil* 170: 183-197.
- KOTTLER (B.D.), WHITE (J.C.) & KELSEY (J.W.), 2001. Influence of soil moisture on the sequestration of organic compounds in soil. *Chemosphere* 42: 893-898.
- LAVELLE (P.), 1997. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research* 27: 93-132.
- LISOWSKA (K.) & DŁUGOŃSKI (J.), 2003. Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 85: 63-69.
- LLOYD-JONES (G.), LAURIE (A.D.), HUNTER (D.W.F.) & FRASER (R.), 1999. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiology Letters* 29: 69-79.
- LORANGER (G.), PONGE (J.F.) & LAVELLE (P.), 2003. Humus forms in two secondary semi-evergreen tropical forests. *European Journal of Soil Science* 54: 17-24.
- LU (X.), REIBLE (D.D.), FLEEGER (J.W.) & CHAI (Y.), 2003. Bioavailability of desorption-resistant phenanthrene to the oligochaete *Ilyodrilus templetoni*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 153-160.
- MARTÍNEZ ALDAYA (M.), LORS (C.), SALMON (S.) & PONGE (J.F.), soumis. Avoidance bio-assays may help to test the ecological significance of soil pollution.
- MILES (R.A.) & DOUCETTE (W.J.), 2001. Assessing the aerobic biodegradability of 14 hydrocarbons in two soils using a simple microcosm/respiration method. *Chemosphere* 45: 1085-1090.

- NAM (K.) & KIM (J.Y.), 2002. Role of loosely bound humic substances and humin in the bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environmental Pollution* 118: 427-433.
- NEWELL (K.), FRANKLAND (J.C.) & WHITTAKER (J.B.), 1987. Effects on microflora of using naphthalene or X-rays to reduce arthropod populations in the field. *Biology & Fertility of Soils* 3: 11-13.
- PELTIER (A.), PONGE (J.F.), JORDANA (R.) & ARIÑO (A.), 2001. Humus forms in mediterranean scrublands with aleppo pine. *Soil Science Society of America Journal* 65: 884-896.
- PIRHONEN (R.) & HUHTA (V.), 1984. Petroleum fractions in soil: effects on populations of Nematoda, Enchytraeidae and Microarthropoda. *Soil Biology & Biochemistry* 16: 347-350.
- PONGE (J.F.), 1980. Les biocénoses des collemboles de la forêt de Sénart. In: *Actualités d'écologie forestière*, ed. P. PESSON. Gauthier-Villars, Paris, pp. 151-176.
- PONGE (J.F.), 1991. Succession of fungi and fauna during decomposition of needles in a small area of Scots pine litter. *Plant and Soil* 138: 99-113.
- PONGE (J.F.), 1993. Biocenoses of Collembola in atlantic grass-woodland ecosystems. *Pedobiologia* 37: 223-244.
- PONGE (J.F.), 1999. Horizons and humus forms in beech forests of the Belgian Ardennes. *Soil Science Society of America Journal* 63: 1888-1901.
- PONGE (J.F.), 2000a. Vertical distribution of Collembola (Hexapoda) and their food resources in organic horizons of beech forests. *Biology & Fertility of Soils* 32: 508-522.
- PONGE (J.F.), 2000b. Acidophilic Collembola: living fossils? *Contributions from the Biological Laboratory, Kyoto University* 29: 65-74.
- PONGE (J.F.), 2003. Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 935-945.
- PONGE (J.F.), ARPIN (P.), SONDAG (F.) & DELECOUR (F.), 1997. Soil fauna and site assessment in beech stands of the Belgian Ardennes. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 2053-2064.
- PONGE (J.F.), BANDYOPADHYAYA (I.) & MARCHETTI (V.), 2002a. Interaction between humus form and herbicide toxicity to Collembola (Hexapoda). *Applied Soil Ecology* 20: 239-253.
- PONGE (J.F.) & CHARPENTIER (M.J.), 1981. Étude des relations microflore-microfaune: expériences sur *Pseudosinella alba* (Packard), Collemboles mycophage. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol* 18: 291-303.
- PONGE (J.F.), CHEVALIER (R.) & LOUSSOT (P.), 2002b. Humus Index: an integrated pool for the assessment of forest floor and topsoil properties. *Soil Science Society of America Journal* 66: 1996-2001.
