

**ÉVALUATION DE BIOPROCÉDÉS D'ASSAINISSEMENT EN
PHASE SOLIDE/LIQUIDE PAR L'UTILISATION DE BIOTESTS
ÉCOTOXICOLOGIQUES**

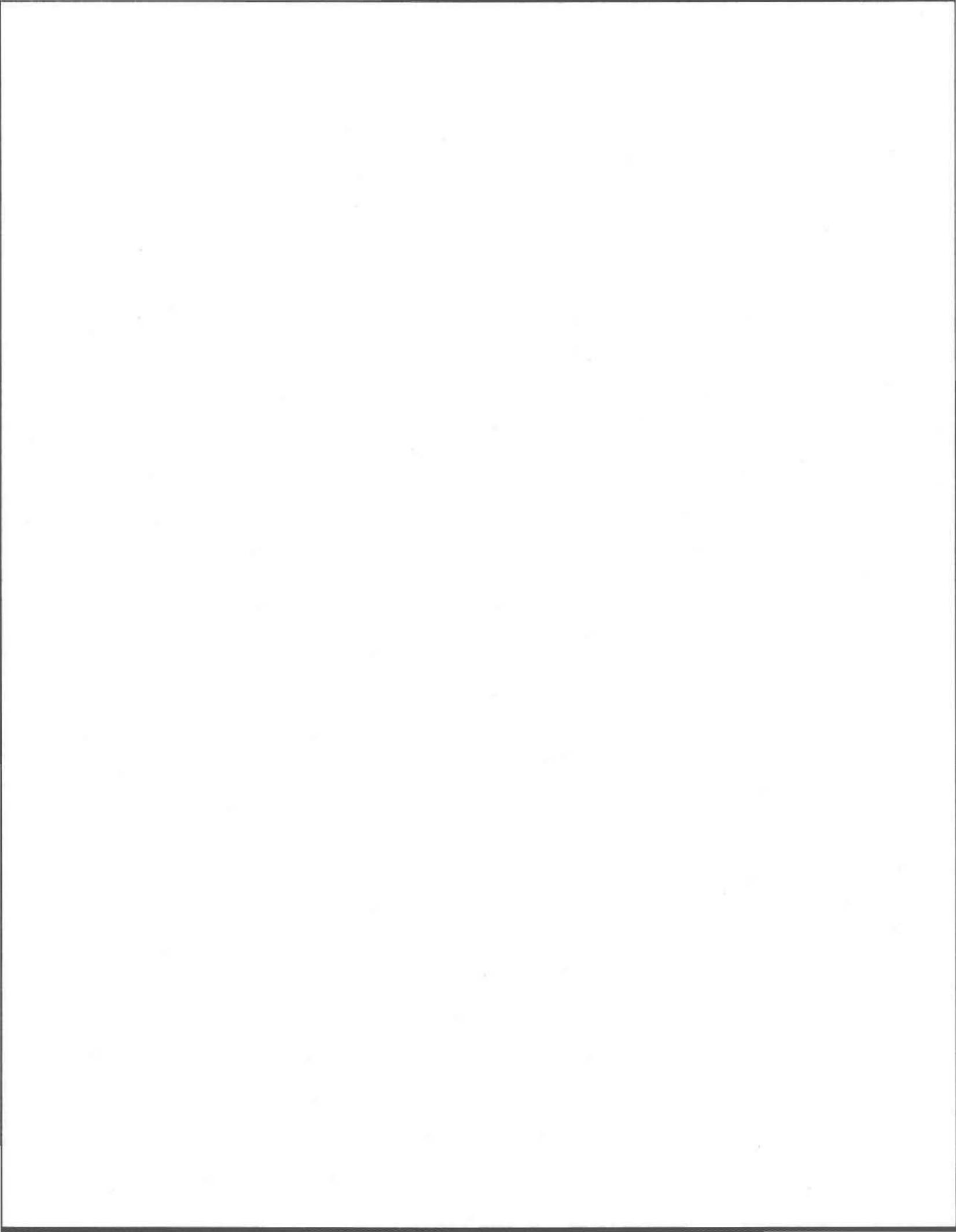
Thèse présentée comme exigence partielle du diplôme Philosophiae Doctor (Ph.D.)
Doctorat en Sciences de l'Eau

par

Agnès Y. Renoux

Institut national de la recherche scientifique, INRS-Eau
2800, rue Einstein, Case postale 7500, SAINTE-FOY (Québec), G1V 4C7

Avril 1996



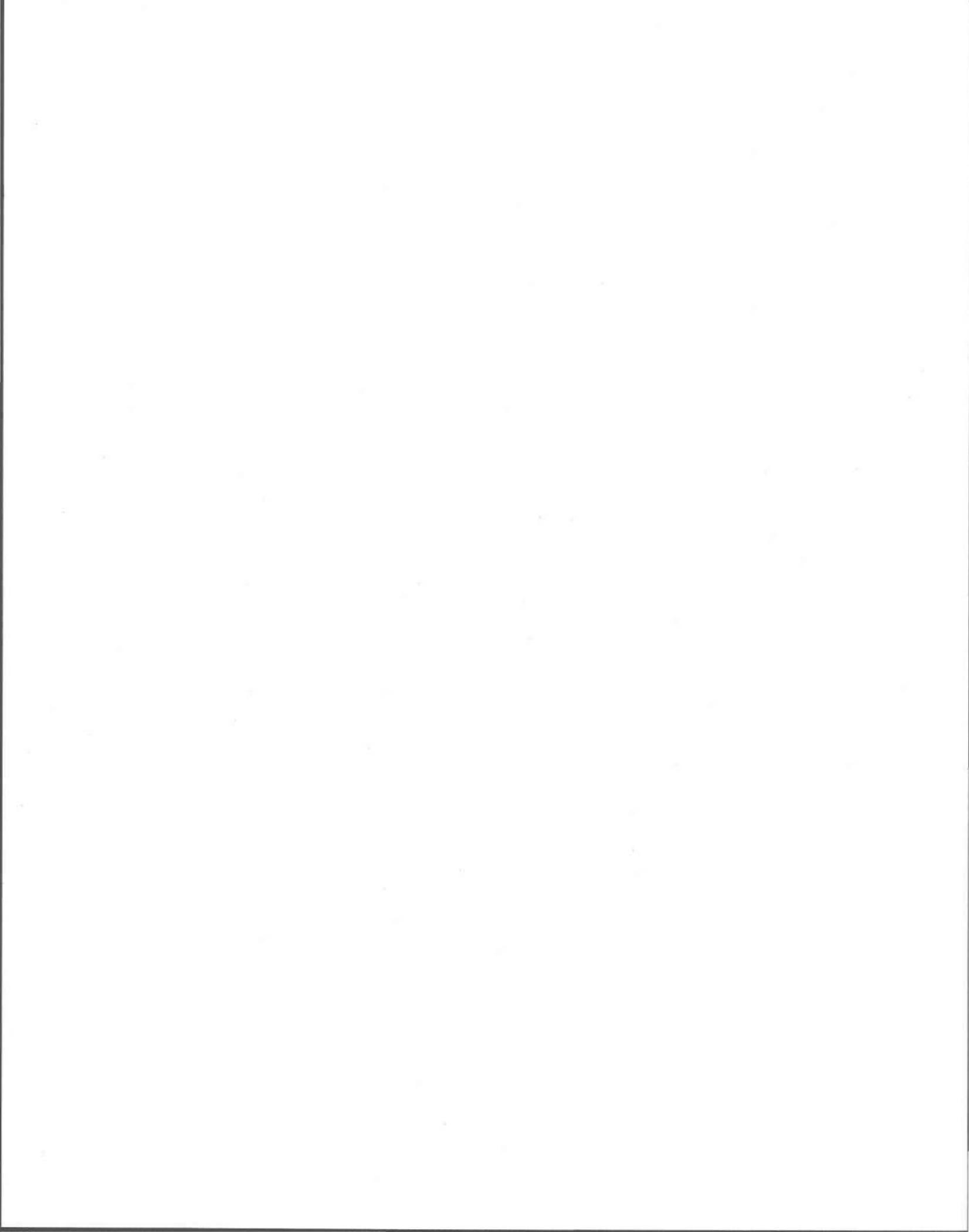
À mes parents,

à mon frère



Mais n'oubliez pas l'élément liant: le désir inscrit en chacun de nous d'aboutir à un petit plus. On se contente d'un mieux parce que le bien est inaccessible pour l'instant.

Tonino Benacquista



REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la contribution de plusieurs personnes et institutions. En premier lieu, je remercie mon directeur, le professeur Rajeswar D. Tyagi pour la liberté qu'il m'a donnée dans l'entreprise de ce projet, et mon codirecteur de recherche, le professeur Réjean Samson, pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoigné.

Je tiens à remercier le Conseil National de Recherche du Canada pour l'enthousiasme et l'encouragement reçus des membres de l'Institut de Recherche en Biotechnologie ainsi que pour les budgets, l'équipement et les locaux mis à ma disposition. L'aide technique fournie par les employés, dont celle de Sylvie Sanschagrin, m'a été précieuse, mais je tiens à souligner le plaisir que j'ai eu à travailler avec Sabine Dodard et Manon Sarrazin.

J'aimerais souligner le soutien financier reçu de l'Institut National de Recherche Scientifique durant les trois premières années de ma thèse. À l'INRS-Eau, le docteur Jean-François Blais et Stéphane Prémont m'ont apporté une aide technique indispensable.

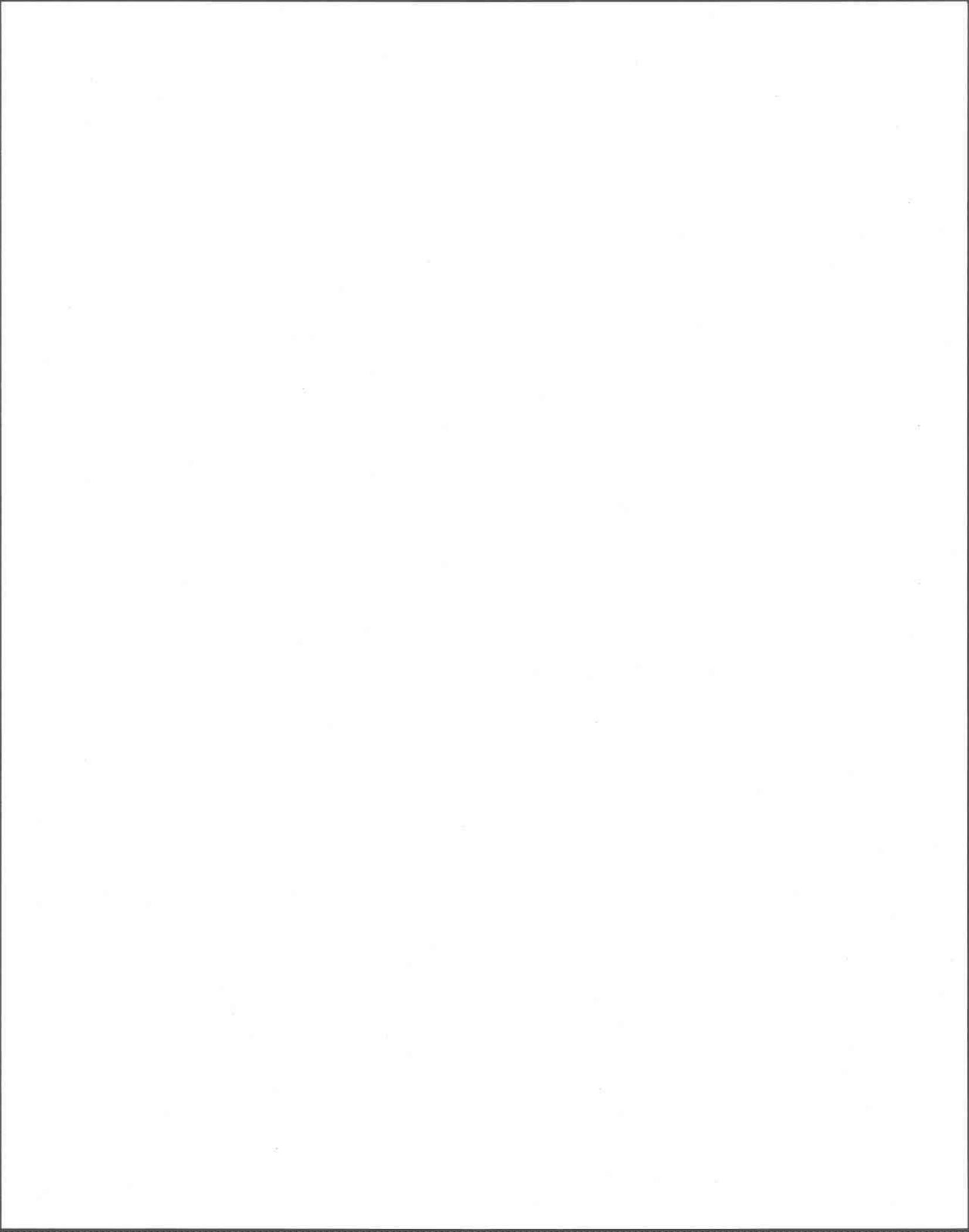
Je remercie la compagnie Analex Inc., en particulier Yves Roy et son personnel, pour l'aide technique et le prêt des équipements, sans quoi une importante partie du projet n'aurait pas été réalisable. Merci également à Richard Legault et au personnel du centre St-Laurent d'Environnement Canada pour leur aide scientifique et technique.

Un remerciement est adressé au docteur Georges Costan, pour son indispensable rigueur et ses conseils scientifiques qui m'ont permis de progresser durant ce travail.

Je tiens à préciser aux personnes ayant en partie ou complètement corrigé ma thèse durant sa rédaction que j'ai beaucoup apprécié leur contribution.

Une appréciation toute particulière est adressée aux étudiants de l'IRB et de l'INRS-Eau, dont Denis Millette, avec qui j'ai partagé réjouissances, frustrations, équipements et colonnes de biodégradation. Je ne peux passer sous silence le soutien de Kevin Wilkinson, aujourd'hui docteur, qui, même avec l'éloignement, a continué à m'encourager.

Enfin je tiens à exprimer une profonde reconnaissance à Steve Hosein, pour sa patience, ses qualités de correcteur, voire parfois de traducteur, et ses encouragements qui m'ont permis de gravir quelques pentes qui me paraissaient alors infranchissables.



RÉSUMÉ

La relation biodécontamination-détoxication sur des matrices relatives aux sols a été évaluée par le biais de biotests écotoxicologiques. En partant de l'hypothèse selon laquelle la biodégradation ou la bioélimination de contaminants s'accompagne d'une réduction concomitante de la toxicité globale, un système expérimental simple de colonnes sol/liquide de biodégradation de composés dérivés de la créosote a été étudié. Par ailleurs, un système expérimental de simulation d'épandage de boue après "biolixiviation" des métaux lourds, et un système à grande échelle de biodégradation *ex situ* d'hydrocarbures aliphatiques contaminant un sol ont été ensuite étudiés avec une batterie complète de biotests.

La première étape de ce projet a été de constituer la batterie de biotests permettant l'évaluation des systèmes sol/liquide. Cette batterie comportait les biotests suivants: Microtox[®] en phase solide (*Photobacterium phosphoreum*; 20 min), germination de graine d'orge (*Hordeum vulgare*; 5 j), croissance de la tige d'orge (*Hordeum vulgare*; 14 j), germination de graine de laitue (*Lactuca sativa*; 5 j), mortalité du ver de terre (*Eisenia foetida*, 14 j), Microtox[®] (*Photobacterium phosphoreum*; 15 min), élongation racinaire (*Lactuca sativa*; 48 h), croissance phytoplanctonique (*Selenastrum capricornutum*, 96 h), mortalité de daphnie (*Daphnia magna*, 48 h) et SOS Chromotest ± S9 (*Escherichia coli*). Finalement des outils de gestion des données écotoxicologiques ont été proposés. D'un point de vue pratique, l'intérêt d'utiliser des biotests en contact direct avec le sol a été mis en évidence, et les conséquences des manipulations d'échantillons sur la mesure de la toxicité ont été évaluées.

L'évolution de la toxicité dans un modèle de biodégradation de composés dérivés de la créosote en solutions mixtes a été étudiée avec le test Microtox[®]. Les composés solubilisés en solution aqueuse ont été injectés dans des colonnes de sol et dégradés par la flore microbienne indigène du sol. Après passage au travers des colonnes, la toxicité de chaque solution, exprimée en inhibition de la bioluminescence, a été réduite très significativement jusqu'à des valeurs proches de la limite de détection du test. Cette détoxication s'est accompagnée d'une réduction simultanée des composés les plus toxiques (phénanthrène et *p*-crésol) dans les solutions, ce qui a permis de vérifier l'hypothèse de travail.

Le procédé de décontamination des boues d'épuration, la biolixiviation des métaux lourds, a été évalué à l'aide d'une batterie de biotests. Dans le but de simuler l'épandage agricole, des boues d'épuration traitées (c. à d. biolixiviées) ou non-traitées ont été mélangées avec un sol non-contaminé utilisé comme témoin négatif aux taux de 1 à 100 g/L de sol. Des éluviats de boue ont également été préparés. La biolixiviation a réduit les effets toxiques associés aux boues pour la plupart des biotests, bien que des effets étaient encore mesurables, même après traitement, aux fortes concentrations en boue ou en éluviate. Pour la germination, la boue biolixiviée était moins toxique (CI50 orge: 53 g/L; laitue: 13.6 g/L) que la boue non-traitée (72; 16.8 g/L). La boue biolixiviée a stimulé la croissance de l'orge aux taux supérieurs à 56 g/L, alors que la boue non-traitée l'a inhibée à 100 g/L. Les vers ont survécu jusqu'à 56 g/L dans la boue biolixiviée, comparé à 32 g/L dans celle non-traitée. Les valeurs de CI50 du Microtox[®] étaient de 4.0 % v/v et 8.4 % v/v pour les éluviats de boues non-traitée et biolixiviée respectivement. Aucun effet génotoxique (SOS Chromotest) n'a été détecté dans les éluviats, et aucune différence significative n'a été observée entre les boues avec le test d'élongation racinaire de la laitue. Le seul biotest où a été observée une augmentation des effets avec le traitement de biolixiviation est celui de la mortalité des daphnies. Dans ce cas, une différence significative n'a été observée qu'à la seule concentration de 5.6 % v/v

en éluviation. Cependant, la non-égalité des variances a rendu les résultats des tests d'élongation racinaire de la laitue et de mortalité des daphnies particulièrement difficiles à interpréter. En conclusion, le traitement de biolixiviation a donc été accompagné d'une réduction de la toxicité. Des expériences complémentaires de bioaccumulation des métaux dans les vers et les tiges d'orge ont permis de mettre en évidence que la biodisponibilité du Cu, du Zn et du Mn a été réduite par le traitement de biolixiviation, indice que la réduction de la toxicité était en partie due à la réduction dans la biodisponibilité des métaux.

Des essais complémentaires avec le Microtox[®] ont permis de mettre en évidence que les manipulations des éluviats, c. à d. l'irradiation gamma et la congélation de 3 mois à -20°C, avaient un effet sur la mesure des effets toxiques. Cependant, aucune interaction entre le traitement des boues et les manipulations n'a été significative, ce qui indique qu'il est possible de comparer les traitements après manipulation des échantillons.

La batterie de biotests a également été utilisée pour évaluer un procédé de traitement de sol contaminé avec des hydrocarbures aliphatiques (12 à 24 carbones). Ce traitement *ex situ* de 1500 m³ de sol issu d'une raffinerie de pétrole a duré 9 mois. Malgré une concentration initiale en huiles et graisses de 2000 mg/kg, aucun effet toxique ou génotoxique n'était significatif dans le sol ou son éluviation avant traitement. Pendant le traitement, qui a diminué les concentrations en huiles et graisses à 800 mg/kg, des effets significatifs ont été détectés par les tests de germination de graine d'orge (MT (toxicité maximale) = 28 %, NOEC = 56 % v/v), de mortalité du ver de terre (MT = 100 %, NOEC = 56 % v/v) et de mortalité des daphnies (MT = 40%, NOEC = 18 % v/v). De plus, une augmentation évidente de la génotoxicité a été observée avec le SOS Chromotest dont les valeurs de FICV sont passées de 1.7 (- S9) et 1.0 (+S9) avant traitement à 2.5 (- S9) et à 1.9 (+ S9) après 9 mois de traitement. Les résultats Microtox[®] en phase solide n'ont pas été considérés car ce test était très sensible aux sols non-contaminés.

Quatre sols non-contaminés, échantillonnés dans différentes zones spécifiques (urbaines, agricoles, forestières) où aucune contamination ponctuelle n'a été enregistrée, ont été testés avec la même batterie. L'éluviation du sol non-contaminé agricole a induit la mortalité des daphnies (MT = 40%, NOEC = 32 % v/v). De plus, les éluviats de trois sols testés avec le SOS Chromotest en absence de S9, et d'un sol en présence de S9, ont montré une activité génotoxique (FICV entre 1.5 et 1.7). Des effets inhérents aux sols sont donc mesurables par certains biotests

Dans le but d'évaluer le biotraitement du sol contaminé aux hydrocarbures et de comparer les effets inhérents des sols non-contaminés à la toxicité mesurée sur les sols traités, deux outils de gestion des résultats écotoxicologiques ont été proposés. L'Indice écotoxicologique pour les sols (ESI) intègre en une valeur globale les résultats d'une batterie de biotests. La valeur de l'indice (S) qui en résulte permet la comparaison de différents échantillons. Le Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS) est établi à partir des résultats obtenus avec les sols non-contaminés et permet de différencier de la toxicité globale d'un sol, l'effet inhérent à tous les sols même non-contaminés. Sa valeur numérique correspond à la moyenne de toutes les valeurs S obtenues avec chaque sol non-contaminé. Ainsi, les échantillons récoltés avant (S = 0) et après le début du traitement (S = 0.48) présentaient une toxicité globale comparable à la toxicité inhérente des sols non-contaminés (NEAS = 0.10). Cependant les valeurs des échantillons prélevés après 5 mois (S = 1.21) et à la fin du procédé de traitement (S = 1.10) ont montré une toxicité augmentée (un ordre de grandeur en échelle logarithmique), et suggèrent que le procédé a été stoppé avant la

complète détoxification. Il faut toutefois tenir compte de la complexité inhérente à ces opérations et à l'hétérogénéité des sols.

L'évaluation écotoxicologique a donc prouvé qu'elle pouvait être un outil fiable pour connaître l'efficacité de détoxification d'un procédé biotechnologique, mais il est important de rester conscient de ses limites. Principalement, l'évaluation écotoxicologique, telle qu'appliquée actuellement, ne peut fournir de relation de causalité entre l'élimination des contaminants et celle des effets toxiques. Ainsi, la réduction des effets toxiques ne peut être directement expliquée par la diminution des métaux dans les boues. De même, la cause de l'apparition d'effets toxiques au cours du traitement du sol ne peut être déterminée par l'évaluation écotoxicologique. Il s'agit d'une méthode de détection globale des effets toxiques, qui peuvent être dus à la contamination initiale, aux agents de la biodégradation, aux métabolites, ou aux changements survenus dans la biodisponibilité des contaminants. Dans la perspective d'appliquer l'approche écotoxicologique à l'évaluation des systèmes sols/liquides et des procédés de traitement, ces travaux constituent des résultats importants.

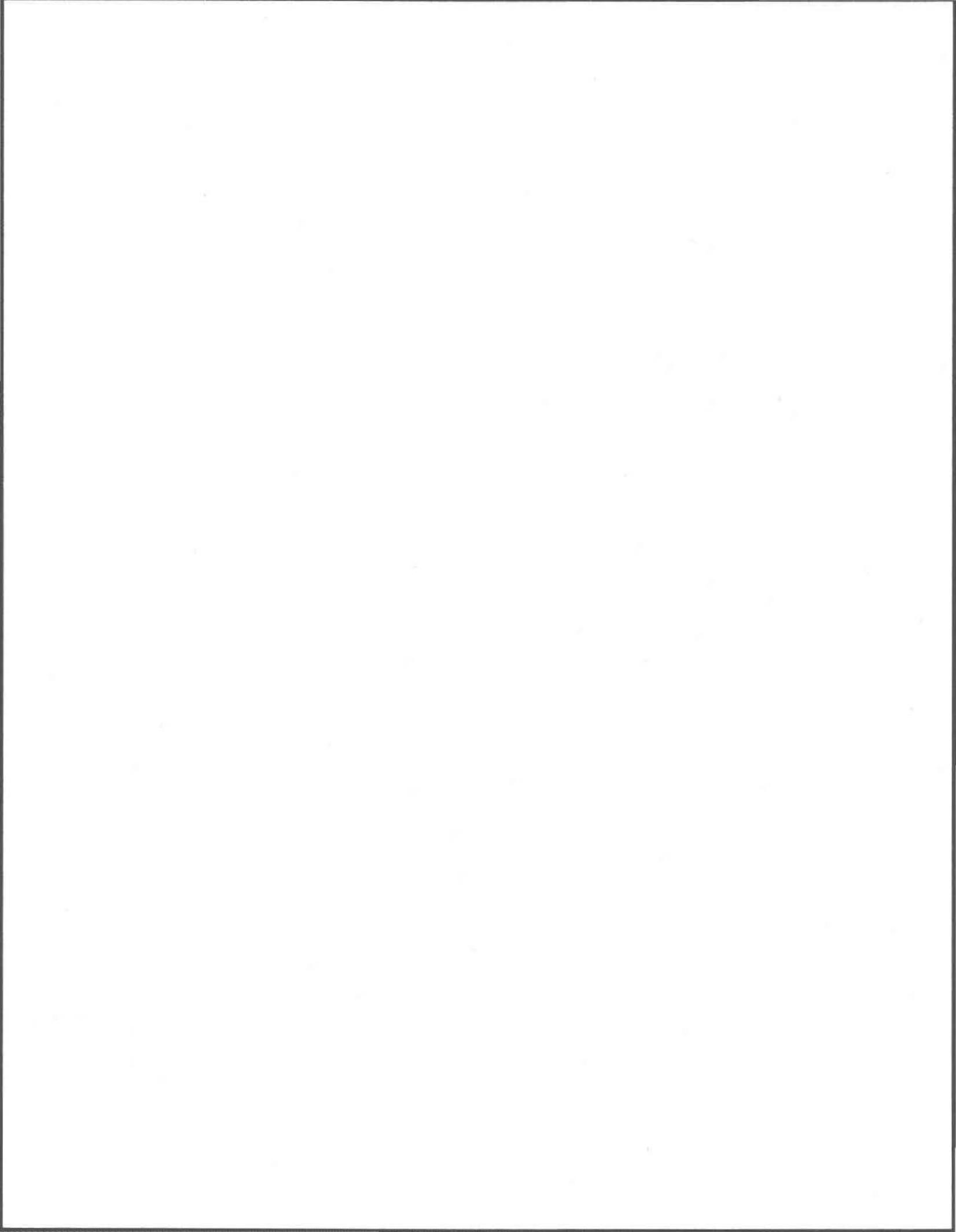


TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	vii
Résumé.....	ix
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures.....	xix
Définitions et abréviations.....	xxi
1 Introduction	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Revue de Littérature.....	2
1.2.1 Pédosphère.....	2
1.2.1.1 Caractéristiques du sol.....	2
1.2.1.2 Organismes vivants dans le sol.....	3
1.2.1.3 Contamination du sol.....	4
1.2.1.4 Conséquences de l'hétérogénéité du sol.....	5
1.2.2 Biotechnologies de restauration.....	7
1.2.2.1 Biodégradation des composés organiques.....	7
1.2.2.2 Bioélimination des métaux.....	8
1.2.2.3 Évaluations chimique et biologique.....	9
1.2.2.4 Biodégradation versus détoxification.....	10
1.2.2.5 Limites de l'évaluation chimique.....	10
1.2.3 Écotoxicologie.....	12
1.2.3.1 Définition.....	12
1.2.3.2 Évaluation écotoxicologique.....	14
1.2.3.3 Biotests.....	14
1.2.3.4 Mesure de la toxicité.....	15
1.2.3.5 Biotests pour les sols.....	16
1.2.4 Évaluations écotoxicologiques de biotraitements.....	17
1.2.4.1 Biotraitements de sols.....	17
1.2.4.2 Biotraitements de boues d'épuration.....	18
1.3 Hypothèse.....	18
1.4 Objectifs.....	19
1.5 Publication des résultats.....	20
2 Développement d'une batterie de biotests adaptée aux systèmes sols/liquides.....	21
2.1 Introduction.....	21
2.2 Biotests avec des plantes supérieures.....	21
2.2.1 Intérêt écologique des plantes supérieures.....	21
2.2.2 Biotests.....	22
2.2.3 Procédures.....	23
2.2.3.1 Tests de germination de graines de laitue (<i>Lactuca sativa</i>) et d'orge (<i>Hordeum vulgare</i>).....	23
2.2.3.2 Test de croissance de tiges d'orge (<i>Hordeum vulgare</i>).....	24

2.2.3.3	Test d'élongation racinaire chez la laitue (<i>Lactuca sativa</i>).....	24
2.3	Biotest de mortalité du ver <i>Eisenia foetida</i>	24
2.3.1	Intérêt écologique des vers de terre.....	24
2.3.2	Choix du biotest <i>Eisenia foetida</i> en phase solide.....	24
2.3.3	Description du ver <i>Eisenia foetida</i>	25
2.3.4	Procédure.....	25
2.4	Microtox® et Microtox® en phase solide.....	26
2.4.1	Intérêt du Microtox®.....	26
2.4.2	Principe.....	27
2.4.3	Procédure du Microtox®.....	27
2.4.4	Procédure du Microtox® en phase solide.....	28
2.4.5	Validité du Microtox® en phase solide.....	28
2.5	Test d'inhibition de croissance phytoplanctonique.....	29
2.5.1	Intérêt écologique des algues.....	29
2.5.2	Choix du biotest de croissance de <i>Selenastrum capricornutum</i>	29
2.5.3	Procédure.....	30
2.6	Test de mortalité des daphnies.....	31
2.6.1	Intérêt écologique des daphnies.....	31
2.6.2	Choix du biotest.....	32
2.6.3	Procédure.....	32
2.7	SOS Chromotest.....	33
2.7.1	Génotoxicité.....	33
2.7.2	Description du test.....	33
2.7.3	Procédure.....	34
2.7.4	SOS Chromotest en phase solide.....	36
2.7.5	Validité du SOS Chromotest en phase solide.....	36
2.8	Conclusion.....	37
3	Réduction de la toxicité dans un système sol/liquide.....	39
3.1	Introduction.....	39
3.2	Matériel et méthodes.....	41
3.2.1	Produits chimiques et solutions stock.....	41
3.2.2	Mesure de la toxicité.....	42
3.2.3	Analyses chimiques.....	43
3.2.4	Description des colonnes et échantillonnage.....	44
3.2.5	Analyses statistiques.....	46
3.3	Résultats et discussion.....	47
3.3.1	Effet des composés en solution pure.....	47
3.3.2	Résumé des résultats de biodégradation.....	50
3.3.3	Évaluation de la toxicité pendant la biodégradation.....	52
3.4	Conclusion.....	56
4	Biolixiviation des métaux des boues d'épuration.....	59
4.1	Introduction.....	59
4.2	Matériel et méthodes.....	62
4.2.1	Échantillonnage et caractérisation pédologique du sol AR9.....	62
4.2.2	Échantillonnage et conditionnement des boues.....	63
4.2.3	Analyses écotoxicologiques.....	68
4.2.4	Bioaccumulation des métaux.....	69
4.2.5	Analyses chimiques des métaux.....	70
4.2.6	Analyses chimiques des HAP.....	70

4.2.7	Analyses statistiques	71
4.3	Résultats et Discussion	72
4.3.1	Caractérisation chimique des boues et du sol AR9	72
4.3.2	Évaluation écotoxicologique après simulation de l'épandage des boues ...	73
4.3.2.1	Germination de la graine d'orge	74
4.3.2.2	Croissance de la tige d'orge.....	75
4.3.2.3	Germination de la graine de laitue	78
4.3.2.4	Mortalité du ver de terre	79
4.3.3	Évaluation écotoxicologique sur les éluviats de boues.....	81
4.3.3.1	Microtox®.....	82
4.3.3.2	Élongation racinaire.....	84
4.3.3.3	Croissance algale	86
4.3.3.4	Mortalité des daphnies	87
4.3.3.5	SOS Chromotest.....	88
4.3.3.6	Analyse des métaux, du carbone et du soufre dans les éluviats	89
4.3.4	Bioaccumulation des métaux et du soufre	90
4.3.4.1	Tiges d'orge.....	91
4.3.4.2	Vers.....	94
4.3.4.3	Facteurs de concentration.....	97
4.4	Conclusion	100
5	Évaluation d'un sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers pendant un procédé de biotraitement.....	101
5.1	Introduction	101
5.2	Matériel et méthodes	102
5.2.1	Sols étudiés.....	102
5.2.2	Caractérisation pédologique	105
5.2.3	Caractérisation chimique.....	106
5.2.3.1	Huiles et graisses minérales.....	106
5.2.3.2	Hydrocarbures polycycliques aromatiques.....	106
5.2.3.3	Pentachlorophénol.....	106
5.2.3.4	Métaux.....	107
5.2.4	Caractérisation écotoxicologique.....	107
5.2.4.1	Biotests	107
5.2.4.2	Analyses statistiques	109
5.3	Résultats et discussion.....	110
5.3.1	Biotests en phase solide.....	112
5.3.1.1	Microtox® en phase solide.....	112
5.3.1.2	Germination de graines et croissance de pousses d'orge	114
5.3.1.3	Mortalité des vers.....	115
5.3.2	Biotests sur éluviats.....	116
5.3.2.1	Croissance phytoplanctonique	116
5.3.2.2	Mortalité des daphnies	117
5.3.2.3	SOS Chromotest.....	118
5.4	Conclusion	120
6	Indice écotoxicologique pour les sols (IES) et niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS).....	121
6.1	Introduction	121
6.1.1	Indice écotoxicologique pour les sols (IES).....	121

6.1.2 Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS).....	121
6.2 Modèle théorique	122
6.2.1 Variables de mesures et formules de calcul.....	122
6.2.2 Calcul de l'IES.....	123
6.2.3 Calcul du NEAS	124
6.3 Résultats et discussion.....	125
6.4 Conclusion	128
7 Conclusion générale et recommandations.....	129
Bibliographie.....	135
Annexe A	159
Espèces pour lesquelles existent des méthodes expérimentales standardisée de biotests	159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1:	Concentrations finales en nutriments dans le milieu du biotest.....	31
Tableau 3.1:	Concentrations (C) déterminées par GC/MS, inhibitions (I) de la bioluminescence de <i>P. phosphoreum</i> de solutions stock de composés dérivés de la créosote, et valeurs de CI50.	47
Tableau 3.2:	Résultats d'analyses toxicologiques et chimiques des colonnes. Pourcentage moyen d'inhibition de la bioluminescence (I) des échantillons (n) collectés avant (entrée E) et après (orifice O-3) traitement.....	53
Tableau 3.3:	Résultats d'analyses toxicologiques et chimiques de la colonne R4p. Pourcentage moyen d'inhibition de la bioluminescence (I) des échantillons (n = 2) collectés à 82 j avant (entrée E) et le long de la colonne (orifices O-1 à O-3).....	54
Tableau 3.4:	Analyse de variance à deux facteurs ("colonne" et "traitement") sur la variable continue "inhibition de la bioluminescence".....	54
Tableau 4.1:	Caractéristiques pédologiques du sol AR9 (n = 3).....	63
Tableau 4.2:	Pourcentage moyen (pd/pd) et coefficient de variation (CV) du poids sec des boues humides après homogénéisation (n = 3).....	66
Tableau 4.3:	Pourcentage moyen (pd/pd) et coefficient de variation (CV) du poids sec des boues déshydratées et tamisées (n = 3).....	66
Tableau 4.4:	Poids sec (% pd/pd) et capacités maximales de rétention d'eau (mL/100 g) du sol AR9 et des boues épandues sur le sol AR9.....	67
Tableau 4.5:	Batterie de biotests en phase solide pour évaluation des boues épandues.....	68
Tableau 4.6:	Batterie de biotests en phase liquide pour évaluation des éluviats de boue.....	69
Tableau 4.7:	Composition moyenne (\pm é.t.) en métaux et en soufre des boues Bp et Xp et du sol AR9 (n = 2).....	72
Tableau 4.8:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "inhibition de germination de graines d'orge".....	74
Tableau 4.9:	Variables de mesure du test d'inhibition de germination de graines d'orge (<i>H. vulgare</i> L.) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9.....	75
Tableau 4.10:	Variables de mesure du test d'inhibition de croissance de tige d'orge (<i>H. vulgare</i> L.) après 14 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9.....	76
Tableau 4.11:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "inhibition de croissance de tige d'orge".....	77
Tableau 4.12:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "inhibition de germination de graines de laitue".....	79
Tableau 4.13:	Variables de mesure du test d'inhibition de germination de graines de laitue (<i>L. sativa</i>) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9.....	79
Tableau 4.14:	Variables de mesure du test de mortalité du ver de terre (<i>E. foetida</i>) après 14 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9.....	80

