VALIDATION DU RHIZOTEST PAR UN TEST INTERLABORATOIRE INTERNATIONAL EN VUE DE SA NORMALISATION

Rapport Final

RHIZOTEST VALIDATION THROUGH AN INTERNATIONAL RING-TEST IN THE SCOPE OF STANDARDISATION

Final Report

11 décembre 2012

Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par le CIRAD, UPR Recyclage et risque – Matthieu Bravin, Laure Lemal, Patrick Cazevieille, Claire Chevassus-Rosset, Jean-Luc Marger, Mélanie Montes et Emmanuel Doelsch – (Contrat n° 1172C0042)

COORDINATION TECHNIQUE : Cécile Grand, Direction exécutive Programmes – Direction Villes et Territoire Durables – Service Friches Urbaines et Sites Pollués – ADEME (Angers)

Nous tenons à remercier les personnes ayant contribué à cette étude :

Jean-Charles Bergen, Christelle Dere et Gilles Colinet – Université de Liège, Belgique ;

Tanja Mimmo – Free University of Bolzano, Italie ;
Nicola Tomasi – University of Udine, Italie ;

Silvia Bass, Elke Reich et Franck Riepert – Institute for Ecological Chemistry, plant Analysis and Stored Product Protection, Allemagne ;

Barbara Heiner et Eva Oburger – University of Natural Resources and Life Sciences, Autriche ;

Didier Arnal et Philippe Hinsinger – INRA, UMR Eco&Sols ;

Yves Barthel – EUROFINS Environnement ;

Pascal Pandard – INERIS ;

Camille Dumat – INPT, UMR EcoLab ;

Hervé Saint Macary – CIRAD, UPR Recyclage et risque.

Nous tenons à remercier l'agence nationale de la recherche (ANR) pour le financement du projet NormaRHIZO (ANR-09-CESA-01), correspondant à la contre-partie à la présente convention RHIZOlab pour le financement du test interlaboratoire.

L'ADEME en bref
L'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) est un établissement public sous la tutelle conjointe du ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement durables, et du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Elle participe à la mise en oeuvre des politiques publiques dans les domaines de l'environnement, de l'énergie et du développement durable. L'agence met ses capacités d'expertise et de conseil à disposition des entreprises, des collectivités locales, des pouvoirs publics et du grand public et les aide à financer des projets dans cinq domaines (la gestion des déchets, la préservation des sols, l'efficacité énergétique et les énergies renouvelables, la qualité de l'air et la lutte contre le bruit) et à progresser dans leurs démarches de développement durable.

www.ademe.fr

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite selon le Code de la propriété intellectuelle (art. L 122-4) et constitue une contrefaçon réprimée par le Code pénal. Seules sont autorisées (art. 122-5) les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé de copiste et non destinées à une utilisation collective, ainsi que les analyses et courtes citations justifiées par la caractère critique, pédagogique ou d'information de l'œuvre à laquelle elles sont incorporées, sous réserve, toutefois, du respect des dispositions des articles L 122-10 à L 122-12 du même Code, relatives à la reproduction par reprographie.

Sommaire

1. Introduction 1

2. Sélection des participants au test interlaboratoire 2

3. Formations à l'outil et à la méthodologie RHIZOtest 3

4. Expérimentations en RHIZOtest 3

4.1. Matériel et Méthode 3

4.1.1. Principe du RHIZOtest 3

4.1.2. Expérimentation du test interlaboratoire 4

4.1.3. Détermination analytique des flux de prélèvements d'éléments traces par les plantes 5

4.1.4. Analyses statistiques et calcul de la variabilité inter-laboratoire 5

4.2. Résultats et discussion 6

4.2.1. Accidents de culture 6

4.2.2. Biomasses 6

4.2.3. Flux de prélèvement des éléments traces par les plantes 9

4.3. Conclusion 15

5. Perspectives de valorisation 15

6. Bibliographie 16

Liste des illustrations

Fig. 1. *Etapes de réalisation du test interlaboratoire du RHIZOtest* *2*

Fig. 2. *Procédure expérimentale du RHIZOtest en deux étapes (préculture et culture test)* *4*

Fig. 3. *Biomasses des parties aériennes et racinaires du chou (a et b), de la fétuque (c et d) et de la tomate (e et f) mesurées sur les plantes témoins à l'issue de la préculture et les plantes cultivées sur quatre sols et récoltées à l'issue de la culture test* *7*

Fig. 4. *Valeur absolue des Z-scores des biomasses des parties aériennes (a) et racinaires (b) du chou, de la fétuque et de la tomate mesurées sur les plantes témoins à l'issue de la préculture* *7*

Fig. 5. *Valeur absolue des Z-scores des biomasses des parties aériennes et racinaires du chou (a et b), de la fétuque (c et d) et de la tomate (e et f) mesurées sur les plantes cultivées sur quatre sols et récoltées à l'issue de la culture test* *8*

Fig. 6. *Flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par le chou cultivé sur quatre sols au cours de la culture test* *9*

Fig. 7. *Flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la fétuque cultivée sur quatre sols au cours de la culture test* *10*

Fig. 8. *Flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la tomate cultivée sur quatre sols au cours de la culture test* *11*

Fig. 9. *Valeur absolue des Z-scores des flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par le chou cultivé sur quatre sols au cours de la culture test* *12*

Fig. 10. *Valeur absolue des Z-scores des flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la fétuque cultivée sur quatre sols au cours de la culture test* *13*

Fig. 11. *Valeur absolue des Z-scores des flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la tomate cultivée sur quatre sols au cours de la culture test* *14*

Tab. 1. *Principales propriétés physico-chimiques des quatre sols utilisés au cours du test interlaboratoire* *5*

Résumé

Le champ d'application du présent projet concerne la mise au point et la normalisation d'outils et de méthodes permettant l'évaluation des risques écotoxicologiques sur les sites et sols contaminés. Il s'inscrit dans les activités des groupes de travail T 95 E "Ecotoxicologie aquatique et terrestre" de l'AFNOR et « Biodisponibilité » (SC 7/WG 8) du comité technique de l'ISO sur la qualité des sols (ISO/TC 190).

L'objectif de ce projet concerne la réalisation d'un test interlaboratoire sur l'outil et la méthodologie RHIZOtest faisant en parallèle l'objet d'une norme en cours de rédaction (ISO/CD 16198). La réalisation de ce test interlaboratoire international soutiendrait fortement l'obtention de la normalisation ISO du RHIZOtest, qui deviendrait alors la seule méthode normalisée à l'échelle internationale permettant la mesure de phytodisponibilité des éléments traces en sols contaminés. C'est sur ce type de méthode que pourra s'appuyer une législation européenne sur la protection des sols, tel que cela est envisagée dans le cadre de la mise en place d'une directive européenne sur les sols.

S'il n'y a pas d'enjeu industriel et commercial envisagé directement à l'issue du projet, cette démarche permettra d'apporter des réponses aux gestionnaires de sites et sols contaminés tant publics que privés. Rien qu'au niveau européen, 3,5 millions de sites sont considérés comme potentiellement contaminés, parmi lesquels 40 % le sont principalement par les éléments traces. D'un point de vue économique, les dépenses pour inventorier les sites contaminés avoisineraient 240 M EUR/an, alors que le coût de gestion des sols contaminés est estimé à plus de 2,1 G EUR/an.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont permis de montrer la capacité du RHIZOtest à être utilisé par des utilisateurs variés (chercheurs et techniciens d'organismes publics et privés dans les domaines de la recherche et de l'évaluation environnementale). Si l'hétérogénéité des conditions de culture intra- et inter-laboratoire a pu être à l'origine de différences significatives de croissance végétale, aucun laboratoire n'a obtenu de valeur « anormale » comparativement aux autres, soulignant ainsi une bonne reproductibilité de croissance végétale. L'homogénéité interlaboratoire a également été vérifiée pour le principal indicateur de phytodisponibilité des éléments traces déterminé à l'aide du RHIZOtest, i.e. le flux de prélèvement d'élément trace par les plantes pendant la phase d'exposition au sol. La mesure de flux s'est montrée suffisamment reproductible pour permettre un classement similaire des quatre sols étudiés entre les différents laboratoires pour la plus part des éléments traces, i.e. As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb et Zn.

Si ces premiers résultats peuvent être précisés par un approfondissement des méthodes statistiques utilisées pour l''analyse des données, ils permettent néanmoins de démontrer la qualité de l'outil et de la méthodologie RHIZOtest dans l'optique de sa normalisation ISO.

Mots clés : Biodisponibilité, Biotest, Ecotoxicologie, Essai circulaire, Métaux Lourds, Sites et sol pollués

Abstract

The scope of the present project deals with the setting up and the standardisation of tools and methodology adequate to assess the ecotoxicological risks occurring in contaminated soils and sites. This project is a task leaded by the working groups T 95 E "Ecotoxicologie aquatique et terrestre" of AFNOR and “Bioavailability” (SC 7/WG 8) of the ISO technical committee dedicated to soil quality (ISO/TC 190).

This project aimed at carrying out an interlaboratory trial dedicated to the RHIZOtest tool and methodology. The writing of an ISO standard on the RHIZOtest (ISO/CD 16198) is concomitantly in progess. The validation of the RHIZOtest through an interlaboratory trial would support substantially the final acceptance of the standard, thereby becoming the first and single methodology standardised at an international level to assess trace element phytoavailability in contaminated soils. Such kind of internationally-standardised methodology should represent a strong basement to a European policy on soil protection, as it is discussed within the framework of a European directive on soils.

If there is no commercial or industrial issue at short-term, standardised tools such as the RHIZOtest should bring solutions to the managers or administrators of contaminated sites. As a European level for instance, 3.5 millions of sites are considered as potentially contaminated whose 40 % are mainly impacted by trace element contamination. This is also an economic challenge as the expenses for the inventory of contaminated sites would reach 240 M EUR/an and those for their remediation would exceed 2.1 G EUR/an.

Within the framework of the present project, the RHIZOtest demonstrates its ability to be used by a broad diversity of users, including scientists and technicians from private or public organisation in the field of research or risk assessment. Some within- and between-laboratory heterogeneity in the growing conditions induced significant differences in plant growth. However, no laboratory exhibits any outlier value for biomass in comparison with the global population, hence supporting a reasonable reproducibility of plant growth. The between-laboratory homogeneity was also addressed through the main indicator of trace element phytoavailability determined thanks to the RHIZOtest, i.e. the uptake flux of trace element in plants during the exposure to the soil. Flux measurements were reproducible enough to enable a similar classification of the four studied soils between the different laboratories for the most of trace elements investigated, i.e. As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn.

Whether the investigation of these first results would require going deeper in the statistical methodology used to analyse the data set, they should meanwhile enable to demonstrate the quality of the RHIZOtest tool and methodology in the scope of its standardisation.

