

**Étude sur l'élaboration et l'essai d'une
méthode d'évaluation écotoxicologique des
sédiments.**

Rapport d'étape No. 1.

**Mise en place et réalisation des tests sur
sédiment entier.**

**Adaptation, implantation et validation de deux
tests de toxicité sur sédiment entier avec
Chironomus tentans et *Hyaella azteca*.**

Préparé par:

**Corinne Bonnet
Chargé de projet**

**Jacques Bureau
Directeur de projet**

**Analex Inc.
914 Cunard
Laval (Québec)**

Septembre 1996

MISE EN GARDE

Cette version préliminaire du rapport d'étape No.1 fait référence à des sources bibliographiques qui sont consignés par ailleurs sur logiciel de gestion de données bibliographiques séparé (Reference Manager pour Windows). Les référence citées dans le texte sont référencées sous un numéro d'ordre dont la correspondance avec la référéce détaillé sera fournie dans le rapport final révisé.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire exécutif

| | |
|---|------|
| 1. Introduction..... | 1-1 |
| 2. Développement des essais de toxicité..... | 2-3 |
| 2.1 Rappels sur la sélection des essais retenus..... | 2-3 |
| 2.1.1 Mise en garde sur le choix des méthodes utilisée..... | 2-3 |
| 3. Implantation de l'essai de toxicité avec <i>Chironomus tentans</i> | 3-1 |
| 3.1 Résumé du chapitre..... | 3-1 |
| 3.2 Mise en place des cultures..... | 3-1 |
| 3.2.1 Objectif..... | 3-1 |
| 3.2.2 Documentation sur les organismes..... | 3-1 |
| 3.2.3 Mise en place des cultures..... | 3-2 |
| 3.2.4 Suivi et modification du procédé de culture..... | 3-2 |
| 3.2.5 Procédure d'Opération Normalisée..... | 3-8 |
| 3.3 Mise en place des essais..... | 3-8 |
| 3.3.1 Objectif..... | 3-8 |
| 3.3.2 Documentation sur les bioessais..... | 3-8 |
| 3.3.3 Mise en place et modifications apportées aux essais de toxicité..... | 3-8 |
| 3.3.4 Procédure d'Opération Normalisée..... | 3-11 |
| 3.3.5 Application de la PON et résultats obtenus..... | 3-11 |
| 4. Implantation de l'essai de toxicité avec <i>Hyaella azteca</i> | 4-1 |
| 4.1 Résumé du chapitre..... | 4-1 |
| 4.2 Mise en culture des organismes..... | 4-1 |
| 4.2.1 Objectif..... | 4-1 |
| 4.2.2 Documentation sur les organismes..... | 4-1 |
| 4.2.3 Mise en place des cultures..... | 4-2 |
| 4.2.4 Suivi et modification des cultures..... | 4-2 |
| 4.2.5 Procédure d'Opération Normalisée..... | 4-4 |
| 4.3 Mise en place des essais de toxicité..... | 4-4 |
| 4.3.1 Objectif..... | 4-4 |
| 4.3.2 Documentation sur les essais de toxicité..... | 4-4 |
| 4.3.3 Mise en place et modifications apportées aux essais de toxicité..... | 4-4 |
| 4.3.4 Procédure d'Opération Normalisée..... | 4-7 |
| 4.3.5 Application de la PON et résultats obtenus..... | 4-7 |
| 5. Revue bibliographique sur la manipulation des échantillons de sédiments destinés à une caractérisation physico-chimique et biologique..... | 5-8 |
| 5.1 Introduction..... | 5-8 |
| 5.2 Prélèvement et transport..... | 5-8 |
| 5.2.1 Collecte de sédiments..... | 5-8 |
| 5.2.2 Transport de sédiments..... | 5-9 |
| 5.2.3 Type de contenants..... | 5-10 |
| 5.2.4 Techniques de conservation..... | 5-10 |
| 5.2.5 Durées de conservation..... | 5-11 |
| 5.3 Manipulation au laboratoire..... | 5-12 |
| 5.3.1 Homogénéisation des sédiments..... | 5-12 |
| 5.3.2 Enrichissement des sédiments ("spiking")..... | 5-13 |
| 5.3.3 Tamisage des sédiments..... | 5-13 |
| 5.3.4 Stérilisation des sédiments..... | 5-14 |
| 5.3.5 Dilution des sédiments..... | 5-15 |

| | |
|---|------|
| 5.4 Caractérisation chimique | 5-16 |
| 5.5 Recommandations minimales sur la manipulation des sédiments | 5-16 |
| 6. Références bibliographiques | 6-1 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|-------------|---|------|
| Tableau 3-1 | Chronologie de la mise en culture et action posée en réponse aux observations effectuées sur nos cultures..... | 3-7 |
| Tableau 3-2 | Chironomus, comparaison des protocoles ASTM 1990 / 1995 | 3-9 |
| Tableau 3-3 | Chironomus, comparaison des protocoles ASTM 1995 / USEPA 1994 / Nebeker et al. 1984 / Environnement Canada (preview to final manuscript)..... | 3-10 |
| Tableau 4-1 | Hyalella, comparaison des protocoles ASTM 1990 / 1995 | 4-5 |
| Tableau 4-2 | Hyalella, comparaison des protocoles ASTM 1995 / USEPA 1994 / Nebeker et al. 1984 / Environnement Canada (preview to final manuscript)..... | 4-6 |
| Tableau 5-1 | Avantages et inconvénients des principales techniques d'échantillonnage | 5-8 |
| Tableau 5-2 | Méthodes appliquées pour stériliser les sédiments (enlever, inhiber la croissance ou tuer les organismes)..... | 5-16 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|---|
| Annexe 1: Procédure de mise en culture de <i>Hyalella azteca</i> | A |
| Annexe 2: Procédure de mise en culture de <i>Chironomus tentans</i> | B |
| Annexe 3: Méthode d'essai de toxicité avec <i>Hyalella azteca</i> | C |
| Annexe 4: Méthode d'essai de toxicité avec <i>Chironomus tentans</i> | D |

SOMMAIRE EXECUTIF

Dans le cadre d'un projet de coopération scientifique et technique entre la France et le Québec, Analex a reçu mandat de la part de l'Agence de L'eau Rhin-Meuse de réaliser une étude portant sur trois volets: Le premier volet visait à mettre en place et à réaliser des essais de toxicité sur sédiment entier; le second volet a pour objectif de sélectionner et de mettre en oeuvre des tests de comportement de la contamination dans une matrice sédimentaire; le troisième volet vise quant à lui à proposer une démarche d'évaluation des sédiments contaminés.

Ce rapport d'étape, qui porte exclusivement sur le volet 1 de l'étude, a pour but de faire le point sur l'état des connaissances acquises au cours de la première étape du projet. Ces connaissances et données préliminaires recueillies à la suite d'une revue de littérature et des manipulations de laboratoire portent principalement sur la manipulations, le stockage et le traitement des sédiments et des cultures d'organismes retenus dans la perspective d'une évaluation de leur toxicité.

1. Introduction

La contamination des sédiments par les activités anthropogéniques est indéniable. Le développement des activités industrielles, de pair avec le développement démographique, a entraîné une contamination des cours d'eau et des sédiments des zones avoisinantes. Dans une perspective de gestion, les responsables de l'environnement doivent avoir à leur disposition des outils d'évaluation leur permettant de déterminer le niveau de toxicité des sédiments contaminés.

Historiquement, l'évaluation de la contamination s'est appuyée sur les seuls outils alors disponibles, à savoir les analyses chimiques. Ces outils quantitatifs, basés sur la comparaison à des valeurs normatives prédéterminées, ont cependant leurs limites, que le développement relativement récent d'outils biologiques permet désormais de dépasser.

Basée sur la détermination des concentrations totales de contaminants, la caractérisation physico-chimique d'un sédiment n'est pas suffisante pour déterminer son degré de toxicité. En effet, la présence d'éléments toxiques ne suffit pas à elle seule à provoquer une réponse toxique chez les organismes du milieu récepteur. Le potentiel toxique de ces composés vis à vis des organismes vivants dépend de nombreux facteurs (disponibilité, bioaccumulation, biodégradation, ...) que, dans la majorité des cas, les déterminations chimiques ne sont pas en mesure de prédire. C'est dans cette optique que les travaux menés depuis une dizaine d'années sur l'utilisation des essais de toxicité ont été orientés.

Qu'il s'agisse d'analyses chimiques ou d'essais de toxicité, les étapes suivies dans un processus d'évaluation de sédiments sont susceptibles d'interférer avec les mesures effectuées en laboratoire. Pour ne citer que les principales, l'échantillonnage, le transport en laboratoire, le stockage ou la préparation de ces sédiments induisent des modifications sur les structures et caractéristiques originelles des sédiments. Malgré le fait que les analyses de laboratoire sur sédiments entiers ne reflètent donc pas exactement les conditions du milieu, elles sont cependant un outil très utile pour mesurer les effets toxiques potentiels des contaminants en conditions contrôlées (7048).

La biodisponibilité des contaminants présents, dans les sédiments est un facteur déterminant dans l'expression de la toxicité. Cependant, elle ne peut être directement prédite par des tests sur la fraction aqueuse extraite du sédiment entier (7035). En effet, certains contaminants, notamment ceux qui sont non solubles dans l'eau, peuvent être adsorbés sur la matière particulaire ou organique de la matrice, et de ce fait sont "piégés" au sein de la matrice solide. En conséquence, l'utilisation d'essai sur la seule phase aqueuse présente certaines limites que des objectifs de gestion doivent prendre en compte. Le choix des essais de toxicité doit prendre en compte les objectifs de l'évaluation recherchée, et doit donc reposer sur une sélection appropriée du type d'essai à réaliser en fonction des objectifs de gestion.

Dans le cadre de ce projet, le choix des outils d'évaluation a fait l'objet de plusieurs mois de concertation entre les partenaires français et québécois. Il en est résulté un document préparatoire à partir duquel deux essais de toxicité ont été retenus. Ces deux essais utilisent les espèces *Hyallolella azteca* et *Chironomus tentans*, deux organismes benthiques résidents à la surface (épibenthique) ou au sein même (endobenthique) de la matrice sédimentaire.

Au delà du choix des essais de toxicité, Analex a réalisé une synthèse bibliographique portant sur les conditions d'applicabilité des tests de toxicité en regard des manipulations préalables nécessités par l'échantillonnage et le stockage des matériaux à évaluer.