Tableau 4.15:	CI50 (\pm é.t. (n)) du test Microtox® (15 min) après exposition aux éluutriats de boues Bp et Xp, irradiés ou non, et congelés ou non	82
Tableau 4.16:	Toxicités maximales (MT) moyennes (\pm é.t. (n)) du test Microtox® (15 min) après exposition aux éluutriats de boues Bp et Xp, irradiés ou non, et congelés ou non	83
Tableau 4.17:	Analyse de variance à trois facteurs fixes (1: "type de boue", 2: "irradiation" et 3: "congélation") sur la variable continue "CI50 du Microtox®"	83
Tableau 4.18:	Variables de mesure du test d'inhibition d'élongation des racines de laitue (<i>L. sativa</i>) après 5 jours d'exposition dans les éluutriats de boues Bp ou Xp.....	86
Tableau 4.19:	Variables de mesure du test de mortalité des daphnies (<i>D. magna</i>) après 48 heures d'exposition à l'éluutriat des boues Bp ou Xp.....	88
Tableau 4.20:	Composition moyenne (\pm é.t.) en métaux, en carbone et en soufre des éluutriats des boues Bp et Xp (n = 4).....	89
Tableau 4.21:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Cu chez l'orge"	91
Tableau 4.22:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Mn chez l'orge"	92
Tableau 4.23:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du S chez l'orge"	92
Tableau 4.24:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Cu chez le ver".....	95
Tableau 4.25:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Mn chez le ver".....	95
Tableau 4.26:	Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Zn chez le ver".....	95
Tableau 5.1:	Caractérisation chimique des sols "non-contaminés" et critères pour les sols du Ministère de l'Environnement du Québec (MENVIQ).....	104
Tableau 5.2:	Caractéristiques pédologiques des sols Urb, AUr, Agr, FOr et Ctl.....	105
Tableau 5.3:	Batterie de biotests en contact direct pour évaluation de la phase solide	108
Tableau 5.4:	Batterie de biotests en phase liquide pour évaluation des éluutriats de sol.....	109
Tableau 5.5:	Résultats de toxicité des sols non-contaminés et contaminés pendant le biotraitement pour chacun des biotests produisant une réponse positive.....	111
Tableau 6.1:	valeurs de toxicité T et calculs de l'Indice écotoxicologique des sols (S).....	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1:	Voies d'exposition des organismes aux contaminants du sol.....	6
Figure 2.1:	Dispositif de filtration du Microtox® en phase solide.....	28
Figure 3.1:	Structures du phénanthrène, du fluorène, du carbazole et du p-crésol....	42
Figure 3.2:	Montage expérimental d'une colonne.....	45
Figure 3.3:	Relations dose-réponse entre le p-crésol (a), le phénanthrène (b) et le fluorène (c), solubilisés dans du MSM (cercles) ou dans de l'eau déionisée (carrés), et l'émission de lumière de <i>P. phosphoreum</i> . Inhibition moyenne \pm écart type (n = 3). Cercles blancs = duplicata ...	49
Figure 3.4:	Transformations (conc./conc. initiale) du phénanthrène (P), du fluorène (F), du carbazole (C) et du p-crésol (pC) dans les colonnes à l'orifice O3. P = 165 μ g/L, F = 238, pC = 10000 et C = 166 pour le signe "+" et P = 33 et F = 48 pour le signe "-", "0" indique l'absence du composé.....	51
Figure 4.1:	Traitement des boues.....	64
Figure 4.2:	Conditionnement des boues.....	65
Figure 4.3:	Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition de germination de graines d'orge (<i>H. vulgare</i> L.) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3).....	75
Figure 4.4:	Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition de croissance de tiges d'orge (<i>H. vulgare</i> L.) après 14 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3).....	77
Figure 4.5:	Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition de germination de graines de laitue (<i>L. sativa</i>) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3).....	78
Figure 4.6:	Poids moyen (\pm é.t.) d'un ver (<i>E. foetida</i>) après 28 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3).....	81
Figure 4.7:	Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition d'élongation racinaire de la laitue (<i>L. sativa</i>) après 120 heures d'exposition aux éluutriats de boue (n = 3). Échantillons testés sans délai (Bp1/Xp1) ou après 2 mois de conservation à -20°C (Bp2/Xp2).	85
Figure 4.8:	Mortalité moyenne (\pm é.t.) de <i>D. magna</i> (%) après 48 heures d'exposition à l'éluutriat des boues Bp ou Xp (n = 3).....	88
Figure 4.9:	Teneurs moyennes (\pm é.t.) en Cu, Mn et S des tiges d'orge <i>H. vulgare</i> L. en fonction de la boue Bp ou Xp et du taux d'amendement (n = 3). a: différence significative (P < 0.05) avec le sol AR9. b: différence significative (P < 0.05) avec la boue Xp au même taux d'amendement.....	93
Figure 4.10:	Teneurs moyennes (\pm é.t.) en Cu, Mn et S dans les vers <i>E. foetida</i> en fonction de la boue Bp ou Xp et du taux d'amendement (n = 3). a: différence significative (P < 0.05) avec le sol AR9. b: différence significative (P < 0.05) avec la boue Xp au même taux d'amendement.	96
Figure 4.12:	Évolution des facteurs de concentration en Mn dans l'orge <i>H. vulgare</i> , en fonction du taux d'amendement de la boue Bp ou Xp ...	99
Figure 5.1:	Inhibition d'émission de lumière, telle que mesurée par le Microtox® en phase solide après 20 min d'exposition avec les sols "non-	

	contaminés" (a) et les sols contaminés échantillonnés pendant le biotraitement (b)	113
Figure 5.2:	Inhibition de germination de graines d'orge (<i>Hordeum vulgare</i>) après 14 j, pour les échantillons contaminés (concentration en sol de 100%) à différents temps de traitement. Moyennes (n = 3) ± écarts types. Probabilité de Tukey indiquée pour différence significative avec témoin négatif.....	115
Figure 5.3:	Mortalité des vers (<i>Eisenia foetida</i>) après 14 j à différentes concentrations du sol Apr92. Moyennes (n = 3) ± écarts types.....	116
Figure 5.4:	Mortalité de daphnies (<i>Daphnia magna</i>) après 48 h, à différentes concentrations en échantillons Agr et Aug92. Moyennes (n = 4) ± écarts types. Probabilité de Mann-Whitney indiquée pour différence significative avec témoin négatif.....	118

DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

Aigu: dans une période très courte par rapport à la durée de vie des organismes (de l'ordre de la minute pour des bactéries aux jours pour des poissons)

Biocœnose: ensemble des espèces qui habitent un milieu déterminé

Biolixiviation: procédé biotechnologique qui permet l'enlèvement des métaux des boues d'épuration après solubilisation par la baisse du pH

Bioluminescence: phénomène d'émission de lumière par des organismes vivants résultant d'activités biochimiques

Biotest: outil bioanalytique qui permet de quantifier le potentiel toxique

Chronique: se produisant durant une période de temps relativement longue (10% ou plus) par rapport à l'espérance de vie d'un organisme

CI50: concentration inhibitrice médiane, c. à d. concentration estimée en matériel produisant 50% d'inhibition (variable de mesure)

CL50: concentration létale médiane, c. à d. concentration estimée en matériel produisant 50% de mortalité des organismes exposés (variable de mesure)

Contaminant: substance que l'on retrouve dans l'environnement, au moins en partie comme résultat de l'activité humaine, et qui a des effets délétères sur les organismes vivants

CV: coefficient de variation

Danger: effet indésirable sur l'Homme ou autre *biota* provenant de la contamination

df: de l'anglais *degree of freedom*, degré de liberté statistique

é.t.: écart type

Élutriat: (parfois dénomé lixiviat) solution aqueuse obtenue après addition d'eau à un matériel solide, mélange, et séparation par centrifugation, décantation ou filtration du surnageant

F: ratio des variances dans une analyse de variance

FICV: facteur d'induction corrigé pour la viabilité du test SOS Chromotest indiquant la présence d'effets génotoxiques

Génotoxicité: effet néfaste manifesté sur le génome (mutation, aberration chromosomique...)

Hormèse: propriété particulière de certaines substances qui, administrées en petite quantité, ont une action stimulante alors qu'à plus fortes doses elles exercent un effet inhibiteur

ISO: International Standards Organization

LOEC: de l'anglais *Lowest Observed Effect Concentration*, concentration testée statistiquement la plus faible produisant un effet toxique sur les organismes cibles

MENVIQ: Ministère de l'Environnement du Québec, aujourd'hui dénommé MEF, Ministère de l'Environnement et de la Faune

MS: de l'anglais *mean square*, terme statistique désignant la moyenne des carrés

MT: Amplitude maximale de l'effet toxique produit par un échantillon en terme de pourcentage d'inhibition ou de mortalité

NEAS: Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols

NOEC: de l'anglais *No Observed Effect Concentration*, concentration testée la plus forte produisant aucun effet statistiquement toxique sur les organismes cibles

Non-contaminé: dans le contexte de cette recherche, s'entend par sol "non-contaminé" un sol n'ayant subi aucune contamination ponctuelle tel un déversement; les dépôts atmosphériques ou les résidus de pesticide n'ayant pas été considérés comme une contamination.

OCDE: Organisation pour la coopération et le développement économique

P: probabilité statistique

PEEP: de l'anglais *Potential Ecotoxic Effect Probe* qui est un indice permettant d'intégrer les résultats écotoxicologiques d'effluents

Témoin négatif: traitement durant un test de toxicité qui duplique toutes les conditions et les facteurs de l'exposition excepté le matériel à tester

Témoin positif: composé standard ou toxique de référence utilisé pour mesurer la stabilité de la sensibilité des organismes testés

Témoin: traitement durant un test de toxicité où les organismes ne sont exposés à aucune condition particulière ou matériel à tester; équivalent parfois à témoin négatif

Toxicité aiguë: causant un effet toxique sur les organismes cibles après une période très courte d'exposition au matériel à tester

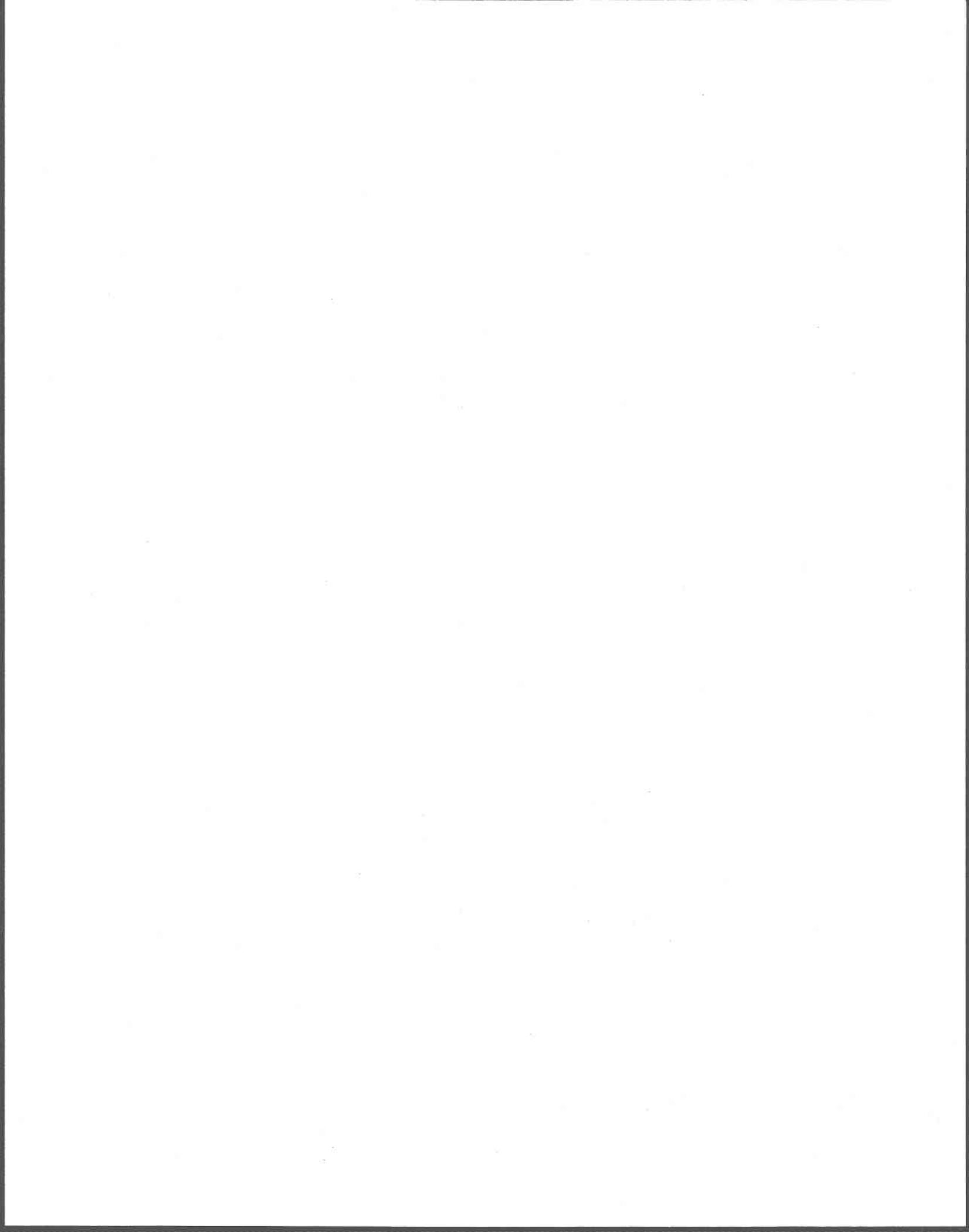
Toxicité chronique: causant un effet toxique sur les organismes cibles après une longue période d'exposition au matériel à tester, en général administré à doses sublétales

TU: seuil toxique correspondant à l'inverse de la moyenne géométrique de la NOEC et de la LOEC et exprimé en unités toxiques

US-EPA: United States Environmental Protection Agency

Variable d'effet: variable (mortalité, inhibition de croissance...) qui indique l'effet étudié par le biotest (se traduit par *end point* en anglais)

Variable de mesure: mesure ou valeur dérivée (MT, CL50, CI50, LOEC...) qui caractérise le résultat obtenu sur la variable d'effet (se traduit également par *end point* en anglais)



1 INTRODUCTION

1.1 Problématique

L'accumulation de polluants dans les sols est un phénomène assez ancien, mais dont la prise de conscience est relativement récente (trois dernières décennies). Aujourd'hui l'industrialisation poussée de notre société nous place devant la gestion des sites contaminés et des déchets toxiques. La menace que ces derniers représentent a suscité la volonté de remédier aux problèmes de pollution des sols par l'élaboration de technologies innovatrices de décontamination. Parmi ces technologies, les procédés biotechnologiques de restauration ont fait la preuve, dans certains cas, de leur efficacité à éliminer la contamination et de leur rentabilité.

L'élimination de la contamination signifie, pour un grand nombre, l'élimination des effets qu'elle engendre. Or, cette relation n'est pas vérifiée systématiquement et, pour en faire la preuve, il faut ajouter aux outils d'évaluation du procédé, la caractérisation des effets. Caractériser les effets d'un contaminant sur l'environnement est du domaine de l'écotoxicologie et a fait l'objet de très nombreuses études en ce qui a trait à la contamination des systèmes aquatiques. Cependant la complexité des sols et des matrices relatives aux sols (eaux souterraines, boues...) rend cette caractérisation difficile.

Bien que l'évaluation écotoxicologique ne soit pas un concept nouveau, son application pour évaluer des procédés biotechnologiques de restauration des sols et des boues n'est que très récente et soulève encore de nombreuses questions. Ce projet de doctorat s'est donc proposé d'appliquer l'évaluation écotoxicologique, par le biais d'une batterie de biotests standardisés, pour évaluer la relation biodécontamination-détoxication sur des matrices relatives au sol. Les matrices relatives aux sols peuvent être de différentes natures. Trois études de cas d'un degré de complexité croissant, la biodégradation en colonnes expérimentales de composés dérivés de la créosote, la biolixiviation des métaux lourds des boues d'épuration et la biorestauration d'un sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers ont donc permis d'en étudier l'applicabilité.

Le présent document est organisé de la façon suivante. La revue de littérature introduit la problématique générale des sols, des biotechnologies de restauration et de l'évaluation

écotoxicologique, qui conduit aux objectifs de la recherche. La batterie de biotests est détaillée au chapitre 2. Pour faciliter la publication ultérieure des résultats dans des revues scientifiques, une étude de cas est décrite par chapitre qui regroupe une introduction, le matériel et les méthodes spécifiques à l'étude, les résultats accompagnés de leur discussion, ainsi que la conclusion relative au chapitre. Le chapitre 3 permet de démontrer dans un système expérimental l'hypothèse que la biodégradation entraîne une réduction de la toxicité. L'évaluation écotoxicologique est appliquée à un système d'assainissement de boues au chapitre 4 et de décontamination de sol au chapitre 5. Un outil de traitement des données est proposé au chapitre 6. La conclusion générale reprends les conclusions de chaque chapitre et les intègre pour répondre aux objectifs de la recherche.

1.2 Revue de Littérature

1.2.1 Pédosphère

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes propres aux écosystèmes continentaux. Leur ensemble est dénommé pédosphère. En comparaison à l'eau et à l'air, le sol est immobile et spatialement hétérogène. Pourtant, ce milieu est en échange constant avec l'atmosphère, le milieu aquatique par les eaux souterraines, et la biosphère par les plantes et les organismes vivant dans le sol. Le sol est divisé en différentes zones et horizons. Principalement il est possible de distinguer la zone vadoze (sol où persiste des compartiments aérés) de la zone saturée qui est baignée par la nappe phréatique. La structure du sol est complexe. Les caractéristiques de ce milieu et les principaux organismes le colonisant sont détaillés dans cette section. Y sont également présentés la contamination et les conséquences de l'hétérogénéité du sol sur l'exposition des organismes à cette contamination.

1.2.1.1 Caractéristiques du sol

La formation des sols représente un processus complexe consistant en la transformation des roches situées à la surface de la croûte terrestre par l'effet conjugué des facteurs climatiques et des êtres vivants. La matrice du sol comprend trois compartiments, solide, liquide et gazeux, difficilement distinguables. Le sol est un mélange complexe de matière minérales et organiques provenant de la décomposition des êtres vivants après leur mort et de leurs excréments. La texture du sol dépend de la nature des fragments de roche-mère. L'analyse granulométrique permet de distinguer des éléments grossiers (cailloux et graviers) ainsi que des éléments fins (sables, limons et argiles). Les sables mesurent entre 2 mm et 53 μm de diamètre, les limons de 53 à 2 μm , et les argiles moins de 2 μm . La proportion relative

d'éléments fins constituant la fraction minérale permet de classer selon leur texture les divers types de sol. La texture présente une grande importance agronomique car c'est d'elle que dépend pour une grande part la circulation de l'eau dans les sols et la capacité de rétention d'eau du sol. La texture influence aussi l'absorption et la biodisponibilité des éléments essentiels et des contaminants. Le pH des eaux libres et interstitielles contenues dans la porosité détermine si le sol est acide ou basique et intervient dans l'absorption des éléments. La fraction colloïdale (micelles) contrôle le pH des sols en régulant les échanges d'ions. Cette fraction, résultant de l'association de particules argileuses et de composés humiques insolubles, libère des anions et des cations de divers métaux (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) en échange d'autres ions contenus dans l'eau interstitielle. La mesure de la capacité d'échange cationique (CEC) estime donc la capacité du sol à retenir les cations. La fraction colloïdale est également responsable du pouvoir tampon du sol. (Sources: Gee et Bauder (1986), Foth (1990), Wershaw (1993))

1.2.1.2 Organismes vivants dans le sol

D'un point de vue écologique, le sol est à la base de la chaîne alimentaire (production primaire des végétaux) et à sa fin (décomposition des organismes). Les fonctions principales du sol sont celles associées à la décomposition de la matière organique, la minéralisation des nutriments et la synthèse des composés humiques, et à l'apport des substances nutritives essentielles à la croissance des plantes. Une partie importante des cycles du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre se situe dans le sol (Barkay *et al.*, 1986; Paul et Clark, 1989). La vie dans le sol est très diverse en termes taxonomiques et écologiques. Cependant, les organismes y vivant sont en général très petits, et la protection des fonctions dont ils sont responsables apparaît plus évidente que leur protection en tant qu'espèces menacées!

Les organismes vivants dans le sol sont principalement des microorganismes, des invertébrés et des plantes. La diversité des groupes taxonomiques est illustrée par Paul et Clark (1989). Les bactéries sont de loin les organismes les plus nombreux dans le sol, leur nombre variant de 10^6 à 10^9 cellules par gramme de sol. Les espèces prédominantes de décomposeurs sont *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Bacillus*. Le sol est riche également en organotrophes capables de fixer l'azote symbiotiquement avec les plantes (*Azotobacter*), en chemolithotrophes capables de convertir NH_4 en NO_2^- et NO_2^- en NO_3^- (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*). Les bactéries du sol se caractérisent par leur ubiquité sur la planète, bien que leur distribution varie selon les climats, que leur nombre décroît avec la

profondeur et la quantité de matière organique, et qu'elles se retrouvent en grande proportion dans la rhizosphère. Des champignons filamenteux, qui par leur hyphes ont la capacité de coloniser le sol, participent à la décomposition du bois (basidiomycètes) et parasitent les plantes (ascomycètes). Les cyanobactéries peuvent contribuer à la fixation de l'azote. Des espèces de phytoplancton se retrouvent dans le sol et croissent en présence de lumière. En association symbiotique avec des champignons, certaines espèces phytoplanctoniques forment le lichen. Le lichen colonise les roches, les zones arctiques en conditions inhospitalières et participe ainsi aux premières étapes de la pédogénèse. Les protozoaires sont prédateurs des bactéries et, en assurant l'équilibre écologique des bactéries, favorisent leur activité de décomposition. Parmi les métazoaires, se retrouvent des nématodes, des mille-pattes, des mites, des annélides, des araignées et des insectes. Les nématodes sont les plus nombreux (plusieurs millions par m³) et parasitent les plantes et les animaux. La présence des métazoaires a de nombreux effets sur les propriétés physico-chimiques du sol notamment en ce qui a trait au maintien de la structure, au transport de la matière organique vers des couches plus profondes, à la fragmentation de la litière, à la prédation des bactéries et des champignons et à l'amélioration des taux de respiration du sol. (Sources: Paul et Clark (1989), Foth (1990))

1.2.1.3 Contamination du sol

L'importante capacité de rétention du sol le rend très susceptible à l'accumulation des contaminants. La contamination, organique ou inorganique, peut provenir d'un dépôt accidentel (déversement) ou d'une accumulation à moyen ou long terme (épandage de boues contaminées, dépôt atmosphérique, passage des eaux souterraines) (Sheppard *et al.*, 1992). Tout comme les constituants du sol, les contaminants présentent une importante hétérogénéité spatiale. Chimiquement, les contaminants peuvent se retrouver dans le sol comme particules distinctes, dissous dans l'eau interstitielle, volatilisés dans l'air, adsorbés aux particules minérales et organiques, et absorbés dans les particules minérales et organiques. Le comportement de chaque forme diffère suivant les conditions environnementales (Eijsackers, 1994): des changements dans le potentiel rédox ou le pH, par exemple, affectent plus les contaminants adhérant aux particules minérales qu'aux particules organiques, les contaminants absorbés par la matière organique peuvent être mobilisés par la décomposition de la matière organique, les contaminants adsorbés aux colloïdes organiques sont facilement lixiviés avec ces colloïdes. En conséquence, les concentrations en substances chimiques dans la matrice du sol fournissent peu d'information sur leur degré de

(bio)disponibilité qui est influencé principalement par les propriétés physiques et chimiques du sol.

1.2.1.4 Conséquences de l'hétérogénéité du sol

L'hétérogénéité dans la constitution des sols est à l'origine des difficultés rencontrées pour évaluer les effets toxiques qu'ils produisent. Ces difficultés se rencontrent à plusieurs niveaux. Tout d'abord au niveau de la distribution des contaminants et de leur biodisponibilité. Comme il a été discuté au paragraphe précédent, les concentrations en contaminants fournissent peu d'information sur leur disponibilité chimique. De plus, l'activité toxicologique des contaminants liés est controversée. Alors que certains auteurs prétendent que les concentrations des contaminants solubilisés peuvent prédire leur toxicité (van Gestel *et al.*, 1991; Weissenfels *et al.*, 1992), d'autres affirment que les contaminants liés aux particules peuvent se comporter comme des toxiques, ne serait-ce que par un lent relargage microbien (Gunkel *et al.*, 1993; Scheunert *et al.*, 1995) ou par ingestion des particules contaminées (Landrum et Robbins, 1990). L'impact que peut avoir un sol contaminé sur son environnement est souvent plus important que prévu. Non seulement, la biocœnose du sol peut être affectée, mais aussi le ruissellement pluvial peut entraîner vers les eaux souterraines de nombreux composés toxiques qu'on pensait immobilisés sur le site d'enfouissement plus ou moins imperméable (Poels *et al.*, 1991). À titre d'indication, la figure 1.1 montre la complexité de l'exposition des organismes à la contamination véhiculée à partir des sols.

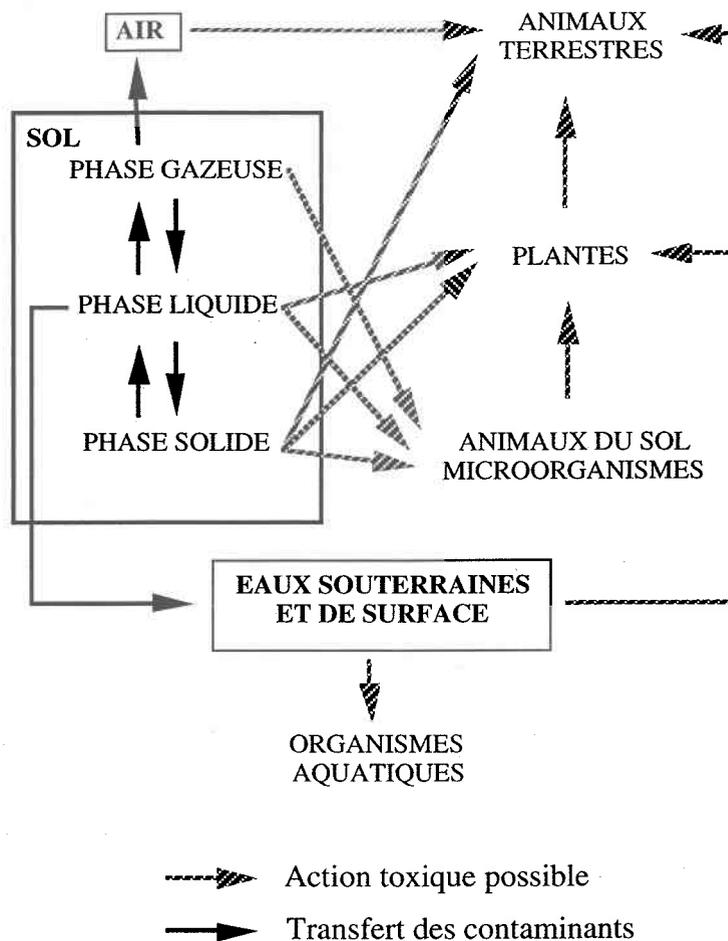


Figure 1.1: Voies d'exposition des organismes aux contaminants du sol

Les organismes peuvent être exposés aux polluants présents dans les sols par différentes voies. Pour les organismes vivants dans le sol, les voies principales d'exposition sont (i) l'ingestion de sol, (ii) le contact direct (dermal, membranaire...) de l'organisme avec le sol ou la phase aqueuse du sol, (iii) l'inhalation des composés volatilés dans le compartiment gazeux (bien qu'il n'y est pas de données sur ces effets) et (iv) l'effet indirect par interactions avec d'autres organismes (symbiose, proie-prédateur...). Les organismes terrestres et aquatiques peuvent également être exposés à la contamination après transfert par volatilisation ou solubilisation. Il est donc important qu'une évaluation écotoxicologique de sol englobe toutes les voies de transfert des contaminants et qu'elle soit en mesure d'évaluer leur biodisponibilité. Le contact direct des organismes avec le sol dans lequel ils vivent est la voie d'exposition la plus importante à considérer. Le contact direct présente l'avantage sur

les extractions complètes (solvants ou acides) de considérer la biodisponibilité réelle des contaminants et évite d'avoir à formuler des hypothèses sur cette biodisponibilité. La contamination des eaux souterraines par les composés hydrosolubles, via les eaux d'infiltration, peut être simulée par une procédure d'élutration (Chiang *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1989) accompagnée de biotests aquatiques. Aucune procédure n'est disponible pour simuler l'exposition d'organismes aux composés volatiles échappés du sol.

1.2.2 Biotechnologies de restauration

Plusieurs technologies de restauration des sols et de traitement des boues d'épuration sont actuellement évaluées par les industries et les agences gouvernementales (Daley, 1989). Parmi ces technologies figurent différents procédés physico-chimiques (solidification, stabilisation, neutralisation, volatilisation, lavage...) et divers traitements thermiques et biologiques (Daley, 1989; Kim et Gee, 1993). Les procédés de décontamination par voie biologique, ou biorestauration, offrent beaucoup de potentiel. L'efficacité des systèmes biologiques à éliminer les contaminants a déjà été prouvée par leur importante utilisation dans les usines d'épuration des eaux usées. Le traitement biologique est un terme général regroupant différents aspects de la biotechnologie appliquée à l'élimination des contaminants. Les différentes technologies ont en commun l'utilisation de microorganismes pour dégrader les polluants dans le cas des composés organiques ou les séparer de la matrice dans le cas des inorganiques. Pour les sols, les traitements biologiques apportent une solution à la fois économique et facile à mettre en oeuvre (Lee *et al.*, 1988). Ces traitements présentent aussi l'avantage de ne pas altérer la structure du sol comme c'est le cas avec les traitements thermiques par exemple.

1.2.2.1 Biodégradation des composés organiques

La biodégradation est la transformation par voie biologique qui conduit à la simplification dans la structure d'un composé organique, par rupture de liaisons moléculaires; la simplification peut être subtile et n'impliquer que la substitution d'un groupe fonctionnel ou complexe et mener à la minéralisation, c. à d. la conversion complète d'une molécule organique en ses constituants inorganiques (CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) (Madsen, 1991). D'un point de vue microbiologique, il existe deux approches au traitement biologique: l'approche microbiologique ou bioaugmentation et l'approche d'écologie microbienne ou biostimulation (Ritter et Scarborough, 1995). La bioaugmentation est réalisée par l'introduction d'une ou plusieurs espèces de microorganismes dégradant spécifiquement le contaminant cible, alors que durant la biostimulation la dégradation s'opère par les

organismes indigènes du sol après ajustement de certains paramètres physico-chimiques (addition de substances nutritives et oxygénation par exemple). Les aspects microbiologiques et chimiques de la biodégradation ont été étudiés pour de nombreux polluants des sols (Alexander, 1981; Atlas, 1981; Morgan et Watkinson, 1989). Différents facteurs contrôlent la biodégradation; parmi eux se retrouvent essentiellement la nature et la concentration des polluants, la composition du sol et le climat. Ainsi, le succès de la décontamination est limitée si le composé est récalcitrant à la biodégradation, comme c'est le cas des hydrocarbures de haut poids moléculaire ou en présence de fortes concentrations de métaux lourds pouvant être toxiques pour les organismes (Samson *et al.*, 1990).

Parmi les traitements biologiques destinés à restaurer les sols se distinguent les technologies *in situ* et *ex situ* (Samson *et al.*, 1990). Le traitement *in situ* nécessite une infrastructure pour contrôler le procédé qui permet de traiter sur place le sol et/ou les eaux souterraines (Madsen, 1991). Le traitement *ex situ* implique l'excavation du sol ou l'extraction des contaminants avant d'être traités en bioréacteur ou en biopile. Le traitement peut alors être aérobie ou anaérobie. Le traitement en biopile est réalisé en déposant le sol sur une surface imperméable, aménagée en cuvette de rétention avec drain de récupération afin de recueillir les eaux de lixiviation qui seront éventuellement recyclées. Un géotextile semi-perméable est appliqué sur la pile empêchant l'eau de pluie de percoler, ce qui réduit les quantités de lixiviat, et permet de contrôler les émissions atmosphériques. L'aération est fournie en aspirant l'air à travers le sol, tandis que l'eau et les substances nutritives sont introduites par arrosage. Le succès du traitement dépend du soin apporté à la préparation initiale du sol. L'humidité peut être maintenue par l'incorporation de gypse, ayant pour propriété de retenir l'eau. Des agents structurants comme les copeaux de bois et le bran de scie peuvent être ajoutés pour réduire la densité des sols (Desrochers *et al.*, 1993).

1.2.2.2 Bioélimination des métaux

Les métaux lourds rejetés dans les eaux usées domestiques et industrielles sont concentrés dans les boues municipales entre 0.5 et 2% sur base de poids sec (6% dans des cas extrêmes) (Lester *et al.*, 1983; Rudd, 1987), ce qui représente un problème important pour le rejet final des boues dans l'environnement et plus directement pour la santé publique (Webber, 1972; Cunningham *et al.*, 1975; Lake, 1986; Chaney, 1990). Plusieurs méthodes chimiques d'extraction des métaux des boues ont été étudiées (Olver *et al.*, 1975; Scott et Horlings, 1975; Jenkins *et al.*, 1981). Certains procédés, tel le traitement à l'acide, donnent de bons rendements d'extraction par solubilisation. Toutefois, les coûts élevés, en acide

entre autres, rendent ces techniques peu attirantes. Au cours de ces dernières années, différentes études ont été menées afin de mettre au point un système biologique d'extraction des métaux lourds associés aux boues produites lors de l'épuration des eaux usées (Wong et Henry, 1983; Tyagi *et al.*, 1988). Ces études ont conduit au développement d'un procédé peu onéreux dit de "biolixiviation" des métaux (Tyagi et Couillard, 1989; Blais *et al.*, 1992b; Blais *et al.*, 1993). La biolixiviation exploite la capacité de bactéries autotrophes du genre *Thiobacilli*, d'abaisser le pH des boues par oxydation du soufre élémentaire (substrat) en acide sulfurique (réaction 1):



La coopération de deux espèces, *Thiobacillus thioparus* et *Thiobacillus thiooxidans*, permet d'abaisser le pH des boues aux environs de 1.5-2.0 (Blais *et al.*, 1992a). Cette baisse de pH, accompagnée d'un haut potentiel d'oxydo-réduction, favorise la solubilisation des métaux lourds. Ces bactéries peuvent également solubiliser des métaux en tirant leur énergie de l'oxydation directe des sulfures de métaux (MS, où M désigne un métal) en sulfates solubles (réaction 2).



Les métaux solubilisés dans les boues lors du procédé de biolixiviation sont ensuite séparés des solides par les méthodes conventionnelles de séparation solide-liquide. Les métaux en solutions sont précipités à pH 10 par addition de chaux. De plus, l'optimisation du bioprocédé a permis que les boues soient digérées simultanément à la solubilisation des métaux en réduisant les pathogènes et les solides volatils en suspension (Tyagi *et al.*, 1993). Ce procédé permet de réduire considérablement le volume des déchets et permet même d'envisager la récupération sélective des métaux.

1.2.2.3 Évaluations chimique et biologique

Les évaluations chimiques sont utilisées systématiquement pour démontrer l'efficacité de traitement d'une technologie. Le suivi rigoureux des polluants s'effectue selon des méthodes standard d'extraction et d'analyses chimiques (American Public Health Association, 1989; Kreuzig et Bahadir, 1991). Les concentrations en contaminant permettent, en se basant sur des critères de restauration ou de qualité des sols, de démontrer que les objectifs de décontamination ont été atteints (Ministère de l'Environnement du Québec, 1990). À titre d'exemple, les critères du MENVIQ (Ministère de l'Environnement du Québec) actuellement

en vigueur sont donnés au tableau 5.1 du chapitre 5. Les critères, spécifiques pour chaque composé, varient en fonction de la gestion future de la matrice (agriculture, industrie...), du pays, mais aussi des connaissances toxicologiques sur les composés. Ainsi, au Canada, des critères basés sur des résultats de toxicité sont en développement (Sheppard *et al.*, 1992). La contamination par les métaux lourds lors de l'épandage des boues en milieu agricole a fait l'objet de nombreuses études et a conduit à l'établissement de critères pouvant s'avérer très différents d'un pays à l'autre (Webber *et al.*, 1984; Tjell, 1986; Webber, 1988).

D'autres paramètres physico-chimiques (O_2 , NO_3^- , température, potentiel d'oxydo-réduction, pH, substances nutritives...) et biologiques font l'objet d'un suivi pendant une phase de biotraitement (Tyagi et Couillard, 1989; Heitzer et Sayler, 1993). L'évaluation biologique permet le contrôle du procédé et la vérification de la nature biologique de l'activité de dégradation ou de solubilisation. Les comptes totaux, la respirométrie, la minéralisation de composés marqués, et l'utilisation de sondes moléculaires capables de reconnaître les bactéries responsables spécifiquement de la dégradation d'un contaminant donné sont des outils qui permettent de suivre la biodégradation (Blais *et al.*, 1992a; Heitzer et Sayler, 1993; MacDonald et Rittmann, 1993; Samson *et al.*, 1994).

1.2.2.4 Biodégradation versus détoxification

Le rôle le plus important des microorganismes dans la transformation des polluants est leur capacité à détoxifier, c'est à dire à éliminer la toxicité. Les processus microbiologiques de dégradation peuvent mener à l'élimination des composés (minéralisation), la formation de produits intermédiaires plus, ou moins toxiques que les composés parents, ou la biosynthèse de produits persistants. Suivant la structure chimique du contaminant, différents processus, peuvent mener à la détoxification (Alexander, 1994): (i) l'hydrolyse (rupture d'une liaison par l'addition d'une molécule d'eau), (ii) l'hydroxylation (addition d'une liaison -OH), (iii) la déhalogénéation (élimination d'un atome halogène), (iv) la déméthylation ou déalkylation (enlèvement d'une substitution méthyl ou alkyl) (v) la méthylation (addition d'un méthyl), (vi) la nitro-réduction (réduction d'un groupe nitro ($-NO_2$) en un amine ($-NH_2$)), (vii) la déamination (enlèvement d'un amine ($-NH_2$)), (viii) la conversion de nitrile ($-CN$) en amide ($-CO-NH_2$), (ix) la conjugaison (liaison entre une molécule cellulaire et le xénobionte).