Key words: Bioavailability, Biotest, Ecotoxicology, Heavy metals, Ring-test, Polluted sites and soils

1. Introduction

Un consensus international a récemment été obtenu sur la définition du concept de biodisponibilité des contaminants dans les sols, permettant ainsi de fixer un cadre directeur pour la sélection et l'application de méthodes d'évaluation de la biodisponibilité (ISO 2008). En ce qui concerne plus particulièrement l'évaluation de la phytodisponibilité des éléments traces, un certain nombre de méthodes chimiques et biologiques sont normalisées à l'échelle internationale. Si les méthodes chimiques sont à l'heure actuelle les méthodes les plus éprouvées pour estimer la phytodisponibilité des éléments traces (ISO 2012a), leur validation par corrélation avec des mesures biologiques reste toutefois partielle. Par ailleurs, ces méthodes chimiques ne peuvent par définition pas tenir compte de la diversité biologique des réponses observées chez les végétaux supérieurs. Quant aux méthodes biologiques, si quatre biotests sont actuellement normalisés à l'échelle internationale (ISO 2005b et c; ISO 2010a et b), ils n'ont été développés que pour évaluer la phytotoxicité des éléments traces. Il n'existe donc à l'heure actuelle aucune méthode biologique normalisée permettant d'évaluer la phytodisponibilité des éléments traces en sols contaminés. C'est notamment pour répondre à ce manque méthodologique que le RHIZOtest a été développé et est en cours de validation en vue de l'obtention d'une normalisation ISO.

Le principe fondamental du RHIZOtest, reposant sur la séparation physique du sol et des racines organisées sous forme de tapis plan, a été initialement mis au point dans les années 1970-80 (Kuchenbuck et Jungk, 1982). Dans les années 1990, ce dispositif a été modifié par l'équipe de P. Hinsinger (INRA, UMR Ecos&Sols) pour être appliqué à l'étude de la dynamique des éléments traces dans la rhizosphère (Guivarch et al. 1999). C'est au cours des années 2000 que le RHIZOtest a été utilisé en évaluation des risques pour estimer la phytodisponibilité du cuivre (Cu) en sols à antécédents viticoles (Chaignon et Hinsinger 2003). Cette application à une problématique concrète de contamination des sols a permis de confirmer l'intérêt des méthodes biologiques, et notamment du RHIZOtest, vis-à-vis des méthodes chimiques et a fait germer l'idée d'approfondir le développement du RHIZOtest en vue de sa normalisation (Bravin et al. 2010).

Basé sur une collaboration entre le CIRAD et l'INRA, le projet NormaRHIZO (2010-2012) a été initié dans le but de finaliser le développement et la validation du RHIZOtest comme outil d'évaluation de la phytodisponibilité des éléments traces en sols contaminés, ce travail devant soutenir in fine la normalisation de l'outil et de la méthode RHIZOtest (Doelsch 2009). Trois ans après son démarrage, plusieurs objectifs du projet NormaRHIZO sont d'ores et déjà atteints concernant le développement du RHIZOtest (Bravin et al. 2011 ; Lemal et al. 2011) :

(i) Le prototype et la méthodologie du RHIZOtest sont achevés et validés expérimentalement.
(ii) La liste des éléments traces pour lesquels le RHIZOtest est en mesure d'évaluer la phytodisponibilité a été élargie et comprend maintenant l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le césium (Cs), Cu, le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn).
(iii) Les trois espèces végétales cibles proposées dans la procédure de normalisation sont sélectionnées.

Une expérimentation complémentaire sur une gamme de 55 sols et dont les déterminations analytiques sont actuellement en cours de finalisation doit permettre de préciser le domaine d'application (types de sol, niveau de contamination…) du RHIZOtest et de le comparer aux méthodes chimiques classiquement utilisées en évaluation environnementale (extractions chimiques sélectives, mesures de spéciation et DGT).

En ce qui concerne la phase de normalisation, celle-ci avait été initialement envisagée à l'échelle nationale (AFNOR) à l'origine du projet NormaRHIZO. Les experts de l'AFNOR et de l'ADEME ont cependant suggéré de soumettre directement le projet de norme à l'ISO qui a validé la proposition. Les résultats obtenus dans le cadre du projet NormaRHIZO ont permis de faire avancer la rédaction de la norme ISO jusqu'au stade « Comity Draft » (ISO 2012b). Pour permettre d'achever la validation de la norme ISO, le RHIZOtest doit être maintenant validé par un test interlaboratoire d'envergure internationale.

Le projet RHIZOlab a donc pour objectif de permettre la réalisation de ce test interlaboratoire à l'échelle internationale, de manière à finaliser la validation de l'outil et de la méthodologie RHIZOtest et ainsi de remplir les dernières conditions nécessaires à l'obtention d'une normalisation ISO. Les différentes étapes de réalisation du test interlaboratoire sont précisées dans la Figure 1.

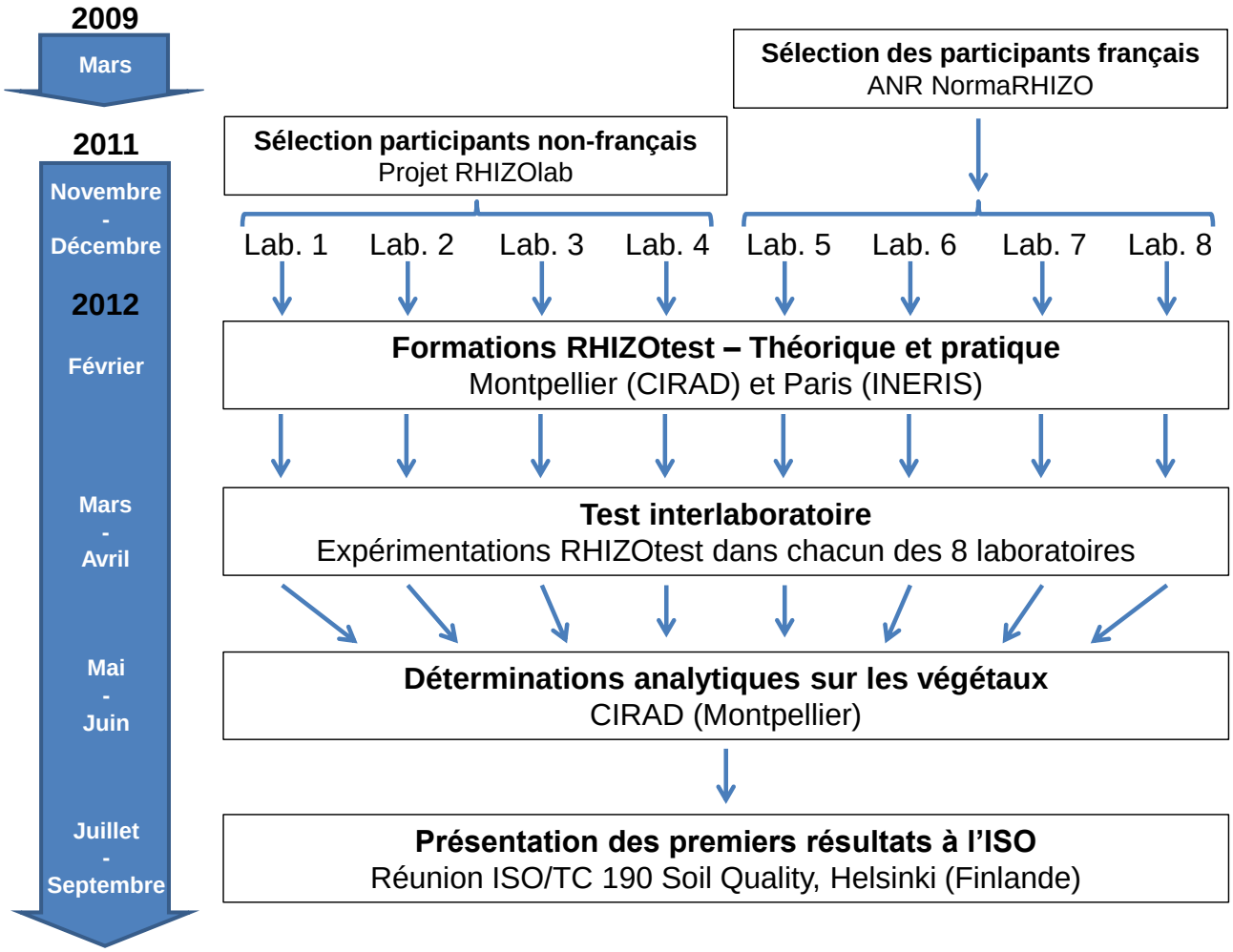

Fig. 1. Etapes de réalisation du test interlaboratoire du RHIZOtest

2. Sélection des participants au test interlaboratoire

La sélection des laboratoires participants au test interlaboratoire s'est faite en deux temps. Quatre laboratoires français ont initialement été sélectionnés courant 2009 lors du montage du projet ANR NormaRHIZO. Il s'agit de :

(i) INERIS ;
(ii) Eurofins IPL Est, Laboratoire Etudes et Expertises, Unité Ecotoxicologie ;
(iii) INRA, UMR Eco&Sols ;
(iv) CIRAD, UR Recyclage et risque.

Les laboratoires INERIS et Eurofins ont été sélectionnés pour leur expérience dans la mise en œuvre de biotests normalisés en écotoxicologie terrestre et la réalisation de test interlaboratoire. Les laboratoires INRA et CIRAD ont pour leur part été sélectionnés pour leur connaissance approfondie du RHIZOtest, dont le premier laboratoire est à l'origine du développement et le second est porteur du projet NormaRHIZO.

Dans un second temps, quatre laboratoires non-français ont été sélectionnés entre novembre 2011 et janvier 2012. Suite à l'appel à participation, dix laboratoires provenant de dix pays différents (Allemagne, Autriche, Belgique, Espagne, Etats-Unis, Finlande, Italie, Pakistan, Sénégal et Tunisie) ont proposé leur candidature. La sélection s'est principalement opérée sur la capacité des laboratoires à assurer la culture des plantes en conditions contrôlées (serre avec complémentation lumineuse ou chambre de culture) ainsi que sur les possibilités d'expédition d'échantillons de semences et de sol depuis la France. De ce fait, la sélection s'est portée sur quatre laboratoires européens :

(i) The University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Rhizosphere Ecology and Biogeochemistry Group, Vienne, Autriche ; compétences expérimentales reconnues pour la culture de plantes sur des des dispositifs proches du RHIZOtest ;
(ii) Les universités d'Udine et de Bolzano, Italie ; compétences expérimentales reconnues pour la culture de plantes sur des des dispositifs proches du RHIZOtest ;

(iii) The institute for Ecological Chemistry, plant Analysis and Stored Product Protection, Berlin, Allemagne ; compétences expérimentales reconnues en écotoxicologie terrestre et en demarche normative.
(iv) L'université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Science du sol, Belgique ; compétences reconnues en cultures de plantes pour l'estimation de la phytodisponibilité des éléments traces.

3. Formations à l'outil et à la méthodologie RHIZOtest

Etant donné la gageure expérimentale que représente la réalisation d'un test interlaboratoire sur une méthode ayant pour objectif d'être normalisée, l'ensemble des participants ont été conviés à l'une des deux sessions de formation réalisées entre fin février (CIRAD, Montpellier) et début mars (INERIS, Paris).