La suite de ce rapport présente successivement les résultats des manipulations de laboratoire réalisées par Analex au cours des mois passés, ainsi que le résultat de la recherche bibliographique portant sur la manipulation des sédiments depuis leur prélèvement jusqu'à leur analyse.

2. Développement des essais de toxicité

2.1 Rappels sur la sélection des essais retenus

2.1.1 Mise en garde sur le choix des méthodes utilisée

Lors du choix des méthodes retenues par le groupe de travail (Agence de l'eau - MEF - Analex), seuls les méthodes reconnues et publiées avaient été prises en compte. La méthode retenue avait été celle de l'ASTM. En 1995, soit quelques semaines après le dépôt du choix, Environnement Canada publiait une méthode d'essai de toxicité avec *Hyallela azteca*. L'examen de cette nouvelle méthode révéla un certain nombre d'améliorations qui suscita une remise en question du choix initial. Après consultation des partenaires du projet, il fut donc décidé (octobre 1995) d'écarter le protocole de l'ASTM au profit de celui d'Environnement Canada (automne 1995).

Les travaux reliés à cette phase du projet ont été initié par Analex en mai 1995. Suite à une revue bibliographique complémentaire à celle déjà réalisé par les partenaires du projet, la commande du matériel requis pour l'implantation des cultures a été été acheminée au laboratoire à la fin du mois de mai. Les essais de mise en culture ont débuté dans les premiers jours de juin.

Suite à l'arrivée de Mme Corinne Bonnet, stagiaire doctorale au CEMAGREF de Lyon, plusieurs variantes et essais ont été essayées afin d'optimiser la production des organismes. Le cycle de vie des organismes étant relativement long, ces essais ont nécessité une période relativement plus longue qu'initialement prévu.

Le détail des manipulations et des différentes options a été consigné sur des registres de laboratoire disponibles sur demande. L'ensemble de ces manipulation a permis à Analex de rédiger des procédure d'opération standardisée (POS) présentées en annexe.

3. Implantation de l'essai de toxicité avec *Chironomus tentans*

3.1 Résumé du chapitre

Les travaux reliés à cette phase du projet ont été initiés par Analex en parallèle à ceux réalisés pour la mise en culture de *Hyallolella azteca*. Comme dans le cas de *Hyallolella azteca*, la méthode initialement retenue était celle publiée par l'ASTM. En 1995, soit quelques semaines après le dépôt du choix, Environnement Canada publiait une méthode d'essai de toxicité avec *Chironomus tentans*. Après consultation des partenaires du projet, il fut donc décidé d'écartier le protocole de l'ASTM au profit de celui d'Environnement Canada (automne 1995). À partir du protocole publié, Analex a donc mis au point une procédure d'opération standardisée (POS) présentée en Annexe 4. Tout comme pour l'essai avec *Hyallolella azteca*, les essais sur *Chironomus tentans* ont été mis en oeuvre en suivant le protocole publié par Environnement Canada en 1995. Le détail des manipulations et des différentes options a été consigné sur un registre de laboratoire disponible sur demande. L'ensemble de ces manipulations a permis à Analex de rédiger une procédure d'opération standardisée (POS) qui est présentée à l'Annexe 3.

3.2 Mise en place des cultures

3.2.1 Objectif

L'objectif poursuivi était d'obtenir le plus rapidement et le plus efficacement, de façon continue, des organismes producteurs en bonne santé de manière à disposer, en tout temps, d'un pool d'organismes de mêmes caractéristiques pour l'application des bioessais.

3.2.2 Documentation sur les organismes

Tout en mettant en place les cultures, des données ont été collectées sur les Chironomides et plus particulièrement sur l'espèce retenue: *Chironomus tentans*, cela afin de comprendre et de maîtriser au mieux les phénomènes se déroulant dans nos cultures, tout au long de l'élevage.

Chironomus tentans est un moucheron très répandu dont le cycle de vie est assez court (24 à 28 jours à 20°C); il est facile à élever en laboratoire (entretien rapide, bons taux de survie et de croissance...) et qu'il est en contact direct avec le sédiment, lors de sa phase larvaire, lorsqu'il creuse les galeries dans lesquelles il vit. Toutes ces caractéristiques en font un organisme très intéressant dans un contexte d'évaluation biologique de risque écotoxicologique au niveau des sédiments.

Le cycle de vie des chironomides se subdivise en trois stades distincts: le stade larvaire aquatique au contact du sédiment, le stade pupal où les individus préparent leur émergence et le stade adulte aérien sous forme de moucheron. À 20 °C, les oeufs pondus par les femelles éclosent trois jours après leur dépôt dans l'eau et l'émergence des adultes a lieu 24 à 28 jours après cette éclosion.

Pour de plus amples renseignements sur *Chironomus tentans* il faut se rapporter au document ci-joint « *Chironomus tentans* » qui traite de la biologie et l'écologie de ces organismes et qui fournit des références bibliographiques.

3.2.3 Mise en place des cultures

La première culture a été lancée en suivant le protocole ASTM (1995). Après quelques semaines, c'est le protocole d'Environnement Canada qui a été appliqué (preview to final manuscript). Nous avons toujours essayé de nous en tenir aux principes de base de ces protocoles, exception faite des optimisations appliquées aux contexte spécifique rencontré chez Analex (équipement, disponibilité du personnel, etc...) qui ont eu lieu au cours du temps.

Les organismes provenaient de la compagnie Aquatic Research Organisms, PO Box 1271, One Lafayette Road, Hampton, NH 03842, USA (tel: 603 926-1650).

En raison de leur plus grande maniabilité et de leur sensibilité moindre, les organismes étaient commandés sous la forme de masse d'oeufs (une masse est un ensemble d'oeufs pondu par une femelle). Dès leur réception, les masses étaient progressivement acclimatées à l'eau de source que nous utilisons pour les cultures (l'analyse et la composition de cette eau sont fournies dans l'Annexe n°1).

Juste après leur éclosion les 4 masses étaient déposées dans un aquarium de 20 l contenant 8 l d'eau de source et ayant comme substrat du papier brun malaxé. La température des aquariums était maintenu à 20°C, l'aération était réalisée grâce à une pipette pasteur alimentée par le système d'aération des culture du laboratoire, l'eau était changée hebdomadairement et les paramètres de cultures (pH, Oxygène dissous, température et conductivité) étaient mesurés régulièrement. La nourriture était fournie sous forme de Tétramin® (paillettes pour poissons) broyé et tamisé à 225 µm puis mélangé à de l'eau purifiée dans un ration de 100 g/l.

3.2.4 Suivi et modification du procédé de culture

Le comportement des organismes dans notre première culture comme dans les suivantes nous a permis d'affiner notre technique d'élevage. Pour chaque aquarium, nous mesurons les paramètres du milieu, observions le comportement des larves et des pupes, suivions l'émergence des adultes mâles et femelles et la production des masses.

3.2.4.1 Suivi du premier aquarium

Nous avons rapidement constaté que les organismes se développaient assez lentement et étaient peu visibles dans le substrat de type papier où ils disparaissaient totalement. Le protocole ASTM préconisait de mettre 2 à 3 masses dans un aquarium de même contenance que le nôtre. Ayant choisi de placer 4 masses par aquatium, nous avons supposé que les animaux étaient trop nombreux pour

l'espace et la quantité de nourriture effectivement disponibles. Afin d'accélérer leur croissance nous avons alors augmenté l'apport de nourriture, ce qui s'est traduit par la chute de la quantité d'oxygène dissous mesuré. Pour contourner cette difficulté, des changements d'eau journalier ont été effectués. Le début de l'émergence s'est stabilisé à 38 jours après l'éclosion des masses, soit avec, minimum, 10 jours de retard par rapport à des données trouvées dans la littérature.

3.2.4.2 Suivi des deux aquariums suivants

Deux masses étaient déposées par aquarium dans deux aquariums ayant des substrats différents. Le premier aquarium comportait toujours du papier brun broyé alors que le second utilisait de la silice comme substrat (diamètre moyen 0.25 mm). La réduction du nombre d'individus devrait éliminer les problèmes de compétition pour l'espace et la nourriture, de baisse des teneurs en oxygène dissous et de retard à l'émergence.

Nous avons alors constaté que dans l'aquarium utilisant la silice comme substrat, le début de l'émergence avait lieu 28 jours après l'éclosion des masses alors que dans celui utilisant le papier brun l'émergence avait lieu 37 jours après l'éclosion des masses. Les autres conditions d'élevage étant les mêmes pour les deux aquariums, nous avons conclu que le retard à l'émergence était principalement dû au substrat lui-même. Les raisons pouvant expliquer le développement plus rapide des organismes à la surface de la silice ont été attribuées à un accès plus facile à la nourriture que dans le papier brun broyé où les organismes pénètrent profondément alors que la nourriture se dépose en surface seulement. La culture maintenue sur papier a finalement été arrêtée peu de temps après le début de l'émergence car l'eau devenait blanchâtre et les larves mouraient.

3.2.4.3 Suivi des quatrième et cinquième aquariums

Pour confirmer l'intérêt de la silice, on décida de relancer un aquarium de 20 l contenant 8 l d'eau de source et deux masses écloses et un aquarium de 10 l contenant 4l d'eau de source et une masse éclosée. Une couche de 3 cm de silice a été déposée sur le fond de l'aquarium. Les premières émergences ont été observées entre le 30^{ième} et le 33^{ième} jour après l'éclosion. L'utilisation d'aquarium de 10 l pour l'élevage a été écarté car il demandait pratiquement autant de soin qu'un aquarium plus grand pour une production réduite de moitié. En outre, nous avons observé que les femelles émergentes issues du petit aquarium avait un abdomen beaucoup plus gros que celles recueillies d'habitude dans les aquariums de 20 l.

3.2.4.4 Suivi des aquariums 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12

Ces aquariums ont été menés avec un substrat siliceux dans les mêmes conditions que précédemment: aération douce, température de 20°C. Chacun d'eux nous permet d'affiner notre expérience pratique. Les sixième et septième aquariums démarrés à 2 jours d'intervalle nous ont permis de constater la sensibilité de nos organismes au manque de nourriture. Dès que les animaux manquaient de nourriture,

nous les observations en surface, morts et décolorés (ils sont normalement colorés en rouge par l'hémoglobine). A l'apparition de morts à la surface du sixième aquarium les quantités de nourriture ont été augmentées pour les deux aquariums simultanément. Le septième aquarium ne montrait pas de morts suspectes jusqu'à l'émergence. Les émergences de ces 2 aquariums ont débuté entre le 30^{ième} (pour l'aquarium où il y a eu des morts et donc moins de compétition pour la nourriture) et le 33^{ième} jour après l'éclosion des oeufs. Les effets du manque de nourriture ont été observés sur d'autres aquariums et confirment nos résultats. Dès que les organismes paraissaient à la recherche de nourriture même quelques heures après notre apport journalier, nous augmentions la quantité de nourriture.