- PONGE (J.F.), GILLET (S.), DUBS (F.), FEDOROFF (E.), HAESE (L.), SOUSA (J.P.) & LAVELLE (P.), 2003. Collembolan communities as bioindicators of land use intensification. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 813-826.
- POSTHUMA (L.), 1990. Genetic differentiation between populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from heavy metal contaminated sites. *Journal of Applied Ecology* 27: 609-622.
- POTAPOW (M.), 2001. Synopses on Palaearctic Collembola. III. Isotomidae. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz* 73: 1-603.

- SADAKA (N.) & PONGE (J.F.), 2003. Climatic effects on soil trophic networks and the resulting humus profiles in holm oak (*Quercus rotundifolia*) forests in the High Atlas of Morocco as revealed by correspondence analysis. *European Journal of Soil Science* 54: 767-777.
- SADAKA-LAULAN (N.), PONGE (J.F.), ROQUEBERT (M.F.), BURY (E.) & BOUMEZZOUGH (A.), 1998. Feeding preferences of the Collembolan *Onychiurus sinensis* for fungi colonizing holm oak litter (*Quercus rotundifolia* Lam.). *European Journal of Soil Biology* 34: 179-188.
- SALMON (S.) & PONGE (J.F.), 1998. Responses to light in a soil-dwelling springtail. *European Journal of Soil Biology* 34: 199-201.
- SALMON (S.) & PONGE (J.F.), 1999. Distribution of *Heteromurus nitidus* (Hexapoda, Collembola) according to soil acidity: interactions with earthworms and predator pressure. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 1161-1170.
- SALMON (S.) & PONGE (J.F.), 2001. Earthworm excreta attract soil springtails: laboratory experiments on *Heteromurus nitidus* (Collembola: Entomobryidae). *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1959-1969.
- SCHIRMER (K.), DIXON (D.G.), GREENBERG (B.M.) & BOLS (N.C.), 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 127: 129-141.
- SMITH (M.J.), LETHBRIDGE (G.) & BURNS (R.G.), 1999. Fate of phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene during biodegradation of crude oil added to two soils. *FEMS Microbiology Letters* 173: 445-452.
- SOKAL (R.R.) & ROHLF (F.J.), 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* Freeman, New York.
- THENG (B.K.G.), AISLABIE (J.) & FRASER (R.), 2001. Bioavailability of phenanthrene intercalated into an alkylammonium-montmorillonite clay. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 845-848.
- TOPOLIANTZ (S.), PONGE (J.F.) & VIAUX (P.), 2000. Earthworm and enchytraeid activity under different arable farming systems, as exemplified by biogenic structures. *Plant and Soil* 225: 39-51.
- TOREN (A.), GEFEN (Y.), RON (E.) & ROSENBERG (E.), 2003. Solubilization of phenanthrene by recombinant protein bioemulsans. *Biochemical Engineering Journal* 3731: 1-6.
- TRANVIK (L.) & EIJSACKERS (H.), 1989. On the advantage of *Folsomia fimetarioides* over *Isotomiella minor* (Collembola) in a metal polluted soil. *Oecologia* 80: 195-200.
- VAÇULIK (A.), KOUNDA-KIKI (C.), SARTHOU (C.) & PONGE (J.F.), 2003. Soil invertebrate activity in biological crusts on tropical inselbergs. *European Journal of Soil Science* 55 (sous presse).
- VAN BRUMMELEN (T.C.), VAN HATTUM (B.), CROMMENTUIJN (T.) & KALF (D.F.), 1998. Bioavailability and ecotoxicity of PAHs. In: *The handbook of environmental chemistry, Vol. 3, Part J*, ed. A.H. Neilson. Springer, Berlin, pp. 203-263.
- VERHOEF (H.A.), NAGELKERKE (C.J.) & JOOSSE (E.N.G.), 1977. Aggregation pheromones in Collembola. *Journal of Insect Physiology* 23: 1009-1013.
- VERSCHUEREN (K.), 2001. *Handbook of environmental data on organic chemicals.* John Wiley & Sons, New York.
- XING (B.), 2001. Sorption of naphthalene and phenanthrene by soil humic acids. *Environmental Pollution* 111: 303-309.
- ZIMDARS (B.) & DUNGER (W.), 1994. Synopses on Palaearctic Collembola. I. Tullbergiinae. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz* 68: 1-70.