Chacune des deux sessions de formation s'est déroulée sur trois jours et comprenait :
(i) 1,5 jours de formation théorique sur l'historique scientifique du développement du RHIZOtest ainsi que sur la présentation du matériel et de la procédure expérimentale RHIZOtest telle que définie dans la norme (ISO 2012b) ;
(ii) 1,5 jours de travaux pratiques ayant pour objectif de familiariser l'ensemble des participants à la manipulation de l'outil et à l'appréhension de la procédure expérimentale.

L'ensemble des participants sont repartis de la formation avec la version à jour de la norme (ISO 2012b) ainsi qu'un fascicule technique décrivant le protocole spécifique au test interlaboratoire (cf. 4.1.2).

4. Expérimentations en RHIZOtest

4.1. Matériel et Méthode

4.1.1. Principe du RHIZOtest

Dans sa version normalisée (ISO 2012b), il est proposé de déployer le RHIZOtest en deux étapes successives de croissance végétale (Fig. 2). Durant la première étape (i.e. pré-culture), les semences sont mises à germer puis les plantules sont cultivées en hydroponie pendant deux semaines afin de permettre le développement d'une biomasse suffisante ainsi que d'un tapis racinaire plan suffisamment dense et homogène recouvrant la totalité de la toile en polyamide qui le sépare de la solution nutritive. Durant la seconde étape (i.e. culture test), le tapis racinaire est mis en contact pendant huit jours avec une couche de sol de 6 mm d'épaisseur, le tapis racinaire restant physiquement séparé du sol par la toile en polyamide.

Un lot de cinq pots contenant les plantes est récolté pour chaque espèce à l'issue de l'étape de pré-culture, de manière à déterminer la quantité d'éléments traces prélevés par les plantes durant cette première phase. Le reste des pots mis en contact avec les sols durant l'étape de culture test sont récoltés à l'issue de cette seconde étape de culture. Les quantités d'éléments traces prélevés par les plantes au cours de cette seconde étape de culture sont alors déterminées par soustraction des quantités prélevées durant la première étape de préculture aux quantités prélevées pendant l'ensemble de l'expérimentation. Les indicateurs de phytodisponibilité des éléments traces qui peuvent être calculés sont, d'une part, les concentrations en éléments traces dans les parties aériennes et racinaires à l'issue de l'étape de culture test et, d'autre part, les flux d'éléments traces prélevés par les plantes durant l'étape de culture test. Si ces deux indicateurs sont généralement positivement corrélés, le flux de prélèvement représente plus fidèlement la phytodisponibilité des éléments traces dans les sols étudiés au cours de l'étape de culture test puisque cet indicateur n'est pas biaisé par la part des éléments traces prélevés durant l'étape de pré-culture.

La croissance des plantes durant l'étape de préculture ainsi que la durée relativement courte de l'étape de culture test sont normalement adaptées pour prévenir l'apparition de symptôme de phytotoxicité induit par une accumulation excessive d'éléments traces dans les plantes au cours de l'étape de culture test. Ainsi, le RHIZOtest s'avère être un dispositif capable de comparer de manière équitable la phytodisponibilité des éléments traces dans une large gamme de sols, y compris les plus fortement contaminés.

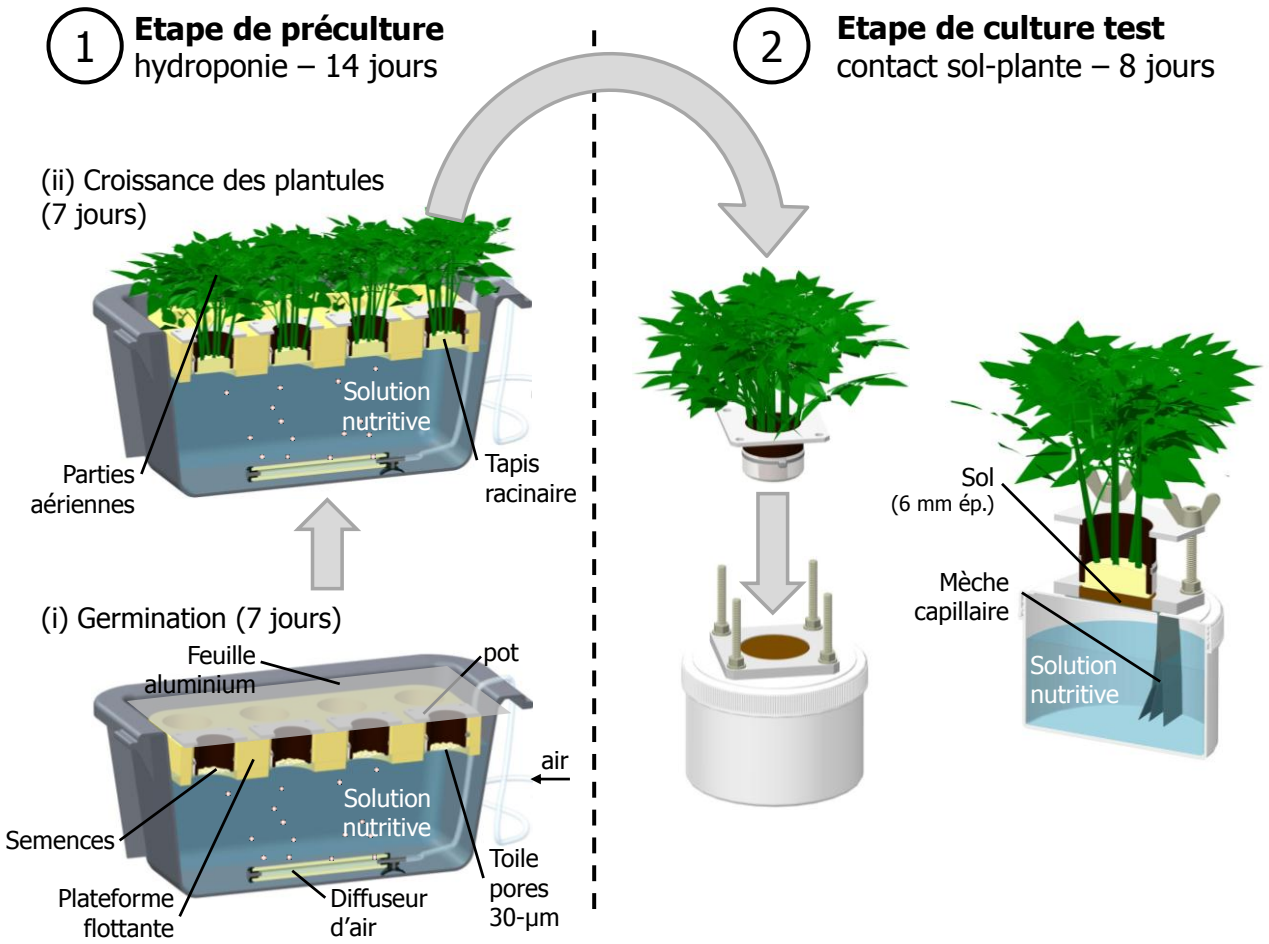

Fig. 2. Procédure expérimentale du RHIZOtest en deux étapes (préculture et culture test)

Au regard de la norme ISO sur la biodisponibilité des contaminants dans les sols (ISO 2008), Le RHIZOtest permet d'évaluer la biodisponibilité environnementale des éléments traces pour les plantes (i.e. phytodisponibilité). Le RHIZOtest s'applique notamment, bien que non exclusivement, aux plantes d'intérêts agronomiques cultivées sur des sols ou des matériaux terreux en conditions oxydantes. Bien qu'il puisse théoriquement s'appliquer à une très large gamme d'éléments traves, le RHIZOtest a été plus particulièrement validé sur les éléments traces suivants : As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn. Dans le cadre de la norme ISO, trois espèces cibles ont été proposées par défaut : le chou (*Brassica oleracea*), la fétuque (*Festuca arundinacea*) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Une large gamme d'espèces végétales peut cependant être cultivée avec le RHIZOtest (ISO 2012b).

4.1.2. Expérimentation du test interlaboratoire

Chaque participant a reçu suite à la formation l'ensemble du matériel RHIZOtest, les semences des trois espèces de référence dans la norme (Chou, cv. castelard ; fétuque, cv. calina ; colza cv. fline) ainsi que les quatre échantillons de sol nécessaire à la réalisation de l'expérimentation en RHIZOtest. Les participants ont fourni pour leur part une chambre de culture ou une serre nécessaire à la culture des plantes ainsi que l'eau déminéralisée et les produits chimiques nécessaires à la confection des solutions nutritives. Les huit expérimentations se sont déroulées du 5 mars au 13 avril 2012 de manière indépendante chez chacun des participants.

Les échantillons de sol correspondent à l'horizon de surface tamisé à 2 mm de quatre sols présentant une large gamme de propriétés physico-chimiques (e.g. pH 5,9-7,7 ; 13-41 g Corg kg^{-1}) ainsi que des contaminations en éléments traces d'origine et de niveau contrastés (Tab. 1). Le sol 1 est un sol agricole calcaire contaminé en Cd, Cu, Pb et Zn suite à des épandages répétés des eaux usées de la ville de Paris pendant plusieurs décennies au cours du XXème siècle (van Oort et al. 2008). Le sol 2 est un sol viticole faiblement acide fortement contaminé en Cu par l'apport répété de fongicide à base de Cu. Le sol 3 est un sol agricole acide contaminé en Cd, Pb et Zn par les retombées atmosphériques d'une fonderie située à proximité (Mallmann et al. 2008). Enfin, le sol 4 est un sol très fortement contaminé en éléments traces et en Pb en particulier par les retombées atmosphériques d'une usine de recyclage de batteries situées à proximité (Cecchi et al. 2008).

Tab. 1. Principales propriétés physico-chimiques des quatre sols utilisés au cours du test interlaboratoire

	Texture				$CaCO_3$	Corg	Concentrations totales en élément trace						
	S	L	A	pH_{eau}			As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
	g kg^{-1}				g kg^{-1}		mg kg^{-1}						
Sol 1	740	102	158	7,7	66	13	14	1,7	90	98	32	163	432
Sol 2	561	322	117	6,2	–	13	24	0,5	33	453	14	215	74
Sol 3	550	337	113	5,9	–	25	10	4,2	38	24	12	590	429
Sol 4	527	311	162	6,7	6	41	203	100	109	388	131	131 340	1 172

Pour chacun des traitements (i.e. une espèce, un sol et un laboratoire), cinq répétitions ont été réalisées. Les plantes des trois espèces ont été récoltées en séparant les parties aériennes et racinaires dans chacune des huit expérimentations à l'issue des étapes de pré-culture (i.e. plantes témoins) et de culture test. Les échantillons de végétaux ont été mis à sécher en étuve à 50 °C dans chacun des laboratoires. Les échantillons secs ont ensuite été expédiés au CIRAD à Montpellier pour analyses.