Les aquariums 6, 7, 8, 9 et 10 avaient des teneurs en oxygène qui évoluaient au cours du temps et que nous considérons comme non satisfaisantes quand les organismes atteignaient l'émergence (en moyenne 60 % d'oxygène dissous dans l'eau contre des recommandations supérieures à 80%). Afin de maîtriser les teneurs en oxygène dissous, nous avons essayé de modifier le type d'apport de nourriture. En effet la nourriture est apportée en mélange avec de l'eau et comporte de la matière organique dissoute qui, consommée par les microorganismes au même titre que l'oxygène, peut indirectement être l'une des causes de la baisse de la teneur en oxygène dissous.

Par rapport aux aquariums 8, 9 et 10 où les organismes étaient nourris avec du Tétramin® broyé apporté sous forme de mélange dans de l'eau, l'aquarium 11 a été alimenté avec du Tétramin® en poudre apporté directement à la surface de l'aquarium. On observa alors un retard non négligeable de ce dernier aquarium à l'émergence: le délai d'émergence était de 36 jours pour l'aquarium 11 contre 28 à 30 jours pour les aquariums 8, 9 et 10. De plus, les valeurs en oxygène dissous évoluaient de la même façon dans tous les aquariums, nous permettant de supposer que l'apport de nourriture sous la forme d'un mélange aqueux n'influçait pas, même indirectement, la teneur en oxygène dissous de l'eau de nos aquariums. Par contre, l'apport de nourriture en poudre, à la surface de l'eau, n'est pas conseillée car elle semble moins disponible aux organismes.

Nous avons alors décidé de modifier le type d'aération afin d'observer l'effet que cela peut avoir sur la teneur en oxygène dissous. Alors que pour les aquariums précédents on utilisait une pipette pasteur pour fournir une aération douce, dans l'aquarium 12 on utilisa une pierre à oxygène. Dans cet aquarium, l'émergence a commencée 27 jours après l'éclosion des masses et la teneur en oxygène dissous y était supérieure de 1 mg/l pour les écarts les moins marqués à 4 mg/l pour les plus visibles (cela passait du simple au double), par rapport aux autres aquariums. L'aération avec une pierre est plus souhaitable qu'avec une pipette même si l'eau est mélangée plus énergiquement.

3.2.4.5 Suivi des aquariums 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 et 21

Suite à l'expérience acquise sur les douze premiers aquariums, on appliqua les protocoles d'élevage et de test proposés par Environnement Canada. Les raisons de ce choix sont exposées ultérieurement (dans le chapitre bioessais).

Pour tous ces aquariums, la température a été portée à 23°C. Un effet immédiat s'est fait sentir sur le délai d'émergence qui passa de 29 jours en moyenne pour nos aquariums maintenus à 20°C à 19 jours pour nos aquariums maintenus à 23°C.

Ces aquariums étaient aérés avec des pierres à oxygène. On remarqua que la teneur en oxygène était supérieure aux aquariums aérés avec des pipettes. À l'approche de la période d'émergence, les organismes étaient nettement plus gros et très nombreux et l'apport de nourriture a été ajusté en conséquence. Cette augmentation de quantité de nourriture s'est traduite par une difficulté à maintenir des teneurs en oxygène dissous supérieures à 80 %.

Afin de déterminer si le taux de renouvellement de l'eau pouvait avoir un effet sur la teneur en oxygène dissous, deux aquariums (18 et 19) ont été mis en place. L'eau y était renouvelée tous les jours dans le premier alors que dans le second l'eau n'était changée qu'à chaque semaine. L'évolution de la teneur en oxygène dissous de ces deux aquariums s'est faite de la même manière et les changements d'eau journaliers ne semblaient pas améliorer la teneur en oxygène de l'eau. Par contre, nous avons observé que l'émergence elle était retardée de 4 jours dans l'aquarium où l'eau était changée quotidiennement par rapport à celle de l'aquarium où l'eau n'était renouvelée qu'à chaque semaine.

Le substrat des aquariums 18 et 19 était constitué d'une silice plus fine (0.15 mm en moyenne contre 0.25 mm pour tous les autres aquariums). Pour l'aquarium 19 qui est entretenu de manière similaire aux autres aquariums le délai d'émergence était identique (19 jours). Ainsi la taille de la silice n'a pas semblé avoir d'effet significatif sur le développement des organismes.

Dans les aquariums 20 et 21, le suivi en continu de la teneur en oxygène dissous a permis d'ajuster le débit d'aération à l'aide d'une valve installée au départ de la pierre d'aération. L'eau était brassée un peu plus vigoureusement mais les organismes étant plus âgés et installés dans leurs fourreaux ne semblaient pas perturbés par cette agitation. Cette technique nous a permis de maintenir une teneur en oxygène dissous toujours supérieure à 80 % et la plupart du temps supérieure à 90 %.

3.2.4.6 Conclusion sur la mise en culture des Chironomus

Généralement les aquariums produisent une série d'adultes à partir de 2 masses et sont arrêtés lorsque la production des adultes est finie. Avec l'optimisation des conditions d'élevage, nous avons été en mesure de maintenir nos cultures pendant plusieurs mois avec des conditions de milieux satisfaisantes et une

production d'adultes (et donc de larves pour les tests) continue sur plusieurs mois, avec un seul aquarium source, permettant une réduction de la charge de travail et un gain de temps, de place et de matériel. Un essai a débuté avec l'aquarium 15 (depuis maintenant 9 mois) et les aquariums 20 et 22 (depuis 7 mois). Les résultats obtenus avec l'aquarium 15 sont concluants à ce jour: les paramètres sont tous à l'intérieur de limites acceptables, l'aquarium produit en moyenne 20 adultes par jour et une masse éclosie est introduite tous les 10 jours pour maintenir le processus de reproduction en continu.

Le Tableau 3-1 retrace l'évolution du protocole d'entretien des cultures jusqu'à ce jour.

Tableau 3-1 Chronologie de la mise en culture et action posée en réponse aux observations effectuées sur nos cultures

| Observation | Solution proposée | Résultat obtenu | Correction apportée |
|--|---|---|---|
| Délais d'émergence assez long | Changer de substrat: passer du papier brun broyé à la silice | Le délai d'émergence passe de 38 j à 28 j | Choix du substrat silice dans les cultures |
| Impact du type de chambre d'élevage | Comparer le délai d'émergence, le comportement et l'aspect des individus dans des chambre d'élevage de 10 et 20 l. | Le délai d'émergence est sensiblement le même mais la production d'émergeant dans la petite chambre d'essai est plus faible pour des manipulations qui restent tout aussi lourdes. | On utilise des chambres d'élevage de contenance 20 l avec 8 l d'eau et 3 cm de substrat |
| Mortalité dans certains aquariums | Modifier la quantité de nourriture en fonction du comportement des organismes et de leur taille | Mortalité contrôlée | La nourriture est apportée en fonction du comportement des organismes et de leur taille |
| Teneur en oxygène basse | Modifier le type d'apport de nourriture pour jouer indirectement sur la teneur en oxygène en faisant chuter la MO dissoute disponible | L'apport direct de nourriture sous forme particulière a un effet négatif sur le délai d'émergence. La nourriture apportée sous forme mélangée avec un liquide est plus facilement disponible aux organismes | La nourriture est apportée sous la forme d'un mélange de Tétramin broyé et d'eau de source |
| Teneur en oxygène basse | Changer de type d'aération: passer de la pipette pasteur à la pierre d'aération | Le changement du type d'aération a un effet positif sur le délai d'émergence | Maintenir une aération douce avec des pierres à oxygène |
| Teneur en oxygène basse durant la période précédant l'émergence | Augmenter les renouvellements d'eau | Les changements d'eau journaliers ont un effet négatif sur le délai d'émergence et entraîne un surcroit de travail | Maintenir un changement d'eau hebdomadaire |
| Teneur en oxygène basse durant la période précédant l'émergence | Augmenter le débit de l'air | L'augmentation de débit de l'air a un effet positif sur le délai d'émergence | Régler le débit en fonction des mesures en oxygène dissous |
| Effet de la taille de la silice sur le délai d'émergence | Etudier 2 type de silice : - diamètre 0.25 mm. - diamètre 0.15 mm | Pour ces deux taille de silice il n'y a pas d'effet sur le délai d'émergence | Utiliser la silice 0.25 mm comme substrat |
| Effet de la température | Etudier le délai d'émergence à 20°C et à 23°C | Le délai d'émergence est réduit de 29 à 19 jours lors que la température passe de 20°C à 23°C | Maintenir nos aquariums à 23°C |
| Durée d'utilisation des aquariums | Produire en continu des individus afin d'optimiser la charge de travail, de gagner du temps, de la place et de diminuer la quantité de matériel utilisé | Les paramètres mesurés sur l'eau sont satisfaisants et l'émergence a lieu en continue | Utiliser un aquarium que l'on laisse tourner en continu sur plusieurs mois |

3.2.5 Procédure d'Opération Normalisée

A partir du protocole de l'ASTM (1995) puis de celui d'Environnement Canada (preview to final manuscript, 1995) nous avons optimisé nos conditions d'élevage et avons abouti à la rédaction d'une Procédure d'Opération Normalisée pour la culture de *Chironomus tentans*. Cette dernière est fournie dans le document ci-joint « Protocoles optimisés » du volet I.

3.3 Mise en place des essais

3.3.1 Objectif

L'objectif de cette phase était de mettre en place et maîtriser un essai de toxicité utilisant *Chironomus tentans* comme organisme test pour effectuer des analyses écotoxicologiques sur des sédiments entiers.

3.3.2 Documentation sur les bioessais

L'utilisation des *Chironomus* pour déterminer la toxicité d'un sédiment et en faire le suivi sur une période plus ou moins longue s'est fortement développée ces dernières années sur le continent Américain. Des normes ont été éditées aussi bien par l'ASTM et l'USEPA que par Environnement Canada. Plusieurs équipes de recherche ont mené des études en proposant des protocoles et des mesures terminales variables. Pour de plus amples renseignements sur l'utilisation de *Chironomus tentans* en tant qu'indicateur biologique de toxicité il faut se reporter au document ci-joint « *Chironomus tentans* ».