1.2.2.5 Limites de l'évaluation chimique

Le niveau de décontamination est évalué par une caractérisation physico-chimique en suivant la disparition des composés et en déterminant les concentrations résiduelles. Cependant, les

résultats des analyses chimiques ne sont pas nécessairement reliés aux effets biologiques. Ces études font abstraction du niveau de toxicité résiduelle (Brown et Donnelly, 1983; Bossert *et al.*, 1984; Liu, 1986; van Deelen, 1987; Bergström *et al.*, 1991). En effet, plusieurs problèmes se profilent derrière ces procédés et leur suivi:

(a) Les sensibilités des analyses chimiques et toxicologiques sont différentes: l'étude de Donnelly *et al.* (1985) montre que certains composés présents dans une eau de ruissellement de déchets pétroliers, non détectables en chromatographie et spectrométrie de masse, étaient génotoxiques. D'autres études ont suggéré que des dérivés des HAP présents à des taux inférieurs aux limites de détection pouvaient être responsables dans une large proportion d'une activité mutagène (Donnelly *et al.*, 1988a; Svenson et Kaj, 1989).

(b) La toxicité des sous-produits de la biodégradation et de leurs métabolites est négligée: les sous-produits de la biodégradation sont parfois plus toxiques directement ou après métabolisation, que le contaminant lui-même (Alexander, 1981; Donnelly *et al.*, 1987). Ainsi les voies de détoxification (voir paragraphe 1.2.1.4) peuvent mener à la formation de composés plus toxiques ou dont la mobilité est très différente du composé précurseur. Ce phénomène est dénommé "activation" (Alexander, 1994). Ce type de transformation est illustrée par l'époxydation microbienne de l'aldrine en dieldrine dans le sol, composé non seulement plus toxique que l'aldrine, mais persistant dans l'environnement (Lichtenstein et Schulz, 1960). De plus, la détoxification opérée par une espèce peut conduire à la formation de composés toxiques pour une autre espèce. C'est le cas de l'alcool pentachlorobenzyle, fongicide non phytotoxique appliqué pendant la culture du riz, qui a été transformé dans le sol en acides penta-, 2,3,4,6-tetra-, 2,3,5,6-tetra-, et 2,3,6-trichlorobenzoïques, composés très toxiques pour une variété de plantes agricoles (Ishida, 1972).

(c) La biodisponibilité des contaminants peut être influencée par l'activité microbologique de biodégradation: il est de plus en plus reconnu que l'activité microbienne agit sur la forme chimique des molécules et donc sur leur biodisponibilité. Par exemple, des recherches récentes ont mis en évidence que la décontamination entraînait le transfert des contaminants adsorbés à la phase solide vers la phase liquide (solubilisation) (Al-Bashir *et al.*, 1990; Abbott et Sims, 1991), ayant pour conséquence de modifier la biodisponibilité des molécules pour les organismes indigènes, ou de contaminer des eaux souterraines si la biodégradation des contaminants est peu efficace par rapport à leur transfert. De même, le traitement de biolixiviation pourrait modifier la spéciation des métaux et les rendre plus biodisponibles. À

l'origine sous une forme peu extractible, ces métaux pourraient, après les étapes de solubilisation/neutralisation, se retrouver moins fortement liés. Ainsi, l'acidification du milieu qui occasionne une solubilisation partielle de la matière organique (Benmoussa *et al.*, 1994) pourrait favoriser l'apparition, sous forme soluble, de complexes organo-métalliques non éliminés à l'étape de séparation solide-liquide. La méconnaissance des mécanismes qui régissent la biodisponibilité des contaminants dans les sols ou les boues ne permet pas à l'heure actuelle de limiter à la fraction soluble ou à la concentration totale, l'évaluation des contaminants.

(d) Les interactions résultant d'une contamination multiple: la combinaison souvent complexe de composés dans un même sol (par exemple: métaux lourds déchargés avec les huiles et les hydrocarbures) pose également des problèmes, puisqu'on ne peut évaluer les interactions de ces composés toxiques en les dosant simplement. Plusieurs travaux montrent qu'une interaction entre plusieurs contaminants peut conduire de façon imprévisible à une synergie, un antagonisme ou une additivité de l'effet génotoxique (Hass *et al.*, 1981; Donnelly *et al.*, 1988b; Davol *et al.*, 1989; Donnelly *et al.*, 1990a; Ma *et al.*, 1991).

Il apparaît donc évident que la décontamination ne doit pas être définie seulement en terme de concentration chimique résiduelle, mais aussi en terme de détoxification.

1.2.3 Écotoxicologie

Puisque la décontamination ne peut plus être définie seulement en terme de concentrations chimiques résiduelles, mais aussi en terme de détoxification, de nouveaux outils permettant la mesure des effets sur la biocœnose devront être inclus dans l'évaluation de procédés de restauration. L'importance de suivre l'évolution de la toxicité pendant les études de biodégradation et de déterminer le risque écologique de tels procédés a déjà été suggérée (Athey *et al.*, 1987; Symons et Sims, 1988; Heitzer et Sayler, 1993). Dans cette section est définie l'écotoxicologie et est expliqué l'intérêt des biotests pour effectuer une évaluation écotoxicologique de biotraitement. Ensuite sont présentés les biotests en général et leurs exigences, la mesure de la toxicité et les biotests adaptés pour tester les sols.

1.2.3.1 Définition

Comme son nom l'indique l'écotoxicologie associe les domaines de la toxicologie et de l'écologie. La toxicologie est définie comme l'étude des effets néfastes des agents chimiques sur les systèmes biologiques (Klassen *et al.*, 1986). Elle étudie les effets sur des individus

ou sur leurs constituants physiologiques, et élucide les mécanismes biologiques de l'agression. La définition originale de l'écotoxicologie, datant de la fin des années 60, est généralement attribuée à Truhaut qui la définit comme

"The branch of Toxicology concerned with the study of toxic effects, caused by natural or synthetic pollutants, to the constituents of ecosystems, animals (including human), vegetable and microbial, in an integral context",

la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques des polluants naturels ou synthétiques sur les constituants des écosystèmes, animaux (incluant l'Homme), végétaux et microbiens, dans un contexte intégral (Truhaut, 1977). Différentes nuances (en fonction de la formation académique des écotoxicologistes) ont été apportées depuis à cette définition assez large de l'écotoxicologie, aussi dénommée toxicologie environnementale. L'écotoxicologie peut ainsi n'étudier que les effets des polluants relargués dans l'environnement par l'activité humaine (Butler, 1984), se restreindre aux espèces autres que l'Homme et ses animaux domestiques (Hayes, 1991), ou étudier les effets des substances toxiques sur les écosystèmes et plus particulièrement les communautés écologiques (Moriarty, 1983; Cairns et Niederlehner, 1995).

Pourtant les objectifs de l'écotoxicologie rencontrent un consensus auprès des écotoxicologistes (Forbes et Forbes, 1994). L'écotoxicologie devrait fournir des données pour l'évaluation du risque et la gestion environnementale. En principe, la recherche en écotoxicologie devrait influencer le développement de directives de réglementation pour la protection de l'environnement et la conception des tests de routine, dont la majorité sont exécutés pour satisfaire à des exigences réglementaires ou pour fournir des données à l'analyse de risque. Finalement, l'écotoxicologie devrait développer des principes empiriques ou théoriques pour mieux comprendre le comportement et les effets des produits chimiques sur les systèmes vivants.

Dans la présente étude, l'écotoxicologie apparaît comme la branche de la toxicologie qui se distingue de la toxicologie pharmaceutique et alimentaire, ayant pour objectif d'élucider le problème environnemental qu'est la pollution. Bien que l'écotoxicologie puisse étudier les effets des substances produites par l'Homme à deux niveaux d'organisation, les organismes et les communautés, seuls les effets biologiques au sein d'une même espèce ont été considérés, et non les effets écologiques d'interactions entre les espèces.

1.2.3.2 Évaluation écotoxicologique

Le suivi de l'évolution de la toxicité pendant un biotraitement ou l'évaluation de l'efficacité d'un biotraitement à détoxifier peuvent être réalisés par une évaluation écotoxicologique (Athey *et al.*, 1987; Heitzer et Sayler, 1993). L'évaluation écotoxicologique, aussi appelée évaluation de danger environnemental, permet par le biais d'analyses biologiques, toxicologiques et/ou écologiques de quantifier le danger pour l'environnement d'une source de contamination. Trois approches peuvent être envisagées. (a) Des études de terrain à grande échelle permettent de connaître les effets sur l'écosystème de façon globale (Seaker et Sopper, 1988). Cependant ce type d'étude, extrêmement complexe et généralement coûteuse, n'est pas applicable pour suivre la toxicité pendant un procédé de décontamination. (b) Une étude de l'état de santé du milieu restauré, par des mesures pertinentes d'activités microbiologiques, renseigne sur l'intégrité de l'écosystème terrestre. Diverses méthodes sont réalisables: études enzymologiques, respirométriques et études de la production d'énergie par les microorganismes vivants dans les sols (Babich et Stotsky, 1986; Bitton et Koopman, 1986; Zelles *et al.*, 1986; Hund *et al.*, 1988; Hulm *et al.*, 1991). Toutefois, dans le but d'évaluer des procédés biologiques de décontamination, il est souvent difficile de distinguer l'activité microbiologique endogène d'un sol de l'activité microbiologique de décontamination. (c) Une étude ponctuelle par le biais de biotests standardisés permet de déterminer certains effets toxiques (Plotkin et Ram, 1984; Thomas *et al.*, 1986). Chacun des biotests donne une mesure de la toxicité dont il est possible de suivre l'évolution durant le biotraitement.

1.2.3.3 Biotests

Un *biotest* est un outil analytique qui permet de quantifier le potentiel de toxicité. Des systèmes biologiques à différents niveaux d'organisation (cellules, individu, population, écosystème) sont utilisés pour détecter par la mesure d'un effet toxique, la présence de substance(s) ou condition(s) néfastes. Chaque biotest détecte spécifiquement un type de toxicité correspondant à une période d'exposition (Klassen *et al.*, 1986). La toxicité aiguë ou à court terme correspond à une dose unique et une observation rapide de l'effet qui doit être important; les biotests fournissant ce type de réponse sont généralement faciles à réaliser et économiques. Une exposition longue, des doses répétées et une observation à long terme des effets correspond à une toxicité chronique. Les conséquences écologiques de chaque type de toxicité sont importantes (Truhaut, 1977). La toxicité aiguë d'un composé, souvent estimée par la létalité, prédit les conséquences à court terme, tel l'empoisonnement brutal par

contact dermique, inhalation ou ingestion. Par contre, si un polluant, à une concentration donnée, n'est pas létal mais retarde le développement des individus, il peut avoir un impact écologique considérable (Moriarty, 1983).

L'utilisation de biotests pour estimer le potentiel toxique d'un composé ou d'une matrice contaminée possède ses limites. De nombreux facteurs peuvent influencer la manifestation de la toxicité. Il est reconnu que, pour un composé donné, la susceptibilité entre les espèces est très variable (Truhaut, 1977). Dans l'objectif de fournir une information exhaustive sur les effets possibles de produits chimiques dans l'environnement, il est donc nécessaire d'observer et d'analyser un large spectre de composants des écosystèmes à différents niveaux de la chaîne trophique (Dutka et Kwan, 1981). Le concept de batterie de biotests, représentative des différents types de toxicité et niveaux trophiques, permet donc de tenir compte de la diversité dans les susceptibilités des organismes. Une batterie de biotests doit comporter au moins trois niveaux trophiques différents (Ahlf et Förstner, 1988). Idéalement, les organismes choisis doivent être représentatifs du milieu testé (Keddy *et al.*, 1994; 1995). Cependant, malgré la pertinence écologique et la diversité des biotests au sein d'une batterie, la détection des effets ne peut être exhaustive. Parmi les critères qui doivent être considérés pour le choix d'un biotest, se retrouve également la reproductibilité du test (Keddy *et al.*, 1994; 1995). Ce critère est très important puisque les résultats seront comparés pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Non seulement le choix de l'espèce doit être précis, mais l'ensemble des résultats doivent provenir d'essais réalisés avec la même souche, puisque des études ont démontré que la sensibilité au sein d'une même espèce pouvait varier suivant la souche (Baird *et al.*, 1991).

1.2.3.4 Mesure de la toxicité

Tester un échantillon avec un biotest permet d'établir une relation dose-réponse, où l'effet toxique s'exprime en fonction de la dose en contaminant. La *dose* peut prendre plusieurs formes. Certaines valeurs (concentration dans le milieu, dose journalière ingérée...) nécessitent d'avoir au préalable identifié et dosé le ou les contaminants. Pour l'évaluation de la toxicité d'un échantillon de contamination mixte ou inconnue, la dose correspond à l'exposition, c'est à dire la quantité de matrice (sol, boue...) par rapport au milieu de référence. La *réponse*, ou *variable d'effet*, peut être dichotomique ou graduée (Eijsackers, 1994). Les réponses dichotomiques (mortalité, germination...) donnent des fréquences, alors que les réponses graduées expriment un changement progressif comme, par exemple, la croissance d'une pousse. Cette valeur peut, par la suite, être transformée en pourcentage

d'inhibition par rapport à la référence (témoin), pour s'harmoniser avec les fréquences. En conséquence, les relations dose-réponse peuvent prendre différentes formes, où la toxicité peut être accompagnée de stimulation et d'hormèse. Plusieurs valeurs, appelées *variables de mesure*, peuvent être calculées à partir de la courbe de dose-réponse d'un échantillon: (i) la sévérité de la réponse de la variable de mesure, observée lorsque la dose est maximale; (ii) le seuil toxique, dose ou concentration en dessous de laquelle l'échantillon ne produit plus d'effet détectable; (iii) la dose ou concentration médiane, correspondant au point de la sigmoïde de réponse où la pente est maximale; (iv) la valeur de cette pente. Le choix des variables de mesure influence l'interprétation des résultats. Il est donc important d'utiliser le maximum d'information de la courbe de dose-réponse pour la comparaison d'échantillons. La multiplicité des variables de réponse pour chaque biotest et des biotests pour chaque batterie rend difficile la comparaison des résultats et la prise de décision concernant l'efficacité de traitement. Dans le but de comparer la toxicité de différents effluents industriels, Costan *et al.* (1993) ont développé un indice, le PEEP (*Potential Ecotoxic Effect Probe*), intégrant les résultats de seuil toxique pour l'ensemble d'une batterie de biotests. Un indice comparable serait nécessaire pour gérer les données écotoxicologiques sur les sols.

1.2.3.5 Biotests pour les sols

Plusieurs outils d'évaluation de la toxicité dans les eaux et les sols ont été proposés dans la littérature, mais les tests de toxicité pour les sols n'ont pas été développés en aussi grand nombre que ceux pour les systèmes aquatiques (van Straalen et Denneman, 1989; Sheppard *et al.*, 1992). Pour cette raison, de nombreuses procédures ont permis de tester les extraits liquides du sol plutôt que le sol directement. Certaines études ont montré que la toxicité des composés organiques dans le sol pouvait être déterminée par les concentrations dans l'eau interstitielle, concentrations elles-mêmes prédites à partir des coefficients d'adsorption (van Gestel *et al.*, 1991; Hulzebos *et al.*, 1993). Pourtant, beaucoup d'inconnues persistent quant à l'effet des propriétés du sol sur la toxicité des contaminants (Sheppard *et al.*, 1992; Gunkel *et al.*, 1993). Ainsi, le test en sol artificiel avec le ver *Eisenia foetida* s'est révélé être une méthode plus appropriée que le test de contact (extrait liquide sur papier filtre) avec le même organisme pour prédire, à partir de données de laboratoire, les effets nocifs de contaminants sur le terrain (Goats et Edwards, 1988). Il est donc nécessaire d'étudier la toxicité directement sur les sols.

Une revue des biotests d'évaluation de la toxicité applicables aux sols, fournissant une évaluation critique de chaque test standardisé actuellement disponible, a été réalisée

récemment (Keddy *et al.*, 1994). Cette revue regroupe toutes les procédures standardisées de l'US-EPA, de l'OCDE, d'Environnement Canada, de l'ASTM et de l'ISO. Une photocopie du tableau récapitulatif regroupant les méthodes pour évaluer les sols a été extraite de ce document et est fournie en annexe (annexe A). La germination et la croissance de graines de différentes espèces de plantes et la mortalité de vers de terre constituent la majorité des biotests en contact direct. Certaines procédures mesurent aussi la reproduction et la croissance de vers. Un autre test mesure la survie et la reproduction de collemboles, animaux présents dans les sols. Pour évaluer la phase liquide des sols, deux types de biotests sont proposés: l'élongation racinaire de différentes espèces végétales et la croissance et reproduction d'organismes phytoplanctoniques. La faible diversité dans les paramètres d'expression de la toxicité et les organismes disponibles restreint le choix des biotests.

1.2.4 Évaluations écotoxicologiques de biotraitements

Depuis les années 80 plusieurs études ont été entreprises pour évaluer, à l'aide de biotests écotoxicologiques, différents procédés de biorestauration des sols. Les sections suivantes détaillent le type d'évaluation qui a été employé pour les biotraitements de sols et de boues.

1.2.4.1 Biotraitements de sols

La disparition de la toxicité mesurée par un nombre limité de biotests a été étudiée à plusieurs reprises. La plupart des études ont utilisé le Microtox[®], qui détecte l'inhibition de bioluminescence chez *P. phosphoreum* (Symons et Sims, 1988; Dasappa et Loehr, 1991; Weissenfels *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1993) ou des tests de détection de la génotoxicité, utilisant *Salmonella typhimurium* (Donnelly *et al.*, 1983; Sims, 1986; Park *et al.*, 1988; Donnelly *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* et *Aspergillus nidulans* (Donnelly *et al.*, 1983). Certaines procédures ont associé le Microtox[®] à un test de détection de la génotoxicité (Aprill *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990; Belkin *et al.*, 1994) ou au test de mortalité des daphnies (Abbott et Sims, 1991). Les tests ont été réalisés sur des extraits de sol, aqueux ou au solvant, et aucune procédure en contact direct n'a été utilisée.

La seule étude rassemblant un nombre important (huit) de biotests, dont des tests en contact direct (trois), a été réalisée récemment sur un site contaminé aux hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) (Hund et Traunspurger, 1994). Le sol a été excavé et a subi une biostimulation par addition régulière de substances nutritives et d'oxygène. La toxicité mesurée par l'ensemble des tests a diminué simultanément à la dégradation des HAP,

excepté pour le test de mortalité des daphnies qui a détecté une augmentation transitoire des effets toxiques, mettant en relief l'importance d'utiliser une procédure d'évaluation comprenant une batterie diversifiée. Les données écotoxicologiques de laboratoire de cette étude ont aussi été confirmées par le repeuplement du sol par des nématodes. Les auteurs suggèrent également que le test d'activité biologique mesurant le taux de respiration des microorganismes refléterait la biodégradation des HAP et non leur toxicité. Par contre, la mesure du taux de nitrification s'est avéré un indicateur rapide de la toxicité. Dans cette étude, l'élimination des contaminants a été concomitante à la détoxification. En conséquence, la simple observation des résultats des biotests était sans ambiguïté quant à l'efficacité du traitement à détoxifier. Les auteurs n'ont donc pas proposé d'outil de gestion des résultats permettant d'intégrer toutes les données écotoxicologiques obtenues avec la batterie. Toutefois, pour deux des tests employés (Microtox[®] et test de croissance de plante), une toxicité résiduelle persistait après le traitement. La trop forte sensibilité du Microtox[®] pour tester des éluviats de sol est suggérée par les auteurs. Il serait intéressant de savoir si, en effet, certains biotests présentent une sensibilité aux sols qui ne serait pas le reflet de la contamination.

1.2.4.2 Biotraitements de boues d'épuration

Aucune procédure d'évaluation écotoxicologique n'a, à notre connaissance, été utilisée pour évaluer des procédés de biotraitement de boues d'épuration des eaux, destinées à l'épandage sur des sols.

1.3 Hypothèse

Pour faire la preuve qu'un procédé de traitement est efficace, il faut donc vérifier l'hypothèse selon laquelle la biodégradation ou bioélimination des composés s'accompagne d'une réduction concomitante de la toxicité globale. La caractérisation écotoxicologique par le biais d'une batterie de biotests standardisés permet théoriquement de vérifier cette hypothèse. Bien que la communauté scientifique ait pris conscience de cette exigence, pas ou peu de procédures complètes d'évaluation écotoxicologique, incluant des tests en contact direct, ont permis de vérifier la détoxification de systèmes incluant une matrice solide. Cette approche doit tenir compte de la complexité du sol, des différentes voies d'exposition des organismes et de la biodisponibilité des contaminants.

1.4 Objectifs

L'objectif de ce projet a été d'évaluer la relation biodécontamination-détoxication sur des matrices relatives au sol. Pour cela, l'évaluation écotoxicologique, par le biais de biotests standardisés, a été appliquée dans un système expérimental simple de colonnes sol/liquide de biodégradation de composés dérivés de la créosote. Puis, le degré de complexité a été augmenté en étudiant avec une batterie de biotests un système expérimental de simulation d'épandage de boue après biolixiviation des métaux lourds, et un système à grande échelle de biodégradation *ex situ* d'hydrocarbures aliphatiques contaminant un sol. L'objectif global de ce projet a été divisé en une série d'objectifs spécifiques regroupés comme suit dans la démarche de travail:

- 1 - Constituer une batterie de biotests permettant l'évaluation de systèmes sol/liquide.
- 2 - Démontrer, pour chaque procédé biotechnologique de décontamination, l'efficacité de traitement du point de vue écotoxicologique en testant l'hypothèse selon laquelle la biodégradation ou la bioélimination des contaminants est simultanée à la détoxication.
- 3 - Appliquer la procédure d'évaluation écotoxicologique aux boues d'épuration. Pour cela, simuler l'épandage agricole des boues et confirmer que la biodisponibilité des métaux n'a pas été augmentée par le traitement en mesurant les métaux bioaccumulés.
- 4 - Vérifier l'existence d'une éventuelle "toxicité" inhérente des sols mesurée sur des sols non-contaminés par la procédure d'évaluation écotoxicologique.
- 5 - Apporter des outils de gestion des données pour démontrer de façon globale qu'un procédé entraîne la disparition de la toxicité. Pour cela, établir un indice global regroupant les résultats de l'ensemble des biotests et établir avec les sols non-contaminés un seuil réaliste de toxicité utilisé comme point de référence.
- 6 - Évaluer la batterie de biotests utilisée en comparant les avantages et inconvénients de chacun des biotests. Démontrer l'intérêt d'utiliser des biotests en contact direct avec le sol. Sélectionner les tests les plus appropriés à chaque type de traitement. Vérifier quelles sont les conséquences de manipulations d'échantillons telles l'irradiation et la congélation des échantillons liquides sur la mesure de la toxicité.
- 7 - Caractériser la toxicité des composés étudiés dans les matrices relatives au sol.

1.5 Publication des résultats

Une partie des travaux de cette thèse a été soumise pour publication avec évaluation par les pairs:

Renoux, A. Y., R. D. Tyagi, Y. Roy et R. Samson (1995). Ecotoxicological assessment of the bioremediation of a petroleum hydrocarbon contaminated soil. Dans *Microbial Processes for Bioremediation*, R.E. Hinchee, F.J. Brockman et C.M. Vogel (éds), p. 259-264. Columbus, OH. Batelle Press.

Par ailleurs, les travaux ont fait l'objet de communications:

Renoux, A. Y., Y. Roy, R. D. Tyagi et R. Samson (1993). Ecotoxicological evaluation of soil biotreatment: comparison with the inherent toxicity of non-contaminated soils. *3rd Annual Symposium on "Groundwater and Soil Remediation"*, p. 377-393. Québec, Canada.

Renoux A.Y., R.D. Tyagi, L. Paquette, and R. Samson (1995). Ecotoxicological evaluation of the bioleaching treatment of sewage sludges contaminated with heavy metals. *Second SETAC World Congress*. Vancouver, Canada.

Millette, D., J. B. Barker, B. Butler, Y. Comeau, E. O. Frind, A. Y. Renoux et R. Samson (1994). Column experiment to study substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds in groundwater. *4th Annual Symposium on "Groundwater and Soil Remediation"*. Calgary, Alberta.

2 DÉVELOPPEMENT D'UNE BATTERIE DE BIOTESTS ADAPTÉE AUX SYSTÈMES SOLS/LIQUIDES

2.1 Introduction

La valeur d'une analyse écotoxicologique repose sur le choix pertinent des biotests de la batterie. Le sol est une matrice écologique complexe, pour laquelle deux voies d'exposition des organismes doivent être considérées: (i) par le contact direct des organismes avec le sol dans lequel ils vivent, et (ii) par le contact indirect via les eaux d'infiltration qui peuvent transporter les contaminants depuis le sol. Pour étudier la deuxième voie d'exposition, une procédure d'éluatriation est proposée qui simule la contamination des eaux souterraines (Joubert, 1980; Chiang *et al.*, 1989). Dans le cas de l'évaluation des sol par contact direct, le choix des biotests est limité (Keddy *et al.*, 1994; voir annexe A). Le choix parmi les différentes procédures disponibles des biotests employés durant ce projet a été fait à l'aide de la littérature et d'essais expérimentaux.

Ce chapitre expose pour chaque biotest utilisé l'intérêt écologique du groupe auquel appartient l'espèce, la description des tests et leur procédure détaillée. La validité de certains tests, comme le Microtox[®] en phase solide et le SOS Chromotest en phase solide, a été vérifiée.

2.2 Biotests avec des plantes supérieures

Quatre biotests différents sont regroupés sous cette section: il s'agit des tests de germination de la laitue (*Lactuca sativa*) et de l'orge (*Hordeum vulgare*), du test de croissance de l'orge (*H. vulgare*) et du test d'élongation racinaire de la laitue (*L. sativa*). L'importance des tests utilisant les plantes supérieures pour l'évaluation des sols est discutée ici pour ces quatre biotests. Chacun des biotests est ensuite détaillé.

2.2.1 Intérêt écologique des plantes supérieures

Les plantes aquatiques et terrestres, productrices d'énergie et d'oxygène dont la majorité des organismes vivants dépendent, sont des éléments essentiels d'un écosystème en santé. Parce qu'elles puisent directement leur eau et leurs éléments nutritifs du sol, et parce que leurs racines sont en contact direct avec le sol, les plantes supérieures sont particulièrement

sensibles aux xénobiontes présents dans ce dernier. Les substances toxiques qui empêchent ou réduisent la germination, l'élongation des feuilles ou des racines vont diminuer la population, et dans un système naturel les espèces touchées seront moins aptes à la compétition, entraînant des changements dans la diversité, le nombre et la dynamique des espèces. Elles sont, de plus, par leur niveau trophique, les premiers maillons de la chaîne de bioconcentration, aspect critique qui limite encore à l'heure actuelle l'épandage agricole des boues susceptibles d'être contaminées aux métaux lourds. Après biorestauration, il est important de savoir si un sol a retrouvé ou non sa fertilité et s'il est apte à recevoir une végétation.

Le développement d'une graine en plante mature est une série de processus complexes, ce qui justifie de tester le stade précoce de développement de la plante. Les graines sèches de plantes, dans leur état de dormance, sont capables de supporter un environnement rude sans perdre leur viabilité. Lorsqu'elles sont réhydratées et sous des conditions favorables, les graines subissent de très rapides changements: le métabolisme, le transport de nutriments et les divisions cellulaires sont activés (Mayer et Poljakoff-Mayber, 1989). C'est à ce moment qu'elles deviennent particulièrement sensibles aux agressions, ce qui en fait un stade de choix pour utiliser les plantes dans des biotests.

2.2.2 Biotests

Un des avantages des tests de germination est leur coût très modéré dû à l'absence de maintenance de culture. De plus, ces tests sont réalisables n'importe quand, relativement rapide (5 à 15 j), faciles à mettre en oeuvre et d'une grande souplesse d'emploi: des échantillons aqueux peuvent être testés aussi bien que des sols en contact direct, des déchets ou des boues. Ces biotests ont essentiellement été utilisés pour tester des herbicides (Horowitz, 1976; Streibig et Kudsk, 1993). Des études ont également été consacrées à l'effet des métaux sur la germination de graines (Carlson *et al.*, 1991; Hsu et Chou, 1992) et l'élongation radiculaire (Carlson *et al.*, 1991), ainsi qu'à l'effet de substances manufacturées (Kenaga, 1981; Hulzebos *et al.*, 1993). Les mêmes substances chimiques peuvent fournir des réponses différentes suivant les espèces, il est donc conseillé d'utiliser plusieurs espèces. Les espèces communément utilisées sont la laitue, *Lactuca sativa*, le blé, *Triticum aestivum*, le concombre *Cucumis sativa*, le trèfle rouge, *Trifolium pratense* et le radis, *Raphanus sativa* (Ratsch, 1983). En réalité ces biotests peuvent être exécutés avec un grand nombre d'espèces qui représentent un intérêt économique, sont facilement disponibles, germent et croissent rapidement. L'information apportée par les biotests utilisant les plantes supérieures

n'est pas redondante à celle apportée par les algues; bien que ces organismes appartiennent au même règne, il a été montré que leurs sensibilités aux métaux et aux herbicides étaient différentes (Miller *et al.*, 1985). Des études comparant la technique "Neubauer" de germination avec des graines de laitue à différents biotests (Microtox[®], mortalité des vers de terre, inhibition de croissance des algues, mortalité des daphnies, élongation de racines) ont montré que ce biotest était le plus sensible (Thomas *et al.*, 1986) et qu'il permettait de détecter des toxiques non-solubles et non-détectables par les autres biotests (Thomas *et al.*, 1990).

2.2.3 Procédures

Il existe un certain nombre de protocoles standardisés pour étudier la germination de graines et la croissance des tiges et des racines (Wang, 1991). Les procédures de germination de graines de laitue et d'orge utilisées dans cette batterie sont celles de l'US-EPA pour la germination de la laitue (Greene *et al.*, 1989) et celle de l'OCDE pour l'orge (OCDE, 1984). L'OCDE fournissant essentiellement des directives, la procédure de l'US-EPA pour la laitue a pu être adaptée à l'emploi de graines d'orge sans modifications. Il s'agit en fait de la technique Neubauer modifiée par Thomas et Cline (1985). Le test de croissance de l'orge exploite celui de la germination en prolongeant le temps d'incubation (OCDE, 1984). Les essais de bioaccumulation des métaux ont été réalisés sur les tiges après récolte. L'élongation radiculaire a été étudiée sur la laitue en utilisant les extraits aqueux obtenus par élutriation. Il s'agit également d'un protocole recommandé par l'US-EPA (Greene *et al.*, 1989). Dans ce cas, uniquement les contaminants solubles sont disponibles aux organismes. Le chlorure de mercure a été utilisé comme témoin positif pour les biotests avec des plantes.

2.2.3.1 Tests de germination de graines de laitue (*Lactuca sativa*) et d'orge (*Hordeum vulgare*)

Quarante graines non traitées de taille homogène ont été déposées à la surface de pétris de verre (150 x 20 mm), où se trouvaient 100 g de sol à tester. Le sol a été préalablement dilué en série géométrique avec du sable (16/20-mesh) ou un sol de référence (sol AR9 dans l'étude des boues). Le volume d'eau déionisée ajouté a été calculé à partir des données de rétention d'eau et de pourcentage d'humidité, pour que l'humidité pour chaque dilution de sol soit fixée à 85% de la capacité au champ. Cinquante grammes de sable ont recouvert le sol. Chaque pétri a été introduit dans un sac en polyéthylène qui a été scellé en gardant un volume d'air. Trois réplicats pour chaque concentration de sol ont été placés à l'obscurité dans une chambre où la température est maintenue à $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Après 48 h les graines ont

subi une photo-période journalière de 16 h de lumière (4300 ± 430 lux). Les graines ayant germé ont été dénombrées après 5 j et les pourcentages d'inhibition de germination calculés.

2.2.3.2 Test de croissance de tiges d'orge (*Hordeum vulgare*)

Après leur dénombrement pendant l'essai de germination de graines, les pétris ont été replacés dans leurs sacs et réincubés 9 j supplémentaires à $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sous une photo-période journalière de 16 h de lumière (4300 ± 430 lux). Au terme de ces 14 j de croissance, les tiges ont été soigneusement récoltées et dénombrées. La biomasse a été estimée en mesurant le poids sec après 16 h à 80°C et 1 h au dessiccateur. Les pourcentages d'inhibition de croissance ont été calculés.

2.2.3.3 Test d'élongation radiculaire chez la laitue (*Lactuca sativa*)

Cinq graines non-traitées de laitue (*L. sativa*) sont disposées par pétri (100 x 15 mm) sur un papier filtre (Whatman n°3) imbibé de 4 mL d'élutriat. L'élutriat, dont le pH est entre 4.0 et 10.0, a été préalablement dilué en séries géométriques. Trois réplicats par concentration sont incubées dans l'obscurité à $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Les racines des graines ayant germé sont mesurées après 5 j et les pourcentages d'inhibition de croissance radiculaire calculés.

2.3 Biotest de mortalité du ver *Eisenia foetida*

2.3.1 Intérêt écologique des vers de terre

Le rôle des vers de terre dans l'amélioration de la structure du sol et de la fertilité est largement reconnu. Il a été montré qu'ils jouent un rôle essentiel dans l'incorporation de la matière organique et des fertilisants dans le sol, dans le mélange et le renouvellement du sol, dans le drainage de l'eau et l'aération (Curry, 1988). En conséquence, les activités microbiennes et la fertilité du sol sont augmentées par leur présence.

2.3.2 Choix du biotest *Eisenia foetida* en phase solide

Il existe différentes méthodes d'exposition des vers aux contaminants ainsi que différents moyens d'en mesurer les effets toxiques (Ma, 1984; Wentsel et Guelta, 1987; Drewes *et al.*, 1988). Cependant le critère de choix prioritaire dans cette étude était le contact direct avec le sol. Le test de mortalité après contact avec le sol contaminé a donc été retenu pour sa simplicité et son coût modéré. Il a d'ailleurs été montré que ce type de test est en accord avec les études de terrain (Goats et Edwards, 1988; van Gestel, 1992; Belfroid *et al.*, 1993), et qu'il est plus sensible que les tests avec des extraits aqueux (Goats et Edwards, 1988; Callahan *et al.*, 1994).

La plupart des méthodes décrites de mortalité de vers de terre utilisent l'espèce *E. foetida* comme organisme-test; il y a cependant de nombreuses autres espèces qui peuvent être utilisées comme celles appartenant aux genres *Lumbricus*, *Allolobophora*, *Eudilus*, *Perionys*, *Apporrectodea*. Parmi ces espèces, contrairement à *E. foetida*, certaines (*Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, *Allolobophora caliginosa* ou *Allolobophora chlorotica*) sont difficiles à nourrir, à maintenir en culture, et produisent insuffisamment d'organismes pour assurer les tests (Heimbach, 1988). En se basant sur une soixantaine de composés, Callahan *et al.* (1994) concluent que *Eisenia foetida* est similaire en terme de sensibilité et de tolérance à trois autres espèces, *Allolobophora tuberculata*, *Eudilus eugeniae* et *Perionys excavatus*.

2.3.3 Description du ver *Eisenia foetida*

Eisenia foetida est un petit ver (10 cm maximum) de couleur rouge, qui se retrouve dans les composts, les fumiers ou tout endroit où la matière organique se décompose (Fender, 1985). En conséquence, son habitat est souvent associé à l'activité humaine. La facilité à le cultiver en a fait une espèce de choix pour l'étude des vers de terre. Ce ver a également beaucoup été utilisé pour évaluer la toxicité de contaminants, ce qui fournit une banque de données non négligeable (Hartenstein, 1982; Roberts et Dorough, 1984; Neuhauser *et al.*, 1985). *E. foetida* semble sensible de façon décroissante aux insecticides de la classe des N-méthylcarbammates, aux phénols, aux amines, aux composés aromatiques substitués, aux composés aliphatiques halogénés, aux HAP puis aux phtalates (Roberts et Dorough, 1984; Neuhauser *et al.*, 1985).

2.3.4 Procédure

La méthode utilisée est celle de l'US-EPA (Greene *et al.*, 1989), modifiée de Edwards (1983), et estime la toxicité aigüe de sols ou de déchets solides sur le ver *Eisenia foetida* dans un test statique de 14 jours. Dix vers, d'un poids variant de 300 à 500 mg ont été déposés dans des contenants perforés à la surface, où se trouvent 200 g de sol à tester. Le sol a été préalablement dilué en série géométrique avec un sol artificiel (10% de tourbe (sphagnum), 20% de kaolite, 70% de sable) ou un sol de référence (sol AR9 dans le cas de l'étude des boues). Le volume d'eau déionisée ajoutée a été calculé à partir des données de rétention d'eau et de pourcentage d'humidité pour que l'humidité pour chaque dilution de sol soit fixée à 75% de la capacité au champ. Trois réplicats pour chaque concentration de sol sont placés à l'obscurité dans une chambre où la température est maintenue à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Après 14

jours, les vers sont dénombrés et les pourcentages de mortalité calculés. Le pentachlorophénate de sodium a été utilisé comme toxique de référence.