4.1.3. Détermination analytique des flux de prélèvements d'éléments traces par les plantes

Une fois les échantillons réceptionnés au CIRAD à Montpellier, les biomasses des parties aériennes et racinaires ont été déterminées par pesées (± 10^{-4} g). Les échantillons de végétaux ont ensuite été minéralisés par calcination à 500 °C pendant 2 h puis par deux attaques acides successives dans HCl 6 N puis HF concentré. Les concentrations en éléments traces (As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) dans les minéralisats ont ensuite été mesurées en ICP-MS. Des blancs de minéralisation ont été introduits dans les séries analytiques tout au long des mesures (85 blancs analysés au total). Un échantillon certifié de feuilles de fraisier (LGC7162) a également été introduit dans les séries analytiques (24 échantillons analysés au total). Les pourcentages de recouvrement de As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans l'échantillon certifié ont été de 87, 124, 81, 127, 88, 117, 147 et 101 %, respectivement.

Les flux d'éléments traces dans les plantes (F_p, ng ET m^{-2} surface d'exposition racinaire s^{-1}) ont enfin été calculés de la manière suivante :

$$F_p = Q_p / (A \times t) \quad (1)$$

$$Q_p = ((C_{f,s} \times m_{f,s} - C_{c,s} \times m_{c,s}) + (C_{f,r} \times m_{f,r} - C_{c,r} \times m_{c,r})) \times 1000 \quad (2)$$

avec :
Q_p la quantité d'élément trace accumulé dans les plantes durant l'étape de culture test, en ng ;
A la surface d'exposition des racines au sol qui est égale à 12,6 cm^2, en m^2 ;
t la durée de l'étape de culture test qui est égale à 8 jours, en s ;
$C_{f,s}$ la concentration en élément trace dans les parties aériennes à la fin de l'étape de culture test, en µg g^{-1} ;
$m_{f,s}$ la biomasse des parties aériennes à la fin de l'étape de culture test, en g ;
$C_{c,s}$ la concentration moyenne en élément trace dans les parties aériennes des plantes témoins à la fin de l'étape de préculture, en µg g^{-1} ;
$m_{c,s}$ la biomasse moyenne des parties aériennes des plantes témoins à la fin de l'étape de préculture, en g ;
$C_{f,r}$ la concentration en élément trace dans les parties racinaires à la fin de l'étape de culture test, en µg g^{-1} ;
$m_{f,r}$ la biomasse des parties racinaires à la fin de l'étape de culture test, en g ;
$C_{c,r}$ la concentration moyenne en élément trace dans les parties racinaires des plantes témoins à la fin de l'étape de préculture, en µg g^{-1} ;
$m_{c,r}$ la biomasse moyenne des parties racinaires des plantes témoins à la fin de l'étape de préculture, en g ;

4.1.4. Analyses statistiques et calcul de la variabilité inter-laboratoire

Les valeurs anormales de quantité d'éléments traces accumulés dans les plantes des cinq répétitions de chaque traitement ont été recherchées puis éliminées à l'aide du test de Grubbs au seuil de 1 % (Grubbs 1969).

Les différences significatives entre les biomasses ont été recherchées à l'aide d'une analyse de variance en utilisant le test de Fischer, complétées par une détermination des groupes homogènes au seuil de 5 %.

L'homogénéité interlaboratoire des biomasses et des flux de prélèvements des éléments traces a été évaluée à l'aide de la détermination des *Z*-scores (ISO 2005a) :

$$Zi = \frac{\overline{X}i - \overline{X}}{S} \quad (3)$$

avec :
$\overline{X}i$ la moyenne des valeurs pour le laboratoire *i* ;
$\overline{X}$ la moyenne des valeurs pour l'ensemble des laboratoires ;
S l'écart-type pour l'ensemble des laboratoires ;

Le *Z*-score étant ainsi défini, il est utilisé pour estimer l'homogénéité interlaboratoire de la façon suivante (ISO 2005a) :

si, $|Z_i| < 2$ la valeur moyenne du laboratoire *i* ne diffère pas de la valeur moyenne de l'ensemble des laboratoires ;
si, $2 \leq |Z_i| < 3$ la valeur moyenne du laboratoire *i* est considérée comme sujette à caution ;
si, $|Z_i| \geq 3$ la valeur moyenne du laboratoire *i* est considérée comme différente de la valeur moyenne de l'ensemble des laboratoires.

4.2. Résultats et discussion

La validation du test interlaboratoire s'est portée sur l'analyse des résultats de biomasse ainsi que sur l'analyse d'un des deux indicateurs de phytodisponibilité des éléments traces, i.e. le flux de prélèvement, que permet de mesurer le RHIZOtest. Cet indicateur a été choisi du fait de sa capacité à ne tenir compte que des éléments traces prélevés pendant l'étape de culture test.

4.2.1. Accidents de culture

L'ensemble des expérimentations se sont déroulées sans incident de culture majeur, à l'exception des deux cas suivants :

(i) Deux laboratoires ont dû recommencer la culture du chou. La seconde culture s'est déroulée sans incident. Pour l'un des deux laboratoires, une erreur dans la préparation des solutions nutritives a permis d'expliquer la mauvaise croissance du chou lors de la première culture.
(ii) Un laboratoire (n° 6) n'a pas obtenu une croissance et un développement suffisant du chou. Du fait d'un démarrage tardif de l'expérimentation, cette culture n'a pas pu être redémarrée dans les délais impartis. De ce fait, aucun résultat n'est présenté pour le chou pour ce laboratoire.

4.2.2. Biomasses

L'analyse des résultats de biomasses s'est portée sur les quatre points suivants :

(i) L'homogénéité interlaboratoire des biomasses des plantes témoins ;
(ii) L' augmentation significative des biomasses entre la fin des étapes de préculture et de culture test ;
(iii) L'homogénéité intralaboratoire des biomasses à l'issue de l'étape de culture test pour les quatre sols étudiés ;
(iv) L'homogénéité interlaboratoire des biomasses à l'issue de l'étape de culture test.

A l'issue de l'étape de préculture, les biomasses aériennes et racinaires des plantes témoins pour chacune des espèces ont présenté des différences statistiquement significatives entre les différents laboratoires (Fig. 3). Cependant, les valeurs absolues des *Z*-scores sont toutes inférieures à deux et même inférieur à un pour six des huit laboratoires (Fig. 4). Ces résultats montrent que malgré les différences significatives de biomasses entre les laboratoires, ces différences sont restées suffisamment faibles pour que les biomasses des plantes témoins puissent être considérées comme raisonnablement homogènes entre les laboratoires.

Les biomasses des plantes ont par ailleurs significativement augmenté entre la fin de l'étape de préculture et la fin de l'étape de culture test pour tous les laboratoires et toutes les espèces, à l'exception du laboratoire 2 pour lequel la tendance à l'augmentation des biomasses aériennes et racinaires de la tomate n'a pas été significative pour les sols 2 et/ou 3 ainsi que du laboratoire 6 pour lequel la tendance à l'augmentation des biomasses racinaires de la fétuque n'a pas été significative pour les quatre sols (Fig. 3). L'observation faite pour le laboratoire 2 est à mettre en parallèle avec les biomasses particulièrement faibles obtenues par ce laboratoire pour la tomate sur les quatre sols testés comparativement aux autres laboratoires.

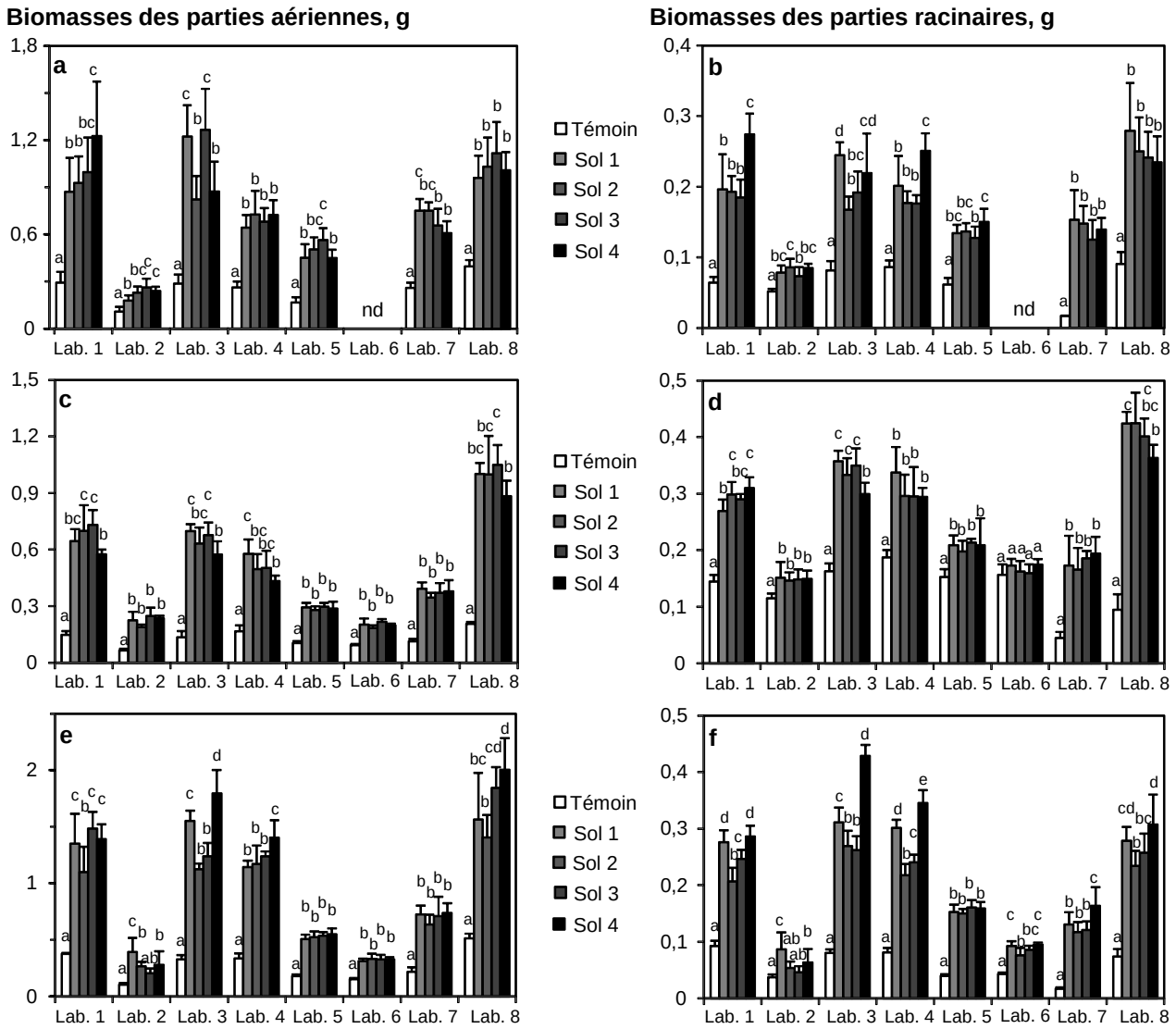

Fig. 3. Biomasses des parties aériennes et racinaires du chou (a et b), de la fétuque (c et d) et de la tomate (e et f) mesurées sur les plantes témoins à l'issue de la préculture et les plantes cultivées sur quatre sols et récoltées à l'issue de la culture test. Les biomasses des choux n'ont pas été déterminées (nd) par le laboratoire 6 suite à un accident de culture. Des lettres différentes pour une espèce végétale et un laboratoire donnés symbolisent des différentes significatives ($P < 0,05$).