3.3.3 Mise en place et modifications apportées aux essais de toxicité

Lors de la sélection préliminaire des biotests applicables sur sédiment entier, en utilisant les fiches signalétiques et en appliquant les grilles d'évaluation du rapport de messieurs Bastien et Martel, le protocole ASTM 1990 utilisant *Chironomus tentans* a été choisi. A la parution du protocole ASTM 1995 les 2 protocoles ont été comparés en utilisant les mêmes fiches (signalétiques et de cotation). Aucune différence n'est observable entre les deux protocoles car les deux documents se réfèrent aux mêmes auteurs et proposent donc une approche similaire pour les tests. Cependant le document ASTM 1995 offre plus de choix car il contient de nouvelles références dont une qu'il recommande (USEPA 1994) et il est globalement plus descriptif et plus précis sur les techniques de culture et sur les tests de toxicité.

Le Tableau 3-1 synthétise les principales caractéristiques de ces deux protocoles (ASTM 1990/ 1995) et signale les différences existantes entre eux.

Tableau 3-2 Chironomus, comparaison des protocoles ASTM 1990 / 1995

| Document ASTM 1990 | Document ASTM 1995. |
|--------------------|---------------------|
|--------------------|---------------------|

ELEVAGE

| Protocole peu précis | Protocole assez précis |
|----------------------|------------------------|
|----------------------|------------------------|

Nourriture

| | |
|------------------------|------------------------|
| Tétramin ®, Cérophyl ® | Tétramin ®, Cérophyl ® |
|------------------------|------------------------|

Eau / renouvellement

| | |
|---------------------|---------------------|
| Statique, Renouvelé | Statique, Renouvelé |
|---------------------|---------------------|

Support

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| Papier essui-tout brun | Sable, Papier essui-tout brun |
|------------------------|-------------------------------|

Aération

| | |
|-----|-----|
| Oui | Oui |
|-----|-----|

Isolement des jeunes

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Fonction de la taille (tamisage) | Fonction de la taille et de l'âge |
|----------------------------------|-----------------------------------|

ESSAI

Durée d'exposition

| | |
|----------|----------|
| 10 -25 j | 10 -17 j |
|----------|----------|

Température

| | |
|-----------|-----------|
| 20 - 25°C | 20 - 25°C |
|-----------|-----------|

Nombre d'organisme / dilution

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| 20 - 25 (2 à 4 réplicats) | 10 - 25 (2 à 15 réplicats) |
|---------------------------|----------------------------|

Nombre de dilution

| | |
|----------------|----------------|
| 1 ou plusieurs | 1 ou plusieurs |
|----------------|----------------|

Eau / Renouvellement

| | |
|---------------------|---------------------|
| Statique, Renouvelé | Statique, Renouvelé |
|---------------------|---------------------|

Enceintes expérimentales

| | |
|-----------------------|---|
| Aquariums de 3 à 20 l | Béchers de 1 l, 2 l, 3 l, 50 ml, 300 ml |
|-----------------------|---|

SEDIMENTS

Sédiment test: quantité

| | |
|-----|-----|
| 2 l | 1 l |
|-----|-----|

Sédiment test: conservation

| | |
|-------------------|-------------------|
| 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C |
|-------------------|-------------------|

Sédiment test: préparation

| | |
|----------|------------------------------------|
| Tamisage | Tamisage, rayon gamma, congélation |
|----------|------------------------------------|

Sédiment contrôle: type

| | |
|------------|-----------------------------|
| Peu défini | Naturel, Reconstitué, Spiké |
|------------|-----------------------------|

Sédiment contrôle: quantité

| | |
|---|-------------------------------|
| ? | 600 ml (naturel), 3 l (spiké) |
|---|-------------------------------|

Sédiment contrôle: conservation

| | |
|------|-----------|
| 4 °C | Sec. 4 °C |
|------|-----------|

Sédiment contrôle:préparation

| | |
|---|------------------------------|
| ? | Fonction du type de sédiment |
|---|------------------------------|

EAU

Eau superficielle

| | |
|---------------|-------------------------|
| Eau d'élevage | Naturelle, Reconstituée |
|---------------|-------------------------|

TOXIQUE DE REFERENCE

Qualification

| | |
|---|--|
| ? | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ |
|---|--|

Le protocole ASTM (1995) se base sur différentes techniques et laisse la manoeuvre assez libre pour le choix du test. Parmi les recommandations de l'ASTM il y a le protocole USEPA (1994) et celui de Nebeker *et al.* (1984). Pour des raisons techniques (température, renouvellement d'eau...) nous avons choisit pour nos premiers essais le protocole de Nebeker *et al.* (1984).

Après application de ce protocole sur 3 séries d'essais, nous avons pu constater de la lourdeur des essais: nous utilisons des volumes de 800 ml d'eau et de 200 ml de sédiment, soit des récipients de 1.4 l. Cela nous limite dans le nombre de concentration réalisables pour le toxique de référence (5 maximum) et dans le nombre de réplicats applicables aux essais (4 maximums). Le temps de préparation, d'entretien puis de lecture de nos tests est aussi très important.

Suite à cette série de résultats nous avons décidé de modifier notre protocole et d'appliquer celui d'Environnement Canada car il permet: d'utiliser des volumes plus petits, d'augmenter la température, de travailler en statique et de travailler avec des organismes plus jeunes (et plus sensibles).

Le Tableau 3-3 synthétise les principaux points communs et les différences existants entre l'ASTM (1995) incluant l'USEPA (1994) et Nebeker *et al.* (1984) et Environnement Canada (preview to final manuscript).

Tableau 3-3 Chironomus, comparaison des protocoles ASTM 1995 / USEPA 1994 / Nebeker et al. 1984 / Environnement Canada (preview to final manuscript)

| Document . ASTM 1995 | Document. USEPA 1994 | Document . Nebeker et al. 1984 | Document. Environnement Canada (preview to final manuscript 1995) |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---|
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---|

ELEVAGE

Température

Nourriture

Eau /

Renouvellement

Substrat

Isolement des

jeunes

| | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 20 à 23 °C | 23 °C | 20 °C | 23 °C |
| Tétramin ® ou Cerophyl ® | Tétramin ® | Tétramin ® | Tétramin ® |
| Statique ou Renouvelé | Statique ou Renouvelé | Statique ou Renouvelé | Statique ou Renouvelé |
| Sable, Papier essui-tout brun | Sable, Papier essui-tout brun | Sable, Papier essui-tout brun | Sable, Papier essui-tout brun |
| Fonction de la taille et de l'âge | Fonction de la taille et de l'âge | Fonction de la taille (tamisage) | Fonction de la taille et de l'âge |

ESSAI

Température

Durée du test

Age des
organismes

Nombre
d'organisme /
dilution

Eau /
Renouvellement

Enceintes
expérimentales

Aération

| | | | |
|---|-----------------|----------------------------------|---|
| 20 à 23 °C | 23 °C | 20 °C | 23 °C |
| 10 à 17 j | 10 j | 10 j | 10 j |
| 10 j | 10 j | 10 j | 4 à 8 j d'âge (second state larvaire) |
| 10 - 25 (2 à 15 réplicats) | 10 (8 réplcats) | 15 (réplicats non référéncés) | 10 (5 réplcats) |
| Statique ou Renouvelé | Renouvelé | Statique | Statique ou Renouvelé |
| Bécher de 1 l, 2 l, 3 l, 50 ml, 300 ml | Bécher 300 ml | Bécher 1 l | Bécher 300 ml |
| Oui / Non | Non | Oui | Oui / Non |

SEDIMENTS

Sédiment test:
quantité

Sédiment test:
conservation

Sédiment contrôle:
type

| | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 50 à 1500 ml | 100 ml | 200 ml | 100 ml |
| 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C |
| Naturel, Reconstitué, Spiké | Naturel, Reconstitué, Spiké | Naturel, Reconstitué, Spiké | Naturel, Reconstitué, Spiké |

EAU

Eau superficielle

| | | | |
|------------|------------|---------------|------------|
| Naturelle, | Naturelle, | Eau d'élevage | Naturelle, |
|------------|------------|---------------|------------|

| Document . ASTM 1995 | Document. USEPA 1994 | Document . Nebeker et al. 1984 | Document. Environnement Canada (preview to final manuscript 1995) |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---|
| Reconstituée | Reconstituée | | Reconstituée |
| 175 à 2000 ml | 175 ml | 800 ml | 175 ml |

Eau test: quantité

TOXIQUE DE REFERENCE

Qualification

| | | | |
|---|---|---|---|
| NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ |
|---|---|---|---|

3.3.4 Procédure d'Opération Normalisée

A partir du protocole de l'ASTM (1995) puis de celui d'Environnement Canada (preview to final manuscript) nous avons optimisé nos conditions de test et avons abouti à la rédaction d'une Procédure d'Opération Normalisée pour les essais de toxicité sur sédiment entier avec *Chironomus tentans*. Cette dernière est fournie dans le document ci-joint « Protocoles optimisés » du volet I.

3.3.5 Application de la PON et résultats obtenus

3.3.5.1 Toxique de référence et carte de contrôle

Le toxique de référence utilisé est le CuSO₄. Sur les 5 essais déjà réalisés, 2 n'ont pas pu permettre de calculer la CL50 et les 3 autres valeurs de CL50 vont de 800 µg de Cu/l à 1375 µg de Cu/l. La dernière mise à jour de la carte de contrôle est fournie en annexe.

3.3.5.2 - Essais sur sédiment

Le sédiment de référence que nous utilisons est de la silice de taille moyenne 0.25 mm. Les tests menés sur cette silice nous donnent des survies supérieures à 70 % au bout de 10 jours et un poids moyen pour les organismes supérieur à 1 mg. Notre référence est acceptable selon les recommandation d'Environnement Canada (mortalité du témoins < 30% et poids moyen des organismes témoins > 0.6 mg).

Deux tests préliminaires sur sédiments ont déjà été testés, ils ne révélaient pas de toxicité significative pour les *Chironomus*. Les feuilles de résultat sont fournies à l'Annexe n°2.