2.4 Microtox[®] et Microtox[®] en phase solide

2.4.1 Intérêt du Microtox[®]

Le Microtox[®] est un test de toxicité simple et standardisé qui utilise une suspension de bactéries marines luminescentes, *Photobacterium phosphoreum*, et qui mesure la toxicité aiguë de solutions aqueuses par la diminution de la bioluminescence. Le Microtox[®] a été développé commercialement par la compagnie Microbics, et mis sur le marché en 1978 (Bulich, 1979; 1986). Il est à présent vendu et utilisé partout dans le monde, ce qui a donné une littérature scientifique importante et une banque de données sur les contaminants appréciable (Kaiser et Ribo, 1988). Les qualités de ce test, simplicité, rapidité, reproductibilité et sensibilité, le désignent comme choix logique pour une pré-évaluation (*screening*) de la toxicité ou au sein d'une batterie, bien qu'il ne s'agisse pas d'une bactérie vivant dans le sol. Ce test de surcroît ne requiert que de petits volumes d'échantillons, ce qui en augmente son intérêt. Le Microtox[®] a déjà été largement utilisé pour l'évaluation du danger durant la biodégradation (Symons et Sims, 1988; Wang *et al.*, 1990; Mueller *et al.*, 1991; Belkin *et al.*, 1994).

La sensibilité du Microtox[®] a été comparée à d'autres tests dans de nombreuses études. Il ressort d'une façon générale que le Microtox[®] est d'une sensibilité comparable aux autres tests basés sur les daphnies, les poissons, et les algues (Qureshi *et al.*, 1982; Ribo et Kaiser, 1983; Beaubien *et al.*, 1986), et fournit une bonne corrélation linéaire avec ces espèces (Ribo et Kaiser, 1983; Blum et Speece, 1991a). Une sensibilité moindre que les daphnies pour les pesticides et les inorganiques est à noter. Le Microtox[®] utilisé avec des extraits aqueux de sédiments présente une sensibilité plus faible ou égale à celle des daphnies, mais il a été démontré qu'il apportait suffisamment d'information pour être utilisé dans une batterie ou en pré-évaluation (Schiewe *et al.*, 1985; Giesy *et al.*, 1988; True et Heyward, 1990). La toxicité vis-à-vis de la flore microbienne des sols a été comparée à celle fournie par le Microtox[®]. Ainsi des comptes cellulaires d'hétérotrophes aérobies, de champignons, d'actinomycètes, des mesures de la respiration, du taux de nitrification et d'activités enzymatiques ont montré que l'émission de lumière de *P. phosphoreum* pouvait être, soit plus sensible (Sorensen *et al.*, 1986) ou présenter une bonne corrélation avec ces mesures biologiques (Reteuna *et al.*, 1986; Blum et Speece, 1991a)

2.4.2 Principe

Son fonctionnement est basé sur la capacité de la bactérie marine *P. phosphoreum* à émettre de la lumière comme sous-produit de la respiration. La mesure de la luminescence accède au flot d'électrons de la chaîne respiratoire et à l'état métabolique de la cellule (Hastings et Nealson, 1977). L'agression toxique entraîne une diminution de la respiration et donc de la bioluminescence. Il s'agit d'une subléthalité aiguë. La lumière est mesurée avec un protocole et un dispositif luminométrique spécifiques. La réduction de lumière à 5, 15 ou 30 minutes est prise comme mesure de la toxicité. La souche bactérienne est utilisée pour déterminer la toxicité d'échantillons aquatiques, mais une procédure a été développée pour permettre la mesure directe de la toxicité d'échantillons solides (Microbics, 1991). Une quantité fixe de la suspension bactérienne de *P.phosphoreum* est exposée en contact direct avec la phase solide qui se trouve diluée graduellement avec de l'eau. Le matériel toxique de l'échantillon solide interfère avec le métabolisme de *P.phosphoreum* et réduit l'émission de lumière. Après exposition (30 min) les organismes sont séparés par filtration, et le dispositif photométrique est utilisé pour lire l'émission de lumière.

2.4.3 Procédure du Microtox®

La procédure normale du test suit les recommandations données par Environnement Canada (Environnement Canada, 1992b). La solution à tester a été diluée en série dans une solution saline (2%), après y avoir ajouté 200 mg de NaCl pour 10 mL, pour les déterminations de la CI50 et des LOEC et NOEC. Chaque dilution par échantillon a été testée en triplicata. Sous température contrôlée ($15 \pm 0.1^\circ\text{C}$) la suspension bactérienne (10 μL) est ajoutée à la solution saline (500 μL par tube). Juste avant l'addition de la solution à tester, l'émission de lumière a été mesurée quantitativement par un dispositif photométrique (Microbics Model 500 Analyser) pour chaque dilution (I_0) et pour les témoins (It_0). La diminution de lumière a été déterminée après 15 min d'exposition avec la solution à tester (I_{15} et It_{15}) et exprimée en pourcentage moyen d'inhibition d'émission de lumière par rapport au témoin par la formule suivante:

$$I = \left(1 - \frac{I_{15} * It_0}{I_0 * It_{15}} \right) * 100$$

Le témoin positif a reçu du phénol, communément utilisé comme toxique de référence du Microtox® (Environnement Canada, 1992b) et pour lequel une littérature bien documentée est disponible (Kaiser et Ribo, 1988).

2.4.4 Procédure du Microtox[®] en phase solide

L'échantillon de sol à tester (0.3 ± 0.02 g) a été mélangé à 3 mL de "Solid Phase Diluent" (Microbics, 1991), puis dilué en série dans ce diluant en s'assurant que les particules étaient en suspension. Après 30 min en présence de la suspension bactérienne (20 μ L), chaque tube a été filtré avec le dispositif prévu à cet effet (figure 2.1). Le filtrat a été transféré dans les cuvettes pour la lecture photométrique (Microbics Model 500 Analyser) qui est réalisée suivant la procédure normale du Microtox[®].

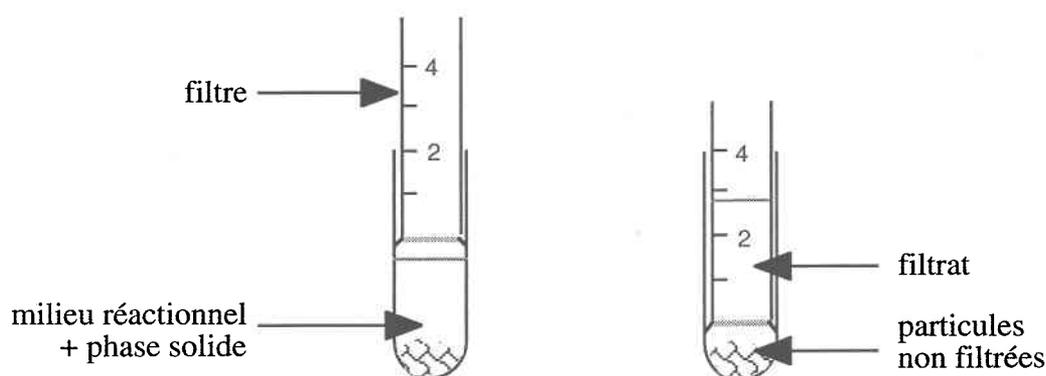


Figure 2.1: Dispositif de filtration du Microtox[®] en phase solide

2.4.5 Validité du Microtox[®] en phase solide

Au cours de l'évaluation des sols non contaminés et du traitement *ex situ* (chapitre 5), il fut constaté que tous les sols testés, contaminés ou non, ont produit un effet. Ce résultat suggérait que le sol lui-même interférait avec le test. Dans le but de vérifier la validité de ce test, des expériences supplémentaires ont été conduites. Ces expériences ont montré que: (i) un sol additionné d'un seul contaminant (ajout dosé de chrome à 500 mg/kg de sol sec) ne donne pas de relation dose-réponse, et (ii) six mesures différentes de l'émission de lumière, répliquées 5 fois chacune, d'un seul type de sol à une concentration unique (9.9 % p/v) ne sont pas homogènes (analyse de variance et test de Tukey, $\alpha = 0.05$) (le coefficient de variation d'une mesure pouvant atteindre 50%). La présence de fines particules dans le filtrat semblait influencer la mesure de l'émission de lumière. Ces particules rendaient le milieu réactionnel turbide et en conséquence les lectures d'émission de lumière bactérienne variaient. Le protocole de correction de couleur fourni par Microbics (Microbics, 1991) n'a

pas amélioré la situation. Une étude récente réalisée sur les sédiments a mis en évidence une relation entre la toxicité mesurée par le Microtox[®] en phase solide et la distribution des particules d'argile et de limon (Benton *et al.*, 1995). En conséquence, aucune interprétation des résultats n'est possible. Un sol testé avec le Microtox[®] en phase solide peut sembler très toxique, quand en fait il ne s'agit que d'interférences physiques des particules du sol avec les lectures. Ce test peut donc être utilisé pendant l'évaluation d'un traitement de sol pour relativiser les effets des sols de même nature, mais ne peut en aucun cas permettre de vérifier l'absence de toxicité.

2.5 Test d'inhibition de croissance phytoplanctonique

2.5.1 Intérêt écologique des algues

La présence d'un test phytoplanctonique parmi ceux composant la batterie de biotests se justifie par le rôle écologique de ces organismes: fournir de l'énergie et de l'oxygène aux organismes de niveaux trophiques supérieurs. La perturbation de mécanismes tels que leur croissance, peuvent être à l'origine de graves désordres écologiques, tels l'eutrophisation des eaux de surface. De très nombreuses espèces de phytoplancton, en particulier les espèces *Chlorella*, *Selenastrum* et *Scenedesmus*, ont été utilisées dans des études de toxicité (Wong et Couture, 1986). Les algues colonisent également les sols (Paul et Clark, 1989).

2.5.2 Choix du biotest de croissance de *Selenastrum capricornutum*

Le biotest de toxicité chronique qui mesure la croissance des algues *Selenastrum capricornutum* est recommandé par l'agence environnementale américaine (Greene *et al.*, 1989) et par le ministère canadien de l'environnement (Environment Canada, 1992a). Une culture de *S. capricornutum* en croissance exponentielle est exposée, dans un système statique, à différentes concentrations ou dilutions d'une solution à expérimenter. La technique sur microplaque, employée par Environnement Canada, est une version à échelle réduite de l'essai en bouteille normalisé de l'US-EPA. Elle présente de nombreux avantages (Blaise, 1986; Thellen *et al.*, 1989). L'essai requiert un faible volume d'échantillon et d'algues (microlitre au lieu de millilitre pour l'essai en bouteilles) et en conséquence moins d'espace pour l'incubation que les essais en bouteille. Ceci facilite également la réplication et la multiplication des concentrations. Un des inconvénients de l'utilisation de microplaques est que les substances volatiles testées dans un puit peuvent affecter les témoins négatifs. Il

est important de vérifier la bonne croissance des témoins et le cas échéant d'isoler les échantillons à tester des témoins. De fortes concentrations en matière organiques dissoutes peuvent fausser les résultats de l'essai. L'adsorption des contaminants sur la paroi des puits est possible. Il est également crucial que la culture soit axénique afin d'obtenir des résultats reproductibles d'un essai à l'autre.

Les deux techniques ont été utilisées durant les présents travaux. Étant donné qu'elles diffèrent quelque peu, l'essai en microplaque est détaillé ci-après et les particularités de l'essai en bouteille sont donnés entre crochets.

2.5.3 Procédure

Les solutions d'essai ont été préparées et distribuées suivant un profil déterminé pour obtenir trois réplicats de chaque concentration et six du témoin positif. Chaque puit [erlen] a reçu 200 μ L [49 mL] de solution d'essai diluée ou non avec de l'eau déionisée, 20 μ L [1 mL] de solution nutritive et d'inoculum algal. Les concentrations finales en nutriments sont données au tableau 2.1. L'inoculum a été préparé à partir d'une culture d'algue en phase exponentielle de croissance de 4 à 7 jours. La densité cellulaire initiale était de $20\,000 \pm 1000$ cellules/mL [10 000 \pm 1000 cellules/mL]. La microplaque [les erlens] a été incubée à une température constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous un éclairage continu de 4000 ± 400 lux durant 96 h, puis la concentration d'algues (nombre de cellules par millilitre) a été mesurée à l'aide d'un compteur électronique de particules (Coulter Counter modèle TAI) [hématimètre - dénombrement en microscopie]. Régulièrement, la sensibilité des algues est vérifiée par un essai avec du chlorure de zinc [dichromate de potassium] comme témoin positif.

Le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration a été calculé comme suit:

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(\frac{d_{96h} - d_0}{d_{t96h} - d_0} \right) \times 100$$

où d_{96h} est la densité cellulaire moyenne des trois réplicats de l'échantillon après 96 h d'incubation, d_{t96h} est la densité cellulaire moyenne des six réplicats du témoin et d_0 est la densité initiale (inoculum).

Tableau 2.1: Concentrations finales en nutriments dans le milieu du biotest

Macronutriment	Concentration (mg/L)
NaNO ₃	15.94
MgCl ₂ •6H ₂ O	6.25
CaCl ₂ •2H ₂ O	2.76
MgSO ₄ •7H ₂ O	9.19
K ₂ HPO ₄	0.65
NaHCO ₃	9.38
Micronutriment	Concentration (µg/L)
H ₃ BO ₃	115.95
MnCl ₂ •4H ₂ O	259.76
ZnCl ₂	2.05
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.89
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.008
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	4.54
FeCl ₃ •6H ₂ O	100
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	187.5

2.6 Test de mortalité des daphnies

2.6.1 Intérêt écologique des daphnies

Les daphnies sont des microcrustacés d'eau douce, généralement connus sous le nom de "puces d'eau", qui appartiennent à l'ordre des cladocères. Les cladocères de la famille des daphniidés, notamment *Daphnia* sp. et *Ceriodaphnia* sp., sont omniprésents dans les eaux douces des climats tempérés. Les deux genres se retrouvent en abondance dans la colonne d'eau et à la surface des sédiments des lacs, des étangs et des secteurs calmes des cours d'eau de l'Amérique du Nord (Pennak, 1989). Dans ce type d'habitat, ces cladocères constituent des espèces importantes sur le plan écologique puisqu'elles sont parmi les principaux groupes à convertir le phytoplancton et les bactéries en protéines animales (Carpenter *et al.*, 1985) et qu'elles constituent une partie importante du régime alimentaire de nombreux poissons, notamment les jeunes salmonidés. Les daphnies présentent certains avantages à être utilisés comme organismes cibles dans des biotests: leur cycle de vie est

relativement bref et elle peuvent être élevées en laboratoire; elles sont sensibles à un large éventail de contaminants (Crosby et Tucker, 1966; LeBlanc, 1980; Bellavere et Gorbi, 1981; Attar et Maly, 1982; Khangarot et Ray, 1987); en raison de leur petite taille, de faibles volumes d'essai sont requis. Les espèces les plus grosses de *Daphnia* (c.-à-d. *D. pulex* et *D. magna*) servent depuis des années à évaluer la létalité aiguë (après 48 h) d'effluents ou de produits chimiques (Banta, 1921; Crosby et Tucker, 1966; Adema, 1978). Un essai de toxicité chronique sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia* a également été développé (Mount et Norberg, 1984; Rao, 1988).

2.6.2 Choix du biotest

La présente étude a utilisé le test standardisé qui mesure la mortalité de *D. magna* à 48 heures en phase liquide (Environnement Canada, 1990). Des daphnies d'un âge inférieur à 24 h sont mises en présence de la solution à tester, et observées après 48 h. Les animaux morts sont alors dénombrés.

Des études ont montré que ce test est sensible (Lewis et Horning, 1991) et très représentatif de la toxicité aiguë en milieu aquatique, si on le compare à d'autres tests (Kenaga, 1978). Pour l'évaluation de sédiments (Dutka et Kwan, 1988; Giesy *et al.*, 1988) et d'élutriats de déchets (Calleja *et al.*, 1986), il a été montré que le test de mortalité des daphnies apportait une information unique dans une batterie de biotests. Khangarot et Ray (1988) ont mis en évidence une forte corrélation ($r = 0.99$) entre les valeurs de CL50 obtenues avec *D. magna* et les valeurs de DL50 du rat. De très bons coefficients de variation ont été obtenus lorsque la reproductibilité du test a été étudiée (Gersich *et al.*, 1986; Schaeffer *et al.*, 1987). Cependant Gersich *et al.* (1986) précisent que la réplication non-simultanée du test est une cause importante de variation des valeurs de CL50 et proposent d'apporter une correction à l'intervalle de confiance obtenu ordinairement par des répliques simultanées (au sein du même essai). Les problèmes de reproductibilité interlaboratoire ont été attribués aux conditions de culture et à la variation génotypique des souches de *D. magna* (Baird *et al.*, 1989; 1991).

2.6.3 Procédure

Ce test statique a été réalisé dans des tubes de verre contenant 60 mL de solution à tester. De l'eau reconstituée (2.4 mM NaHCO₃, 2.8 mM CaCl₂, 150 µM K₂SO₄, pH = 8.0 ± 0.2, dureté = 120-250 mg/L) a permis les dilutions et a servi de solution contrôle pour les témoins. Quatre ou cinq daphnies par réplicat (3 ou 4 réplicats par

concentration) d'un âge inférieur à 24 h ont été mises en présence de la solution à tester, et observées périodiquement (1 h, 24 h, 48 h). Les tubes, placés à $20 \pm 1^\circ\text{C}$, ont été soumis à une photopériode diurne de 16 h de lumière (800 lux). Après 48 h les animaux morts (battements cardiaques interrompus et immobilité des antennes observés au microscope binoculaire) ont été dénombrés. Afin d'évaluer la précision des données produites par le laboratoire ainsi que la sensibilité relative des daphnies, un toxique de référence (dichromate de potassium) a été utilisé.

2.7 SOS Chromotest

2.7.1 Génotoxicité

Certains agents, qui interagissent avec l'ADN *in vivo*, peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et sur la survie des organismes. En particulier ces agents peuvent induire des mutations et des cancers. La détection de ces agents est un problème important en toxicologie génétique. Les bactéries sont largement utilisées comme organisme indicateur au sein de biotests de génotoxicité (Hollstein *et al.*, 1979; Hoffmann, 1982). Elles offrent des avantages pratiques et permettent de visualiser des mécanismes basiques de la génotoxicité et de ses conséquences. Un des systèmes les plus connus est celui de Ames (Ames *et al.*, 1973; 1975) qui utilise une souche de *Salmonella*. Ce test fournit une très bonne indication du potentiel mutagénique d'un agent, mais est long et fastidieux car spécifique à chaque type de mutation testée.

Les bactéries possèdent, comme tout organisme vivant, des mécanismes élaborés pour répondre aux agents endommageant l'ADN (Battista *et al.*, 1990). Chez *E. coli* les réponses induites par un traitement génotoxique impliquent une série de fonctions appelée "réponse SOS" (Little et Mount, 1982) ou "*damage-inducible genes*". Le SOS Chromotest exploite une des conséquences de l'action génotoxique qui est l'inhibition de la division cellulaire elle-même contrôlée chez *E. coli* par le locus *sfiA* (Huisman et D'Ari, 1981).

2.7.2 Description du test

Le gène structural de la β -galactosidase (*lacZ*) a été fusionné à l'opéron SOS sous le contrôle du gène *sfiA* (Huisman et D'Ari, 1981), permettant ainsi par une mesure colorimétrique simple d'avoir un test direct mesurant la réponse SOS subséquente à une agression de l'ADN. La souche *E. coli* PQ37 (Quillardet *et al.*, 1982) possède les gènes fusionnés *sfiA::lacZ* et la région normale *lac* est déléetée. En conséquence l'activité de la β -galactosidase

est strictement dépendante de l'expression de *sfiA*. Une mutation dans le gène *uvrA* rend la souche déficiente pour le mécanisme d'excision-réparation, ce qui accroît la réponse à certains agents génotoxiques. Une mutation dans le gène *rfa* rend la souche déficiente en liposaccharides et permet une meilleure diffusion de certains composés chimiques dans la cellule.

L'essai consiste à incuber la souche *E. coli* PQ37 avec le composé ou l'échantillon à tester et de mesurer l'activité de la β -galactosidase synthétisée. Une préparation d'activation microsomale (fraction S9) (Ames *et al.*, 1975) peut être additionnée au milieu d'incubation. La réponse est obtenue rapidement (quelques heures). Les composés testés peuvent à certaines concentrations inhiber la synthèse protéique ou tuer les bactéries, ce qui pourrait conduire à une sous-estimation de la β -galactosidase induite (faux-négatifs dans les cas extrêmes). Une estimation générale de la synthèse protéique pendant la période d'incubation permet d'apporter une correction. La mesure de l'activité de l'enzyme phosphatase alcaline, constitutive chez *E. coli*, est utilisée à cette fin.

Le SOS Chromotest est un test quantitatif et fournit une valeur de génotoxicité, le facteur d'induction corrigé pour la viabilité (FICV). Le SOS Chromotest a été validé par comparaison avec le test d'Ames, où la génotoxicité détectée sur la plupart des composés testés était corrélée avec le potentiel mutagénique du test d'Ames (Quillardet *et al.*, 1985; Eder *et al.*, 1989; McDaniels *et al.*, 1990; Legault *et al.*, 1994). Ce test a été utilisé pour l'évaluation génotoxique de nombreux composés (Quillardet *et al.*, 1985; Olivier et Marzin, 1987; von der Hude *et al.*, 1988; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992). Kwan et Dutka (1992) ont récemment adapté le test à l'évaluation des sédiments en contact direct.

2.7.3 Procédure

La méthode du SOS Chromotest, à l'origine développée par Quillardet *et al.* (Quillardet *et al.*, 1982; Quillardet et Hofnung, 1985) a été modifiée par la compagnie Organics (Yavne, Israël), ce qui permet d'utiliser des microplaques à 96 puits (Fish *et al.*, 1987). Le protocole était essentiellement basé sur le manuel d'instruction fourni avec le kit du SOS (*The SOS Blue Kit - Instructions for Use*, 1988). Les réactifs du SOS Chromotest (bactéries lyophilisées, *blue chromogen* et *pNPP*) ont été fournis par Environmental Bio Detection Products inc. (Brampton, Ontario, Canada). Les bactéries lyophilisées ont été reconstituées avec 20 mL de milieu casitone 1X (2.5 g d'extrait de levure Bacto, 2.5 g de casitone Bacto et 8.5 g de NaCl dans 1 L d'eau) et incubées 16 h à 37°C. Les cultures nocturnes ont été

diluées avec du milieu casitone (2X) frais afin d'obtenir des densités bactériennes d'absorbance (A) moyenne de 0.05 à 600 nm. Pour l'essai nécessitant la fraction d'activation de foie de rat (S9), le mélange d'activation a été ajouté pour représenter 25% de la solution bactérienne. Le mélange d'activation est préparé auparavant avec 2% de solution stérile de KCl (1.65 M) et de MgCl₂ (0.4M), 50% de Tris (0.2 M, pH ajusté à 7.4), 1% d'une solution de Glucose-6-phosphate monosodique (0.5 M) filtrée sur 0.22 µm, 4% d'une solution de NADP disodique (0.1 M) filtrée sur 0.22 µm et 2% de fraction S9 (Microbiological Associates inc., Rockville, Maryland USA). Chaque test a été réalisé dans deux microplaques à fond plat de 96 puits (Linbro) dans lesquelles les activités enzymatiques ont ensuite été mesurées photométriquement. Huit réplicats de blanc (milieu réactionnel sans bactérie), de témoins négatifs (eau déionisée) et de chaque concentration d'élutriat ont été attribués à différentes colonnes. Une colonne a été attribuée aux différentes concentrations de chaque témoin positif (4NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide et 2AA: 2-amino-anthracène). 100 µL des solutions à tester ont été pipetées avec une micropipette à canaux multiples, puis 100 µL de solution bactérienne ont été ajoutées et mélangées, résultant ainsi en une concentration maximale d'élutriat de 50%. Les microplaques ont alors été incubées 2 h à 37°C, après quoi elles ont été centrifugées (700 g, 20 min). Le surnageant a été jeté et les culots bactériens ressuspendus dans 100 mL de tampon Tris (Tris 0.2 M, MgCl₂ 3 mM et pH ajusté à 8.0). Une microplaque a été attribuée à la mesure de l'activité de la β-galactosidase par l'addition dans chaque puit de 100 µL de substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase (réactif *blue chromogen*), tandis que l'autre microplaque a permis la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline par l'ajout de 100 µL de substrat *p*-nitrophenyl phosphate disodium (réactif *pNPP* dilué dans 12 mL de tampon Tris). Les microplaques ont ensuite été réincubées à 37°C afin de permettre le développement de la couleur: 20 min pour l'activité de la phosphatase alcaline et 60 min pour celle de la β-galactosidase. Les activités relatives de β-galactosidase et phosphatase alcaline ont été mesurées à 620 et 405 nm respectivement. L'absorbance a été lue avec un spectrophotomètre qui permet la lecture de microplaques (Multiskan[®], modèle MCC/340 MK2) connecté à un micro-ordinateur. L'activité de la phosphatase alcaline a permis de suivre les effets cytotoxiques. Une diminution significative ($P \leq 5\%$) des valeurs d'absorbances à 405 nm comparées à celles du témoin négatif a été interprétée comme étant un effet toxique et a permis l'estimation d'un facteur de correction pour la viabilité (fcv):

$$fcv = \frac{A_{405nc}}{A_{405t}}$$

où *nc* représente le témoin négatif et *t* la solution testée. Lorsqu'aucune différence significative n'était observée, une valeur fixe de 1 était attribuée au *fcv*. Les facteurs d'inductions corrigés pour la viabilité (FICV) qui reflètent l'activité génotoxique ont été calculés à partir de l'équation suivante:

$$\text{FICV} = \frac{A_{620t}}{A_{620nc}} \times \text{fcv}$$

Une activité génotoxique est jugée significative lorsque le FICV dépasse une valeur seuil de 1.5 (Quillardet et Hofnung, 1985) et lorsque les valeurs d'absorbance à 620 nm sont significativement (*P* de Tukey $\leq 5\%$) supérieures au témoin.

2.7.4 SOS Chromotest en phase solide

La procédure utilisée a été légèrement modifiée de celle proposée par Kwan et Dutka (1992) pour l'évaluation des sédiments. Les réactifs étaient identiques à ceux utilisés pour la procédure normale du test. La culture nocturne d'*E. coli* a été utilisée pour préparer le milieu réactionnel avec ou sans fraction S9. Six échantillons de sol (5 à 100 μg) ont été répartis dans des tubes où il a été ajouté 1 mL de milieu réactionnel (à cette étape, la procédure originale proposait de peser un gramme de sol, d'y ajouter le milieu réactionnel et d'effectuer des dilutions en série). Les témoins ont été attribués à deux tubes n'ayant pas reçu de sol. Après 2 h d'incubation à 37°C, le contenu des tubes a été mélangé au vortex pendant 5 sec et le sol a été décanté pendant 1 min avant de transférer 100 μL de milieu réactionnel dans quatre puits de la microplaque. La mesure des activités enzymatiques s'est faite par l'addition dans chaque puit de 100 μL de substrat de la β -galactosidase [5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase (réactif *blue chromogen*)] et de la phosphatase alcaline [*p*-nitrophenyl phosphate disodium (réactif *pNPP*)]. Immédiatement après l'addition des substrats, les absorbances à 620 et 405 nm ont été lues (mesure des bruits de fond). Les absorbances ont été relues à 405 nm et 620 nm, après 20 et 60 min respectivement d'incubation à 37°C. Les calculs d'activité ont été réalisés de la même façon que pour la procédure normale, excepté que les valeurs de bruits de fond ont été retranchées des lectures photométriques.

2.7.5 Validité du SOS Chromotest en phase solide

Différentes observations ont été faites au cours d'essais préliminaires de validation de la méthode, menant à la conclusion que la présence du sol interfère avec les mesures spectrophotométriques et/ou les activités enzymatiques. Des particules de sol ont été

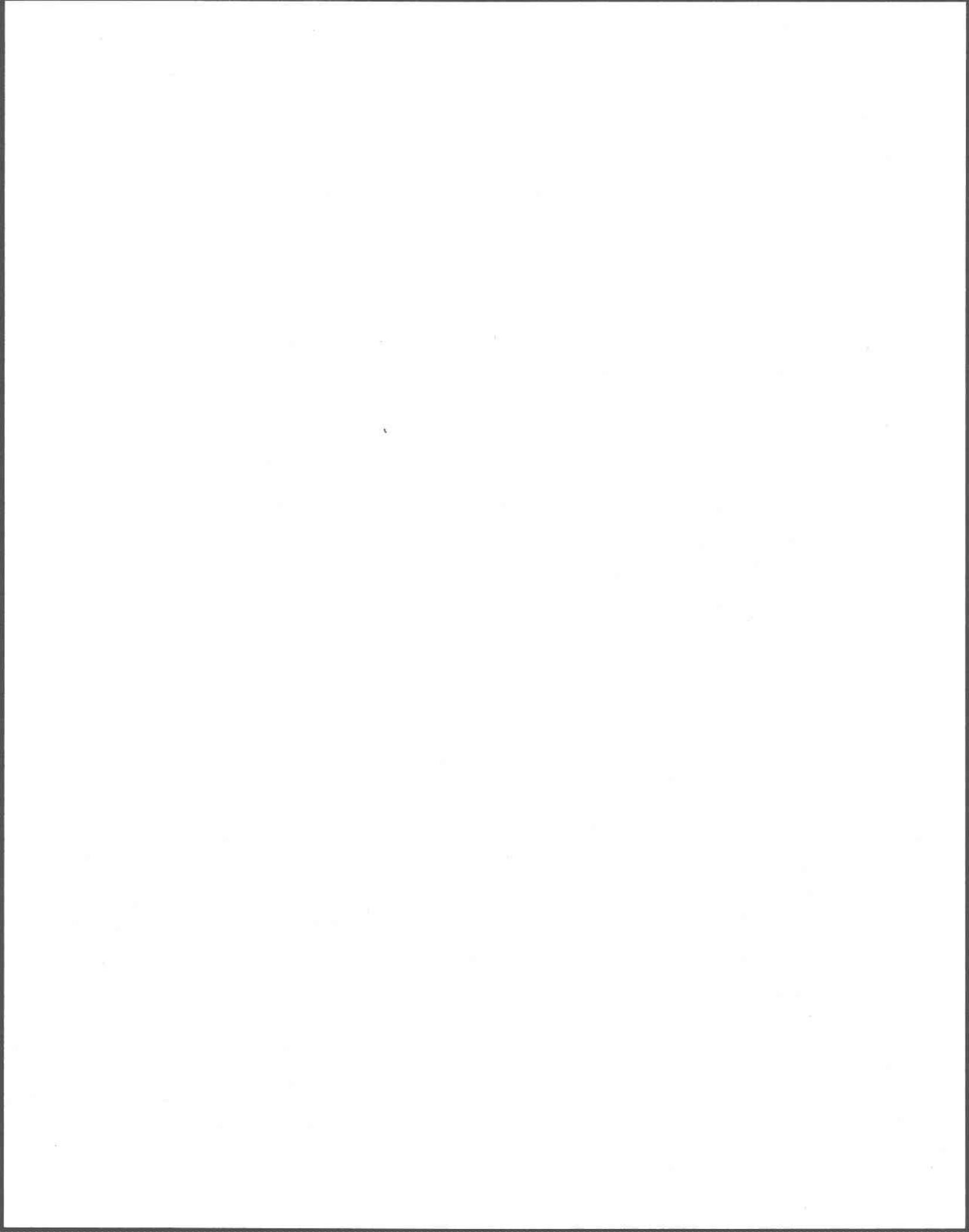
retrouvées dans le fond des puits suite à l'incubation enzymatique de 2 heures; des essais de filtration n'ont pu empêcher cet effet. Des mesures corrigées d'absorbance à 620 nm inférieures au témoin (voire négatives) ont été observées en présence de composés génotoxiques (sol contaminé aux HAP ou 4NQO ajouté à un sol non-contaminé), entraînant l'impossibilité de mesurer un effet génotoxique. Les mesures d'absorbance à 405 nm étaient en relation avec la concentration de sol présent dans le milieu. L'hypothèse selon laquelle la présence de bactéries du sol ait pu entraîner une augmentation en phosphatase alcaline, susceptible d'être présente chez ces bactéries, a été testée par la stérilisation d'un sol non-contaminé. Cependant, aucune conclusion n'a pu être tirée du fait que la stérilisation préalable du sol, en plus d'éliminer les bactéries, a modifié sa structure, entraînant l'absence de coloration du milieu et l'absence de particules dans les puits de lecture. L'interférence des sols avec les réactions enzymatiques et/ou la lecture spectrophotométrique a empêché de distinguer les effets provoqués par un sol très contaminé en HAP (4700 mg/kg) et un sol agricole. La procédure jugée non valide et difficilement améliorable a donc été abandonnée.

2.8 Conclusion

L'évaluation écotoxicologique de systèmes sol/liquide a donc été réalisée dans ce projet avec les biotests suivants: germination de graine d'orge, croissance de la tige d'orge, germination de graine de laitue, mortalité du ver de terre, Microtox[®], élongation radiculaire, croissance phytoplanctonique, mortalité de daphnie et SOS Chromotest \pm S9.

La procédure du SOS Chromotest en phase solide s'est révélé non valide pour l'évaluation des sols, la présence de sol interférant avec les résultats du test.

Le Microtox[®] en phase solide a posé également des problèmes méthodologiques d'interférence du sol avec les lectures photométriques.



3 RÉDUCTION DE LA TOXICITÉ DANS UN SYSTÈME SOL/LIQUIDE

3.1 Introduction

La vérification de l'hypothèse selon laquelle la biodégradation des composés s'accompagne d'une réduction concomitante de la toxicité a été effectuée dans un système sol/liquide en colonnes expérimentales. L'évolution de la toxicité a été étudiée dans un modèle de biodégradation de composés dérivés de la créosote en solutions mixtes. Les composés solubilisés en solution aqueuse ont été injectés dans des colonnes de sol et dégradés par la flore microbienne indigène du sol.

L'exposition à des composés dérivés de la créosote, suite à la contamination par les industries de conservation du bois, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les produits phénoliques et les N-hétérocycles, constitue un danger important pour la santé humaine. Des corrélations ont pu être mises en évidence entre une contamination environnementale avec de la créosote ou des HAP, même à des concentrations de l'ordre du ppb, et des effets toxiques (Tagatz *et al.*, 1983), carcinogéniques (Malins *et al.*, 1985; Vogelbein *et al.*, 1990) et de bioaccumulation (DeLeon *et al.*, 1988; Elder et Dresler, 1988) chez de nombreux organismes. Parmi les composés dérivés de la créosote, les propriétés toxiques et/ou carcinogéniques du phénanthrène, du fluorène, du carbazole et du *p*-crésol les rendent particulièrement inquiétants. Le phénanthrène, HAP, s'est révélé toxique pour des organismes aquatiques, tels la truite arc-en-ciel et la perche (Black *et al.*, 1983), les moules (Pipe et Moore, 1986), les algues vertes (Kusk, 1981), et les daphnies (Savino et Tanabe, 1989). Les études concernant les activités mutagéniques et carcinogéniques du phénanthrène sont contradictoires (Simmon *et al.*, 1979; Carver *et al.*, 1986; Rossman *et al.*, 1991). Le fluorène, HAP également, bien que non identifié comme carcinogène (Tonelli *et al.*, 1979), a présenté dans des cellules mammifères des activités mutagéniques (Garberg *et al.*, 1988; Wangenheim et Bolcsfoldi, 1988) et clastogéniques en présence de la fraction d'activation S9 (Matsuoka *et al.*, 1991). Le fluorène est également toxique pour des vers de terre (Neuhauser *et al.*, 1985). La mort de lapins, de chats et de rats a été provoquée après l'absorption orale et cutanée de *p*-crésol, de même degré toxique que le phénol dont il est un dérivé (Deichmann et Witherup, 1944). L'effet aigu principal du *p*-crésol est la baisse des

fonctions du système nerveux central, et l'absorption chronique peut conduire à des désordres nerveux et digestifs et à la promotion de papillomes (Dean, 1978). Dans des tissus végétaux, le *p*-crésol a induit des effets sur le fuseau chromatique (Dean, 1978). Ce composé est également toxique pour la biocénose aquatique (Alabaster *et al.*, 1973). Le N-hétérocycle carbazole a induit des effets hépato-carcinogéniques chez le rat (Ito *et al.*, 1988). La bioaccumulation du carbazole à des concentrations de l'ordre du ppb chez les daphnies a été étudiée (Southworth *et al.*, 1979), mais à notre connaissance, les effets toxiques du carbazole et du fluorène sur les organismes aquatiques ont peu ou pas été étudiés.

La capacité des bactéries indigènes à dégrader les composés de la créosote présents dans les sols et les aquifères a été étudiée (Madsen, 1991; Cerniglia, 1992). Cependant, les connaissances sur la dégradation des mélanges de composés aromatiques, qui existent en combinaisons complexes dans l'environnement, sont limitées (Cerniglia, 1992). L'information est encore plus limitée en ce qui concerne l'évolution de la toxicité pendant la dégradation de ces mélanges (Belkin *et al.*, 1994). Viennent s'ajouter à la toxicité inconnue des sous-produits de la dégradation, des interactions qui, dans le cas d'effets synergiques, vont amplifier la toxicité produite par chacun des composés. L'évolution de la toxicité atteint un degré de complexité supérieur dans un système hydrodynamique saturé, tel les eaux souterraines, où les contaminants et leur métabolites ne migrent pas nécessairement à la même vitesse. En conséquence, la ségrégation des espèces chimiques en fonction de la distance depuis la source de contamination peut sérieusement modifier le patron de biodégradation et de toxicité. Mesurer la perte en composés initialement présents n'assure donc pas qu'une détoxification complète s'est produite (Alexander, 1981; Svenson et Kaj, 1989; Belkin *et al.*, 1994).