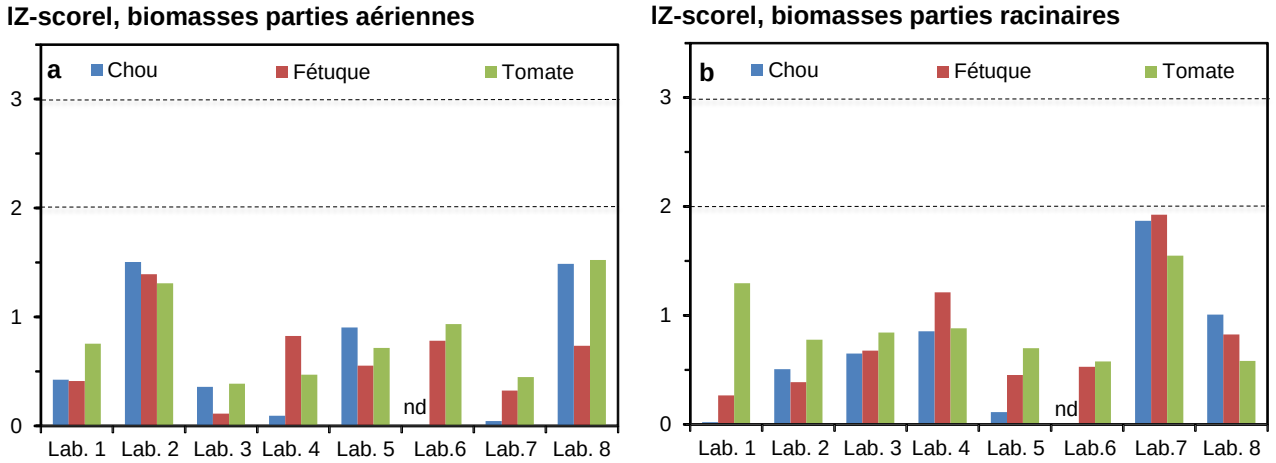

Fig. 4. Valeur absolue des *Z*-scores des biomasses des parties aériennes (a) et racinaires (b) du chou, de la fétuque et de la tomate mesurées sur les plantes témoins à l'issue de la préculture. Les biomasses des choux n'ont pas été déterminées (nd) par le laboratoire 6 suite à un accident de culture.

Les biomasses des parties aériennes et racinaires à l'issue de l'étape de culture test n'ont pas montré de différence significative pour chaque espèce et chaque laboratoire seulement dans 29, 56 et 25 % des cas pour le chou, la fétuque et la tomate, respectivement (Fig. 3). Si ce résultat pourrait mettre en évidence une certaine hétérogénéité des biomasses à l'issue du test du fait par exemple d'effets phytotoxiques, cette hypothèse reste peu probable puisque les tendances entre les sols ne sont pas conservées d'un laboratoire à un autre. Cette hétérogénéité serait alors plutôt due à la conjonction de la variabilité inhérente à la croissance de matériel végétal et de la variabilité des conditions de cultures entre les laboratoires (e.g. niveau d'éclairement, stabilité des paramètres climatiques) et au sein de chaque laboratoire (e.g. hétérogénéité spatiale des conditions climatiques au sein des chambres de culture). Cette hypothèse est confortée par l'absence de différence significative entre les biomasses moyennes de chaque espèce pour l'ensemble des laboratoires entre les quatre sols (résultats non présentés).

L'homogénéité interlaboratoire des biomasses aériennes et racinaires est par ailleurs confirmée par l'analyse des *Z*-scores, dont les valeurs absolues sont toutes inférieures à deux quel que soit le laboratoire, l'espèce végétale, le sol et la partie végétale concernés (Fig. 5).

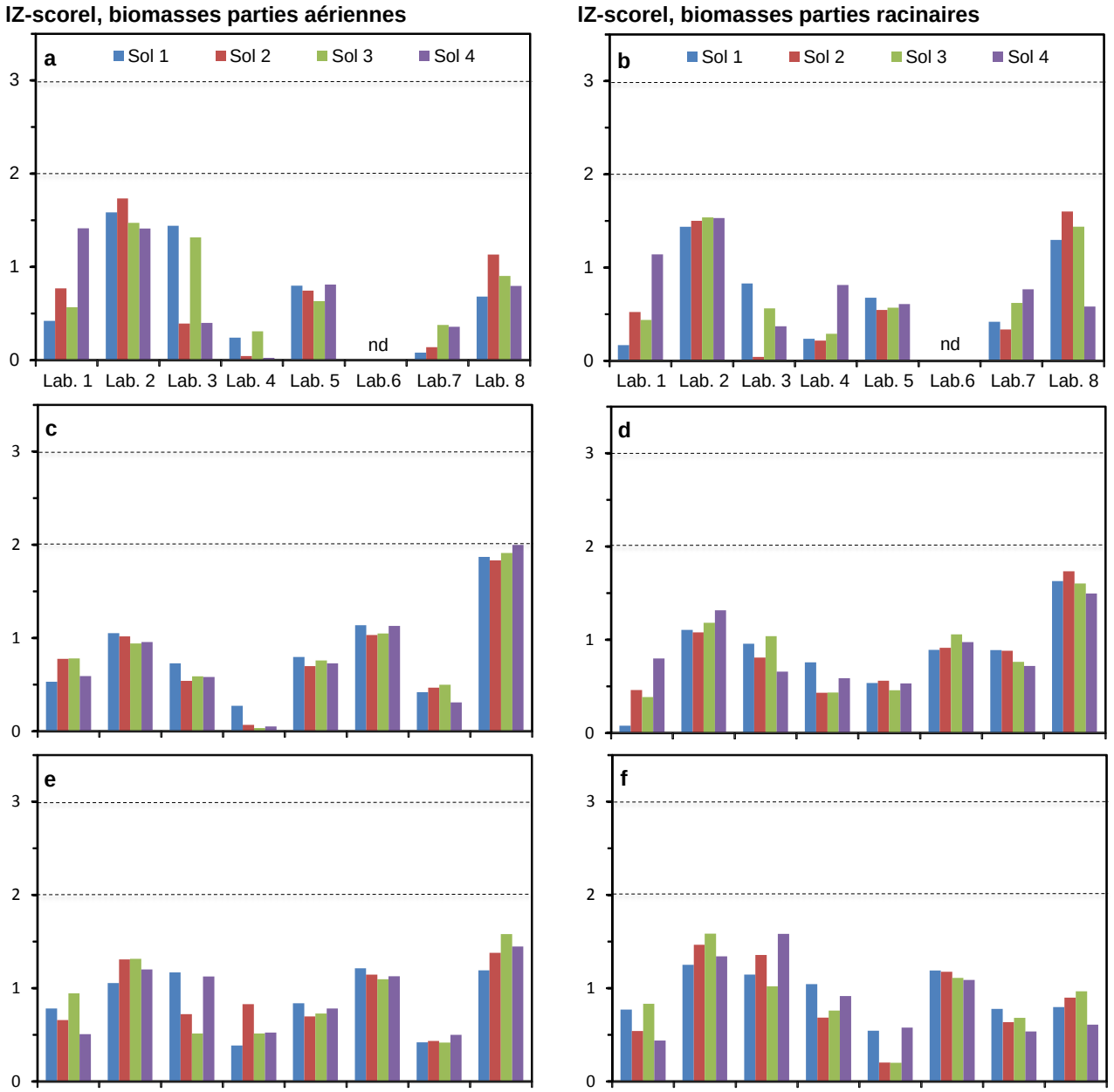

Fig. 5. Valeur absolue des *Z*-scores des biomasses des parties aériennes et racinaires du chou (a et b), de la fétuque (c et d) et de la tomate (e et f) mesurées sur les plantes cultivées sur quatre sols et récoltées à l'issue de la culture test. Les biomasses des choux n'ont pas été déterminées (nd) par le laboratoire 6 suite à un accident de culture.

4.2.3. Flux de prélèvement des éléments traces par les plantes

Au-delà de la non-obtention d'échantillon de chou par le laboratoire 6, les concentrations de la majorité des éléments traces dans les parties aériennes et racinaires des plantes témoins des trois espèces se sont avérées anormalement élevées pour le laboratoire 2. Aucun biais expérimental ou analytique ne semblant pouvoir permettre d'expliquer et de corriger ces valeurs anormalement élevées, les données issues du laboratoire 2 n'ont pas été conservées dans l'analyse des résultats de flux de prélèvement.

L'analyse des résultats de flux de prélèvement s'est portée sur les deux points suivants :

(i) L'homogénéité interlaboratoire du classement des sols du point de vue des flux mesurés ;
(ii) L'homogénéité interlaboratoire des flux mesurés durant l'étape de culture test.

Les flux de prélèvement de As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn par les trois espèces cultivées sur les quatre sols dans chacun des sept (six pour le chou) laboratoires dont les résultats ont été pris en compte sont présentés dans les figures 6, 7 et 8.