4. Implantation de l'essai de toxicité avec *Hyaella azteca*

4.1 Résumé du chapitre

Les travaux reliés à cette phase du projet ont été initiés par Analex en parallèle à ceux réalisés pour la mise en culture de *Chironomus tentans*. La méthode initialement retenue était celle publiée par l'ASTM. En 1995, soit quelques semaines après le dépôt du choix, Environnement Canada publiait une méthode d'essai de toxicité avec *Hyaella azteca*. Après consultation des partenaires du projet, il fut donc décidé d'écarter le protocole de l'ASTM au profit de celui d'Environnement Canada (automne 1995). À partir du protocole publié, Analex a donc mis au point une procédure d'opération standardisée (POS) présentée en Annexe 4. Tout comme pour l'essai avec *Chironomus tentans*, les essais sur *Hyaella azteca* ont été mis en œuvre en suivant le protocole publié par Environnement Canada en 1995. Le détail des manipulations et des différentes options a été consigné sur un registre de laboratoire disponible sur demande. L'ensemble de ces manipulations a permis à Analex de rédiger une procédure d'opération standardisée (POS) qui est présentée à l'Annexe 3.

4.2 Mise en culture des organismes

4.2.1 Objectif

Notre objectif était d'obtenir rapidement et sur une base régulière des jeunes *Hyaella* à partir de parents producteurs en bonne santé de manière à disposer, en tout temps, d'un pool de jeunes de mêmes caractéristiques pour l'application des essais de toxicité.

4.2.2 Documentation sur les organismes

Tout en mettant en place les cultures, des données ont été collectées sur les Amphipodes et plus particulièrement sur l'espèce retenue, soit *Hyaella azteca*. Notre objectif étant de comprendre et de maîtriser les phénomènes biologiques se déroulant dans nos aquariums, tout au long de l'élevage.

Hyaella azteca est l'amphipode le plus largement distribué en Amérique du nord, il est ubiquiste dans la plupart des corps d'eau dont la température moyenne est supérieure à 10°C. *Hyaella azteca* est un détritivore épibenthique qui creuse des galeries à la surface des sédiments et qui digère les bactéries et les algues présentes sur le sédiment ingéré.

En tant qu'organisme test, *Hyaella azteca* a plusieurs caractéristiques intéressantes: temps de génération court (cycle de vie de 12 à 14 semaines à 25 °C), facilement transférable du terrain au laboratoire, d'élevage facile (temps d'entretien et manipulations réduits), écologiquement significatif et sensibilité à la contamination. De plus *Hyaella azteca* peut être utilisé aussi bien pour tester des sédiments d'eau douce (lacs et rivières) que d'eau saumâtre (estuaires).

Le cycle de vie de *Hyaella azteca* est divisé en trois stades distincts: un stade immature (les 5 premières inter-mues), un stade juvénile (incluant les inter-mues 6 et 7) et un stade adulte (l'inter-mue 8 et les suivantes). Un cycle de vie complet se déroule, à 25°C, en 12 à 14 semaines. La période de reproduction commence quand *Hyaella azteca* est âgée de 5 à 6 semaines, atteint un pic à l'âge de 8 à 12 semaines et décroît avec le vieillissement des adultes.

Pour de plus amples renseignements sur *Hyaella azteca* le lecteur est invité à se référer au document ci-joint «*Hyaella azteca*» qui traite de la biologie et l'écologie de ces organismes et qui comporte des références bibliographiques.

4.2.3 Mise en place des cultures

La première culture a été lancée en suivant le protocole ASTM 1990). Progressivement, et pour des raisons similaires à celles exposées à propos de *Chironomus*, nous avons appliqué le protocole d'Environnement Canada (preview to final manuscript 1995). Nous avons toujours essayé de nous en tenir à ces protocoles exception faite des optimisations qui ont eu lieu au cours du temps.

Les organismes provenaient de la compagnie Aquatic Research Organisms, PO Box 1271, One Lafayette Road, Hampton, NH 03842, USA (tel: 603 926-1650). En raison de leur utilisation plus rapide les organismes étaient commandés sous la forme d'une culture hétérogène composée d'individus d'âge variable.

Dès leur réception, les individus étaient progressivement acclimatés à l'eau de source utilisée pour les cultures (l'analyse et la composition de cette eau sont fournies dans l'Annexe n°1). Les individus étaient séparés dans deux aquariums de 20 l, contenant 8 l d'eau de source et ayant comme substrat de la gaze de coton, sans tenir compte de leur taille ou de leur âge. L'aquarium était aéré doucement avec une pipette pasteur, l'eau était changée hebdomadairement et les paramètres de cultures (pH, oxygène dissous, température et conductivité) étaient suivis régulièrement.

4.2.4 Suivi et modification des cultures

Le comportement des organismes dans notre première culture comme dans les suivantes nous a permis d'affiner notre technique d'élevage.

Comme pour les élevages de *Chironomus*, nous mesurons les paramètres du milieu et observons le comportement des *Hyaella* dans nos aquariums d'élevage. Cette culture n'a pas posé de problème particulier mais certaines modifications ont été effectuées pour optimiser nos cultures et les manipulations à y appliquer.

La gaze utilisée comme substrat était initialement fixée sur un support (lame de microscope), elle est maintenant introduite dans les aquariums sous forme de morceaux libres dans l'eau (économie de manipulation et de temps) sans que nous n'ayons pu noter un d'effet sur la croissance des organismes).

L'apport de nourriture qui est laissé à la discrétion du manipulateur dans la bibliographie (Env Can et ASTM) a été modifié par rapport aux premiers essais. A l'origine on nourrissait les *Hyalella* avec des boulettes de nourriture pour lapin broyées et tamisées à 225 µm. Lors de la séparation des adultes (retenus sur un tamis de maille 1000 µm) et des juvéniles produits (retenus sur un tamis de maille 225 µm), de nombreux déchets et des particules de nourriture se retrouvaient piégées avec les juvéniles rendant leur repérage plus difficile. De plus, la charge en matière organique induisait une pollution des aquariums de stockage des juvéniles avant leur utilisation dans des tests ou pour le repiquage des cultures.

Plusieurs types de nourriture ont été testées, dont l'YCT (Yeast Cerophyl Trout, aliment liquide composé de Tétramin®, de levure et de Cerophyl®). Les animaux se comportent bien et les paramètres du milieu restent satisfaisants.

Après plusieurs tentatives, nous avons opté pour une alternance des deux apports de nourriture afin de mieux satisfaire les besoins en fonction de la taille et de l'âge des organismes. Nous donnons 1 jour sur 2 de l'YCT et l'autre jour de la nourriture pour lapin. Les paramètres du milieu étaient toujours excellents, les particules de nourriture étaient moins concentrées et nos adultes produisent des jeunes en continu.

Contrairement à une aération préconisée au départ avec pipette pasteur permettant d'obtenir un brassage très doux de l'eau, l'aération actuelle se fait par pierre à oxygène. Le risque que les organismes se prennent dans les bulles d'air et qu'ils meurent piégés à la surface de l'eau ne s'est jamais fait concrétisé, et nous n'avons constaté aucune perte significative d'individus causé par un mélange plus énergique par pierre à oxygène.

Trois mois après le lancement des premières cultures, nous avons appliqué les protocoles d'élevage et de test d'Environnement Canada pour des raisons qui étaient listées ultérieurement (dans le chapitre essais de toxicité).

La température d'élevage a été augmentée de 20°C à 23°C pour nous aligner sur la température de test et pour augmenter la production de jeunes (rendement de la culture). Nous avons attendu que les jeunes exposés à cette température deviennent adultes et produisent à leur tour des jeunes pour utiliser ces derniers dans nos essais de suivi de reproduction.

Depuis que toutes les conditions d'élevages sont définies, nous suivons le rendement hebdomadaire de production de nos adultes en nombre de jeunes.

4.2.5 Procédure d'Opération Normalisée

A partir du protocole de l'ASTM (1995) puis de celui d'Environnement Canada (preview to final manuscript 1995) nous avons optimisé nos conditions d'élevage et avons produit une Procédure d'Opération Normalisée pour la culture de *Hyaella azteca*. Cette dernière est fournie dans le document ci-joint « Protocoles optimisés » du volet I.

4.3 Mise en place des essais de toxicité

4.3.1 Objectif

Mettre en place et maîtriser un bioessai utilisant *Hyaella azteca* comme organisme test pour effectuer des analyses écotoxicologiques sur des sédiments entiers.

4.3.2 Documentation sur les essais de toxicité

L'utilisation de ces organismes pour déterminer le niveau de toxicité d'un sédiment s'est fortement développée ces dernières années sur le continent Américain. Des méthodes normalisées ou standardisées ont été publiées aussi bien par l'ASTM et l'USEPA que par Environnement Canada. Différentes études proposent des protocoles modifiés, et des mesures terminales différentes ont également été proposées.

4.3.3 Mise en place et modifications apportées aux essais de toxicité

Lors de la sélection préliminaire des essais de toxicité applicables sur sédiment entier, basée sur les fiches signalétiques et en application des grilles d'évaluation du rapport de Bastien et Martel (1995), le protocole ASTM 1990 utilisant *Chironomus tentans* a été choisi. A la parution du protocole ASTM 1995 les 2 protocoles ont été comparés en utilisant les mêmes fiches (signalétiques et de cotation). Aucune différence n'est observable entre les deux protocoles car les deux documents se réfèrent aux mêmes auteurs et proposent donc une approche similaire pour les tests. Cependant le document ASTM 1995 offre plus de choix car il contient de nouvelles références dont une qu'il recommande (USEPA 1994). Il est plus descriptif et plus précis sur les techniques de culture et sur les tests de toxicité.

Le Tableau 4-1 synthétise les principales caractéristiques de ces deux protocoles (ASTM 1990/ 1995) et signale les différences existantes entre eux.