Bien qu'aucun biotest ne peut fournir à lui seul une évaluation étendue de la toxicité d'un composé, un test valide tel le Microtox[®], peut apporter l'information pertinente pour relativiser la toxicité d'un composé et de ses métabolites durant un traitement. Le Microtox[®] est un test microbien sensible qui a déjà été largement utilisé pour l'évaluation du danger durant la biodégradation (Symons et Sims, 1988; Wang *et al.*, 1990; Mueller *et al.*, 1991; Belkin *et al.*, 1994), l'évaluation de la toxicité de HAP (Bulich *et al.*, 1981; Lebsack *et al.*, 1981), et durant des études de relation quantitative structure-activité de polluants (Hermens *et al.*, 1985; Blum et Speece, 1991b). Pour la présente étude, la procédure du Microtox[®] a été modifiée pour compenser l'ajout de sels dans les solutions contaminées pendant la

biodégradation. La comparaison des courbes de toxicité du phénol et du phénanthrène a permis de vérifier que cette procédure d'ajustement de la salinité n'affectait pas la toxicité.

L'objectif principal de la présente étude a été de déterminer dans quelle mesure la détoxification s'est produite durant la biodégradation du phénanthrène, du fluorène, du carbazole et du *p*-crésol dans un système sol/liquide non-statique. Cet objectif a été réalisé en conduisant des expériences en colonnes et: (i) en caractérisant la toxicité des composés étudiés; (ii) en évaluant et en comparant la toxicité des échantillons d'eau à l'entrée et à la sortie des colonnes; et (iii) en comparant la perte en composés spécifiques aux changements observés dans la toxicité pour chaque colonne.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Produits chimiques et solutions stock

Le phénanthrène et le carbazole (figure 3.1) de haute pureté (>99%) ont été obtenus chez Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA. Le fluorène (pureté 98.3%) a été acquis chez Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, et le *p*-crésol de haute pureté chez Fluka Chemika-BioChemica, Suisse (figure 3.1). Le dichlorométhane, grade Accusolv (pureté > 99.7%) a été obtenu chez Anachemia Science, Montréal, Canada. Les composés chimiques ont été solubilisés dans un milieu en sels minéraux (MSM) (Greer *et al.*, 1990) ou dans de l'eau déionisée selon la méthode publiée par Millette *et al.* (1995a) et décrite ci-après. Les solutions stock de phénanthrène, fluorène et carbazole ont été préparées en dissolvant une quantité déterminée de composé sous forme cristal dans une solution stérile de MSM ou dans une solution aqueuse, en flasque volumétrique fermée et recouverte de papier aluminium, par agitation magnétique à 40°C pendant 24 h, puis à température ambiante pendant 24 h additionnelles. Chaque solution a été ensuite filtrée sur borosilicate (1 µm) pour éliminer les cristaux non dissous. Les concentrations des solutions stock, proches du maximum de solubilité ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). Les solutions stock de *p*-crésol ont été préparées en ajoutant une quantité déterminée du composé dans une solution stérile de MSM, et en le dissolvant par agitation magnétique pendant 20 min à température ambiante, dans une flasque volumétrique fermée et recouverte de papier aluminium. La filtration n'a pas été nécessaire à cause de la nature hydrophile de ce composé.

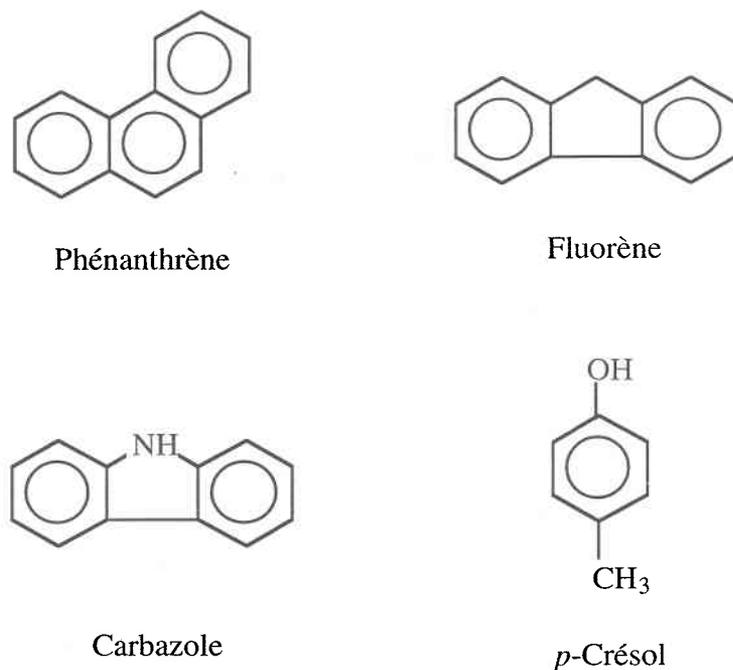


Figure 3.1: Structures du phénanthrène, du fluorène, du carbazole et du *p*-crésol

3.2.2 Mesure de la toxicité

Le Microtox[®] est un test de toxicité simple et standardisé qui utilise une suspension de bactéries marines luminescentes (*Photobacterium phosphoreum*) et qui mesure la toxicité aiguë de solutions aqueuses par la diminution de la bioluminescence. La procédure du test a été celle d'Environnement Canada (1992b). La solution à tester a été diluée à 49.5% pour la procédure de *screening* et en série pour la détermination de la CI50 (concentration inhibant 50%). Après l'addition de la suspension bactérienne et sous température contrôlée ($15 \pm 0.1^\circ\text{C}$), l'émission de lumière a été mesurée quantitativement par un dispositif photométrique (Microbics Model 500 Analyser). Chaque dilution par échantillon a été déterminée en triplicata. La diminution de lumière a été déterminée après 15 min d'exposition et exprimée en pourcentage moyen d'inhibition d'émission de lumière. Pour la détermination de la CI50, une analyse de régression a été effectuée sur la partie linéaire de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations (échelle logarithmique), permettant la prédiction inverse de la concentration produisant 50% d'inhibition avec un intervalle de confiance à $\alpha = 0.05$ (Zar, 1984).

Afin de protéger *P. phosphoreum* d'un choc osmotique, du chlorure de sodium (2%) est habituellement additionné aux échantillons avant l'analyse, donnant une conductivité de

22 200 $\mu\text{mho/cm}$. Cependant, les expériences présentes de dégradation ont été conduites dans une solution de MSM, dont la conductivité de 4 300 $\mu\text{mho/cm}$ n'a pas été modifiée par passage dans les colonnes. Afin de déterminer la salinité à ajouter aux échantillons, une expérience préliminaire a été réalisée où deux procédures différentes ont été testées sur du phénol en présence de MSM. Le phénol est communément utilisé comme toxique de référence du Microtox[®] (Environment Canada, 1992b) et une littérature bien documentée est disponible (Kaiser et Ribo, 1988). La CI50 (15 min) du phénol dans les conditions normales du test a été estimée à 22 mg/L avec un intervalle de confiance à 5% de 18 à 27 mg/L. Cette valeur est comparable à celles fournies par la littérature et se situant entre 18 et 39 mg/L à 5 min (Kaiser et Ribo, 1988; Blum et Speece, 1991a) et à 34 mg/L à 15 min (Dutka et Kwan, 1981; Ribo et Kaiser, 1983). Le phénol a tout d'abord été préparé dans du MSM et la conductivité a été ajustée à 22 200 $\mu\text{mho/cm}$ par l'addition de 1.6% (p./v) de chlorure de sodium. Cette solution a été testée soit avec du NaCl-2% (procédure normale) soit avec une solution de MSM additionnée de NaCl-1.6% comme diluants et témoins négatifs. Les valeurs de CI50 obtenues étaient de 19 mg/L (13-28) en présence de MSM et de 36 mg/L (24-58) avec du NaCl-2%. Après comparaison avec la CI50 du phénol dans les conditions normales du test, le MSM additionné de NaCl-1.6% a été choisi pour le reste des essais comme diluant et témoin négatif. Les échantillons ont été ajustés à la conductivité désirée par l'addition de 1.6% (p./v.) de chlorure de sodium. Cependant, il doit être noté que la présence de MSM dans le témoin négatif induit une légère stimulation de la bioluminescence; en conséquence, le ratio du blanc ($R_t = \text{lumière émise par le témoin négatif au temps 15 min} / \text{lumière émise par le témoin négatif au temps zéro}$) était de 1.0 en moyenne, au lieu de 0.8 pour la procédure normale avec NaCl-2%.

Quelques essais ont été réalisés sans succès avec le test d'inhibition de croissance du phytoplancton *Selenastrum capricornutum* (Environment Canada, 1992a). Cette algue d'eau douce étant très sensible à la salinité, la solution de MSM, aux concentrations utilisées dans les colonnes, inhibait sa croissance.

3.2.3 Analyses chimiques

Les concentrations en phénanthrène, fluorène, *p*-crésol et carbazole ont été déterminées par GC/MS. Les échantillons aqueux ($\approx 45 \text{ mL}$) ont été collectés dans des ampoules de verre de 60 cm^3 fermés avec des septa en Téflon[®]. Au moment de l'échantillonnage, 2 mL d'une solution HCl (1N) a été ajoutée. Les composés étudiés ont été extraits en suivant une technique de micro-extraction au solvant (Millette *et al.*, 1995b). La méthode peut être

résumée comme suit: (i) les standards de récupération, 4-fluorobiphényle et *o*-crésol, ont été ajoutés et les vials agités pendant 10 min à 400 rpm sur un agitateur orbital; (ii) 3 mL de dichlorométhane ont été ajoutés aux échantillons et l'agitation (400 rpm) a été prolongée 20 min; (iii) les vials ont été centrifugés à 600 g pendant 10 min, en position inversée pour permettre une séparation complète du solvant de la phase aqueuse; 1 mL a été prélevé avec une seringue, et un standard interne, le 1,2,3-trichlorobenzène, a été ajouté. L'extrait a été analysé par GC/MS d'après la méthode de l'US-EPA #8270 (1986). Les limites de détection obtenues étaient de 3, 4, 10, et 1.4 µg/L pour le phénanthrène, le fluorène, le *p*-crésol et le carbazole respectivement.

3.2.4 Description des colonnes et échantillonnage

Chaque colonne consiste en un tube d'acier inoxydable (46 cm de long, 7.2 cm de diamètre) fermé à chaque extrémité d'un disque d'acier inoxydable et équipé de trois orifices d'échantillonnage (figure 3.2). Les colonnes ont été alimentées en continu en flux ascendant en utilisant 2 pompes équipées de deux seringues de verre de 50 mL. De l'oxygène a été injecté dans la solution de flux entrant (10 mL/min) par des diffuseurs de basse pression. Les colonnes ont été montées dans un incubateur à 10°C, ce qui a permis l'opération de 8 colonnes simultanément. Les colonnes ont été remplies de sable collecté dans la nappe aquifère non-confinée de la base des Forces canadiennes de Borden, Ontario. Les détails concernant la collection du sable et ses propriétés physico-chimiques sont fournies dans Millette *et al.* (1995a). Les solutions de flux entrant étaient préparées en ajoutant le volume approprié de solution stock à du MSM stérile.

Sept colonnes ont été étudiées avec un flux entrant constant de carbazole de 166 µg/L. Les effets du phénanthrène et du fluorène ont été étudiés sur quatre d'entre elles (colonnes R1, R2, R3 et R4). Le phénanthrène a été injecté en moyenne dans R1 et R2 à 33 µg/L et dans R3 et R4 à 165 µg/L, alors que le fluorène l'était en moyenne à 48 µg/L dans R1 et R3 et à 238 µg/L dans R2 et R4. Un réplicata de la colonne R4 a été réalisé (R4r). De plus, le *p*-crésol a été étudié en l'injectant à 10 000 µg/L dans un second réplicata de la colonne R4 (R4p). Finalement, un témoin avec du carbazole seulement a été préparé (colonne C).

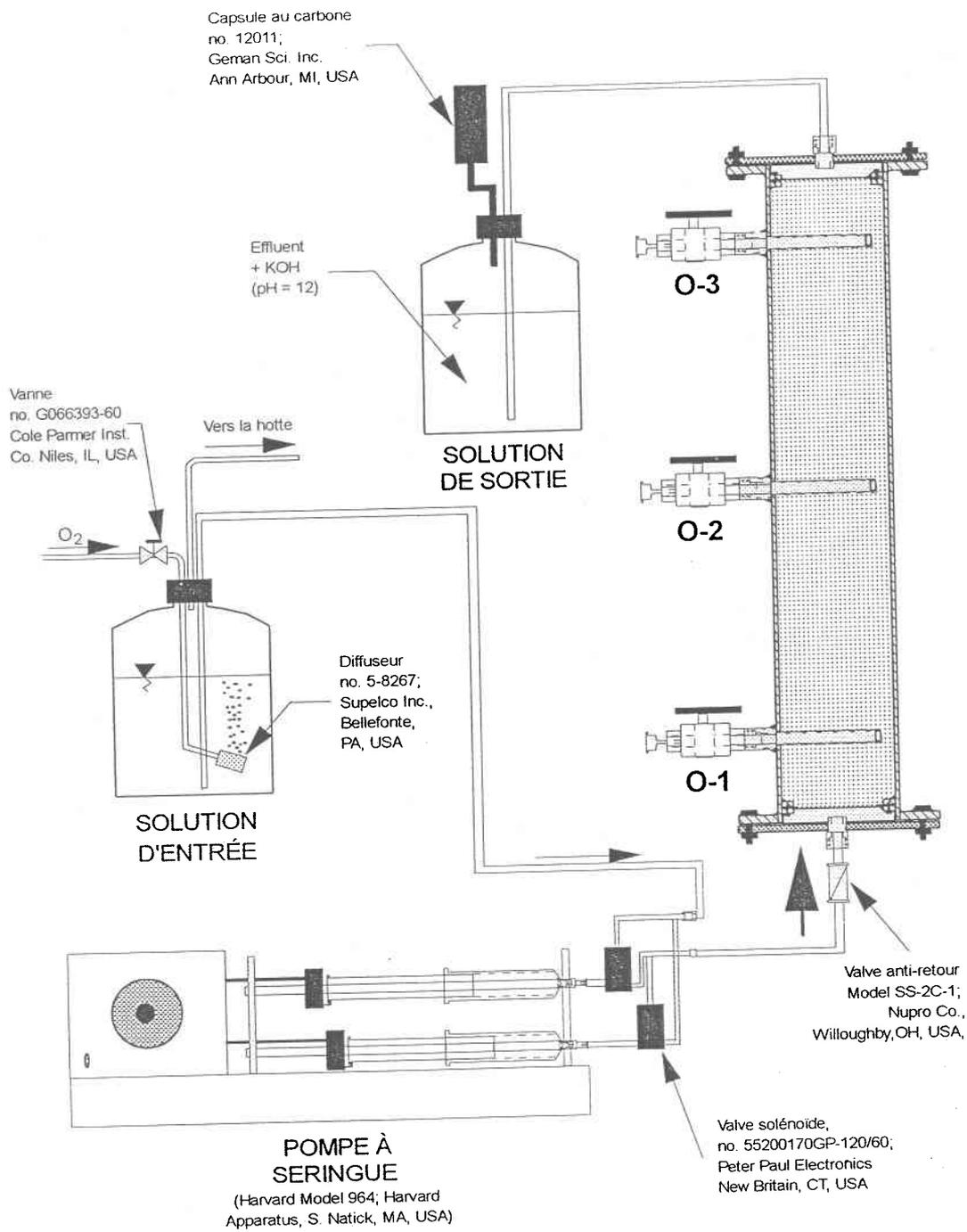


Figure 3.2: Montage expérimental d'une colonne

Quand les équilibres de biodégradation ont été atteints dans les colonnes (82 à 105 jours), les échantillons ont été prélevés avant traitement à l'entrée des colonnes (E: flux entrant) et après traitement dans le dernier orifice (O-3: flux sortant de l'orifice 3), excepté pour la colonne R4p où les trois orifices (O-1 à O-3) ont été échantillonnés. Les échantillons ont été conservés à l'obscurité et à 4°C, analysés par Microtox[®] dans les 24 h et extraits dans la semaine qui a suivi l'échantillonnage. Le pH de l'échantillon n'a pas été ajusté avant l'analyse puisque le MSM l'avait été précédemment à pH 7.2.

3.2.5 Analyses statistiques

La limite de détection de l'inhibition de bioluminescence produite par une solution a été déterminée avec n échantillonnages et donc n essais indépendants. Pour chaque essai, la luminescence a été mesurée en triplicata pour l'échantillon et en six réplicats pour le témoin négatif. Dans le but de vérifier l'homogénéité ($\alpha = 0.05$) entre les différentes valeurs obtenues par chaque essai, les ratios R (lumière émise au temps 15 min/lumière émise au temps zéro) de l'échantillon et du témoin négatif ont été comparés par une analyse de variance à deux facteurs. Ces deux facteurs étaient (i) l'"échantillon", variable fixe à deux niveaux (échantillon testé ou témoin négatif) et (ii) l'"essai", variable fixe à n niveaux (n essais). L'inhibition de la bioluminescence était considérée non-significative (ns), lorsque la probabilité pour la comparaison de l'échantillon avec le témoin négatif était supérieure à la valeur 0.05. Il a été vérifié pour chaque analyse que l'interaction entre les variables "échantillons" et "essai" n'était pas significative.

Dans le but d'apprécier l'efficacité des colonnes à détoxifier les solutions contaminées, une analyse de variance à deux facteurs a également été effectuée sur les valeurs de pourcentage d'inhibition. Chaque solution échantillonnée n fois a fourni n valeurs d'inhibition. Deux facteurs (variables fixes), l'effet du "traitement" (2 niveaux: flux entrant comparé à flux sortant des orifices) et l'effet des "colonnes" (7 niveaux: comparaison des 7 colonnes) ont été étudiés. Les comparaisons des valeurs d'inhibition entre les solutions ont été obtenues par un test post-hoc de comparaison (méthode Tukey) adapté pour des tailles d'échantillons inégales (Spjotvol et Stoline, 1973).

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Effet des composés en solution pure

Avant d'étudier l'évolution de la toxicité de mélanges complexes de composés aromatiques, les effets toxiques individuels du phénanthrène, fluorène, carbazole et *p*-crésol solubilisés dans du MSM ont été examinés. Les solutions saturées ont été testées avec la procédure de screening du Microtox[®], et lorsque l'inhibition était supérieure à 50% la CI50 était déterminée par dilution en série de la solution stock (tableau 3.1 et figure 3.3). Le *p*-crésol a causé la plus forte inhibition. Cependant, à cause de sa forte solubilité, sa concentration était bien plus importante que celles des autres composés (tableau 3.1 et figure 3.3a). Des valeurs comparables de CI50 pour le *p*-crésol après 5 min d'exposition de *P. phosphoreum* (1500 et 1300 µg/L) sont données dans la littérature (Bulich *et al.*, 1981; Lebsack *et al.*, 1981) indiquant que la présence de MSM n'affecte pas la toxicité du *p*-crésol. En comparant les valeurs de CI50 des composés testés dans la présente étude, le phénanthrène était le plus puissant, suivi du fluorène et du *p*-crésol (tableau 3.1). Le carbazole a faiblement réduit la luminescence (tableau 3.1); en conséquence, la CI50 n'a pu être déterminée.

Tableau 3.1: Concentrations (C) déterminées par GC/MS, inhibitions (I) de la bioluminescence de *P. phosphoreum* de solutions stock de composés dérivés de la créosote, et valeurs de CI50.

	C ^a (µg/L)	I ^a (%)	CI50 ^b (µg/L)
Carbazole	1506 (9)	37.5 (5.3)	>745
Fluorène	1556 (93)	50.8 (4.1)	756 (482-1296)
Phénanthrène	994 (2)	74.7 (0.9)	142 (121-167)
	892 (49)	72.2 (0.1)	144 (111-186)
<i>p</i> -Crésol	1190000	100 (0)	1501 (1129-1994)

^a: écart type donné entre parenthèses

^b: intervalle de confiance ($\alpha = 0.05$) donné entre parenthèses

Le phénanthrène solubilisé dans de l'eau déionisée a aussi été testé, dans le but de vérifier si la présence du MSM affectait la toxicité. Des résultats très similaires de ceux en présence de MSM ont été obtenus (figure 3.3b). La solution saturée de phénanthrène dans l'eau à une concentration de 1076 µg/L a produit 70.9% (é.t. = 0.5) d'inhibition d'émission de

lumière tel que déterminé par la procédure de *screening*. Une valeur de CI50 de 182 µg/L, avec un intervalle de confiance ($\alpha = 0.05$) de 123 à 274 µg/L ont été obtenus, résultat en accord avec ceux obtenus en présence de phénanthrène (Tableau 3.1). Le MSM n'a donc eu aucun effet détectable sur la toxicité de ce composé et la procédure d'ajustement de la salinité s'est révélée acceptable pour tester des composés aromatiques solubilisés dans du MSM.

Le Microtox[®] est un biotest pertinent pour suivre la détoxification du phénanthrène, du fluorène, du carbazole et du *p*-crésol, puisque ces composés ont provoqué des effets toxiques chez d'autres organismes aquatiques, à des concentrations comparables. Une concentration de 113 µg/L a causé la mort de 33 à 73% des daphnies *Daphnia pulex* exposées 16 j au phénanthrène (Savino et Tanabe, 1989). La survie d'embryons de poissons a également été affectée par le phénanthrène (Black *et al.*, 1983): les concentrations létales médianes étaient respectivement de 40 et de 180 µg/L pour la truite *Salmo gairdneri* et la perche *Micropterus salmoides*. L'activité enzymatique des cellules digestives de la moule *Mytilus edulis* a été perturbée par 200 µg/L de phénanthrène (Pipe et Moore, 1986). Des concentrations supérieures à 200 µg/L ont diminué la photosynthèse d'organismes phytoplanctoniques naturels et cultivés en laboratoire (Kusk, 1981). Bien que peu de données soient disponibles pour le fluorène, une concentration entre 700 et 1300 µg/L était létale à la moitié des annélides marins *Neanthes arenaceodentata* exposés 96 h (Rossi et Neff, 1978). Ces mêmes organismes étaient par contre moins sensibles que *P. phosphoreum* au phénanthrène. En ce qui concerne la toxicité du *p*-crésol, la bioluminescence de *P. phosphoreum* apparaît être une variable d'effet moins sensible que la consommation d'oxygène par des bactéries hétérotrophes aérobies ou de l'ammoniaque par des *Nitrosoma*, ou que la production de gaz par des méthanogènes (Blum et Speece, 1991b). Cependant, *P. phosphoreum* était plus sensible au *p*-crésol que différentes espèces de poissons (24h-CL50 de 4 à 400 mg/L) (Alabaster *et al.*, 1973; Schultz *et al.*, 1978).

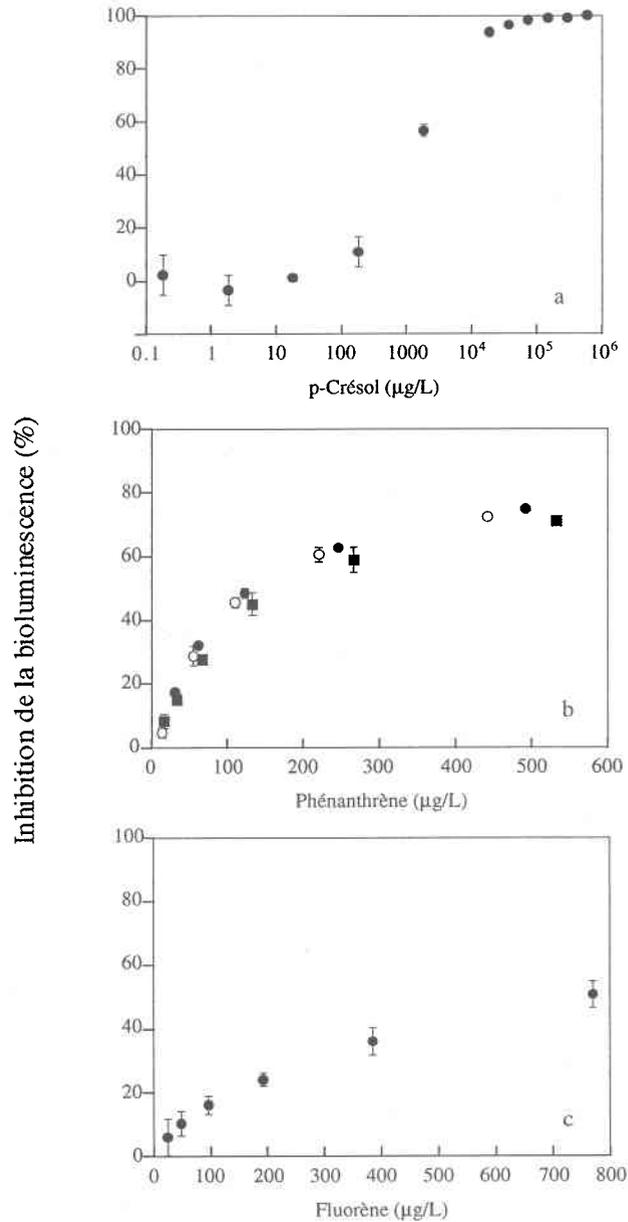


Figure 3.3: Relations dose-réponse entre le *p*-crésol (a), le phénanthrène (b) et le fluorène (c), solubilisés dans du MSM (cercles) ou dans de l'eau déionisée (carrés), et l'émission de lumière de *P. phosphoreum*. Inhibition moyenne \pm écart type ($n = 3$). Cercles blancs = duplicata

3.3.2 Résumé des résultats de biodégradation

Dans cette section un résumé des résultats de biodégradation est présenté. Plus de détails sont fournis par Millette *et al.* (1995b). Les courbes de disparition (C/C_0) des quatre composés à l'orifice d'échantillonnage O-3 des colonnes sont présentées à la figure 3.4. Dans cette figure le signe "+" indique que le composé était injecté à sa plus forte concentration, alors que le signe "-" indique qu'il l'était à sa plus faible, "0" indiquant l'absence du composé.

Le *p*-crésol n'a été détecté qu'à l'orifice O-3 de la colonne R4*p* et n'a jamais été détecté dans les autres orifices. De même, le phénanthrène n'a jamais été détecté à l'orifice O-3 et n'a été détecté à l'orifice O-1 qu'au début de l'expérience. Le *p*-crésol et le phénanthrène ont donc été biotransformés près de l'entrée des colonnes. Aucune donnée concernant leurs éventuels métabolites n'est cependant disponible. Injecté à la faible concentration (-), le fluorène n'a jamais été détecté à l'orifice O-3 car il a été complètement éliminé avant d'atteindre cet orifice. Les concentrations résiduelles de carbazole à l'orifice O-3 de toutes les colonnes, exceptées R4*p*, ont convergé entre 65 et 115 µg/L et celles du fluorène entre 30 et 95 µg/L. Dans la colonne R4*p*, la minéralisation du carbazole a augmenté après 50j, alors qu'elle est restée mineure dans les autres colonnes. Cette minéralisation s'est accompagnée d'une baisse rapide de la concentration en carbazole et graduelle de celle du fluorène. Ce phénomène a été observé plus tard à l'orifice O-2. Après 75 j le carbazole n'était plus détecté aux orifices O-3 et O-2, et la concentration de fluorène est tombée à moins de 10 µg/L à l'orifice O-3. Une chromatographie en couche mince, effectuée sur des échantillons collectés à l'orifice O-3 de la colonne R4r après 50 j et extraits au solvant, a mis en évidence l'accumulation de métabolites du carbazole.

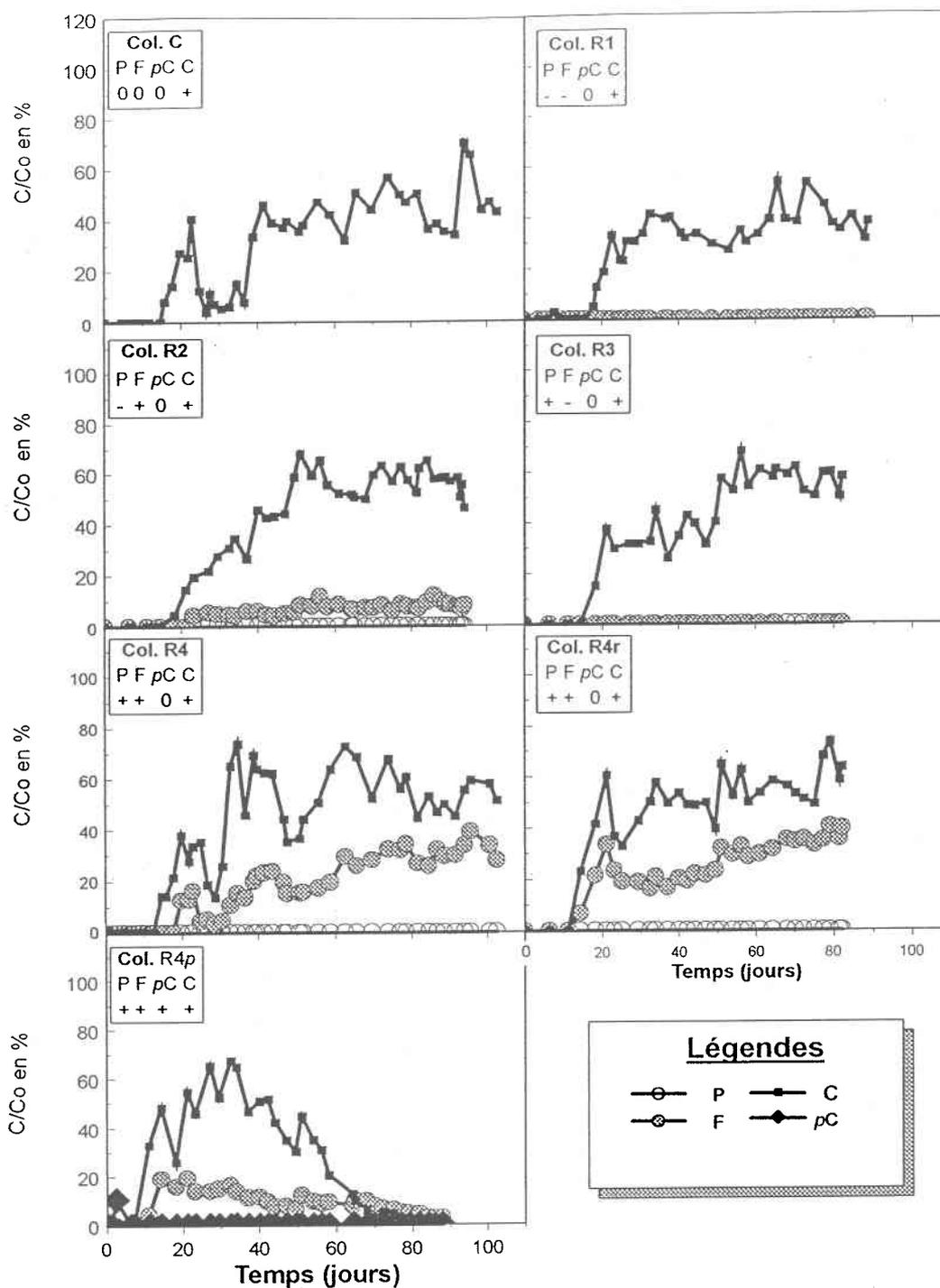


Figure 3.4: Transformations (conc./conc. initiale) du phénanthrène (P), du fluorène (F), du carbazole (C) et du *p*-crésol (*pC*) dans les colonnes à l'orifice O3. P = 165 µg/L, F = 238, pC = 10000 et C = 166 pour le signe "+", P = 33 et F = 48 pour le signe "-", "0" indique l'absence du composé.

3.3.3 Évaluation de la toxicité pendant la biodégradation

La procédure de *screening* du Microtox® a été utilisée pour fournir une indication de la toxicité aiguë des percolats générés par les colonnes de biodégradation, et de l'efficacité des traitements à détoxifier les solutions injectées. Les pourcentages d'inhibition de lumière émise par *P. phosphoreum* pour chaque colonne avant (E) et après traitement (O-3) sont résumés au tableau 3.2, excepté pour la colonne R4p dont l'évolution de la toxicité le long de la colonne (O-1, O-2 et O-3) est donnée au tableau 3.3. Les analyses chimiques des composés étudiés sont aussi fournis dans ces tableaux. Les données ont vérifié les hypothèses statistiques de base, permettant d'utiliser une procédure d'analyse paramétrique. De plus, une bonne reproductibilité des échantillons a été obtenue, puisque les écarts-types des pourcentages d'inhibition n'ont jamais dépassé 4.1% d'inhibition. En conséquence, une analyse de variance à deux facteurs ("traitement" et "colonnes") suivie d'un test de comparaisons multiples (méthode de Tukey) ont permis de distinguer des différences significatives entre les toxicités des solutions à l'entrée et aux orifices de sortie. La reproductibilité de l'expérience a été confirmée par l'homogénéité entre les colonnes dupliquées, R4 et R4r, où les probabilités de Tukey étaient respectivement $P = 1.00$ et $P = 0.73$ pour la comparaison des échantillons à l'entrée E et à l'orifice O-3.

La solution de flux entrant de la colonne C, qui ne contenait que du carbazole n'a pas produit d'effet détectable sur la luminescence de *P. phosphoreum* (tableau 3.1), résultat en accord avec la faible toxicité du carbazole à cette concentration ($49.5\% \times 187 \mu\text{g/L} = 93 \mu\text{g/L}$). Bien qu'un effet dans le flux sortant était détectable, aucune différence significative entre les flux entrant (I) et sortant (O-3) n'a pu être mise en évidence dans la colonne C (P de Tukey = 0.93).

L'addition combinée de phénanthrène, fluorène et *p*-crésol dans les solutions de flux entrant a produit des effets toxiques (25 à 80% d'inhibition) suivant les proportions de composés dans le mélange (tableaux 3.2 et 3.3). Ces résultats sont en accord avec la toxicité observée de ces composés aux concentrations testées (voir figure 3.3), mais des interactions entre les composés sont possibles.

Tableau 3.2: Résultats d'analyses toxicologiques et chimiques des colonnes. Pourcentage moyen d'inhibition de la bioluminescence (I) des échantillons (n) collectés avant (entrée E) et après (orifice O-3) traitement; le pourcentage d'inhibition a été déterminé en triplicata pour chaque échantillon. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) déterminées par GC/MS.

Colonnes	C		R1		R2		R3		R4		R4r	
	E	O-3	E	O-3	E	O-3	E	O-3	E	O-3	E	O-3
I (%)	1.5 ^{ns}	5.0	24.4	7.6	29.5	4.6	47.3	4.6	48.8	4.9	49.3	10.5
é.t.	3.8	2.0	3.5	0.8	4.1	2.5	1.6	0.8	1.9	1.4	2.8	2.6
n	4	3	3	2	3	2	3	2	3	2	4	2
Concentrations ($\mu\text{g/L}$)												
Phénanthrène	0	0	45	0	38	0	174	0	242	0	203	0
Fluorène	0	0	58	0	268	24	39	0	305	60	290	90
Carbazole	187	66	192	58	195	83	181	80	192	73	206	96
Temps (j)	105		84		82		82		105		82	

^{ns}: différence non significative avec le témoin négatif du test ($P < 0.05$)

Après passage au travers des colonnes, la toxicité de chaque solution (O-3) a été significativement réduite ($F_{1,23} = 1457$; $P < 0.001$) indiquant que le traitement a été efficace pour détoxiquer (tableau 3.4). L'effet significatif de l'interaction entre les colonnes et le traitement s'explique par la différence dans l'efficacité de traitement des colonnes. Ainsi, le traitement s'est avéré hautement significatif pour abaisser la toxicité (P de Tukey < 0.001) dans chacune des colonnes exceptée dans la colonne C (voir ci-haut). La détoxification observée a été corroborée par la perte des composés dans la solution (tableaux 3.2 et 3.3), et plus spécifiquement par la disparition complète du phénanthrène et/ou du *p*-crésol, qui étaient les composés les plus nocifs.

Tableau 3.3: Résultats d'analyses toxicologiques et chimiques de la colonne R4p. Pourcentage moyen d'inhibition de la bioluminescence (I) des échantillons ($n = 2$) collectés à 82 j avant (entrée E) et le long de la colonne (orifices O-1 à O-3); le pourcentage d'inhibition a été déterminé en triplicata pour chaque échantillon. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) déterminées par GC/MS.

Colonne R4p	E	O-1	O-2	O-3
I (%)	81.4	15.8	-0.4 ^{ns}	-2.3 ^{ns}
é.t.	2.0	1.8	0.8	1.5
Concentrations ($\mu\text{g/L}$)				
<i>p</i> -Crésol	10000	0	0	0
Carbazole	190	0	0	0
Fluorène	239	71	9.5	11
Phénanthrène	191	108	0	0

ns: différence non significative avec le témoin négatif du test ($P < 0.05$)

Tableau 3.4: Analyse de variance à deux facteurs ("colonne" et "traitement") sur la variable continue "inhibition de la bioluminescence"

Effets	df	MS	F	P
Colonne	6	737	99	< 0.001
Traitement	1	10803	1457	< 0.001
Interaction	6	923	125	< 0.001
Résiduelle	23	7.4		

Si les colonnes sans *p*-crésol sont considérées (tableau 3.2), les valeurs d'inhibition à l'orifice O-3 sont de 6% en moyenne. La signification statistique de ces valeurs, bien que très proches de la limite de détection du test, peut s'expliquer par (i) la présence résiduelle du fluorène dans les solutions collectées à l'orifice O-3 des colonnes R2, R3 et R4r, et/ou (ii) l'apparition dans chacune de ces colonnes de métabolites dont les éventuels effets toxiques et d'interaction sont inconnus.