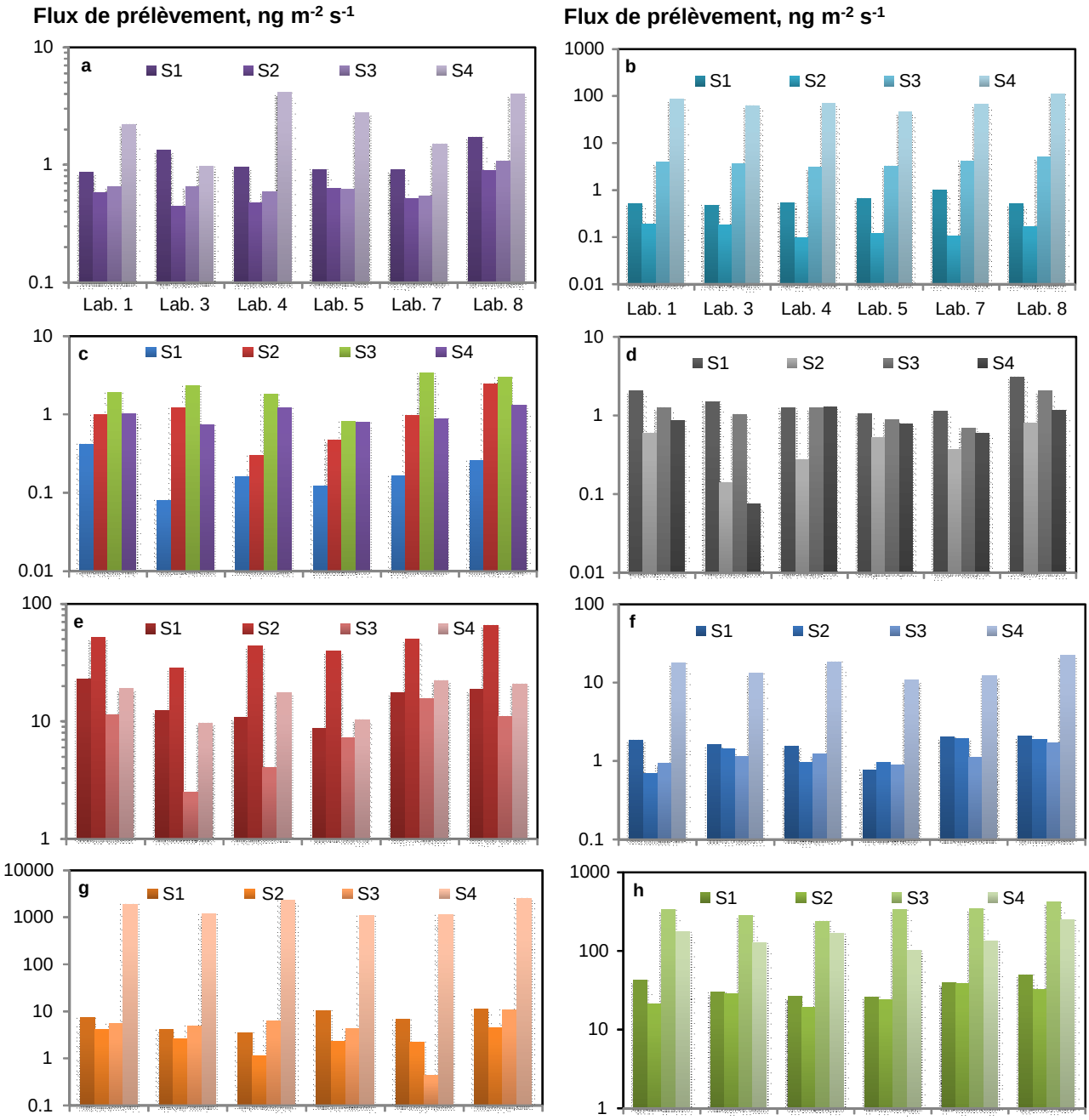

Fig. 6. Flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par le chou cultivé sur quatre sols au cours de la culture test. Les flux n'ont pas été calculés pour le laboratoire 2 du fait de valeurs anormalement élevées d'éléments traces dans les plantes. Les mesures n'ont pas été réalisées pour le laboratoire 6 suite à un accident de culture.

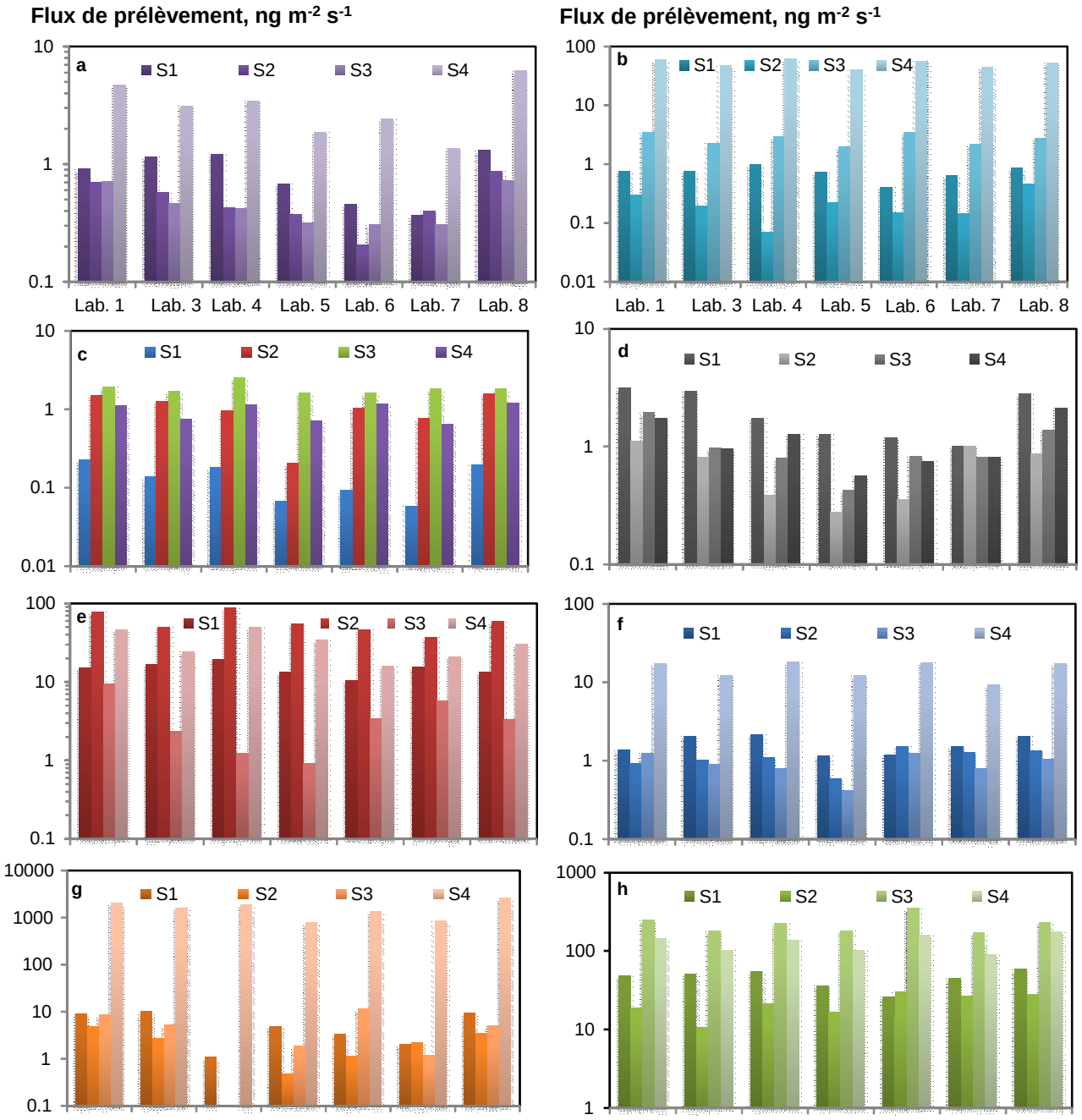

Fig. 7. Flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la fétuque cultivée sur quatre sols au cours de la culture test. Les flux n'ont pas été calculés pour le laboratoire 2 du fait de valeurs anormalement élevées d'éléments traces dans les plantes.

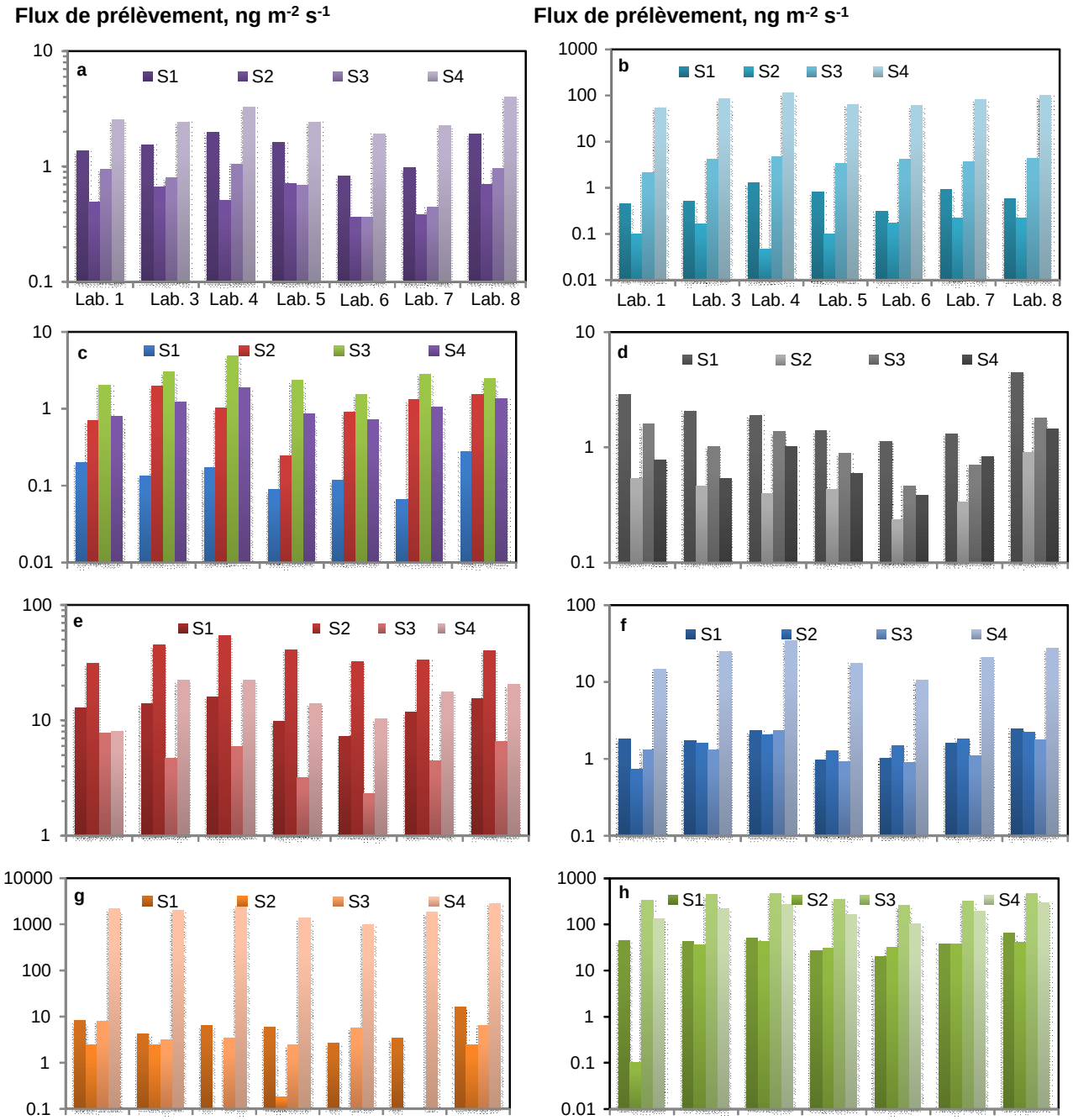

Fig. 8. Flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la tomate cultivée sur quatre sols au cours de la culture test. Les flux n'ont pas été calculés pour le laboratoire 2 du fait de valeurs anormalement élevées d'éléments traces dans les plantes.