Tableau 4-1 Hyalella, comparaison des protocoles ASTM 1990 / 1995

| | Document ASTM 1990 | Document ASTM 1995 |
|---------------------------------|--|---|
| ELEVAGE | Protocole peu précis | Protocole assez précis |
| Nourriture | Granulés pour lapin, Tétramin ®, Daphnies, Feuilles séchées prétrempées, Crevettes | Granulés pour lapin, Tétramin ®, Daphnies, Feuilles séchées prétrempées, Yeast Cerophyl Trout (YCT) |
| Eau / renouvellement | Statique, Renouvelé | Statique, Renouvelé |
| Support | Gaze, Feuilles séchées prétrempées | Gaze, Feuilles séchées prétrempées |
| Aération | Oui | Oui |
| Isolément des jeunes | Fonction de la taille (tamisage) | Fonction de la taille et de l'âge |
| ESSAI | | |
| Durée d'exposition | 10 -30 j | 10 -28 j |
| Température | 20 - 25°C | 20 - 25°C |
| Nombre d'organisme / dilution | 20 - 100 (2 à 4 réplicats) | 10 - 20 (2 à 8 réplicats) |
| Nombre de dilution | 1 ou plusieurs | 1 ou plusieurs |
| Eau / Renouvellement | Statique, Renouvelé | Statique, Renouvelé |
| Enceintes expérimentales | Béchers 1 l ou Aquariums 20 l | Béchers de 250 ml, 300 ml, 1 l, 2.5 l |
| SEDIMENTS | | |
| Sédiment test: quantité | 2 l | 1 l |
| Sédiment test: conservation | 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C |
| Sédiment test: préparation | Tamisage | Tamisage, rayon gamma, congélation |
| Sédiment contrôle: type | Peu défini | Naturel, Reconstitué, Spiké |
| Sédiment contrôle: quantité | ? | 600 ml (naturel), 3 l (spiké) |
| Sédiment contrôle: conservation | 4 °C | Sec. 4 °C |
| Sédiment contrôle: préparation | ? | Fonction du type de sédiment |
| EAU | | |
| Eau superficielle | Eau d'élevage | Naturelle, Reconstituée |
| TOXIQUE DE REFERENCE | | |
| Qualification | ? | NaCl, Kcl, CaCl ₂ , CuSO ₄ |

Le protocole ASTM (1995) se base sur différentes techniques et laisse une bonne latitude pour le choix du test. Parmi les recommandations de l'ASTM figure le protocole USEPA (1994) et celui de Nebeker *et al.* (1984). Pour des raisons techniques (température, renouvellement d'eau...) nous avons choisi pour nos premiers essais le protocole de Nebeker *et al.* (1984).

Après application de ce protocole sur 3 séries d'essais, nous avons pu en mesurer la lourdeur des essais: il requerrait des volumes de 800 ml d'eau et de 200 ml de sédiment donc des récipients de 1.4 l qui limitait le nombre de concentration réalisables pour le toxique de référence (5 maximum) et le nombre

de répliqués applicables aux essais (4 maximums). Le temps de préparation, d'entretien et de lecture de nos tests était également très élevé.

Suite à cette série de résultats nous avons décidé de modifier notre protocole et d'appliquer celui d'Environnement Canada car il permet d'utiliser des volumes plus restreints, d'augmenter la température, de travailler en mode statique avec des organismes plus jeunes (et plus sensibles), de mener un test plus long et de nourrir à l'YCT.

Le Tableau 4-2 synthétise les principaux points communs et les différences existants entre l'ASTM (1995) incluant l'USEPA (1994) et Nebeker *et al.* (1984) et Environnement Canada (preview to final manuscript).

Tableau 4-2 Hyalella, comparaison des protocoles ASTM 1995 / USEPA 1994 / Nebeker et al. 1984 / Environnement Canada (preview to final manuscript)

| Document . ASTM 1995 | Document. USEPA 1994 | Document . Nebeker et al. 1984 | Document. Environnement Canada. (preview to final manuscript) |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---|
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---|

ELEVAGE

Température

Nourriture

| | | | |
|---|----------------------------|--|----------------------------|
| 20 à 23 °C | 23 °C | 20 °C | 23 °C |
| Granulés pour lapin, Tétramin ®, Daphnies, Feuilles séchées prétrempées, Yeast Cerophyl Trout (YCT) | Yeast Cerophyl Trout (YCT) | Granulés pour lapin, Tétramin ®, Daphnies, Feuilles séchées prétrempées, Crevettes | Yeast Cerophyl Trout (YCT) |

Eau / Renouvellement

Substrat

Isolement des jeunes

| | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Statique ou Renouvelé | Statique ou Renouvelé | Statique ou Renouvelé | Statique ou Renouvelé |
| Gaze, Feuilles séchées prétrempées | Gaze, Feuilles séchées prétrempées | Feuilles séchées prétrempées | Gaze, Feuilles séchées prétrempées |
| Fonction de la taille et de l'âge | Fonction de la taille et de l'âge | Fonction de la taille (tamisage) | Fonction de la taille et de l'âge |

ESSAI

Température

Durée du test

Age des organismes

Nombre d'organisme / dilution

Eau / Renouvellement

Enceintes expérimentales

Aération

| | | | |
|--------------------------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 20 à 23 °C | 23 °C | 20 °C | 23 °C |
| 10 à 28 j | 10 j | 10 j | 14 j |
| 7 à 14 j | 7 à 14 j | 7 à 14 j | 2 à 9 j d'âge |
| 10 - 20 (2 à 8 répliqués) | 10 (8 répliqués) | 15 (répliqués non référencés) | 10 (5 répliqués) |
| Statique ou Renouvelé | Renouvelé | Statique | Statique ou Renouvelé |
| Bécher de 250 ml, 300 ml, 1 l, 2.5 l | Bécher 300 ml | Bécher 1 l | Bécher 300 ml |
| Oui / Non | Non | Oui | Oui / Non |

SEDIMENTS

Sédiment test: quantité

| | | | |
|-------------|--------|--------|--------|
| 50 à 200 ml | 100 ml | 200 ml | 100 ml |
|-------------|--------|--------|--------|

| | Document . ASTM 1995 | Document. USEPA 1994 | Document . Nebeker et al. 1984 | Document. Environnement Canada. (preview to final manuscript) |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| Sédiment test: conservation | 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C | 2 semaines à 4 °C | 2 à 6 semaines à 4 °C |
| Sédiment contrôle: type | Naturel, Reconstitué, Spiké | Naturel, Reconstitué, Spiké | Naturel, Reconstitué, Spiké | Naturel, Reconstitué, Spiké |

EAU

Eau superficielle

| | | | |
|----------------------------|----------------------------|---------------|----------------------------|
| Naturelle, Reconstituée | Naturelle, Reconstituée | Eau d'élevage | Naturelle, Reconstituée |
| 175 à 2000 ml | 175 ml | 800 ml | 175 ml |

Eau test: quantité

TOXIQUE DE REFERENCE

Qualification

| | | | |
|---|---|---|---|
| NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ | NaCl, KCl, CdCl ₂ , CuSO ₄ |
|---|---|---|---|

4.3.4 Procédure d'Opération Normalisée

A partir du protocole de l'ASTM (1995) puis de celui d'Environnement Canada (preview to final manuscript) nous avons optimisé nos conditions de test et avons abouti à la rédaction d'une Procédure d'Opération Normalisée pour les essais de toxicité sur sédiment entier avec *Hyaella azteca*. Cette dernière est fournie dans le document ci-joint « Protocoles optimisés » du volet I.

4.3.5 Application de la PON et résultats obtenus

4.3.5.1 Toxique de référence et carte de contrôle

Le toxique de référence utilisé est le CuSO₄. Sur les 6 essais déjà réalisés, les valeurs de CL50 s'échelonnent de 368 µg de Cu/l à 861 µg de Cu/l. D'autres essais sont en cours afin d'affiner notre carte de contrôle.

4.3.5.2 Essais sur sédiment

Alors que les problèmes de récupération à la fin des tests pour les *Chironomus* ont été rapidement réglés, ils restaient assez marqués pour *Hyaella*. Nous utilisons désormais une plaque lumineuse sur laquelle nous plaçons un plat de verre dans lequel est placé le surnageant de nos essais. Les organismes sont repérés sur la plaque par contraste. Pour le toxique de référence et le sédiment contrôle, la silice est versée progressivement jusqu'à avoir récupéré tous nos organismes. Les sédiments sont passés sur un tamis de 0.500 µm et c'est ce qui est retenu sur le tamis qui est déposé dans le plat transparent.

Le sédiment de référence que nous utilisons est de la silice de taille moyenne 0.25 mm. Les tests menés sur cette silice nous donnent des survies supérieures à 80 % au bout de 4 jours pour les témoins du

toxique de référence. Mais ceux menés sur 14 jours sur cette silice, jusqu'à présent, ne nous donnaient qu'un taux de survie de 78% comparativement au taux recommandé de 80. Suedels et Rodgers ont constaté le même problème, et ont opté, avec succès, pour le traitement avec silice. Au lieu de simplement la rincer à l'eau purifiée, la silice est soumise à un flot continu d'eau de source pendant sept jours permettant la croissance d'un biofilm. Un essai a été mené en rinçant la silice à l'eau de source et il donne une mortalité de 4% seulement. Des essais complémentaires sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

5. Revue bibliographique sur la manipulation des échantillons de sédiments destinés à une caractérisation physico-chimique et biologique

5.1 Introduction

Le sédiment est une matrice complexe composée de microenvironnements dont les potentiels redox et les processus biologiques et physico-chimiques sont variables dans l'espace et dans le temps. Pour cette raison, un sédiment ne peut être échantillonné, transporté en laboratoire, stocké puis testé sans que les structures et caractéristiques originelles n'en soient modifiées (7020). Plusieurs facteurs peuvent influencer la toxicité d'un sédiment et chaque perturbation de l'environnement complique l'interprétation des effets mesurés en laboratoire. Cependant les mécanismes qui influencent ces facteurs sont à ce jour mal connus (7019). Il est donc souvent délicat de prédire si ces opérations ont des conséquences significatives sur les résultats des essais, et donc sur l'objectif de l'étude.

5.2 Prélèvement et transport

5.2.1 Collecte de sédiments

Il existe de nombreuses méthodes de prélèvement des sédiments (7044). Leur objectif est d'isoler et de récupérer, avec un minimum de modifications, le volume de sédiment nécessaire pour l'étude à mener. Par exemple, lors de la collecte et tout au long des manipulations, il faut éviter l'exposition directe au soleil et le séchage, même superficiel, des sédiments. Le Tableau 5-1 présente les techniques de prélèvements les plus courantes, et précise leurs avantages et leurs inconvénients.

5.2.1.1 Bennes (dredge)

Les techniques de prélèvement en vrac à l'aide de bennes type Ponar, Ekman Van Veen, Shipek ou Peterson sont plus perturbatrices que celles basées sur le carottage de sédiment qui sont eux-mêmes plus destructeurs que les études *in situ* (7019).

Tableau 5-1 Avantages et inconvénients des principales techniques d'échantillonnage

Tiré de Burton, G.A. Sediment collection and processing: factors affecting realism. In: Sediment toxicity assessment. Edited by Burton, G.A., Chelsae: Lewis Publishers, 1992.