La toxicité de la solution dans le flux entrant et à la sortie de chacun des orifices a été déterminée afin de visualiser son évolution le long de la colonne, lorsque 10 000 µg/L de *p*-crésol ont été ajoutés au phénanthrène, au fluorène et au carbazole (tableau 3.3). Malgré la présence de *p*-crésol à une concentration très toxique, la toxicité de la solution a été substantiellement réduite par passage au travers de la colonne. De plus, une baisse de la toxicité s'est produite dès l'orifice O-1, et plus aucun effet significatif n'a été observé à partir de l'orifice O-2. Une réduction plus importante de la toxicité a été obtenue à l'orifice O-3 de la colonne R4*p* qu'à ceux des colonnes R4 et R4r, bien que les colonnes ne différaient que par l'addition de *p*-crésol. Ce résultat est en accord avec la biodégradation complète des composés dans la colonne R4*p* (figure 3.4). Le carbazole et le fluorène, plus récalcitrants à la biodégradation dans les colonnes R4 et R4r, et l'apparition de métabolites inconnus et potentiellement dangereux pourraient expliquer l'effet toxique persistant dans ces colonnes. La toxicité à la sortie de l'orifice O-1 de la colonne R4*p* peut aussi s'expliquer par la persistance de 71 µg/L de fluorène et par l'apparition de métabolites de nature inconnue. La toxicité injectée dans la colonne R4*p* (81% d'inhibition) a été en majorité éliminée avant l'orifice O-1 (65%), c. à d. dans les premiers 5 cm de la colonne. Une fois de plus, la détoxification est associée à l'élimination complète du *p*-crésol et du phénanthrène.

L'évaluation écotoxicologique pendant la biodégradation de composés de la créosote dans des systèmes liquides a été réalisée par Mueller *et al.* (1991). Ces auteurs ont examiné les taux de détoxification dans des études en flacons agités où le pentachlorophénol et des HAP, présents dans de l'eau souterraine à des concentrations de l'ordre du ppm, étaient biodégradés. Les analyses chimiques ont révélé des résultats très similaires au cas présent: parmi d'autres composés, le *p*-crésol, le phénanthrène et le fluorène ont été largement dégradés, alors que le carbazole et le pentachlorophénol étaient plus récalcitrants. Pourtant, en raison de la persistance du pentachlorophénol, seulement une faible baisse de la toxicité a pu être observée par le Microtox[®], ainsi qu'une faible baisse de la tératogénicité provoquée sur des embryons de poisson *Menidia beryllina*. L'évolution de la toxicité et de la génotoxicité pendant la biodégradation de HAP a également été étudiée dans des systèmes sols/liquides (Symons et Sims, 1988; Belkin *et al.*, 1994). Dans ces études, le sol était contaminé avant d'être introduit dans des colonnes et de l'eau y était additionnée et récoltée. Ces deux approches différentes ont résulté en des comportements de la toxicité opposés. La baisse de toxicité (Microtox[®]) a été corrélée à la dégradation de HAP pendant des processus de biodégradation en colonne de déchets amendés à du sol (Symons et Sims, 1988). Au

contraire, Belkin *et al.* (1994), qui ont étudié la biodégradation de HAP en colonnes percolées, ont mis en évidence une augmentation dans la toxicité (Microtox[®]) et dans la génotoxicité (Mutatox) pendant l'expérience. Ces différents comportements de la toxicité peuvent être attribués à différentes raisons: composition du mélange de contaminants, approche de biodégradation, type du sol, flux hydrique. Ceci met l'emphase sur l'importance de travailler avec un système contrôlé afin de pouvoir expliquer l'évolution de la toxicité.

3.4 Conclusion

L'évolution de la toxicité de mélanges de phénanthrène, fluorène, carbazole et *p*-crésol dans un système dynamique de simulation en colonnes a été étudiée en utilisant le test Microtox[®]. Différentes conclusions peuvent être tirées des résultats obtenus:

(i) La caractérisation toxicologique des composés étudiés a mis en évidence que:

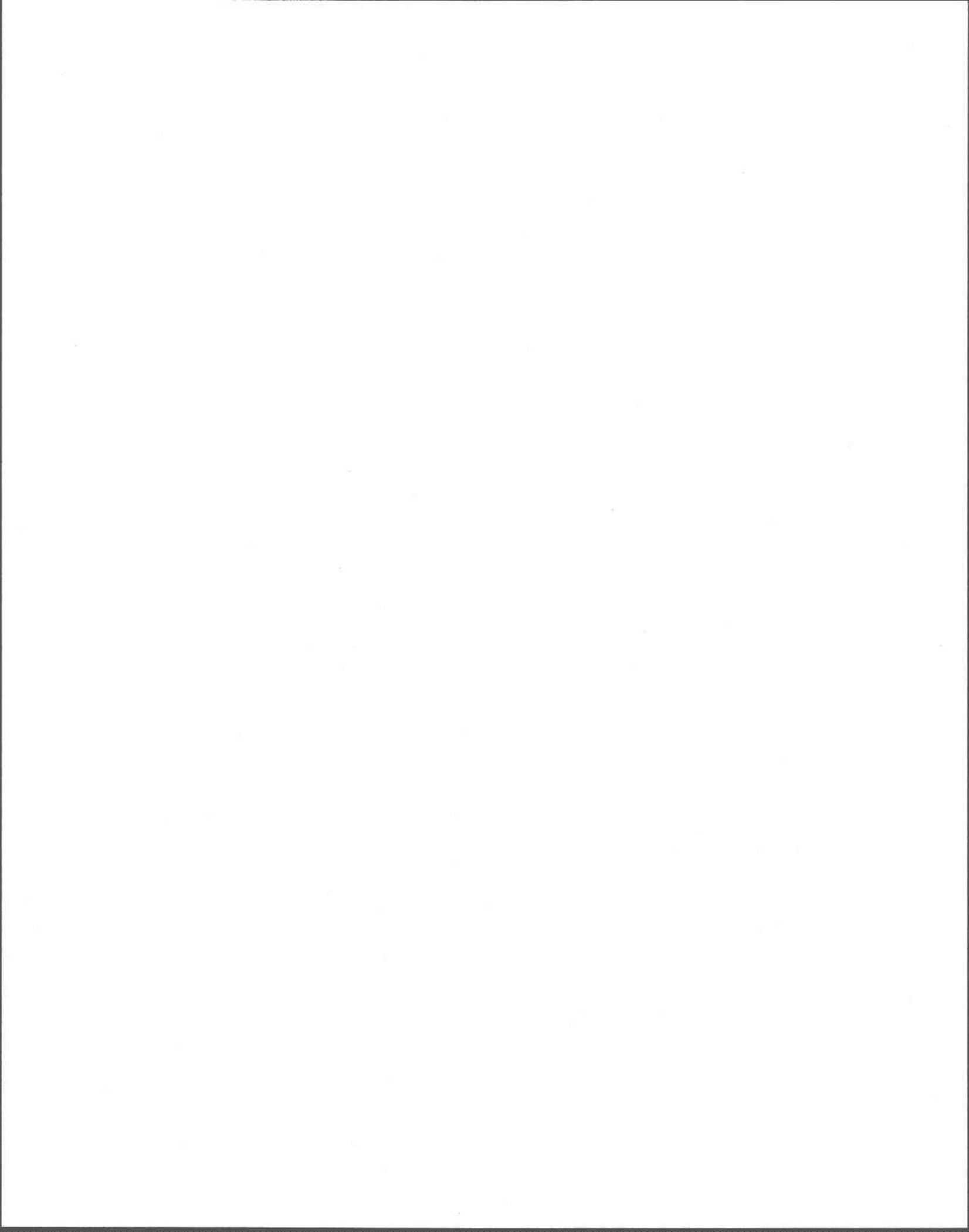
- Le phénanthrène, le *p*-crésol et le fluorène isolément en phase aqueuse, ont produit des effets inhibiteurs de l'émission de luminescence par *P. phosphoreum*; les valeurs de CI50 ont été déterminées à 140 µg/L, 1500 µg/L et 600 µg/L respectivement. En conséquence, ces composés aromatiques sont nocifs même si leur solubilité peut être relativement faible. Ce résultat a mis également en évidence l'intérêt d'étudier le devenir de faibles concentrations de contaminants dans les eaux souterraines.

- Le carbazole s'est révélé faiblement toxique pour *P. phosphoreum*.

(ii) La détoxification de solutions de mélanges a été démontrée par la réduction de la toxicité. La baisse de toxicité est apparue évidente quand le phénanthrène, le fluorène et le carbazole étaient combinés dans un système de biodégradation. La diminution rapide le long des colonnes a démontré l'efficacité d'un système dynamique de biodégradation, et indique donc le potentiel pour des systèmes sols/liquides d'être décontaminés quand les conditions sont adéquates et contrôlées.

(iii) Le test de toxicité aiguë a corroboré l'analyse chimique mettant en évidence l'élimination des composés des colonnes de biodégradation. La comparaison des pertes en composés et des changements dans la toxicité, indique que:

-
- Le succès dans la détoxification a principalement été attribué à l'élimination du phénanthrène et du *p*-crésol. Cependant, la persistance du fluorène et/ou l'apparition de métabolite(s) a semblé influencer la toxicité résiduelle.
 - La présence de *p*-crésol a augmenté l'efficacité de détoxification. Ce phénomène pourrait être dû à la nature chimique de ce composé ou à sa concentration relativement plus élevée que celle des autres composés entraînant un phénomène de biostimulation.
 - Le *p*-crésol et le phénanthrène sont très biodisponibles, à la fois du point de vue de la biodégradation et de la toxicité.



4 BIOLIXIVIATION DES MÉTAUX DES BOUES D'ÉPURATION

4.1 Introduction

La constitution riche en matière organique et en éléments nutritifs des boues issues d'usines d'épuration municipales ont accru l'attrait de leur utilisation comme fertilisant des terres agricoles (Webber, 1988). Les principaux bénéfices des boues sont (i) l'apport en azote et phosphore, dont la plupart des sols agricoles sont pauvres, et qui permet de réduire l'utilisation de fertilisants chimiques, et (ii) la modification structurale du sol qui permet d'améliorer le drainage et l'aération (Sterritt et Lester, 1980; Fresquez *et al.*, 1990; Alloway et Jackson, 1991). Cependant, les métaux lourds rejetés dans les eaux usées domestiques et industrielles sont concentrés dans les boues municipales entre 0.5 et 2% sur base de poids sec (6% dans des cas extrêmes) (Lester *et al.*, 1983; Rudd, 1987), ce qui représente un problème important pour le rejet final des boues dans l'environnement et pour la santé publique (Webber, 1972; Cunningham *et al.*, 1975; Lake, 1986; Chaney, 1990). En effet, un certain nombre de métaux lourds (Al, Cd, Cr, Cu, Ni, Mn, Pb, Zn) sont toxiques, même si certains de ces éléments à faible concentration sont considérés comme essentiels aux plantes (Cu, Mn et Zn) et aux animaux (Cr) (Alloway, 1990). L'élimination des métaux des boues d'épuration peut être réalisée par un procédé biologique, appelé "biolixiviation", qui présente de nombreux avantages par rapport aux traitements chimiques (Tyagi et Couillard, 1989). La biolixiviation exploite la capacité de bactéries autotrophes du genre *Thiobacillus* d'abaisser le pH des boues par la production d'acide. L'abaissement du pH assure la solubilisation des métaux dans la phase liquide, qui est ensuite séparée des boues.

Ce procédé permet donc de réduire la concentration des métaux lourds dans les boues. Toutefois, les effets toxiques provoqués par les métaux ne dépendent pas seulement de leur concentration, mais aussi de leur biodisponibilité. La biodisponibilité des métaux pour les végétaux a beaucoup été étudiée car les plantes sont le premier maillon de la chaîne alimentaire et l'épandage agricole des boues peut provoquer une réduction des rendements. Les interrelations affectant la dynamique des métaux lourds entre le sol et la plante sont complexes (Alloway, 1990; Ross, 1994); le système sol-plante est un système ouvert sujet à des entrées de composés, tels les contaminants, pendant l'épandage des boues et à des pertes

par la récolte d'une partie de la plante, la lixiviation, l'érosion et la volatilisation. Les connaissances sur les formes chimiques précises des métaux qui sont disponibles pour les plantes sont très limitées. Il est généralement reconnu que, pour qu'un métal soit absorbé par une plante ou qu'il exerce un effet sur sa croissance, il doit être présent en solution (Lake, 1986; Alloway, 1990). Un métal peut être soluble lorsqu'il est sous forme ionique ou complexé à des composés organiques ou inorganiques; la disponibilité relative de chacune de ces formes pouvant varier considérablement. Pour y étudier la spéciation des métaux, les boues peuvent être fractionnées en 5 phases: échangeable, oxydable (matière organique), acido-soluble (carbonates), réductible (oxydes et hydroxydes de Fe et Mn) et résiduelle (Tessier *et al.*, 1979). Au cours du traitement de l'eau et des boues, les métaux deviennent de moins en moins mobilisables, et ont tendance à s'associer aux phases réductibles et résiduelles, les espèces solubles et échangeables représentant en général moins que 10% des métaux totaux (Lake *et al.*, 1984; Legret *et al.*, 1987). L'application de boues aux sols cause des changements dans la disponibilité des métaux, puisque les propriétés du sol (pH, potentiel d'oxydo-réduction, texture, composition minérale (argiles, oxydes de fer et de manganèse..), capacité d'échange cationique (CEC), quantité et type de composés organiques, présence d'autres métaux, humidité, température et activité bactérienne) influencent leur distribution entre les différentes formes physico-chimiques (Lake, 1986; Alloway, 1990; He et Singh, 1993). Ainsi, Dudka et Chlopecka (1990) ont montré que l'application de boue au sol augmente la proportion de Ni et de Zn dans la fraction échangeable, avec pour conséquence une biodisponibilité augmentée. La matière organique apportée par les boues joue un rôle primordial dans la spéciation des métaux (Lake, 1986). L'association des métaux avec la matière organique dans le sol se caractérise par une combinaison relativement stable et insoluble avec les acides humiques. La matière organique a également tendance à augmenter la CEC, ce qui a pour conséquence d'immobiliser davantage les métaux. Mais une liaison soluble des métaux avec la matière organique est également possible avec, entre autres, des acides aminés libres et des acides organiques (acides formique, acétique, oxalique, citrique, succinique, lactique et butyrique) (Lake, 1986).

Le traitement de biolixiviation en abaissant considérablement le pH des boues pourrait donc modifier la spéciation des métaux et les rendre plus biodisponibles. À l'origine sous une forme peu extractible, ces métaux pourraient, après les étapes de solubilisation/neutralisation, se retrouver moins fortement liés. Ainsi, l'acidification du milieu qui occasionne une

solubilisation partielle de la matière organique (Benmoussa *et al.*, 1994) pourrait favoriser l'apparition sous forme soluble de complexes organo-métalliques non éliminés à l'étape de séparation solide-liquide. Il faut donc vérifier que le traitement de biolixiviation n'entraîne pas une modification de la spéciation des métaux qui, malgré la diminution de leurs concentrations, les rendrait plus biodisponibles. De plus, les effets d'une accumulation de soufre dans les boues, due à l'addition importante de soufre durant le procédé, ne sont pas connus et doivent être examinés, bien qu'à priori ces effets soient inoffensifs (le soufre étant indispensable à la synthèse protéique). Cette étude vise donc à vérifier que le traitement de biolixiviation des boues permettait, en plus de la réduction des métaux, une réduction de la toxicité.

Les effets toxiques provoqués par les boues d'épuration ont été étudiés largement sur le terrain, où les rendements des récoltes et l'accumulation des métaux étaient suivis (Sterritt et Lester, 1980; Lake, 1986; Alloway et Jackson, 1991). Cependant, par leur coût et la quantité requise de matériel à tester, les études de terrain ne se prêtent pas à l'évaluation des procédés de traitement en cours d'élaboration. Par contre, les biotests, qui nécessitent peu de boue, sont de meilleurs outils d'évaluation de la toxicité aux premières étapes de développement des procédés. Peu d'études ont utilisé les biotests pour évaluer la toxicité des boues d'épuration (Carlson et Morrison, 1992; Forge *et al.*, 1993; Costello et Read, 1994). Ce manque d'information rend difficile le choix des biotests les plus appropriés pour ce type de matrice.

Dans cette étude, les outils d'évaluation écotoxicologique des sols ont été utilisés pour vérifier l'efficacité du traitement de biolixiviation des boues. Plus spécifiquement, cette étude visait comme objectifs: (i) de comparer les effets de deux boues ayant subi ou non le traitement de biolixiviation, sur différents organismes terrestres et aquatiques après simulation de l'épandage agricole, et après élutriation, (ii) de valider ce procédé (biolixiviation des boues) du point de vue toxicologique, (iii) de déterminer la bioaccumulation de certains métaux et du soufre chez deux espèces terrestres, (iv) d'évaluer les conséquences de la manipulation des éluutriats, et finalement, (v) de sélectionner les biotests les plus appropriés à l'évaluation des boues.

4.2 Matériel et méthodes

L'ensemble des expériences ont été réalisées avec des contenants en verre soigneusement lavés avec un détergent sans phosphate, puis à l'acide (10% v/v), et rincés six fois avec de l'eau déionisée. Cette dernière a été obtenue par un système de purification (Zenopure Mega-90).

4.2.1 Échantillonnage et caractérisation pédologique du sol AR9

Afin de sélectionner le sol qui a servi à l'épandage des boues, des essais écotoxicologiques préliminaires ont été réalisés avec deux sols non contaminés AR5 et AR9. Chacun des deux sols à une concentration unique de 100% a été testé sur la germination et la croissance de l'orge, l'élongation radiculaire de la laitue et la mortalité du ver de terre. Les deux sols étaient sans effets sur ces organismes, mais le sol AR9, obtenu en plus grande quantité à Boucherville (sol forestier de la rive sud de Montréal) et mieux caractérisé, a été choisi pour la suite de l'expérimentation. Ce sol a été tamisé sur 2 mm (tamis en polyéthylène lavé à l'acide) et bien homogénéisé.

Les caractéristiques pédologiques du sol AR9 sont résumées au tableau 4.1. Le poids sec et le contenu en matière organique sont estimés par des méthodes standard (American Public Health Association, 1989). La méthode # 2540B a été utilisée pour la détermination du poids sec, alors que la quantité de matière organique a été estimée par la quantité de solides volatilisés à 600°C (méthode # 2540E). L'analyse de la taille des particules, la densité réelle et le pH du sol ont été déterminées selon les méthodes de Gee et Bauder (1986) et de McLean (1982). La méthode de l'hydromètre (ASTM) a été choisie pour déterminer les proportions d'argile et de limon dans le sol. Le nom de la texture a été obtenu à partir du triangle des textures (Gee et Bauder, 1986). La détermination de la capacité effective d'échange cationique (CEC_{eff}) a été modifiée de van Reeuwijk (1987): suite à la centrifugation (700 g, 20 min) de la solution de réaction (sol + thiouréa-Ag), le surnageant a été filtré sur borosilicate (0.7 µm) avec un système en Téflon®, dans le but d'éliminer les particules d'argile non sédimentées. L'argent présent dans le filtrat a été analysé par absorption atomique (Modèle Graphite Tube Atomizer 95 de Varian). Trois déterminations distinctes ont été réalisées sur les analyses, sauf pour la CEC_{eff} qui a été déterminée en duplicata. La densité apparente du sol a été mesurée en pesant 170 mL de sol non tassé.

Tableau 4.1: Caractéristiques pédologiques du sol AR9 (n = 3)

Caractéristique	valeur moyenne (é.t.)
Poids sec (% pd/pd)	84.61 (0.02)
Matière organique (% pd/pd)	4.24 (0.04)
Densité réelle (g/mL)	2.65 (0.02)
Densité apparente (g/mL)	1.22 (0.09)
Texture	Sable
argile (% pd/pd)	3 (0.09)
limon (% pd/pd)	5 (0.58)
sable (% pd/pd)	92 (0.003)
pH (apparent)	5.88 (0.04)
CEC _{eff} (me/100 g sol sec)	2.58

4.2.2 Échantillonnage et conditionnement des boues

Le procédé de biolixiviation a été réalisé à l'échelle pilote en bioréacteur à l'usine d'épuration de la base de Valcartier (Québec). Les boues, issues du traitement d'eaux urbaines, ont été prélevées du bassin de rétention des boues issues du décanteur primaire (80% v/v approximativement) et de l'unité de décantation secondaire (20%). Les boues ont été homogénéisées à l'aide d'une pompe broyeuse, puis échantillonnées le jour même de l'essai pilote. Le contenu en solides des boues employées variait entre 24.5 et 34.0 g/L. Le bioréacteur était un bassin en polyéthylène basse densité de marque Bonar (modèle 4022-1) d'une capacité maximale de 4900 L dont 4000 L de volume utile. Un volume de 3200 L de boues fraîches avec un apport de 800 L d'inoculum ont été employés pour les divers essais. Les concentrations de soufre industriel en poudre (Sulchem Products Ltd) ajouté variaient entre 1.0 et 3.0 g/L, tandis que le taux d'aération se situait entre 0.03 et 0.12 vvm. Les essais en mode cuvée ont duré 14 jours et ont permis d'abaisser le pH à 2.0. L'échantillonnage des boues a été effectué à différentes reprises avant (Bp) et après (Xp) le procédé. Les échantillons de boues Xp ont subi un conditionnement similaire à celui des

échantillons Bp, excepté qu'après déshydratation par filtration sous presse, les échantillons Xp ont été neutralisés à la chaux (figure 4.1).

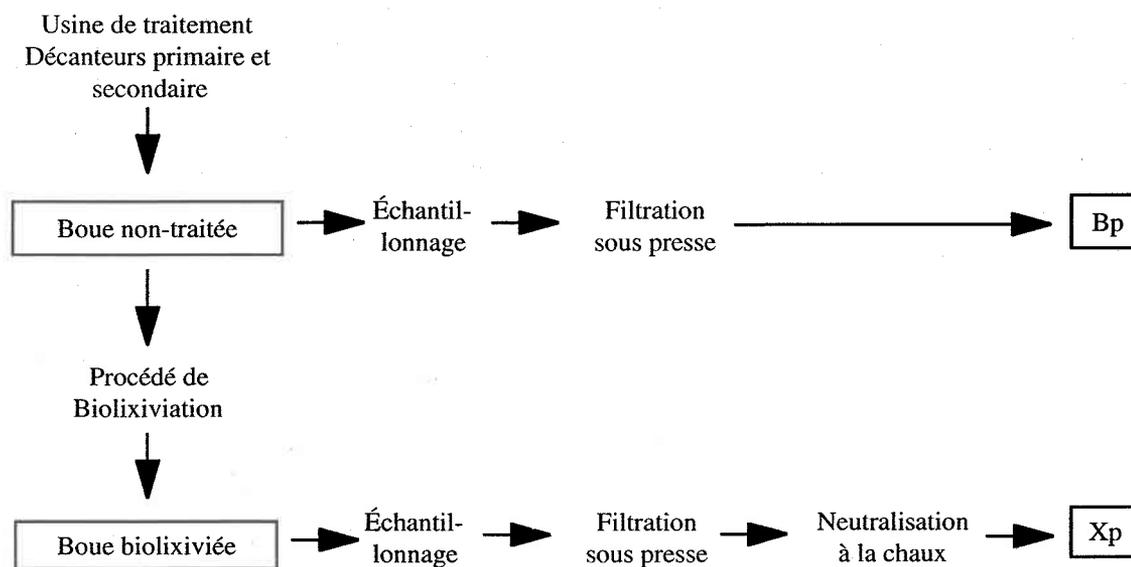


Figure 4.1: Traitement des boues

Les présents travaux ont porté sur quatre litres de boues filtrées provenant de l'essai pilote. Pendant toute la durée de l'expérience les boues ont été conservées à 4°C. La figure 4.2 résume les manipulations et biotests réalisés sur chacune des boues. Celles-ci ont d'abord été homogénéisées séparément avec deux mélangeurs possédant des cuves et des bras en acier inoxydable. Suite à l'homogénéisation, le poids sec de chacune des boues a été déterminé en triplicata (tableau 4.2). Quatre aliquots de chaque boue ont été transférés dans des bouteilles de verre, dans le but de subir l'élutration (boues liquides), alors que le reste des boues était déshydraté pendant 48 h à 65°C (boues déshydratées). La déshydratation des boues permet d'avoir de meilleures homogénéité, stabilité et facilité d'utilisation; la distribution des métaux y étant qualitativement la même que dans les boues liquides (Oake *et al.*, 1984). Les boues déshydratées ont été broyées au mortier et tamisées sur 2 mm (tamis en polyéthylène lavé à l'acide). Leur poids sec après déshydratation a été déterminé (tableau 4.3).

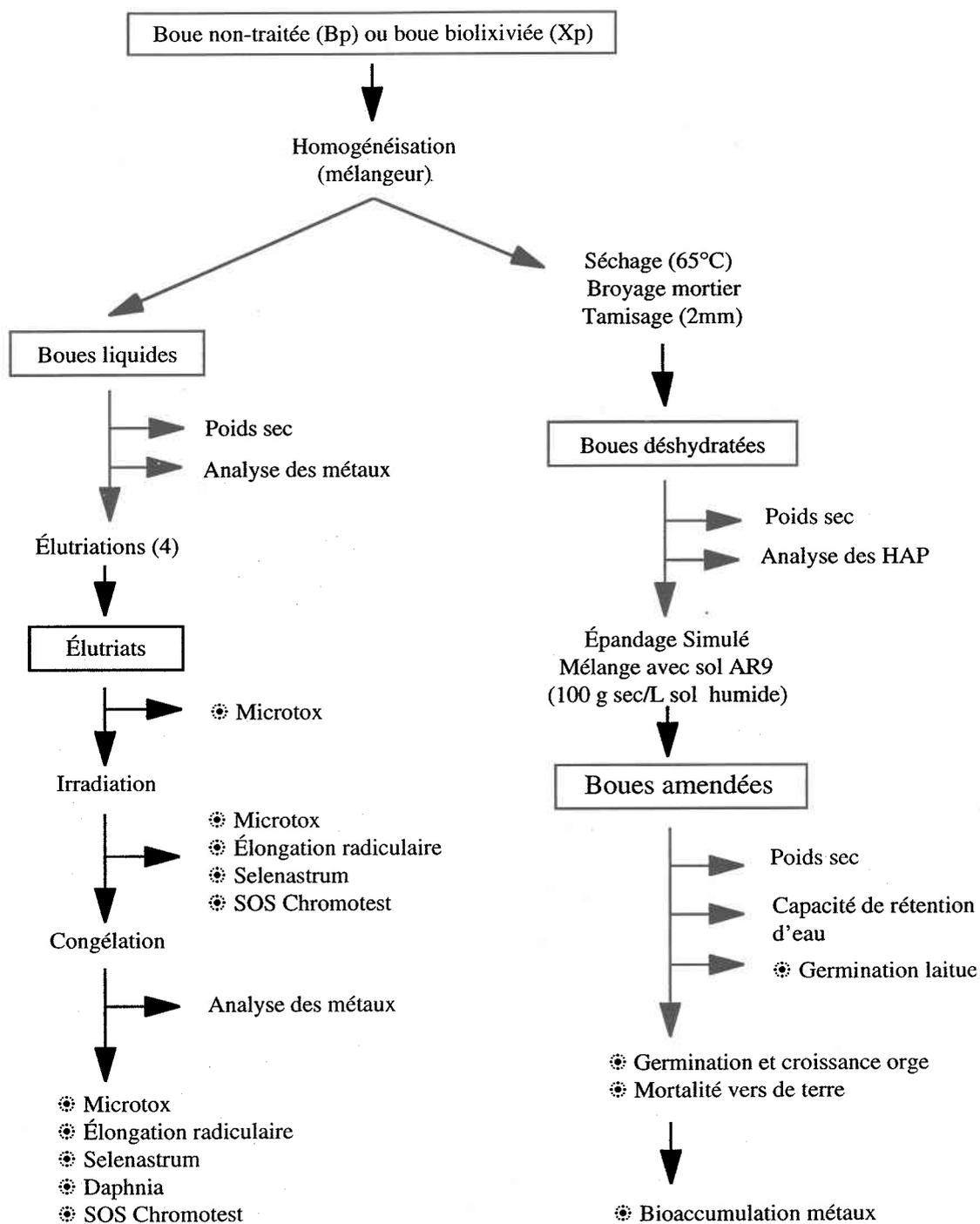


Figure 4.2: Conditionnement des boues

Tableau 4.2: Pourcentage moyen (pd/pd) et coefficient de variation (CV) du poids sec des boues humides après homogénéisation (n = 3)

Boue	Bp	Xp
Poids sec (% pd/pd)	9.9	18.1
CV	0.02	0.03

Tableau 4.3: Pourcentage moyen (pd/pd) et coefficient de variation (CV) du poids sec des boues déshydratées et tamisées (n = 3)

Boue	Bp	Xp
Poids sec (% pd/pd)	93.8	92.6
CV	0.001	0.002

L'épandage des boues a été simulé par l'addition de 250 g de boue déshydratée à 2850 g de sol AR9 (humidité de 15% et densité apparente de 1.22 g/mL), ce qui correspond à 100 g de boue déshydratée par litre de sol. Ces valeurs ont été déterminées par la revue de Webber et al (1984) où sont énumérés, pays par pays, les limites, taux et conditions d'épandage des boues. Selon cette étude, ainsi que d'autres plus ponctuelles (Sterritt et Lester, 1980; Matthews, 1984), les valeurs suggérées d'épandage des boues peuvent atteindre 5 tonnes par hectare et par année; et les valeurs limites peuvent aller jusqu'à 200 tonnes par hectare (calculs sur poids sec) suivant les pays. D'autre part, des concentrations de 50 à 150 t/ha ont été utilisées dans le cadre d'études sur l'impact des contaminants suite à l'épandage (Juste et Soldâ, 1986; Brown et Donnelly, 1988; Donnelly *et al.*, 1990b; Thomas *et al.*, 1990). Pour la présente étude, l'impact cumulatif à long terme, correspondant aux conditions les plus pessimistes, a été établi à 200 t/ha. Pour le calcul des quantités de boues à mélanger au sol, il est usuellement estimé que 20 cm de sol sont labourés, représentant 2000 m³ pour 1 ha. Ainsi une tonne de boue épandue sur un hectare, équivaut à un gramme mélangé à 2 litres de sol. Dans nos expériences 100 g de boue sèche ont donc été mélangées à 1 litre de sol, permettant de tester des concentrations allant de 1 à 100 g/L (soit 2 à 200 t/ha).

Le poids sec et la capacité de rétention d'eau du sol AR9 et des boues mélangées au sol AR9 ont été déterminés (tableau 4.4) afin de connaître les quantités d'eau à ajouter dans les essais de germination de graines et de mortalité de vers de terre.

Tableau 4.4: Poids sec (% pd/pd) et capacités maximales de rétention d'eau (mL/100 g) du sol AR9 et des boues épandues sur le sol AR9

Sol	AR9	Bp	Xp
Poids sec (% pd/pd)	84.4	86.8	85.9
Capacité de rétention (mL/100 g)	36.0	47.4	49.3

La contamination des eaux souterraines a été simulée par la procédure standard d'éluatriation (TCLP) telle que décrite par l'US-EPA dans la méthode #1312 (Chiang *et al.*, 1989). Les quatre aliquots de boue non-séchée ont permis de produire quatre éluatriats d'environ 300 mL chacun, qui ont ensuite été testés avec les biotests en phase liquide. Le liquide d'extraction est préparé à partir d'eau déionisée dont le pH est ajusté à 4.5 avec un mélange d'acide sulfurique et nitrique (60/40 en poids). Vingt volumes (mL) du liquide d'extraction sont additionnés à un volume (g sur base sèche) de boue dans une bouteille préalablement nettoyée à l'acide. La bouteille est agitée durant 18 ± 2 h à une température de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ dans un agitateur rotatif (30 ± 2 rpm). Le contenu de la bouteille est ensuite filtré sur borosilicate ($0.7 \mu\text{m}$ - Environmental Express, Mt Pleasant, SC) dans un système en Téflon[®] sous pression d'azote (345 kPa).

Afin d'éviter toute interaction entre les organismes issus des boues, dont elles sont très riches, et ceux des biotests, ainsi que pour assurer la stabilité dans le temps des échantillons, une partie des éluatriats a été irradiée sous un rayonnement gamma de 25 kGray dans les heures qui ont suivi l'éluatriation. Avant de réaliser les tests d'élongation radriculaire et de mortalité des daphnies, les quatre éluatriats de chaque boue ont été rassemblés en proportions égales pour former un échantillon unique (250 mL par aliquot pour un total de 1 L).

4.2.3 Analyses écotoxicologiques

Les tableaux 4.5 et 4.6 présentent les biotests utilisés pour évaluer les boues épandues sur le sol AR9 et les éluviats de boues. La description complète de chaque test est donnée au chapitre 2 de la thèse.

Tableau 4.5: Batterie de biotests en phase solide pour évaluation des boues épandues

Biotest	Espèce	Méthode	Variables d'effet	Type de toxicité Niveau Trophique
Germination de graine d'orge	<i>Hordeum vulgare</i> L.	(OCDE, 1984)	inhibition germination 5 j	Sublétale Chronique Plante, producteur primaire
Croissance de la tige d'orge	<i>Hordeum vulgare</i> L.	(OCDE, 1984)	inhibition croissance 14 j	Chronique Plante, producteur primaire
Germination de graine de laitue	<i>Lactuca sativa</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1989) p. 84-89	inhibition germination 5 j	Sublétale Chronique Plante, producteur primaire
Mortalité du ver de terre	<i>Eisenia foetida</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1989) p. 78-83	mortalité 14 j	Létale aigüe Animal, consommateur primaire

Tableau 4.6: Batterie de biotests en phase liquide pour évaluation des éluutriats de boue

Biotest	Espèce	Méthode	Variables d'effet	Type de toxicité Niveau Trophique
Microtox®	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	(Environment Canada, 1992b)	émission de lumière 15 min	Sublétale aigüe Protiste, décomposeur
Élongation radiculaire	<i>Lactuca sativa</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1989) p. 90-95	inhibition croissance 5 j	Sublétale chronique Plante, producteur primaire
Croissance algale	<i>Selenastrum capricornutum</i>	(Environment Canada, 1992a)	inhibition croissance 96 h	Sublétale chronique Plante, producteur primaire
Mortalité de Daphnie	<i>Daphnia magna</i>	(Environnement Canada, 1990)	mortalité 48 h	Létale aigüe Animal, consommateur primaire
SOS Chromotest ±S9	<i>Escherichia coli</i>	(Fish <i>et al.</i> , 1987)	FICV	Chronique génotoxicité Protiste, décomposeur

4.2.4 Bioaccumulation des métaux

L'effet chronique de bioaccumulation des métaux a été étudié chez le ver (*Eisenia foetida*) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.). Les vers dénombrés après 14 jours d'incubation pour le biotest de mortalité du ver de terre sont replacés dans leurs contenants respectifs et réincubés 14 jours supplémentaires, portant à 28 jours le temps de contact des vers avec le sol à tester. Après cette période, les vers ont été dénombrés à nouveau, purgés deux fois 24 h sur du papier filtre (Whatman #41) imbibé de 5 mL d'eau déionisée, puis purgés 24 h dans 2 mL d'eau déionisée. Après trois rinçages à l'eau, les vers sont séchés sur du papier filtre, pesés et congelés à -20°C dans des contenants en polyéthylène à haute densité (Simmers *et al.*,

1986; Morgan et Morgan, 1988; Rhett *et al.*, 1988). Les vers sont ensuite décongelés, lyophilisés et repesés. De même, au terme des 14 jours du test de croissance, les tiges d'orge ont été soigneusement récoltées et dénombrées. La biomasse a été estimée en mesurant le poids sec après 16 h à 80°C et 1 h au dessiccateur. En vue d'en extraire les métaux, la matière sèche a été broyée à l'aide d'un mortier et d'azote liquide. Les échantillons ont été congelés avant d'être digérés.

4.2.5 Analyses chimiques des métaux

Les concentrations en métaux (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Zn) et en soufre ont été déterminées par spectrophotométrie d'émission au plasma (ICP, modèle Atom Scan 25 de Thermo Jarrel Ash Corporation). Certains métaux, dont les concentrations étaient inférieures aux limites de détection de l'ICP, ont été analysés par spectrophotométrie d'absorption atomique avec four au graphite (modèle Spectra-300 de Varian). Pour solubiliser les métaux, les boues et les sols ont été au préalable digérés avec les acides nitrique, fluorhydrique et perchlorique (HNO₃, HF et HClO₄) d'après la méthode standard # 3030 I (American Public Health Association, 1989). La mise en solution des tiges d'orge a été faite par l'ajout de 10 mL d'eau régale chaude (acides nitrique 5 mL et chlorhydrique 15 mL, volume final de 100 mL) aux échantillons (McDaniel, 1992). Le Cu, le Mn, le Zn et le S ont été analysés à l'ICP, alors que le Cd, le Pb et le Ni l'ont été au four au graphite. Les vers ont été digérés à l'acide nitrique chaud (15 mL, volume final de 50 mL) pendant une nuit (van Loon, 1985), puis analysés à l'ICP pour l'Al, le Cd, le Cr, le Cu, le Fe, le Mn, le Ni, le Pb, le Zn et le S.