Malgré des différences significatives entre les différents laboratoires des flux mesurés pour un élément trace, une espèce végétale et un sol donnés, le classement des sols pour chaque élément trace apparaît globalement homogène entre les laboratoires. Les flux de Cd entre les quatre sols sont classés de façon rigoureusement identique pour chacune des trois espèces. Les flux de Cu et Zn entre les quatre sols sont également classés de façon rigoureusement identique pour au moins deux des trois espèces. Bien qu'ils ne soient jamais classés de façon rigoureusement identique, les flux de As, Co, Ni et Pb entre les quatre sols sont classés de façon similaire pour les valeurs extrêmes, les valeurs intermédiaires étant moins clairement discriminées. Enfin, les flux de Cr sont ceux pour lesquels les sols sont classés de la façon la moins homogène entre les différents laboratoires et ce pour chacune des trois espèces. Ces observations peuvent également être rapprochées des amplitudes de variation des valeurs de flux pour les différents éléments traces. Les flux de Cd, Co, Cu, Ni, Pb et Zn se distribuent généralement sur trois à quatre ordres de grandeur, quand les flux de Cr se distribuent sur un à deux ordre(s) de grandeur. Si l'amplitude de variation n'explique pas à elle seule l'homogénéité du classement des sols entre les différents laboratoires, elle semble en revanche positivement impacter le degré d'homogénéité.

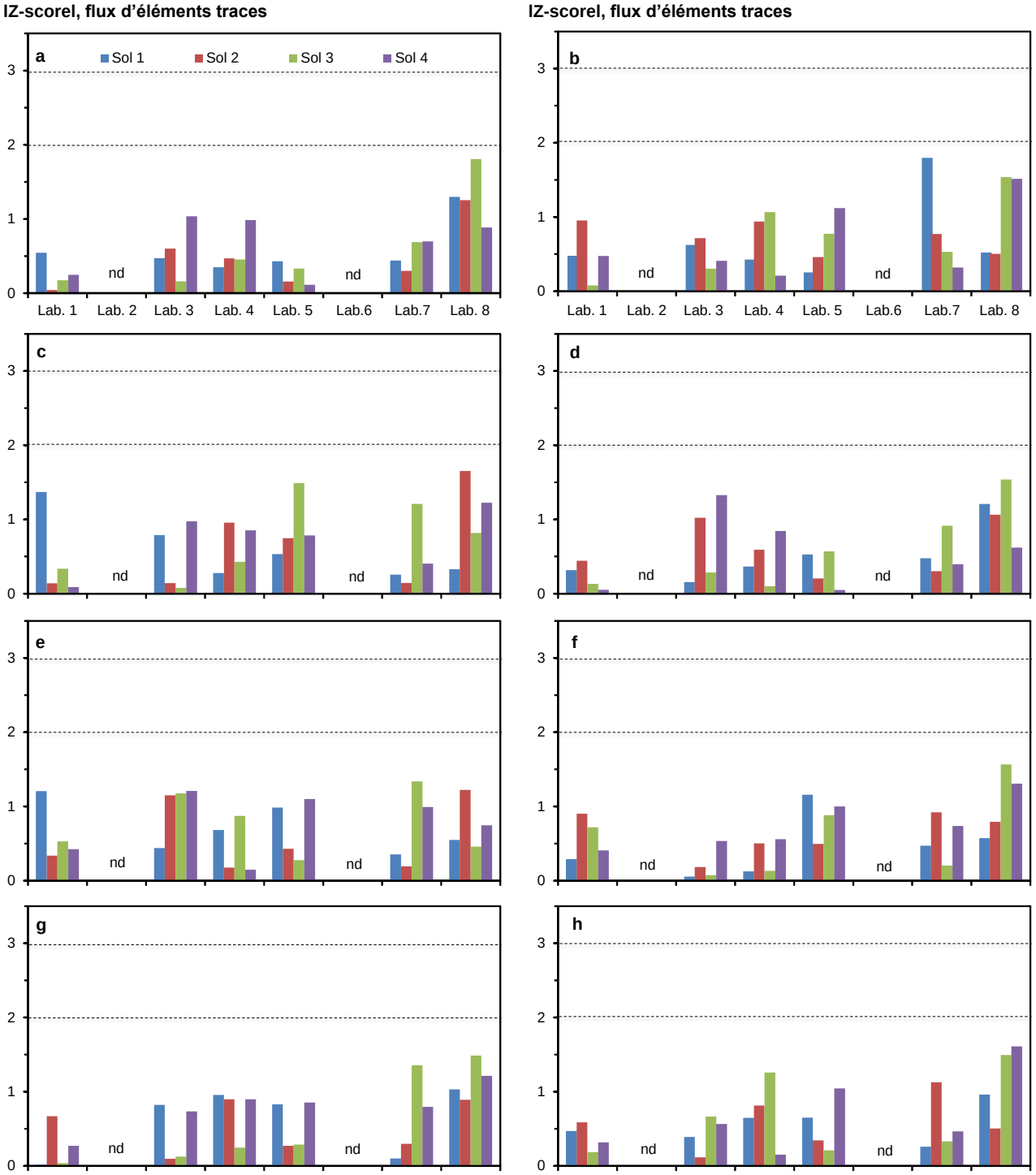

Fig. 9. Valeur absolue des *Z*-scores des flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par le chou cultivé sur quatre sols au cours de la culture test. Les Z-scores n'ont pas été déterminés (nd) pour le laboratoire 2 du fait de valeurs anormalement élevées de flux d'éléments traces dans les plantes ainsi que pour le laboratoire 6 suite à un accident de culture.

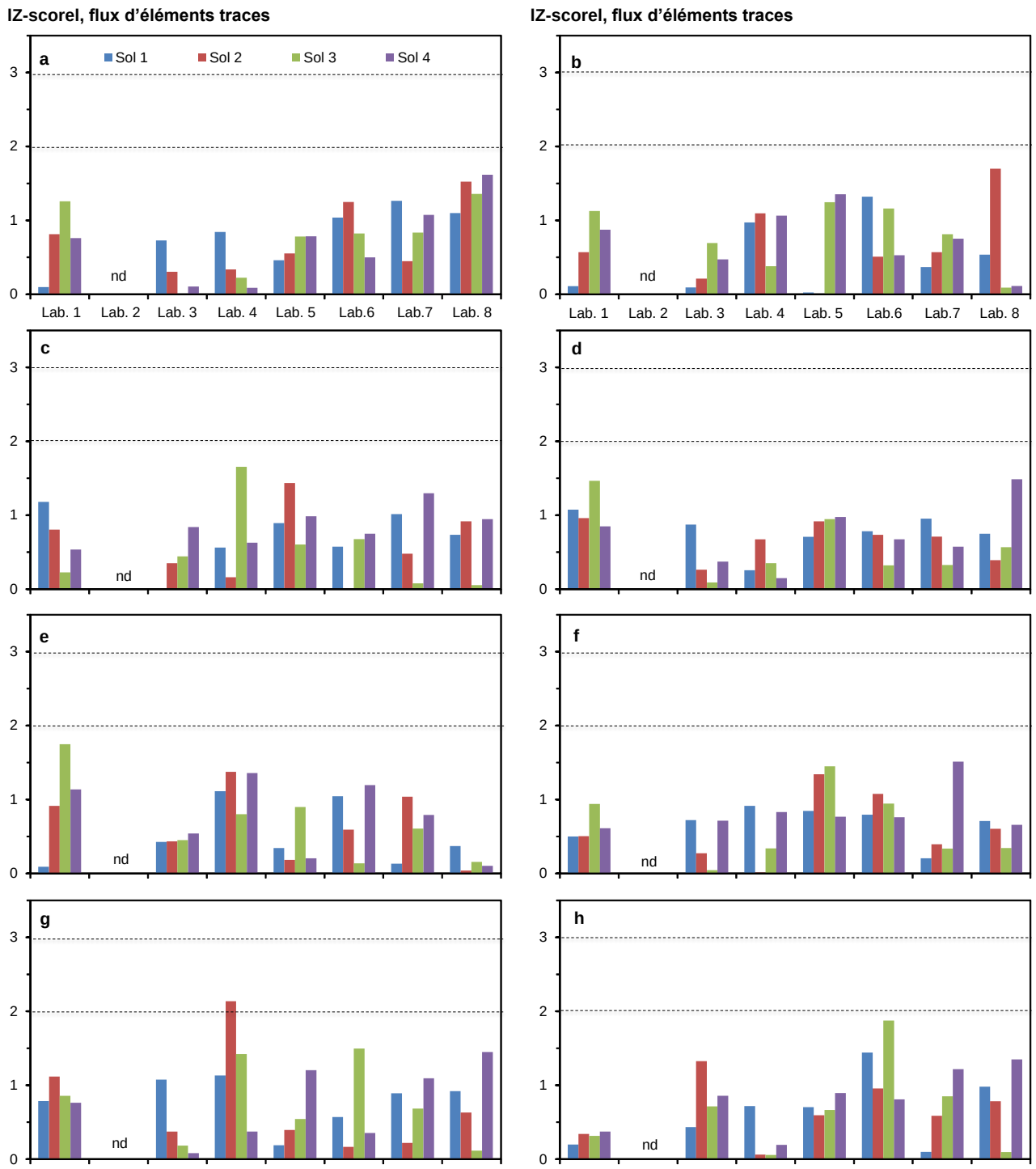

Fig. 10. Valeur absolue des *Z*-scores des flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la fétuque cultivée sur quatre sols au cours de la culture test. Les Z-scores n'ont pas été déterminés (nd) pour le laboratoire 2 du fait de valeurs anormalement élevées de flux d'éléments traces dans les plantes.