Lors d'un prélèvement de sédiment à l'aide d'une benne à partir d'une embarcation, la surface du sédiment est généralement perturbée ce qui peut entraîner une perte des particules fines. L'interface eau-sédiment, biologiquement très active, est un lieu d'échanges dynamiques entre la matrice particulaire et la colonne d'eau d'où proviennent généralement les particules sédimentaires. D'autre part, dans les méthodes de prélèvement les plus courantes, les couches inférieures anoxiques sont exposées à l'oxygène lors de la collecte du sédiment. Cette exposition entraîne la conversion de formes réduites en complexes oxydés, ce qui en quelques heures, modifie les conditions physico-chimiques de la matrice, et influence considérablement sur les réponses biologiques mesurées. Finalement, l'utilisation de bennes se traduit par une perte du profil vertical de l'échantillon lors de la récupération de l'échantillon à la sortie de la benne (7131, 7006).

De manière générale, les bennes ont une faible pénétration dans le sédiment et provoquent une onde de choc susceptible d'entraîner la dispersion des particules fines, des composés hydrosolubles et des composés organiques volatils. Les bennes sont donc plus appropriées pour la collecte de sédiments destinés à être testés dans une perspective de dragage, car les deux phénomènes perturbent l'intégrité du sédiment et entraînent une perte des particules fines (7131, 7006, 7044).

De toutes les bennes disponibles, la benne Ekman est considérée comme étant celle qui perturbe le moins les sédiments; cependant, elle ne peut pas être utilisée dans les eaux profondes et les sédiments compacts.

5.2.1.2 Carottiers (benthic grab or core)

La plupart des problèmes associés aux prélèvements effectués avec les bennes sont maîtrisés avec les carottiers. En effet, le carottage peut permettre de conserver la structure et l'intégrité de la surface du sédiment et peut aussi permettre le prélèvement sur une certaine profondeur (7006) qui dans certains cas peut atteindre, voire dépasser le mètre.

Les échantillonnages par carottages ont cependant des limites: ils sont limités à l'échantillonnage de sédiments fins pauvre en sable. EN outre, la quantité de matériel ainsi collecté est sensiblement plus faible que celle collecté par des bennes. Il est généralement recommandé de recourir à des carottier d'une certaine tailles de manière à limiter l'onde de choc (perturbation des sédiments de surface), et la compaction qui altèrent le profil vertical.

5.2.2 Transport de sédiments

Le transport des sédiment depuis le lieu de prélèvement jusqu'au laboratoire se fait généralement dans des contenants en plastiques, en Téflon ®, en polyéthylène ou en verre et en conditions réfrigérées à $4 \pm 2^\circ\text{C}$. L'échantillon ne doit pas geler lors du transport. Généralement, les contenants utilisés pour le transport sont les même que ceux utilisés lors du stockage (7044).

Quand l'échantillon contient des composés volatiles et semi-volatiles, le transport et le stockage doivent être effectués dans des contenants hermétiques et sur une durée maximale de 7 à 8 jours à 4°C.

5.2.3 Type de contenants

Le choix du type contenant doit être fait en fonction de la composition de l'échantillon, de son temps de stockage, de sa capacité de sorption (7044). Les contenants plastiques en polytetrafluoroéthylène (PTFE) sont considérés comme étant relativement inerte et utilisables pour les échantillons contaminés avec différents types de produits chimiques. Pour les sédiments où des substances organiques sont en cause on conseille le verre type borosilicate, alors que pour ceux où il y a des métaux on conseille le PTFE.

5.2.4 Techniques de conservation

5.2.4.1 Atmosphère de confinement

Le transport et le stockage sont souvent effectués en atmosphère aérobie, ce qui intensifie l'oxydation au niveau de la « nouvelle » surface du sédiment dans le contenant. Ce phénomène d'oxydation s'observe facilement dans les bouteille de sédiment où on note une coloration brune-rouille, généralement associée à l'oxydation du fer ferreux à la surface et sur les bords de l'échantillons. Le sédiment sous-jacent peut cependant être maintenu dans un état anoxique.

En raison de leur relative résistance à la biodégradation et à leur sorption aux solides, les sédiments dont la contamination est d'origine organique non polaire non volatile changent peu durant le stockage. Les métaux et les métalloïdes sont plus affectés par le changement de potentiel Redox et le métabolisme bactérien. Pour cette raison, ces sédiments doivent être testés relativement rapidement (7019).

Quand des sédiments anoxiques sont exposés à l'air, les AVS (acid-volatile sulfide) se volatilisent rapidement. Les AVS sont réactifs et se lient aux métaux entraînant généralement une réduction de la toxicité. Si l'objectif d'une étude est d'étudier la toxicité de métaux, la mise en contact des sédiments avec l'air peut influencer sur le résultat, augmenter ou diminuer la toxicité, en oxydant ou précipitant les espèces métalliques ou en modifiant la complexation des métaux avec les AVS.

5.2.4.2 Traitement de conservation

Le séchage, la congélation et la réfrigération affectent tous la toxicité et la biodisponibilité des contaminants (7020,7031,7006, 7019,7044). Généralement, après l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, le stockage se fait à 4°C (7006).

⇒ La congélation.

Pour éviter les risques de modification dans la composition des sédiments, certaines auteurs suggèrent la congélation des échantillons. La congélation rapide est recommandée pour des analyses de métaux et de

produits organiques. Cependant ces techniques affectent la structure du sédiment et inhibent l'oxydation de composés réduits manganeux et ferreux (7020). Si des sédiments doivent être congelés pour des analyses chimiques, on se doit de prélever un sous échantillon du sédiment conservé à 4°C pour le test de toxicité.

⇒ La réfrigération à 4°C.

Lorsque les sédiments sont situés à une profondeur située au dessous de la thermocline, leur température est maintenue relativement basse tout au long de l'année. Cela implique que la communauté microbienne qui s'y développe est principalement psychrophile et qu'à ce titre elle métabolise mieux à basse température. Le stockage à 4°C, recommandé pour les tests toxicologiques, n'arrête donc pas la métabolisation qui continue à un taux reflétant la disponibilité des nutriments dans le milieu et les conditions microenvironnementales (7019). La coagulation et la précipitation du matériel humique a lieu en moins d'une semaine dans l'eau interstitielle de sédiments conservés à 4°C.

5.2.5 Durées de conservation

Les durées de stockage peuvent être variables et elles ne sont pas toujours clairement spécifiées dans les études ou manuel d'échantillonnage. La conservation peut être de l'ordre de quelques jours à un an (7006, 7131). L'ASTM (American Society for testing and material) recommande un temps de stockage pour des sédiments enrichis avec des métaux de 2 à 5-7 jours jusqu'à moins de 2 semaines. Lorsqu'un sédiment est destiné à des essais biologiques, la durée de conservation d'un sédiment naturel ne doit pas excéder 6 semaines et plus préférablement le test doit être mené dans les deux semaines qui suivent le prélèvement de l'échantillon (7006). Des recommandations ont été émises par Environnement Canada sur les conditions de stockage (contenant, durée, traitement et température) en fonction de l'objectif de l'étude et du type de contaminant (7044).

Les durées de stockages doivent prendre en compte la composition du sédiment et des composés toxiques qu'il contient. Ainsi, les sédiments contaminés avec des composés organiques non ioniques et non volatils évolueront généralement peu durant leur stockage en raison de la relative résistance à la biodégradation et de la sorption aux solides de ces toxiques. Les sédiments contaminés par les métaux et métalloïdes peuvent voir leur toxicité relative affectée par les variations de potentiel redox, l'oxydation ou le métabolisme microbien. Dans ce dernier cas, le sédiment doit être testé le plus rapidement possible après son échantillonnage.

Pour déterminer l'effet du temps de stockage sur des sédiments marins provenant de zones de référence et de zones contaminées, trois tests de toxicité avec un amphipode (*Rhepoxynius*), un polychète (*Neanthes*) et le *Microtox* (*Photobacterium*) sont effectués. Les sédiments sont stockés à 4°C jusqu'à 16 semaines. Les résultats des trois tests de toxicité varient significativement avec le temps de stockage

pour chaque sorte de sédiment. La survie des amphipodes diminue généralement avec le temps de stockage, alors que la luminescence du test Microtox et la biomasse des polychètes varient de façon non prédictible. L'effet du temps de stockage est plus marqué pour des résultats indiquant des niveaux de faible ou de moyenne toxicité, alors qu'il l'est moins pour des résultats indiquants de fortes toxicités. Il est donc recommandé de tester les sédiments aussi rapidement que possible après la collecte sur le terrain pour minimiser le potentiel d'altération de la toxicité durant le stockage (7086).

Dans certaines études, des sédiments contaminés n'ont pas montrés de changements significatifs dans leur chimie et leur toxicité après plusieurs mois de stockage à 4°C (7019). Cependant, d'autres études ont observé des variations significatives sur une échelle de temps de quelques jours jusqu'à plusieurs semaines (7086, 7131). La durée de conservation d'un échantillon a donc des effets variables et non prédictibles sur l'intégrité des sédiments et leurs toxicités.

5.3 Manipulation au laboratoire

La manipulation des sédiments est souvent nécessaire pour l'expérimentation. Il peut s'agir d'homogénéiser, d'enrichir, de tamiser, de stériliser ou diluer les sédiments.

5.3.1 Homogénéisation des sédiments

Lors de leur récupération, les sédiments sont agités ou mélangés et cela afin de produire un sédiment homogène en terme de couleur, de texture, d'humidité et de toxicité globale. Pour des sédiments collectés sur le terrain, la qualité de l'échantillon varie en fonction de la profondeur du prélèvement, de l'activité bactérienne et de la distribution des toxiques, qui elle-même est fonction de l'historique de la contamination historique et de la sédimentation). La résultante de ce mélange peut être une augmentation ou une diminution de la toxicité. On peut mélanger avec une spatule ou effectuer une agitation mécanique (déposer les sédiments sur des rouleaux ou des plateaux agitateurs, brasser à l'aide d'un mixeur). L'agitation dure généralement de une à plusieurs minutes et il est recommandé d'observer la granulométrie avant et après le brassage.

L'homogénéisation entraîne l'introduction d'oxygène dans des milieux anoxiques, la perturbation du potentiel redox et des gradients microbiens et microenvironnementaux, l'altération de conditions d'équilibre pour les produits chimiques associés à l'eau interstitielle et aux particules de sédiment, et l'introduction de nouveaux composés (espèces azotées, composés oxyhydroxy-métalliques...) par des processus de désorption et d'oxydation (7019).