4.2.6 Analyses chimiques des HAP

L'absence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a été vérifiée par la méthode de l'US-EPA (1986) pour évaluer les déchets solides. Les HAP ont été extraits par un rinçage continu (16 h) au dichlorométhane sur un dispositif de type Soxhlet (méthode #3540). Vingt grammes de substrat homogénéisé ont été préalablement séchés avec du sulfate de sodium anhydre. L'extrait brut a été purifié par élution avec de l'hexane sur un gel de silice (100-200 mesh); le gel avait été activé par 16 h de chauffage à 150°C. L'analyse quantitative s'est faite suivant la méthode #8270 de l'US-EPA par GC-MS (chromatographe gazeux HP5890 couplé à un spectromètre de masse MSD HP5970); le p-terphényl a été utilisé comme standard de récupération.

4.2.7 Analyses statistiques

La détermination de la LOEC et de la NOEC s'est faite par comparaison des effets entre les témoins rassemblés (6 réplicats) et chacune des concentrations en boue ou éluviat (3 réplicats par concentration). Une analyse de variance suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey pour échantillons inégaux (Spjotvol et Stoline, 1973) ont été utilisés avec les données satisfaisant les conditions d'égalité des variances, de Normalité et d'indépendance (données de germination et croissance de l'orge, de germination de la laitue, du Microtox[®] et de bioaccumulation des métaux). Un test non paramétrique, test U de Mann-Whitney (un trop grand nombre de groupes à comparer empêchant l'utilisation du test de Kruskal-Wallis), a été utilisé pour comparer 2 à 2 les témoins et les échantillons quand les hypothèses n'étaient pas vérifiées (données d'élongation radriculaire et de mortalité des daphnies). Une régression sur la partie linéaire des pourcentages d'inhibition ou de mortalité en fonction du logarithme des concentrations a permis de prédire la concentration produisant 50% d'inhibition (CI50) ou de létalité (CL50) avec un intervalle de confiance à $\alpha = 0.05$ (Zar, 1984). La toxicité maximale observée (MT) est donnée en pourcentage d'inhibition ou de mortalité (voir chapitre 6).

Une analyse de variance à 2 facteurs ("type de boue" et "taux d'amendement") suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey a permis la comparaison des effets produits par les deux boues Bp et Xp (données de germination et croissance de l'orge, de germination de la laitue et de bioaccumulation des métaux). Pour le facteur "taux d'amendement", le nombre de niveaux correspondait au nombre de concentrations testées et dépendait donc du biotest. Lorsque les conditions pour l'analyse paramétrique n'étaient pas vérifiées (données d'élongation radriculaire et de mortalité des daphnies), le test non paramétrique de Mann-Whitney était utilisé pour comparer 2 à 2 à chaque concentration les effets des deux boues. Pour le Microtox, une analyse de variance à 3 facteurs ("type de boue", "irradiation" et "congélation") sur les valeurs de CI50 a permis de mettre en évidence les traitements significatifs et d'éventuelles interactions entre ces facteurs.

4.3 Résultats et Discussion

4.3.1 Caractérisation chimique des boues et du sol AR9

Le traitement pilote des boues a été réalisé avec succès du point de vue chimique. Les concentrations en métaux sont présentés au tableau 4.7. La boue avant traitement (Bp) était classée comme une boue faiblement à moyennement contaminée par les métaux (Lake, 1986; Alloway, 1990). Les concentrations en métaux lourds ont diminué pendant le traitement de biolixiviation, et ce particulièrement pour le Cd, le Cu, le Mn, le Ni et le Zn. Par contre, la teneur en S des boues est passée de 1% à 3.4% pendant le traitement. Les teneurs en K (0.4%) et en P (1.2%) confirment des résultats précédents indiquant que la valeur fertilisante de la boue est conservée pendant la biolixiviation (Benmoussa *et al.*, 1994).

Tableau 4.7: Composition moyenne (\pm é.t.) en métaux et en soufre des boues Bp et Xp et du sol AR9 (n = 2)

Éléments (mg/kg)	AR9	Bp	Xp
Al	43632 \pm 4852	14607 \pm 763	12195 \pm 1126
Cd	0.36 \pm 0.04	5.71 \pm 0.13	0.78 \pm 0.04
Cr	39.0 \pm 0.4	49.9 \pm 0.0	52.3 \pm 1.9
Cu	12 \pm 5	1297 \pm 6	344 \pm 35
Fe	19484 \pm 175	16005 \pm 84	13255 \pm 499
K	17643 \pm 2040	3176 \pm 23	3936 \pm 134
Mg	4710 \pm 853	3746 \pm 44	2872 \pm 123
Mn	423 \pm 48	428 \pm 3	82 \pm 7
Na	23964 \pm 390	2834 \pm 288	2397 \pm 3
Ni	13.7 \pm 2.1	27.2 \pm 2.0	14.4 \pm 0.0
P	606 \pm 32	12785 \pm 63	11988 \pm 527
Pb	43 \pm 8	172 \pm 7	154 \pm 3
S	906 \pm 94	10007 \pm 7	34343 \pm 202
Zn	114 \pm 62	785 \pm 14	201 \pm 11

Des concentrations totales de 20 et 15 mg/kg (poids sec) de HAP ont été détectées dans les boues Bp et Xp respectivement. Ces valeurs sont typiques de celles d'une boue dérivée d'un

traitement d'eaux urbaines (Wild *et al.*, 1990). Ces composés sont parmi les contaminants organiques les plus abondants dans les boues d'épuration (Connor, 1984; Dean et Suess, 1985). Bien qu'il ait été montré que ces composés persistent plusieurs années dans les sols où de telles boues ont été épandues (Wild *et al.*, 1991), leur présence semble peu dommageable à la croissance des plantes (Dean et Suess, 1985; Wild et Jones, 1992). Une étude sur des carottes (*Daucus carota*), réalisée avec une concentration totale en HAP de 17 mg/kg dans la boue et des taux d'épandage (18, 55 et 180 t/ha) similaires au présent projet, a mis en évidence une stimulation de la croissance des feuilles à chaque taux d'épandage et de celle des racines au taux de 18 t/ha, les deux autres taux réduisant les racines de 15 et 30% (Wild et Jones, 1992); ce dernier effet n'étant pas expliqué par la présence de HAP, mais plutôt par la quantité excessive d'azote apportée par la boue.

Les concentrations en métaux observées dans le sol AR9 (tableau 4.7) sont représentatives d'un sol non contaminé (Alloway, 1990). De plus, aucun HAP n'a été détecté dans ce sol (< 3 mg/kg). La CEC_{eff} de 2.5 meq/100g du sol AR9 reflète sa texture très sableuse (tableau 4.1). La CEC_{eff} donne une mesure de la charge négative d'un sol, c'est à dire l'expression de la capacité d'un sol à adsorber les cations. En conséquence, ce sol présente une faible capacité de mobilisation des métaux, accentuée par un pH acide. Le sol AR9 est riche en K (1.8%), ce qui en fait un sol idéal pour l'épandage, étant donné que les boues en sont généralement pauvres (Sterritt et Lester, 1980).

4.3.2 Évaluation écotoxicologique après simulation de l'épandage des boues

La composition trop riche des boues, ainsi que leur texture ne permettent pas d'effectuer de test d'évaluation écotoxicologique en contact direct. Les boues ont donc été additionnées au sol AR9 avant d'effectuer les tests de germination de graines, de croissance de plantes et de mortalité de vers de terre, ce qui a permis de simuler des conditions d'épandage. Aucun ajustement de pH n'a été effectué puisque l'addition des boues Bp ou Xp à 100 g/L n'a pas sensiblement modifié le pH du sol AR9, qui est resté proche de 5.7. Les résultats des tests en contact direct sont présentés ci-après test par test. L'évaluation écotoxicologique après simulation de l'épandage des boues indique qu'aux taux normaux d'épandage (1 à 10 g/L) aucun effet des boues n'est détectable, et ce, quelque soit la boue, et, qu'aux taux supérieurs, les effets négatifs sont réduits par la biolixiviation de la boue.

4.3.2.1 Germination de la graine d'orge

La figure 4.3 schématise l'effet des boues épanchées et du sol AR9 sur la germination de graines d'orge (*Hordeum vulgare* L.) après 5 jours d'exposition. L'effet négatif de l'accroissement des concentrations de boue se traduit par une augmentation de l'inhibition de la germination. Cet effet peut s'expliquer par la persistance de certains contaminants organiques pendant le traitement ou par une composition trop riche des boues (Vlamis *et al.*, 1985; Wild et Jones, 1992). Néanmoins, le traitement pour l'enlèvement des métaux est efficace. La boue traitée (Xp) produit un effet toxique sur la germination des graines significativement plus faible ($F_{1,24} = 25$; $P < 0.001$) que celui mesuré avec la boue non-traitée (Bp) (tableau 4.8). Cette différence entre les effets des deux boues ne peut cependant être dissociée du taux d'amendement. Une différence significative (P de Tukey < 0.001) entre le pourcentage d'inhibition de la boue Bp et celui de la boue Xp n'a été observée qu'à la concentration de 100 g de boue par litre de sol AR9. Le tableau 4.9 montre la réduction de toxicité telle que mesurée par la diminution de l'inhibition de germination à ce taux d'épandage et par l'augmentation des valeurs de CI50, LOEC et NOEC après traitement de la boue. Plus ces valeurs sont élevées, plus faible est la toxicité. Aux taux normaux d'épandage (1 à 10 g/L) aucun effet négatif n'a été observé.

Tableau 4.8: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "inhibition de germination de graines d'orge"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	734	25	< 0.001
Taux d'amendement	5	5611	194	< 0.001
Interaction	5	173	6	< 0.01
Résiduelle	24	29		

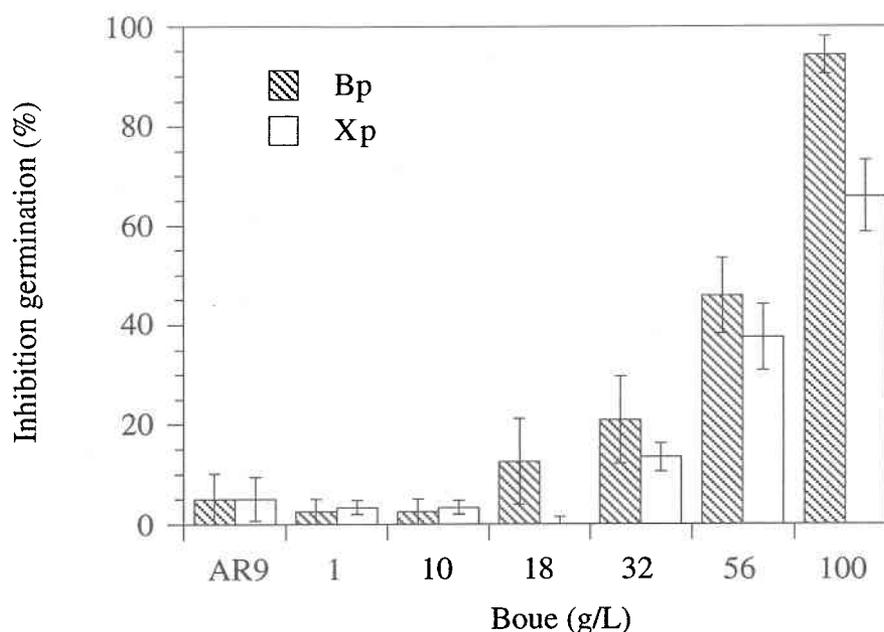


Figure 4.3: Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition de germination de graines d'orge (*H. vulgare* L.) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3)

Tableau 4.9: Variables de mesure du test d'inhibition de germination de graines d'orge (*H. vulgare* L.) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9

Boue	CI50 (intervalle confiance ^a)	MT	LOEC ^b	NOEC ^b
Bp	53 g/L (37-75)	94.2 %	32 g/L	18 g/L
Xp	72 g/L (53-98)	65.8 %	56 g/L	32 g/L

^a $\alpha = 0.05$

^bobtenu par le test de Tukey (P < 0.05)

4.3.2.2 Croissance de la tige d'orge

Pour les taux d'amendement inférieurs ou égaux à 18 g/L, l'addition de boue au sol AR9 a été sans effet significatif sur le rendement de croissance de l'orge (*H. vulgare* L.) (figure 4.4). Les autres taux testés diffèrent suivant la boue quant aux effets produits. La

boue non traitée (Bp) a produit une inhibition significative de la croissance de la tige à la concentration de 100 g/L par rapport au témoin (sol AR9) (tableau 4.10). Au contraire, la boue biolixiviée a produit une stimulation de la croissance significative ($P < 0.05$) à partir de la concentration de 32 g/L (figure 4.4). Les deux traitements diffèrent significativement ($F_{1,24} = 146$; $P < 0.001$) pour les taux 100 g/L ($P < 0.001$) et 56 g/L ($P < 0.001$) (tableau 4.11).

Il a été montré dans des conditions similaires d'épandage de boue, que le Cu diminuait les rendements de matière sèche des parties supérieures de betterave dès 80 mg/kg (Webber, 1972). De plus, 50 mg de Cu par kg de sol en absence de boue a diminué les rendements en poids sec de tiges d'orge, effet accru par la présence de 10 et 100 mg/kg de Zn, lui-même toxique à partir de 100 mg/kg (Luo et Rimmer, 1995). L'effet inhibiteur de la boue Bp amendée à 100 g/L ne peut être attribuée à la toxicité d'un ou deux métaux en particulier, la variabilité de réponse d'un sol à l'autre et d'une espèce à l'autre rendant difficile l'extrapolation. Cependant, la concentration en Cu dans ce mélange (Bp, 100 g/L) était de 125 mg/kg de sol/boue, alors qu'elle était comprise entre 12 et 75 mg/kg dans tous les autres échantillons où aucun effet inhibiteur n'a été observé. La concentration en Zn, elle, était supérieure à 100 mg/L quelque soit l'échantillon de sol ou de mélange sol/boue. Le biotraitement de la boue a donc non seulement permis d'éliminer les facteurs produisant un effet inhibiteur sur la croissance de l'orge, mais aussi de restaurer la valeur fertilisante de la boue. Ces résultats concordent avec ceux de Lake (1986), de Wild et Jones (1992) et Hooda et Alloway (1994) qui notent une stimulation de croissance des plantes en présence des boues.

Tableau 4.10: Variables de mesure du test d'inhibition de croissance de tige d'orge (*H. vulgare* L.) après 14 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9

Boue	CI50	MT	LOEC ^a	NOEC ^a
Bp	non calculable	55.3 %	100 g/L	56 g/L
Xp	>100 g/L	0 %	>100 g/L	100 g/L

^a obtenu par le test de Tukey ($P < 0.05$)

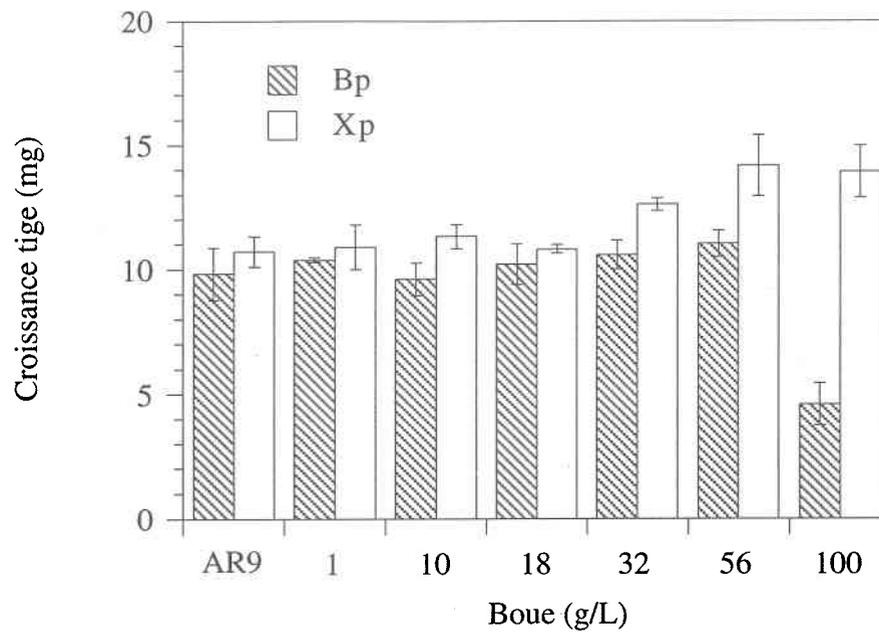


Figure 4.4: Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition de croissance de tiges d'orge (*H. vulgare* L.) après 14 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3)

Tableau 4.11: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "inhibition de croissance de tige d'orge"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	75.2	146	< 0.001
Taux d'amendement	5	7.7	15	< 0.001
Interaction	5	16.4	32	< 0.001
Résiduelle	24	0.51		

4.3.2.3 Germination de la graine de laitue

L'amendement des boues a provoqué une inhibition significative de la germination des graines de laitue (*Lactuca sativa*) dès 18 g de boue par litre de sol (figure 4.5), et ce, quelque soit la boue. Cependant, une différence significative a été notée entre les deux boues par une analyse de variance à facteurs multiples (tableau 4.12), où le type de boue et le taux d'amendement étaient considérés ($F_{1,24} = 19.5$; $P < 0.001$). Cette différence dépend du taux d'amendement et n'est attribuable qu'à l'effet inhibiteur plus important de la boue Bp à la concentration de 18 g/L, différence révélée significative par le test de Tukey de comparaisons multiples ($P < 0.001$). De plus, les deux boues ont produit des valeurs équivalentes pour les variables de mesure (tableau 4.13). Il est donc plus difficile avec ces résultats d'affirmer que le traitement a été efficace. D'autres données, obtenues avec un plus grand nombre d'échantillons entre 10 et 18 g/L, auraient été nécessaires pour la prise de décision.

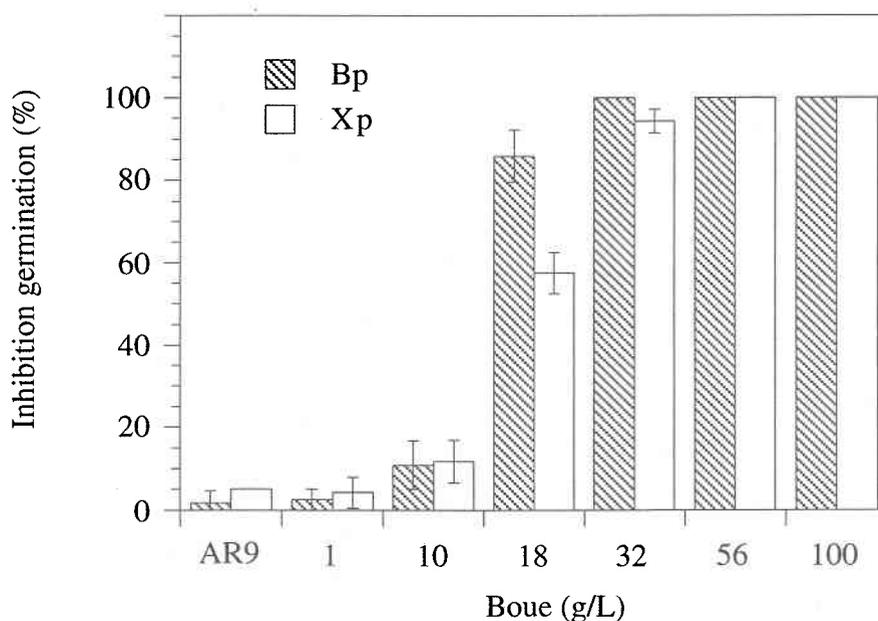


Figure 4.5: Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition de germination de graines de laitue (*L. sativa*) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 ($n = 3$)

Tableau 4.12: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "inhibition de germination de graines de laitue"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	251	19.5	< 0.001
Taux d'amendement	5	12250	954	< 0.001
Interaction	5	202	15.7	< 0.001
Résiduelle	24	13		

Tableau 4.13: Variables de mesure du test d'inhibition de germination de graines de laitue (*L. sativa*) après 5 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9

Boue	CI50	MT	LOEC ^a	NOEC ^a
Bp	13.6 g/L (11.8-15.7)	100 %	18 g/L	10 g/L
Xp	16.8 g/L (14.2-19.9)	100 %	18 g/L	10 g/L

^a obtenu par le test de Tukey (P < 0.05)

La comparaison des deux tests de germination (tableaux 4.9 et 4.13) indique que la graine de laitue est plus sensible à la contamination des boues des métaux que celle d'orge. Cette sensibilité accrue de la laitue par rapport à d'autres espèces a déjà été mise en évidence pour les métaux traces avec l'élongation racinaire (Carlson *et al.*, 1991).

4.3.2.4 Mortalité du ver de terre

Une mortalité de 100 % a été observée chez *Eisenia foetida* après 14 j en présence du sol amendé de 56 et 100 g/L de boue non traitée (Bp) et en présence du sol amendé de 100 g/L de boue biolixiviée (Xp). Dans tous ces cas, les 10 organismes de chacun des 3 réplicats ont péri. La survie du ver n'a pas été affectée par les autres concentrations, où les vers ont éliminé l'odeur nauséabonde des boues et rétabli la neutralité du pH du sol. Sheppard et Evenden (1992) dans leur tentative d'améliorer la méthodologie du biotest mesurant le taux de survie du ver de terre (*Lumbricus terrestris*) ont constaté la mort en cascade des vers lorsque ceux-ci étaient plus d'un par contenant. D'après les auteurs, l'utilisation de plusieurs vers par contenant décroît suffisamment le taux de survie au point de compromettre l'estimation des variables mesurées (CI50, LOEC/NOEC). Néanmoins, les résultats de la

présente étude montre que le traitement des boues améliore la survie des vers, les valeurs de LOEC et de NOEC étant plus élevées avec la boue traitée (tableau 4.14). Roberts et Dorough (1984) classent le Cd, le Cu et le Pb comme étant des composés très toxiques pour le ver *E. foetida*. La létalité médiane (CL50) est provoquée par ces métaux entre 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cependant, l'absence de sol dans cet essai rend la comparaison des concentrations difficile. En présence de sol, des concentrations relativement importantes de Cu (1000 mg/kg), de Cd (150 à 1000 mg/kg), de Ni (2000 à 2500 mg/kg) et de Pb (> 3000 mg/kg) étaient nécessaires pour tuer la moitié des vers testés de l'espèce *Lumbricus rubellus* (Ma, 1982). Par contre le laiton (70% Cu, 30% Zn), additionné au sol sous forme solide, a provoqué un effet identique sur *L. terrestris* à seulement 190 mg/kg (Wentzel et Guelta, 1987), indiquant que l'action combinée de différents métaux, comme c'est le cas dans les boues, peut être différente de celles de chacun des composés purs.

Tableau 4.14: Variables de mesure du test de mortalité du ver de terre (*E. foetida*) après 14 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues dans le sol AR9

Boue	CL50	MT	LOEC	NOEC
Bp	non calculable	100 %	56 g/L	32 g/L
Xp	non calculable	100 %	100 g/L	56 g/L

Différents auteurs ont mis en évidence que la présence de métaux dans les sols provoquait une perte de poids des vers y ayant séjourné (Malecki *et al.*, 1982; Ma, 1984; Neuhauser *et al.*, 1984; Wentzel et Guelta, 1987). Dans des sols contaminés au Ni et au Pb, une telle perte de poids a précédé la mortalité du ver *L. rubellus* (Ma, 1982). Cependant, c'est un gain de poids des vers qui a été enregistré après 28 jours en présence des boues (figure 4.6), mettant en évidence l'effet bénéfique des boues sur la biomasse animale des sols. Ce gain de poids par rapport au témoin a été significatif ($P < 0.05$) au taux 18 g/L pour les deux types de boue et à 32 et 56 g/L pour la boue biolixiviée (Xp). Mais aucune différence statistique ($F_{1,16} = 0.70$; $P = 0.41$) entre les poids des vers ayant séjourné dans l'une ou l'autre des deux boues n'a pu être établie par une analyse de variance à deux facteurs ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "poids des vers".

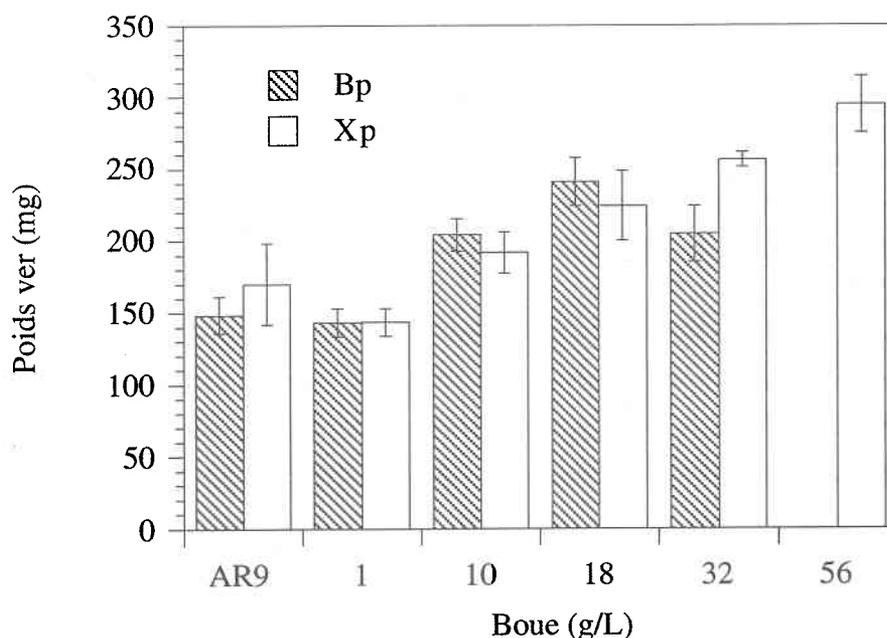


Figure 4.6: Poids moyen (\pm é.t.) d'un ver (*E. foetida*) après 28 jours de contact avec les boues Bp ou Xp épandues à différents taux dans le sol AR9 (n = 3)

4.3.3 Évaluation écotoxicologique sur les éluutriats de boues

Pour les essais réalisés en présence des éluutriats de boue, l'efficacité du traitement de biolixiviation des boues n'a été mise en évidence que par le test Microtox[®] d'inhibition de bioluminescence. Les autres biotests (élongation radriculaire, mortalité des daphnies et SOS Chromotest) n'ont pas détecté de différence entre les effets produits par les éluutriats de boue, ou n'ont pu être utilisés avec les éluutriats (croissance algale). Des essais préliminaires avec d'autres échantillons de boue ont montré que leurs éluutriats produisaient un effet interférant avec la mesure enzymatique du SOS Chromotest, créant ainsi des faux-positifs. Cet effet mesurable même en l'absence des enzymes d'*E. coli* était possiblement dû à la présence importante de bactéries dans les éluutriats (environ 10^8 CFU/mL), et par conséquent à la présence des enzymes phosphatase alcaline et β -galactosidase. Cette présence importante de microorganismes a également pu avoir un effet sur d'autres tests. Afin d'éviter ces inconvénients les bactéries ont été éliminées des éluutriats par irradiation. Certains tests ont également été réalisés sur des échantillons d'éluutriat congelé. L'effet de ces manipulations de l'éluutriat sur la toxicité a été démontré par le Microtox[®].

4.3.3.1 Microtox®

Le test mesurant l'inhibition d'émission de lumière chez la bactérie *Photobacterium phosphoreum* a permis de vérifier l'effet positif du traitement des boues sur la toxicité de leurs éluutriats. Ce test a notamment été choisi du fait de sa rapidité, pour savoir si les manipulations appliquées aux échantillons d'éluutriat (irradiation et congélation de 3 mois à -20°C) avaient un effet sur leur toxicité. Bien que ce fût le cas, aucune interaction avec la variable étudiée, c. à d. le traitement des boues, n'a été détectée.

Chacune des combinaisons, éluutriats de boue biolixiviée (Xp) ou non (Bp), ayant subi ou non l'irradiation et ayant subi ou non la congélation, a été testée par la procédure du Microtox®. Des valeurs de MT, de LOEC/NOEC et de CI50 ont été calculées à partir des courbes de dose-réponse pour chaque échantillon d'éluutriat (pour chaque boue, les 4 échantillons provenant des 4 éluutriations n'ont pas été systématiquement testés). Les seuils de toxicité calculés à partir des valeurs de LOEC/NOEC ont produit de très importantes variations et, en conséquent, n'ont pas été utilisés pour l'analyse des données. Les valeurs moyennes de CI50 et de MT, fournies respectivement aux tableaux 4.15 et 4.16, témoignent de l'effet des éluutriats de boue sur l'émission de luminescence de *P. phosphoreum*, puisqu'il est nécessaire de les diluer de 5 à 20 fois pour obtenir l'inhibition médiane. La bonne homogénéité des réplicats se reflète par les faibles écarts-types et indique que la procédure d'éluutriation est valide et reproductible.

Tableau 4.15: CI50 (\pm é.t. (n)) du test Microtox® (15 min) après exposition aux éluutriats de boues Bp et Xp, irradiés ou non, et congelés ou non

CI50 (% v/v)	Type d'éluutriat	
	Bp	Xp
Traitement de l'éluutriat		
Sans traitement	4.0 \pm 1.8 (4)	8.4 \pm 4.1 (4)
Irradiation	7.9 \pm 1.7 (4)	15.4 \pm 3.0 (4)
Congélation	6.2 \pm 0.4 (2)	10.9 (1)
Congélation et irradiation	11.3 \pm 0.4 (2)	19.8 \pm 2.8 (2)

Tableau 4.16: Toxicités maximales (MT) moyennes (\pm é.t. (n)) du test Microtox[®] (15 min) après exposition aux éluutriats de boues Bp et Xp, irradiés ou non, et congelés ou non

MT Traitement de l'éluatriat	Type d'éluatriat	
	Bp	Xp
Sans traitement	94.6 \pm 0.5 (4)	93.4 \pm 1.2 (4)
Irradiation	88.3 \pm 2.6 (4)	79.5 \pm 2.7 (4)
Congélation	92.9 \pm 0.8 (2)	96.1 \pm 1.1 (2)
Congélation et irradiation	84.7 \pm 2.9 (2)	77.8 \pm 9.1 (2)

Tous les effets principaux [traitement des boues ($F_{1,15} = 26.2$; $P < 0.001$), irradiation ($F_{1,15} = 25.5$; $P < 0.001$) et congélation ($F_{1,15} = 6.6$; $P < 0.05$)] se sont révélés significatifs par une analyse de variance à 3 facteurs où les données de "CI50" (variable continue) étaient étudiées (tableau 4.17). Aucune des interactions n'était significative ($P > 0.05$). Les valeurs de MT n'ont pu être traitées par la même analyse car une des conditions pour l'analyse paramétrique n'était pas vérifiée (dépendance des écart types sur les moyennes due aux faibles variations aux valeurs proches de 100%). Une analyse non paramétrique (Test U de Mann-Whitney) a mis en évidence que seule l'irradiation avait un effet significatif ($P < 0.001$) sur la toxicité maximale produite par l'échantillon.

Tableau 4.17: Analyse de variance à trois facteurs fixes (1: "type de boue", 2: "irradiation" et 3: "congélation") sur la variable continue "CI50 du Microtox[®]"

Effets	df	MS	F	P
1: Type de boue	1	180.4	26.2	< 0.001
2: Irradiation	1	175.7	25.5	< 0.001
3: Congélation	1	45.2	6.6	< 0.05
Interaction 1x2	1	13.4	1.9	0.18
Interaction 1x3	1	0.5	0.07	0.80
Interaction 2x3	1	2.9	0.42	0.52
Interaction 1x2x3	1	0.2	0.02	0.88
Résiduelle	15	6.9		

Cet essai montre donc que la biolixiviation de la boue a été efficace pour diminuer la toxicité (CI50) des éluutriats. Cependant l'irradiation, tout comme la congélation, ne sont pas sans effet sur la toxicité, qu'elles diminuent. Les interactions entre l'irradiation et le traitement des boues, ou la congélation et le traitement des boues n'ont pas eu d'effet, ce qui permet malgré tout de comparer des échantillons d'éluutriat ayant subi le même traitement.

Une récente étude sur l'effet sur des boues d'épuration de l'irradiation gamma a mis en évidence que celle-ci entraînait une réduction dans les rendements et les concentrations en azote de plantes, suggérant une réduction par l'irradiation de l'azote organique disponible dans les boues digérées (Wen *et al.*, 1995). De même, la congélation a entraîné une réduction dans la toxicité sur *P. phosphoreum* (CI50, 15 min) d'effluents industriels (Naudin *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été observés avec des tests de croissance algale, de mortalités de daphnies et d'embryons de poisson. Cependant, les auteurs précisent que contrairement à la réfrigération, ce moyen de conservation n'est pas influencé par le temps, et s'avère donc préférable si les échantillons ne peuvent être traités dans les 48 h. La variation imprévisible de la toxicité mesurée par le Microtox[®] d'échantillons de sédiments ayant été conservés jusqu'à 16 semaines à 4°C vient confirmer ce résultat (Becker et Ginn, 1995).

4.3.3.2 Élongation racinaire

Avant de réaliser le test d'élongation des racines de laitue (*L. sativa*) les quatre éluutriats de chaque boue ont été rassemblés en proportions égales pour former un échantillon composite unique. Ce test a été exécuté à 2 reprises sur les échantillons d'éluutriats de boue: la première série de données (Bp1/Xp1) a été obtenue dans les plus brefs délais directement après éluutriation/irradiation, alors que la seconde série (Bp2/Xp2) provient de tests réalisés après 2 mois de conservation de ces échantillons à -20°C. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.7. Une très grande variabilité entre les réplicats a été obtenue aux faibles concentrations en éluutriat (< 1.8 % v/v). L'enroulement des racines en poussant a pu causer des difficultés à les mesurer, particulièrement quand celles-ci étaient longues (faibles effets inhibiteurs). Cette non-égalité des variances remet en cause l'analyse paramétrique des données.

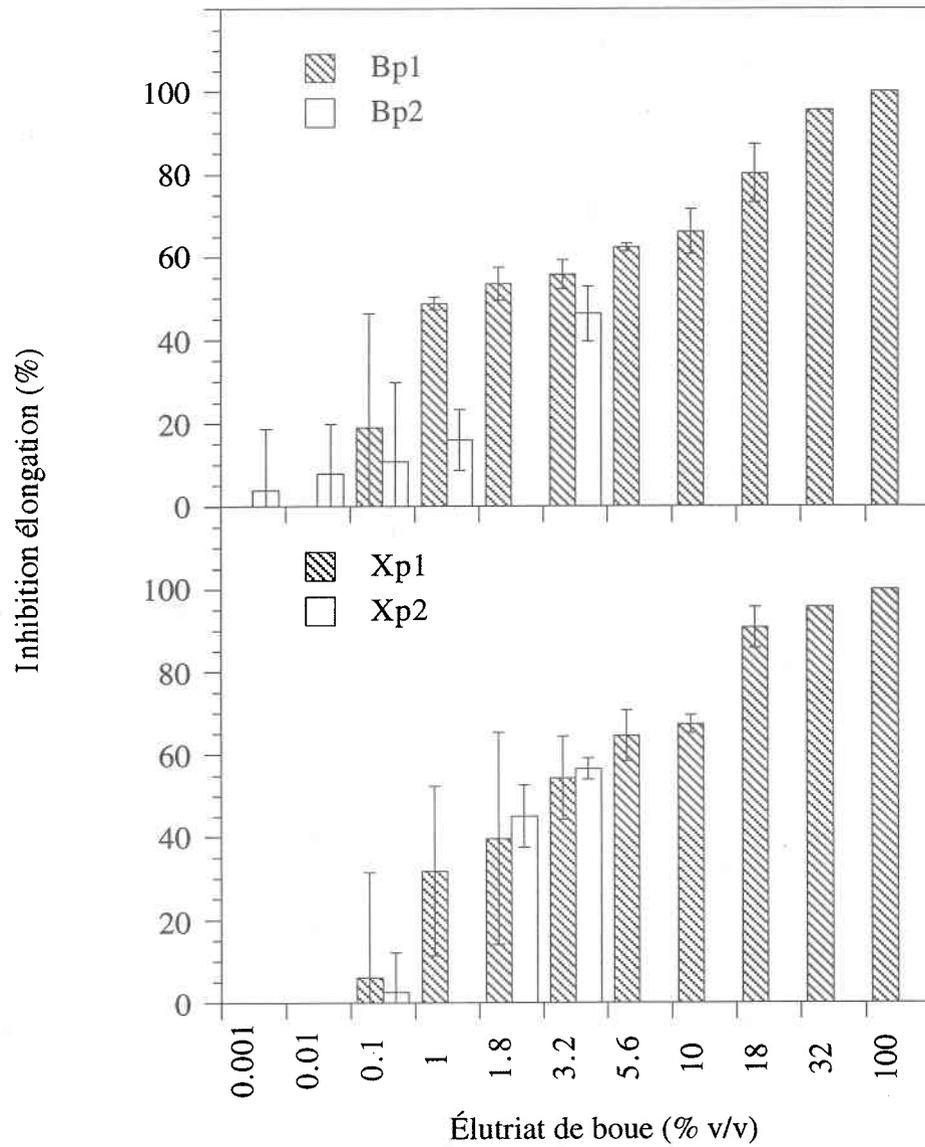


Figure 4.7: Pourcentage moyen (\pm é.t.) d'inhibition d'élongation radriculaire de la laitue (*L. sativa*) après 120 heures d'exposition aux éluutriats de boue ($n = 3$). Échantillons testés sans délai (Bp1/Xp1) ou après 2 mois de conservation à -20°C (Bp2/Xp2).

Les données obtenues sans délai et après conservation, aux 3 concentrations 0.1 % v/v, 1 % v/v et 3.2 % v/v, ont indiqué une diminution des pourcentages d'inhibition après congélation (figure 4.7). La comparaison 2 à 2 par un test U de Mann-Whitney à chacune de ces concentrations a permis de mettre en évidence une différence à la limite de la signification ($P \leq 0.05$) pour 5 cas sur 6. La conservation à -20°C pendant 2 mois a donc modifié les caractéristiques toxiques des échantillons. L'effet de la congélation, déjà observé avec le Microtox[®], a donc été confirmé. En conséquence, seules les données obtenues sans délai ont été considérées pour l'analyse de ce test et ont permis de calculer les variables mesurées (tableau 4.18).