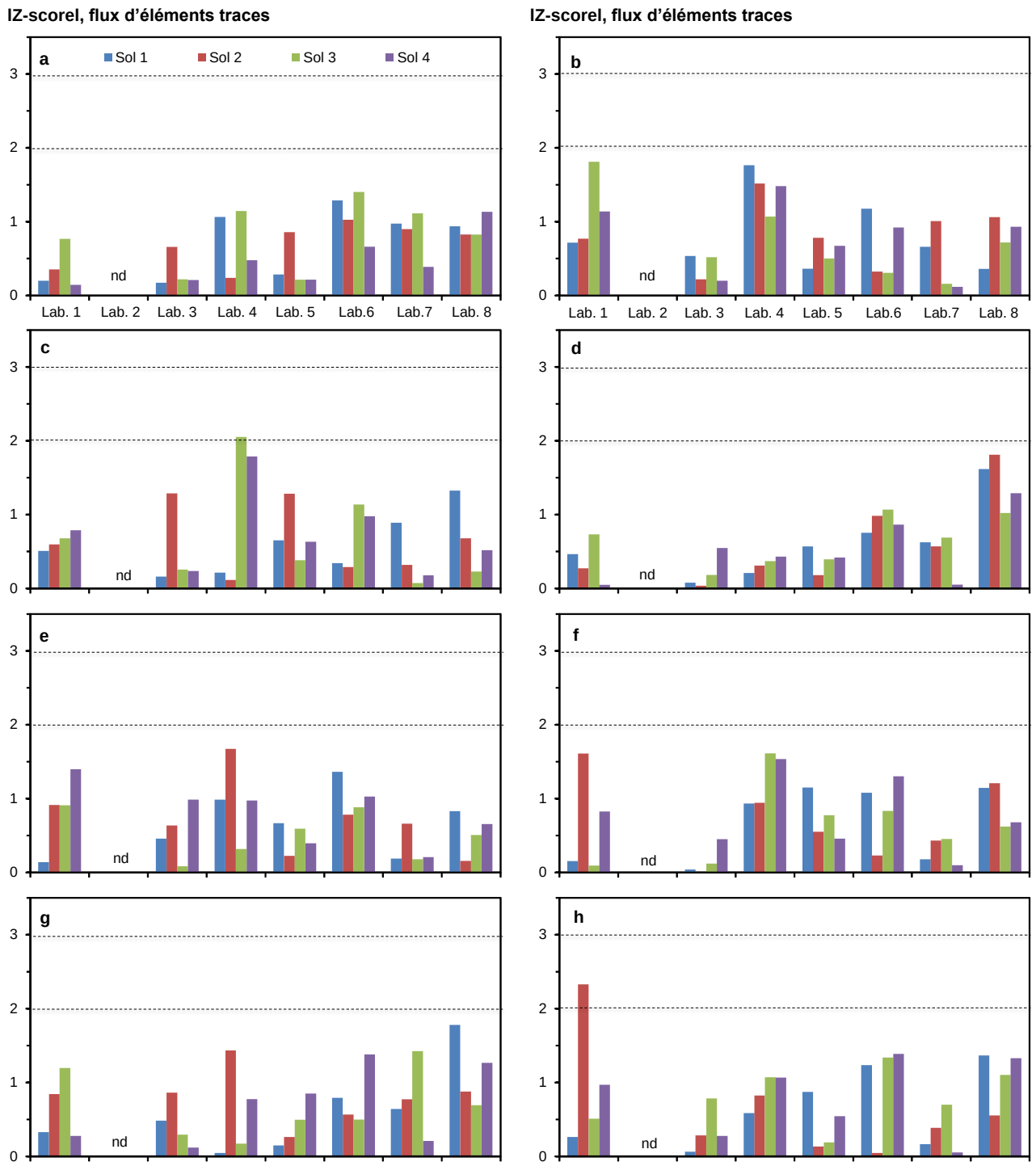

Fig. 11. Valeur absolue des *Z*-scores des flux de prélèvement de As (a), Cd (b), Co (c), Cr (d), Cu (e), Ni (f), Pb (g) et Zn (h) par la tomate cultivée sur quatre sols au cours de la culture test. Les Z-scores n'ont pas été déterminés (nd) pour le laboratoire 2 du fait de valeurs anormalement élevées de flux d'éléments traces dans les plantes.

L'homogénéité interlaboratoire des flux de prélèvements mesurés a été évaluée par la détermination des *Z*-scores pour chaque élément trace, chaque sol et chaque espèce végétale (Figs. 9, 10 et 11). Sur les 640 *Z*-scores calculés, seules deux valeurs ont été supérieures à deux mais inférieures à trois, alors que 95 % des *Z*-scores se sont avérés inférieurs à 1,5. Les deux valeurs considérées comme sujettes à caution correspondent à des éléments traces, des espèces végétales et des laboratoires différents et semblent donc n'être que des cas isolés ne pouvant pas révéler une hétérogénéité interlaboratoire généralisée.

4.3. Conclusion

La capacité des mesures en RHIZOtest à ne pas être affectées par des modifications légères de la procédure expérimentale (i.e. robustesse) ainsi que l'homogénéité intra- (i.e. répétabilité) et inter-laboratoire (i.e. reproductbilité) de la mesure en RHIZOtest ont été sondées dans la présente étude en s'intéressant plus particulièrement aux données de biomasses aériennes et racinaires ainsi qu'aux flux de prélèvements des éléments traces durant l'étape de culture test. Ces données ont été analysées à travers l'évaluation des différences statistiquement significatives entre les différents traitements ainsi que par l'établissement des *Z*-scores permettant d'estimer le niveau de reproductibilité des mesures.

Hormis un accident de culture irréversible pour un laboratoire et une espèce, la croissance des trois espèces s'est avérée significative au cours de la culture et relativement homogène entre les différents laboratoires. Si des différences significatives de biomasses ont été observées pour chacune des espèces entre les différents sols, celles-ci n'ont pas présenté de caractère répétitif ou systématique, soulignant ainsi plus une variabilité inhérente à l'hétérogénéité des conditions de culture que d'éventuels effets phytotoxiques.

Les mesures de flux de prélèvement des éléments traces par les plantes ont permis de mettre en évidence des différences significatives entre les sols. Ces différences de flux de prélèvement entre sols se sont avérées globalement homogènes entre les différents laboratoires avec cependant une reproductibilité variable suivant les éléments traces : As > Cu ≈ Zn > As ≈ Co ≈ Ni ≈ Pb > Cr. Le niveau de reproductibilité semble être en partie corrélé à l'amplitude de variation des mesures de flux pour l'élément trace considéré, la reproductibilité augmentant parallèlement avec l'amplitude de variation. L'analyse des *Z*-scores a également permis de confirmer la bonne reproductibilité des mesures de flux dont aucune n'est apparue anormalement élevée par rapport à la moyenne de l'ensemble des laboratoires.

Cette première analyse des résultats du test interlaboratoire tend à valider les performances de l'outil et de la méthode RHIZOtest, et ce plus particulièrement des points de vue de sa robustesse et de sa reproductibilité. Cette analyse repose essentielle sur la détermination des *Z*-scores telle que cela est suggéré par l'ISO (ISO 2005a). Les valeurs de *Z*-score ont été déterminées sur l'ensemble des données provenant de tous les laboratoires. Si ce mode de calcul permet une première évaluation rapide de la reproductibilité, il peut également amener à sous-estimer la variabilité interlaboratoire dans le cas où l'écart-type de référence de la méthode serait surestimé par le calcul sur l'ensemble des données issues de tous les laboratoires (i.e. incluant d'éventuelles valeurs anormalement élevées).

Le prolongement direct de cette étude serait donc de déterminer selon la norme ISO 5725-2 (ISO 1994) la moyenne et l'écart-type de référence des mesures en RHIZOtest. Ces valeurs seraient alors utilisées dans le calcul des *Z*-scores à la place de la moyenne et de l'écart-type déterminés sur l'ensemble des données. Dans un deuxième temps, l'aptitude du RHIZOtest à classer les sols de façon reproductible suivant la phytodisponibilité des éléments traces pourrait être approfondie. Pour cela, les données de cette étude pourraient être analysées à l'aide de techniques d'attribution de score et de classification dans le but de valider la similitude du classement global des sols entre les différents laboratoires.

5. Perspectives de valorisation

Les résultats préliminaires de la présente étude ont été présentés au groupe de travail « Biodisponibilité » le 11 septembre 2012 à Helsinki (Finlande) dans le cadre du séminaire annuel de l'ISO/TC 190 dédié à la qualité des sols. Le groupe de travail a ainsi donné son accord pour que les résultats du test interlaboratoire soient intégrés dans la norme dédiée au RHIZOtest (ISO 2012b) sous forme d'une annexe. La norme, alors sous sa forme finalisée, sera présentée en début d'année 2013 pour un vote final devant décider de l'acceptation de l'épreuve en tant que norme ISO.

Le groupe de travail « Biodisponibilité » a également fait part de son intérêt de voir l'analyse des résultats du test interlaboratoire être approfondie dans le but d'être publiée dans une revue scientifique internationale à comité de lecture. Ce travail sera mené au cours du premier semestre 2013.

Enfin, la réalisation du test interlaboratoire a également permis de promouvoir l'utilisation du RHIZOtest. Cinq des six nouveaux laboratoires ayant participé au test interlaboratoire ont souhaité conserver le matériel RHIZOtest pour l'utiliser dans de prochaines expérimentations. Au-delà des participants au test interlaboratoire, deux équipes de recherche tunisienne et marocaine ont pris contact avec le CIRAD pour la mise en œuvre de collaborations scientifiques autour de l'utilisation du RHIZOtest sur leur terrain d'application.

6. Bibliographie

Bravin MN, Michaud AM, Larabi B et Hinsinger P 2010 RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. Environ. Pollut., 158, 3330-3337.

Bravin MN, Lemal L, Arnal D, Cazevieille P, Chevassus-Rosset C, Letourmy P, Hinsinger P et Doelsch E 2011 From rhizosphere research to risk assessment: toward the standardisation of a plant-based biotest for assessing trace element phytoavailability in contaminated soils. Conférence Rhizosphere 3, 25-30 septembre 2011, Perth, Australie.

Cecchi M, Dumat C, Alric A, Felix-Faure B, Pradere P et Guiresse M 2008 Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. Geoderma, 144, 287-298.

Chaignon V et Hinsinger P 2003 A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. J. Environ. Qual., 32, 824-833.

Doelsch E (coord.) 2009 NormaRHIZO : vers la Normalisation du RHIZOtest pour l'évaluation de la phytodisponibilité des éléments traces en sols contaminés. ANR « Contaminants, Ecosystèmes, Santé », 2010-2012, 500 k€, 53 p.

Guivarch A, Hinsinger P et Staunton S 1999 Root uptake and distribution of radiocaesium from contaminated soils and the enhancement of Cs adsorption in the rhizosphere. Plant Soil, 211, 131-138.

Grubbs FE 1969 Procedures for detecting outlying observations in samples. Technometrics, 11, 1-21.

ISO 1994 ISO 5725-2 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 2 : Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.

ISO 2005a ISO 13528 Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires.

ISO 2005b ISO 17126 Qualité du sol — Détermination des effets des polluants sur la flore du sol — Essai de détection de l'émergence des plantules de laitue (*Lactuca sativa* L.).

ISO 2005c ISO 22030 Qualité du sol — Méthodes biologiques — Toxicité sur les plantes supérieures.

ISO 2008 ISO 17402 Qualité du sol — Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol.

ISO 2010a ISO 11269-1 Qualité du sol — Détermination des effets des polluants sur la flore du sol — Partie 1 : Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

ISO 2010b ISO 11269-2 Qualité du sol — Détermination des effets des polluants sur la flore du sol — Partie 2 : Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.

ISO 2012a ISO/CD 14858 Soil quality — Environmental availability in soil — Use of soil extracts for the assessment of trace element bioavailability.

ISO 2012b ISO/CD 16198 Qualité du sol — Un test végétal pour l'évaluation de la biodisponibilité environnementale des éléments traces pour les plantes

Kuchenbuch R et Jungk A 1982 A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil. Plant Soil, 68, 391-394.

Lemal L, Bravin MN, Letourmy P, Hinsinger P et Doelsch E 2011 Development of a new plant-based biotest to assess trace element phytoavailability in contaminated soils: Selection of target-plant species for standardisation. 21ème Conférence de la SETAC, 15-19 mai 2011, Milan, Italie.

Mallmann FJK, dos Santos DR, Cambier P, Labanowski J, Lamy I, Santanna MA, Tessier D, van Oort F 2012 Using a two site-reactive model for simulating one century changes of Zn and Pb concentration profiles in soils affected by metallurgical fallout. Environmental Pollution, 162, 294-302.

van Oort F, Jongmans AG, Lamy I, Baize D and Chevallier P 2008 Impacts of long-term waste-water irrigation on the development of sandy Luvisols: consequences for metal pollutant distributions. European Journal of Soil Science, 59, 925-938.