Le microenvironnement des microorganismes est généralement rapidement épuisé en nutriment. La communauté microbienne est donc un excellent indicateur précoce des conditions du milieu à cause de leur capacité rapide de répondre à leur environnement.

5.3.2 Enrichissement des sédiments ("spiking")

Les sédiments peuvent être enrichis avec des produits spécifiques, pour déterminer l'effet d'un seul toxique, ou avec un mélange. Les premières techniques ont évolué d'une technique d'enrichissement à sec vers une technique d'enrichissement humide. Les techniques d'enrichissement à sec sont basées sur un séchage du sédiment qui entraîne des modifications de la disponibilité en métaux, de la complexation, des caractéristiques granulométriques, et la perte de composés volatils. A ce titre l'enrichissement à sec est déconseillé (7006).

Il existe plusieurs techniques d'enrichissement humide en fonction du produit à enrichir. Les différences entre toutes ces techniques viennent de la quantité d'eau présente dans le mélange lors de l'enrichissement, de la présence ou non d'un solvant et de la technique de brassage. Le temps de mélange suivant l'enrichissement doit être minimisé (de quelques minutes à quelques heures) et la température doit être conservée à un minimum de 4°C en raison des altérations rapides qui peuvent intervenir dans le sédiment. Après l'enrichissement, le mélange doit atteindre un état d'équilibre entre le produit adsorbé sur les sédiments et celui présent dans l'eau interstitielle. La technique de stockage et sa durée varient beaucoup selon les études (7006,7020). Pour les métaux, cette phase d'équilibre est atteinte après 24 heures, mais certains auteurs recommandent une attente de 120 jours. Pour les composés organiques, elle peut varier de 24 heures à plus de 5 semaines. Bien que les concentrations totales de produits mesurées dans la matrice sédiment ne reflètent pas la fraction disponible de ces produits, des mesures physicochimiques permettent de confirmer que la répartition du toxique dans le sédiment est homogène (7006).

La technique d'enrichissement utilisée est fonction de l'objectif de l'étude et des composés à introduire. Les composés organiques ou hautement volatils sont généralement introduits à l'aide d'un solvant agissant comme vecteur. Avec les composés volatils on conseille de débiter le test assez rapidement (24 heures).

5.3.3 Tamisage des sédiments

Si l'on désire garder des conditions anoxiques des sédiments, la préparation des sédiments et leur tamisage doivent être faits dans des boîtes à atmosphère inerte contrôlée (azote) munies de gants de manipulation.

Le tamisage est reconnu pour perturber l'équilibre chimique et augmenter ou diminuer la toxicité, la plupart des méthodes ne le conseillent donc, après l'agitation, que pour éliminer les débris les plus grossiers, et pour limiter la prédation exercée par les organismes indigènes sur les organismes utilisés pour les essais.

Les sédiments peuvent être tamisés sous pression (pressure sieving) ou à l'eau (wet sieving). Cette dernière technique doit être évitée si possible car elle peut entraîner l'élimination, avec l'eau du tamisage, des particules plus fines que la maille du tamis. De plus, les éléments solubles sont susceptibles de transiter vers la phase aqueuse, et donc de disparaître, modifiant ainsi les équilibres physicochimiques qui prévalaient avant le tamisage. Les particules retenues sur le tamis sont examinées et récupérées si elles sont intéressantes pour l'étude. Les tamis utilisés pour ces études peuvent être d'une maille variant de 0.25 à 2 mm. Le tamis le plus utilisé est celui de 1 mm mais le choix dépend de l'objectif de l'étude.

Le tamisage peut influencer sur la concentration de la toxicité en augmentant ou diminuant la charge en particules toxiques. Certains auteurs ont montré que le tamisage sur une maille de 0.25 mm diminue de près de 4 fois la concentration en HAP et PCB (7026).

5.3.4 Stérilisation des sédiments

La stérilisation des sédiments a pour but majeur d'éliminer les organismes indigènes.

Il existe différentes techniques pour stériliser les sédiments, enlever les organismes, inhiber leur croissance ou les tuer.

Les organismes endémiques peuvent être enlevés à la main dans le cas des gros prédateurs comme les sangsues mais dans le cas des espèces d'invertébrés qui sont morphologiquement similaires à nos espèces tests et qui sont en compétition pour l'espace et la nourriture avec elles, il est souvent nécessaire de tamiser. Le choix de la maille doit être fait en fonction du test, des organismes tests, des prédateurs, des compétiteurs et de la nature de l'échantillon. Dans le cas des *Hyalella* et *Chironomus* il est conseillé d'utiliser une maille de 0.25 mm ou moins pour écarter les organismes endogènes (7050, 7006).

D'autres techniques que le tamisage existent pour inhiber l'activité biologique endémique dans les sédiments: l'autoclavage, la congélation, le rayonnement gamma, la stérilisation chimique ou encore les traitements antibiotiques (7044). Mais les effets de ces techniques sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des sédiments sont assez mal connus. Outre le fait qu'elles éliminent les organismes indigènes, elles peuvent aussi inhiber l'activité microbienne, tuer le biotope, entraîner un passage en anoxie, modifier la toxicité, les équilibres physico-chimiques, détruire des molécules. En dehors des techniques de collecte à la main ou à la pince de ces organismes, les techniques les moins perturbatrices sont le tamisage et l'irradiation au rayon gamma. Bien qu'il existe peu de données sur l'effet de l'irradiation gamma sur la toxicité des contaminants, cette technique est la plus prometteuse car des données suggèrent qu'elle cause peu d'altération dans les caractéristiques physico-chimiques des sédiments (7026).

5.3.5 Dilution des sédiments

La dilution de sédiments contaminés avec un sédiment propre permet d'obtenir de dresser une courbe concentration-réponse de toxicité sur le sédiment. Ces dilutions sont réalisables avec un sédiment propre aussi bien qu'avec toute matrice solide réputée inerte, généralement du sable. (7006).

Des comparaisons ont été faites entre la concentration-réponse du Microtox 15 minutes, de *Daphnia magna* 48 heures, de *Chironomus tentans* 10 jours et d'*Hexagenia limbata* en utilisant différents types de dilutions de sédiments. Les trois techniques de dilution sont: l'extraction de l'eau interstitielle d'un sédiment contaminé et sa dilution avec de l'eau interstitielle d'un sédiment de référence, la récupération de l'eau interstitielle après avoir dilué un sédiment contaminé avec un sédiment de référence (pour les deux premiers essais de toxicité) et la dilution directe d'un sédiment contaminé avec un sédiment de référence (pour les deux derniers essais de toxicité). Alors que les trois techniques de dilution donnent des résultats similaires dans certains essais, ils donnent des résultats très différents dans d'autres cas. Les relations concentration-réponse déterminées par les trois techniques de dilution varient en fonction du sédiment, des toxiques, du type d'essais de toxicité et la relation concentration-réponse dérivant de chaque technique doit être interprétée en conséquence (7034).

Tableau 5-2 Méthodes appliquées pour stériliser les sédiments (enlever, inhiber la croissance ou tuer les organismes)

Tiré de EPS. Guidance document on the collection and preparation of sediment for physico-chemical characterisation and biological testing. Ottawa, Ontario. 1995. 178pp..

5.4 Caractérisation chimique

L'analyse de toxiques dans les sédiments est généralement effectuée avec des méthodes standards comme celles de l'USEPA (7006), Environnement Canada (7044), ASTM (7006) ou APHA..

Il est recommandé de caractériser le sédiment avant et après le tamisage pour documenter les changements attribuables au tamisage (par exemple: les métaux dans l'eau interstitielle, la Demande Chimique en Oxygène, les Acid-Volatiles Sulfides, la teneur en Carbone Organique Total) (7008).

Les sédiments qui doivent être analysés pour leur toxicité doivent être caractérisés physiquement et chimiquement. Cette caractérisation doit comporter, au minimum, une teneur en humidité, en carbone organique total (TOC) ou en matière volatile totale (TVS), la granulométrie (% de sable, d'argile ou de limon), la mesure du pH et de la température (7044). Une étude plus approfondie peut être requise pour atteindre l'objectif de l'étude et on peut alors avoir à mesurer la température *in situ*, le poids frais, le Carbone Organique Dissous et Total (COD et COT), la salinité de l'eau interstitielle, la capacité d'échange cationique (CEC), le potentiel redox, (Eh), l'ammonium (NH₃), la Demande Biologique en Oxygène (DBO) et la Demande Chimique en Oxygène (DCO) (7006).

Les opérations à effectuer pour préparer les sédiments pour les différents types d'analyse physico-chimique et biologique sont détaillées dans le manuel d'Environnement Canada (7044) et/ou dans celui de l'ASTM (7006).

5.5 Recommandations minimales sur la manipulation des sédiments

Il est important de posséder un sédiment aussi peu perturbé que possible pour la réalisation d'un test de toxicité afin de s'approcher d'une évaluation des conditions réelles du terrain.

Dans ces conditions il est recommandé de collecter les sédiments en utilisant la technique la moins perturbatrice (carottage plutôt que prélèvement avec benne), de placer les échantillons à analyser dans des contenants adéquats et de les tenir réfrigérés lors du transport. Les échantillons utilisés pour les analyses chimiques doivent être conservés dans des contenants et sur une durée adéquates (voir remarques précédentes). Si cela est nécessaire il faut conserver le sédiment en condition anoxique, à 4°C. Bien qu'il ait été démontré que certains contaminants peuvent être conservés sans altérations

durant 12 mois, le temps de stockage doit être limité à 2 semaines à 4°C à moins que des données définissant la durée sur laquelle la stabilité du sédiment est prouvée n'existent.

6. Références bibliographiques

Voir note de mise en garde au début du document.

1. USEPA. *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. Duluth, MN:EPA-600-R94-024, USEPA, 1994.pp. 1-133.
2. Nebeker, A.V., Cairns, M.A., Gakstetter, J.H., Malueg, K.W., Schuytema, G.S., and Krawczyk, D.F. Biological methods for determining toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates. *Environ.Toxicol.Chem.* 3:617-630, 1984.
3. EPS *Test for growth and survival in sediment using the freshwater amphipod Hyalella azteca.*, Ottawa, Ontario:Environment Canada, 1996.pp. 1.
4. EPS *Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius).* Ottawa, Ontario:Environment Canada, 1996.pp. 1.
5. ASTM *Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. Philadelphia, PA:E 1706-95, ASTM, 1995.pp. 1-82.
6. ASTM *Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates*. Philadelphia, PA:E 1383-90, ASTM, 1990.pp. 1-19.
7. Bastien C. et Martel L.