Tableau 4.18: Variables de mesure du test d'inhibition d'élongation des racines de laitue (*L. sativa*) après 5 jours d'exposition dans les éluviats de boues Bp ou Xp

Boue	CI50	MT	LOEC ^a	NOEC ^a
Bp1	2.0 % v/v (0.7-5.0)	100 %	1 % v/v	0.1 % v/v
Xp1	3.1 % v/v (1.1-6.4)	100 %	1.8 % v/v	1 % v/v

^a obtenu par le test U de Mann-Whitney ($P < 0.05$)

Excepté pour le seuil de toxicité, qui s'explique par la très faible variabilité de Bp1 à 1%, le comportement des deux éluviats de boue Bp1 et Xp1 ont été similaires (figure 4.7 et tableau 4.18). Ainsi, la comparaison 2 à 2 par un test U de Mann-Whitney à chaque concentration n'a pas mis en évidence de différence significative ($P > 0.05$) entre les deux éluviats.

4.3.3.3 Croissance algale

Les éluviats de boues n'ont pas pu être testés avec l'algue *Selenastrum capricornutum* du fait de l'apparition massive de bactéries pendant l'incubation de 96 h (culots blancs), et ce malgré l'irradiation des échantillons. L'importance de la population bactérienne a empêché le compte différentiel (compteur de particules) pour distinguer les algues des bactéries. Des essais en conditions complètement stériles où la croissance bactérienne a persisté, suggèrent que, malgré les vérifications effectuées, la population d'algues n'était pas axénique au moment de l'essai.

4.3.3.4 Mortalité des daphnies

Comme pour le test d'élongation radiculaire, un échantillon composite de chaque éluutriat de boue a été testé. Les exigences requises (toxique de référence) pour utiliser le test mesurant la mortalité du cladocère *Daphnia magna* n'ayant pas été rencontrées à la date de préparation des éluutriats, ces derniers ont été congelés à -20°C pendant deux mois. Comme il l'a été démontré avec le Microtox[®] et le test d'élongation radiculaire, cette conservation a pu affecter les caractéristiques des échantillons, mais la comparaison des 2 types de boues qui ont subi le même traitement reste possible puisqu'aucune interaction entre la congélation et le type de boue n'a été établie.

La mortalité du cladocère *D. magna* produite par l'éluutriat était inchangée ou plus importante après le traitement de biolixiviation (figure 4.8). Les très petits nombres d'organismes par réplicat (4) et de réplicats ($n = 3$), ainsi que la courbe dose-réponse abrupte de Xp ont rendu très importante la variation du test. Cette importante variation s'est répercutée sur les intervalles de confiance des mortalités et des CI50 (figure 4.8 et Tableau 4.19). La non-égalité des variances a empêché l'utilisation d'un test paramétrique pour distinguer les effets des différentes concentrations, conduisant ainsi à l'usage du test U de Mann-Whitney. Il n'est possible de distinguer statistiquement les mortalités provoquées par les deux éluutriats qu'à la concentration 5.6 % v/v ($P = 0.046$); à cette concentration, l'éluutriat de la boue Xp était plus toxique (85 % de mortalité) que celui de la boue Bp (33 %) tout en présentant une conductivité plus importante (900 et 750 μmhos respectivement). Les seuils toxiques des deux boues, obtenues par ce test, étaient équivalents (2.4 et 2.6 % v/v pour Bp et Xp respectivement). Ce résultat montre cependant la grande sensibilité des daphnies aux éluutriats de boues. Cette sensibilité est peut-être due à la présence importante de matière organique dans l'éluutriat (turbidité des échantillons - voir résultat carbone total au paragraphe 4.3.3.6), la conductivité paraissant être un indicateur de la toxicité. À la concentration de 100 % en éluutriat la conductivité était de 3750 μmhos pour Bp et de 5600 pour Xp. D'autres facteurs inhérents aux éluutriats de boue peuvent être responsables des effets causés aux daphnies. Ainsi la présence d'ammoniaque, de matière particulaire et le manque d'oxygène peuvent provoquer la mort de certains animaux aquatiques (Costello et Read, 1994). Ces phénomènes expliqueraient la réponse des daphnies à l'éluutriat Xp plus riche en carbone, et surtout, diminueraient l'intérêt de ce test pour distinguer les effets dus aux substances dangereuses lixiviées des boues.

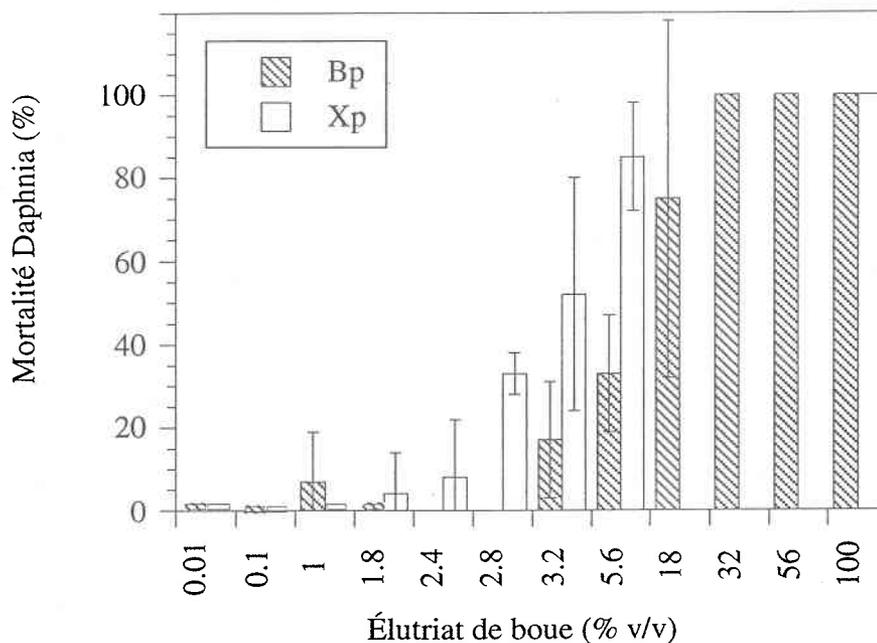


Figure 4.8: Mortalité moyenne (\pm é.t.) de *D. magna* (%) après 48 heures d'exposition à l'élutriat des boues Bp ou Xp (n = 3)

Tableau 4.19: Variables de mesure du test de mortalité des daphnies (*D. magna*) après 48 heures d'exposition à l'élutriat des boues Bp ou Xp

Boue	CL50 (intervalle confiance ^a)	MT	LOEC ^b	NOEC ^b
Bp	8.8 % v/v (0.5-424)	100 %	3.2 % v/v	1.8 % v/v
Xp	3.5 % v/v (2.0-6.3)	100 %	2.8 % v/v	2.4 % v/v

^a $\alpha = 0.05$

^bobtenu par le test de Mann-Whitney (P < 0.05)

4.3.3.5 SOS Chromotest

Les quatre élutriats de chaque boue, testés avec le SOS Chromotest en présence ou non de la fraction d'activation (S9) se sont révélés non génotoxiques (seuil critique de 1.5 pour le FICV).

4.3.3.6 Analyse des métaux, du carbone et du soufre dans les éluutriats

Les éluutriats des deux types de boue présentent des différences du point de vue chimique (tableau 4.20). Peu de métaux lourds se retrouvent à des concentrations détectables à l'ICP. Parmi ceux-ci, le Zn se retrouve en plus grande quantité ($P = 0.04$) dans l'éluutriat de la boue Xp, alors que la présence du Mn y est diminuée ($P = 0.02$) par rapport à Bp (test de Mann-Whitney). On retrouve également dans l'éluutriat de la boue traitée (Xp) plus de C ($P = 0.02$), plus de P ($P = 0.02$), plus de S ($P = 0.02$) (test de Mann-Whitney).

Tableau 4.20: Composition moyenne (\pm é.t.) en métaux, en carbone et en soufre des éluutriats des boues Bp et Xp ($n = 4$)

Éléments (mg/kg)	Bp	Xp
Al	0.62 ± 0.24	0.30 ± 0.24
C	609 ± 33	948 ± 105
Cd	< 0.04	< 0.04
Cr	< 0.02	< 0.02
Cu	0.16 ± 0.09	0.10 ± 0.04
Fe	52.2 ± 19.0	45.7 ± 20.6
Mg	25.4 ± 3.8	20.7 ± 5.1
Mn	3.05 ± 0.39	0.58 ± 0.12
Na	82.7 ± 26.0	98.2 ± 56.2
Ni	< 0.04	< 0.04
P	24.7 ± 14.2	114.3 ± 22.8
Pb	< 0.6	< 0.6
S	13.1 ± 1.5	480.8 ± 75.2
Zn	0.70 ± 0.25	1.59 ± 0.51

Les valeurs observées de concentrations en métaux des éluutriats expliquent peu les effets toxiques mesurés avec le Microtox[®]. Une étude utilisant la procédure du Microtox[®] en phase solide a mis en évidence que la présence du Cu dans les boues, et dans une moindre mesure celles du Pb et du Zn, étaient responsables d'effets toxiques (Carlson et Morrison, 1992). En solutions pures, le Cu et le Zn ont produit des effets variables suivant les études. La concentration produisant 50% d'inhibition de la bioluminescence de *P. phosphoreum* pour le Cu était de 1.7 et 0.45 mg/L, et pour le Zn de 1.9 et 2.7 mg/L (Carlson et Morrison,

1992; Codina *et al.*, 1993). La concentration en Cu dans les deux éluutriats est apparemment insuffisante pour provoquer une inhibition importante, mais il a été observé que l'addition d'eaux d'égout ou de boues, au contraire des autres métaux, intensifiait l'effet produit par le Cu sur *P. phosphoreum* (Codina *et al.*, 1993; Carlson-Ekwall et Morrison, 1995). Pour avoir une meilleure estimation de leur effet sur la bioluminescence, le Zn (sous forme de sulfate) et le Mn (sous forme de chlorure) ont été testés avec le Microtox[®]. Des valeurs assez différentes de la littérature ont été obtenues pour le Zn, dont la CI50 était de 0.8 mg/L et le seuil toxique de 0.03 mg/L. Le Zn, présent à 1.6 mg/L dans l'éluutriat de la boue Xp et à 0.7 mg/L dans celui de Bp, a donc pu produire un effet significatif sur la bioluminescence. Seule la différence importante entre les concentrations de Mn pourrait expliquer la toxicité accrue de l'éluutriat de la boue Bp. Cette observation n'est cependant pas confirmée par les résultats du test en présence de Mn, dont le seuil toxique a été déterminé à 3.8 mg/L. La toxicité plus importante de l'éluutriat Bp est peut-être due à l'action combinée de tous les métaux, incluant ceux non détectés à l'ICP qui ont pu interagir (Davis et Carlton-Smith, 1984), puisque peu de polluants organiques semblent être lixiviables des boues municipales (Dietrich *et al.*, 1993).

Le comportement similaire de *D. magna* en présence des deux éluutriats de boue peut s'expliquer entre autres par la présence de Cu. En effet, deux espèces de daphnies, *D. Hyalina* et *D. magna*, se sont montrées très sensibles au Cu en solution, produisant respectivement des CL50 (48 h) de 0.005 et 0.010 mg/L (Biesinger et Christensen, 1972; Baudouin et Scoppa, 1974). Les concentrations en Cu dans les éluutriats étaient donc dix fois plus concentrées que ces valeurs (tableau 4.20), nombre de fois qu'il faut d'ailleurs diluer ces éluutriats pour diminuer la mortalité (figure 4.8). Le Zn peut également avoir contribué à l'effet toxique puisque ses concentrations dans les éluutriats se trouvent être du même ordre que la valeur de CL50 (48h) de 0.100 mg/L enregistrée avec *D. magna* (Biesinger et Christensen, 1972). La présence de C dans les éluutriats (tableau 4.20) a également pu entraîner la mort des daphnies (Costello et Read, 1994). Si tel a été le cas, l'unique différence à 5.6 % entre les mortalités des daphnies en réponse aux deux éluutriats pourrait s'expliquer par les apports plus importants de C et de Zn dans l'éluutriat de la boue Xp.

4.3.4 Bioaccumulation des métaux et du soufre

Suivant le métal considéré, le pH, la matière organique, la spéciation et les interactions entre les métaux (et donc l'addition de boue) ont une influence sur sa bioaccumulation (Lake, 1986; Roca et Pomares, 1991). Chang *et al.* (1992) suggèrent que l'accumulation d'un

métal dans les feuilles ou les racines d'une plante est l'indice le plus approprié pour confirmer les effets phytotoxiques de ce métal. L'analyse des métaux dans les tiges d'orge et les vers récoltés après l'exécution des biotests a permis de mettre en évidence l'accumulation du Cu, du Mn, du Zn et du S en présence des boues. Ces éléments sont essentiels pour les plantes et les animaux, mais des concentrations excessives peuvent être responsables d'effets toxiques (Lake, 1986; Sadusky et Wentzel, 1991; Davis *et al.*, 1993). À certaines concentrations le Cu et le Zn sont même considérés, avec le Ni, comme les métaux les plus inquiétants du point de vue de la phytotoxicité (Lake, 1986).

4.3.4.1 Tiges d'orge

La boue non biolixiviée Bp, aux taux d'amendement supérieurs ou égaux à 10 g/L, a augmenté les teneurs en Cu de la tige d'orge *H. vulgare* L. (figure 4.9). Aucun des taux d'amendement de la boue biolixiviée n'a produit un tel effet. En conséquence, une analyse de variance a décelé une différence significative ($F_{1,20} = 55$; $P < 0.001$) entre les deux types de boue (taux 10, 18 et 32 g/L) (tableau 4.21). Les valeurs observées semblent pourtant normales, puisque des concentrations en Cu allant de 10 à 20 mg/kg ont été fournies pour les feuilles de différentes espèces de végétaux (Roca et Pomares, 1991). L'application de boue a occasionné une augmentation des concentrations de Cu dans les tissus de l'ivraie *Lolium perenne* L. à des valeurs supérieures à 22 mg/kg, jugées critiques pour cette espèce du point de vue phytotoxique (Davis et Carlton-Smith, 1984; Hooda et Alloway, 1994).

Tableau 4.21: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Cu chez l'orge"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	57.4	55	< 0.001
Taux d'amendement	4	7.9	7.8	< 0.001
Interaction	4	1.5	1.4	0.27
Résiduelle	20	1.1		

La teneur en Mn a été augmentée par la présence des boues dès 10 g/L, et diminuée ensuite de façon inversement proportionnelle à la concentration en boue dans le sol jusqu'à des valeurs inférieures à celles observées dans le sol AR9 (figure 4.9). De plus, bien que la

boue traitée, ainsi que son éluviat, présentent des concentrations en Mn inférieures à celles de la boue Bp, sa présence entraîne des teneurs en Mn dans les tiges d'orge significativement supérieures ($F_{1,20} = 120$; $P < 0.001$) (tableau 4.22).

Tableau 4.22: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Mn chez l'orge"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	3289	120	< 0.001
Taux d'amendement	4	2199	81	< 0.001
Interaction	4	46	1.7	0.20
Résiduelle	20	27		

L'apport accru de S dans les boues Bp et Xp par rapport au sol AR9 semble favoriser son assimilation par les plantes dès 10 g/L (figure 4.9). La boue Xp, plus riche en cet élément, produit un effet significativement plus important ($F_{1,20} = 138$; $P < 0.001$), effet dépendant du taux d'amendement de la boue (tableau 4.23).

Tableau 4.23: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du S chez l'orge"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	56 600 000	138	< 0.001
Taux d'amendement	4	21 900 000	53	< 0.001
Interaction	4	3 020 000	7.3	< 0.001
Résiduelle	20	410600		

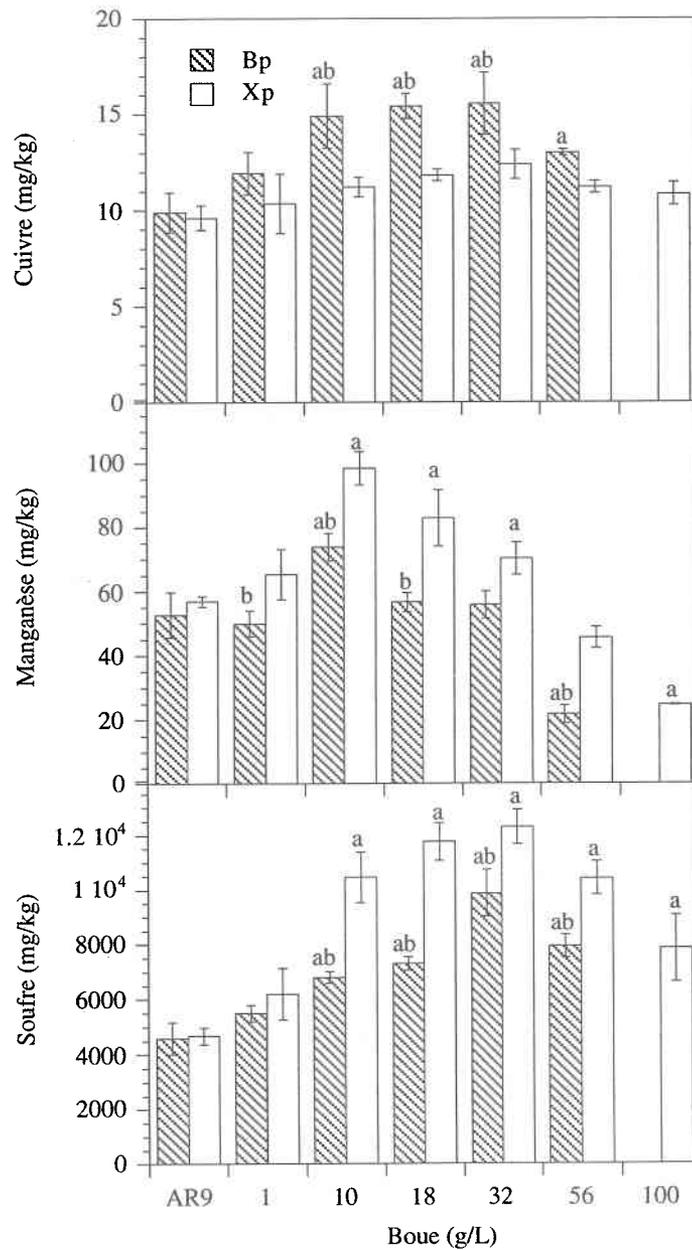


Figure 4.9: Teneurs moyennes (\pm é.t.) en Cu, Mn et S des tiges d'orge *H. vulgare* L. en fonction de la boue Bp ou Xp et du taux d'amendement ($n = 3$). a: différence significative ($P < 0.05$) avec le sol AR9. b: différence significative ($P < 0.05$) avec la boue Xp au même taux d'amendement.

La présence de l'une ou l'autre boue n'a pas affecté significativement ($P > 0.05$) les teneurs en Zn dans la tige de l'orge, qui étaient de 67.5 ± 12.8 mg/kg de matière sèche ($n = 39$). Le Zn est un élément essentiel aux plantes, et des valeurs du même ordre ont été enregistrées chez la même espèce (12 à 55 mg/kg) (Wu et Aasen, 1994), et dans des feuilles de pomme de terre, de maïs et de laitue (20 à 70 mg/kg) (Roca et Pomares, 1991). Cependant l'application de boue contaminée en Zn a conduit à une accumulation de ce métal chez l'orge (75 à 300 mg/kg) (Kirkham, 1975; Vlamis *et al.*, 1985) et chez l'ivraie (> 200 mg/kg) (Hooda et Alloway, 1994). De telles concentrations dans les tissus de différentes plantes se sont avérées critiques sur les rendements (Davis et Carlton-Smith, 1984; Chang *et al.*, 1992).

Les résultats d'analyse du Ni (inférieur à la limite de détection de 2 mg/kg) ainsi que du Cd et du Pb (coefficients de variation supérieurs à 100%) n'ont pas pu être interprétés.

4.3.4.2 Vers

Certains métaux présents dans les vers *E. foetida* à des concentrations inférieures à la limite de détection n'ont pas été considérés dans la suite de l'analyse. Il s'agit de l'Al (< 2 mg/kg), du Cd (< 2 mg/kg), du Cr (< 1 mg/kg), du Ni (< 2 mg/kg), et du Pb (< 30 mg/kg). De plus, aucun effet significatif ($P < 0.05$) n'a été observé en comparant les teneurs en Fe et en S des vers, respectivement de 68.2 ± 11.1 mg/kg ($n = 30$) et de 1627 ± 119 mg/kg ($n = 31$).

Les comportements d'accumulation du Cu, du Mn et du Zn chez le ver, représentés à la figure 4.10, sont similaires. La boue Bp aux concentrations supérieures ou égales à 10 g/L a provoqué une augmentation dans les teneurs des vers en Cu, Mn et Zn. Après traitement de la boue (Xp), aucun effet significatif n'a été détecté. La composition de la boue a donc modifié l'accumulation du Cu ($F_{1,16} = 18.6$; $P < 0.001$) (tableau 4.24), celle du Mn ($F_{1,15} = 16.3$; $P < 0.001$) (tableau 4.25), et celle du Zn ($F_{1,14} = 32.2$; $P < 0.001$) (tableau 4.26). Dans le cas du Zn, le taux d'amendement n'a pas eu d'effet significatif sur son accumulation dans les vers mais a exercé une interaction significative avec le type de boue (tableau 4.26), indiquant que le comportement d'accumulation est différent suivant la boue. Il apparaît très distinctement que la biolixiviation a permis d'empêcher l'accumulation par les vers de ces trois métaux. Bien que la boue Bp était moyennement contaminée en métaux, le Cu, le Mn et le Zn y ont été puisés par les vers. La différence de comportement

d'accumulation des vers entre les deux boues peut s'expliquer par la différence dans leur composition en métaux ou par la différence dans la nature même des boues.

Tableau 4.24: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Cu chez le ver"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	2.22	18.6	< 0.001
Taux d'amendement	3	0.69	5.8	< 0.01
Interaction	3	0.23	1.9	0.16
Résiduelle	16	0.12		

Tableau 4.25: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Mn chez le ver"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	6.0	55	< 0.001
Taux d'amendement	3	2.3	7.8	< 0.01
Interaction	3	1.4	1.4	0.03
Résiduelle	15	0.37		

Tableau 4.26: Analyse de variance à deux facteurs fixes ("type de boue" et "taux d'amendement") sur la variable continue "bioaccumulation du Zn chez le ver"

Effets	df	MS	F	P
Type de boue	1	39.6	32.2	< 0.001
Taux d'amendement	3	0.89	0.72	0.56
Interaction	3	11.8	9.6	< 0.001
Résiduelle	14	1.2		

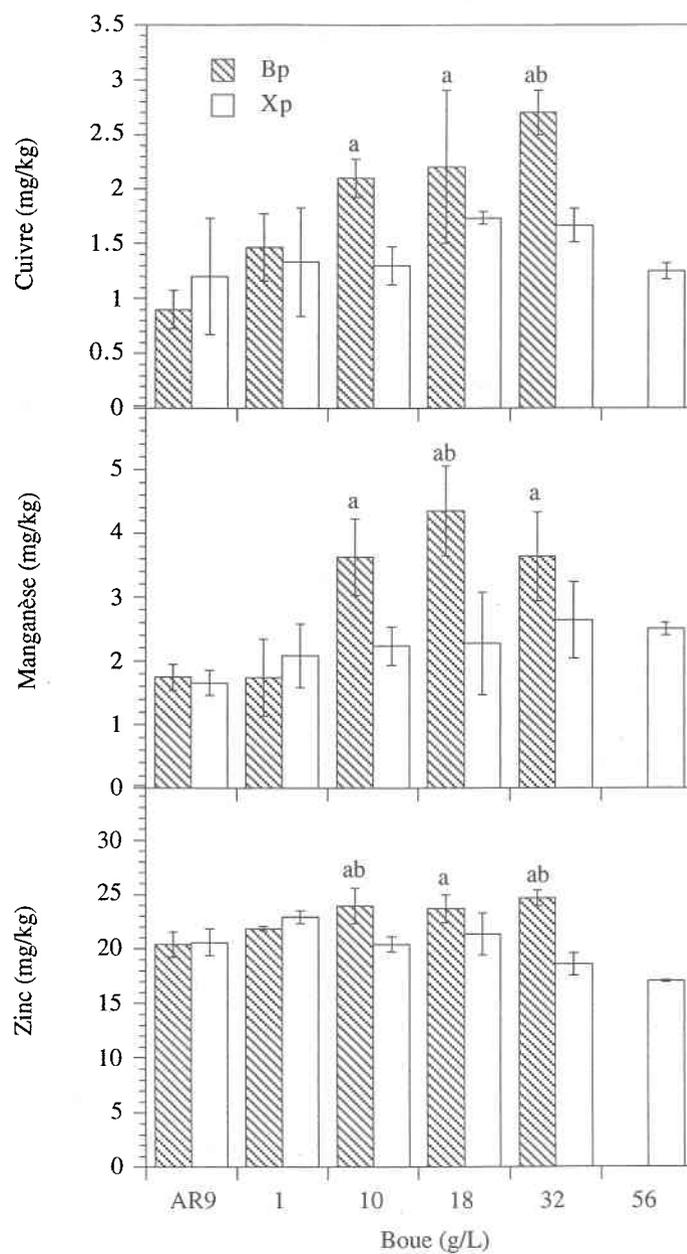


Figure 4.10: Teneurs moyennes (\pm é.t.) en Cu, Mn et S dans les vers *E. foetida* en fonction de la boue Bp ou Xp et du taux d'amendement ($n = 3$). a: différence significative ($P < 0.05$) avec le sol AR9. b: différence significative ($P < 0.05$) avec la boue Xp au même taux d'amendement.

4.3.4.3 Facteurs de concentration

Les facteurs de concentration, qui correspondent aux ratios de la concentration d'un élément dans un organisme sur celle du mélange sol/boue, ont été calculés chez l'orge et le ver pour le Cu, le Mn, et le Zn. Ces facteurs ne sont pas constants et varient avec la contamination du sol, le taux d'épandage des boues, mais aussi, avec le type de boue. Ces variations, illustrées à la figure 4.11, mettent en évidence la différence de biodisponibilité des métaux dans les deux types de boue Bp et Xp. Le facteur de concentration a tendance à décliner avec un taux croissant de contaminant et de boue dans le sol. Pour les métaux Cu, Mn et Zn, le facteur de concentration reste inférieur à l'unité indiquant que les organismes étudiés limitent leur absorption ou réduisent leur translocation vers les feuilles. Morgan et Morgan (1988) suggèrent que l'accumulation du Cu et du Zn est régulée physiologiquement chez les deux espèces de vers *L. rubellus* et *Dendrodilus rubidus*. D'après leur étude, les facteurs édaphiques (pH, [Ca], CEC, matière organique) n'ont pas eu d'effets sur l'accumulation du Cu et du Zn par ces vers de terre. Pourtant, l'effet du type de boue sur le taux d'absorption est mis en évidence avec le Cu, et plus particulièrement avec le Mn et le Zn (figure 4.11). Pour ces métaux les facteurs de concentration varient d'une boue à l'autre, et suivant le taux d'amendement de la boue, indiquant que la biodisponibilité des métaux est différente dans le sol et dans chacune des deux boues, et que l'accumulation dans les organismes en dépend. Si les facteurs de concentration pour ces 3 métaux sont comparés, à concentrations égales en métaux dans le sol, ils sont supérieurs pour la boue Bp que pour la boue Xp, indiquant que la biodisponibilité est accrue dans Bp.

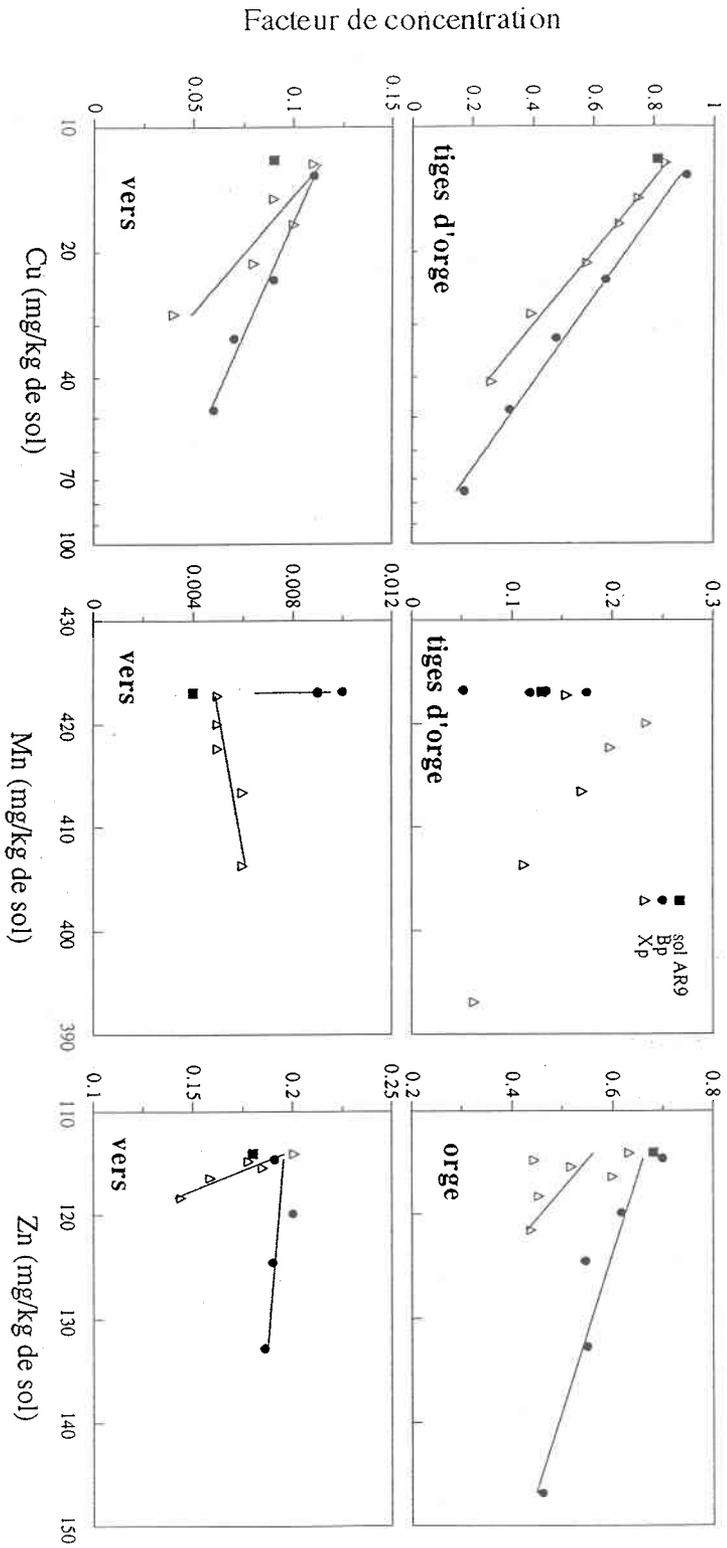


Figure 4.11: Évolution des facteurs de concentration des métaux Cu, Mn et Zn en fonction de leur concentration dans le sol amendé ou non de la boue Bp ou Xp, pour le ver *E. foetida* ou l'orge *H. vulgare*

La concentration du Mn dans le sol amendé de la boue Bp est restée constante, quelque soit le taux d'épandage (concentrations équivalentes dans Bp et AR9), alors que la concentration dans la tige d'orge et le ver et, en conséquence les facteurs de concentration, ont varié (figure 4.9 et 4.11). La biodisponibilité du Mn, et donc les facteurs abiotiques, semblent donc avoir contrôlé son absorption. L'addition de boue a également entraîné l'accumulation du Mn par la plante tropicale *Vigna unguiculata* et une augmentation de la phytotoxicité (Vega *et al.*, 1992). Les auteurs suggèrent que la matière organique des boues favorise un environnement microbien réducteur et la complexation du Mn par des anions organiques. Pour le mélange sol/boue Xp, la concentration en Mn diminue alors que le pourcentage de boue augmente (concentrations plus faibles dans la boue Xp que dans le sol AR9). Dans ce cas, le comportement d'accumulation du Mn dépend nettement de l'organisme. Alors que le facteur de concentration est peu modifié pour le ver qui compense pour la perte en Mn dans le milieu, il est augmenté puis diminué de façon importante pour l'orge. En fait, pour l'orge l'accumulation du Mn semble dépendre plus du taux d'amendement de la boue que de la concentration en Mn dans le mélange sol/boue (figure 4.12).

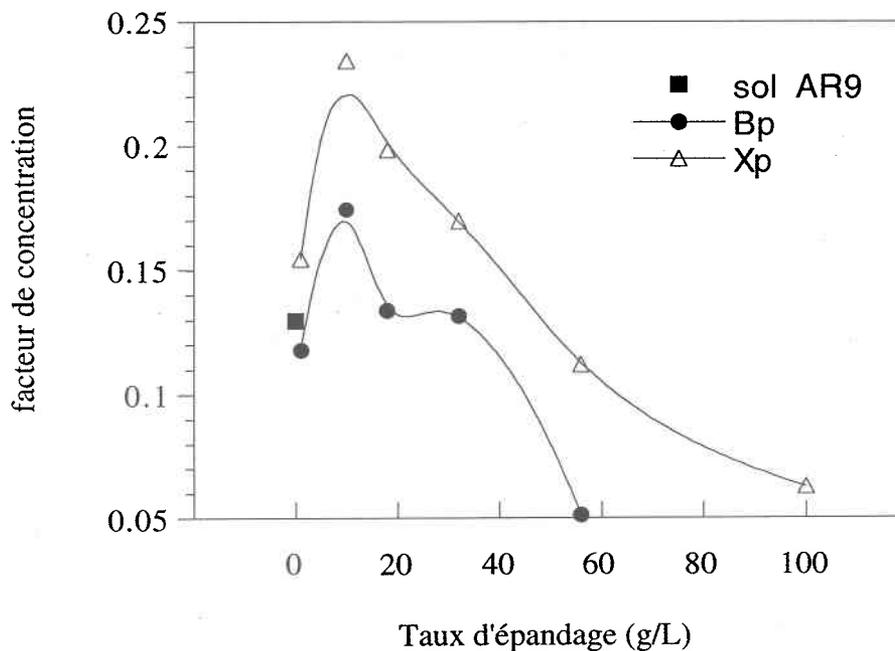


Figure 4.12: Évolution des facteurs de concentration en Mn dans l'orge *H. vulgare*, en fonction du taux d'amendement de la boue Bp ou Xp

4.4 Conclusion

Les résultats de cette étude nous amènent à tirer les conclusions suivantes:

- L'hypothèse selon laquelle la décontamination est accompagnée d'une réduction simultanée de la toxicité a été démontrée, puisque le traitement de biolixiviation des boues a réduit les effets mesurés par les biotests de germination de l'orge, de croissance de la pousse d'orge, de mortalité du ver et du Microtox. Bien que cette réduction ne peut être directement reliée à la diminution des métaux dans les boues, le traitement a réduit l'accumulation du Cu dans les tiges d'orge et celles du Cu, du Mn et du Zn dans les vers. Cette observation démontre du moins que la biodisponibilité de ces métaux était réduite dans la boue biolixiviée par rapport à la boue non traitée. Par contre, le biotest mesurant la mortalité des daphnies a montré un effet inverse, mais il n'est pas évident que cet effet ne soit attribuable à des caractéristiques physiques de l'élutriat de boue biolixiviée.

- Le Microtox a permis de mettre en évidence que l'irradiation et la congélation ont diminué la toxicité des élutriats de boue. Ce phénomène a été confirmé pour la congélation par le test d'élongation radiculaire de la laitue.

- L'évaluation écotoxicologique par le biais de biotests terrestres et aquatiques est réalisable avec des boues d'épuration. Il existe cependant quelques restrictions pour certains biotests: (i) le test de germination de la graine de laitue s'est avéré plus sensible à la présence des boues que celui utilisant la graine d'orge; (ii) le phénomène de mort en cascade des vers a été observé, confirmant la nécessité de séparer ces organismes au moment du test; (iii) la grande variabilité des écarts-types obtenus avec les biotests d'élongation radiculaire de laitue et de mortalité des daphnies empêche l'analyse statistique paramétrique des données, ce qui diminue l'intérêt de ces tests. D'une façon générale les résultats ont été plus faciles à obtenir et plus intéressants avec les tests en contact direct (germination et croissance de graine, mortalité de vers) après simulation de l'épandage des boues qu'avec les tests aquatiques (élongation radiculaire, mortalité daphnies, croissance algale, SOS Chromotest) sur les élutriats.

5 ÉVALUATION D'UN SOL CONTAMINÉ AUX HYDROCARBURES PÉTROLIERS PENDANT UN PROCÉDÉ DE BIOTRAITEMENT

5.1 Introduction

La pollution du sol est un problème ancien pour lequel la prise de conscience environnementale n'est que récente (Poels *et al.*, 1991). Pour y remédier, différentes technologies de restauration des sols à grande échelle sont développées et évaluées par l'industrie et les agences environnementales (Daley, 1989; Sims, 1990; Wick et Pierce, 1990). Pour évaluer le risque environnemental associé aux sols contaminés et à leur décontamination, la communauté scientifique promeut l'évaluation écotoxicologique des sols par l'utilisation de biotests, en plus de la caractérisation chimique communément utilisée (Porcella, 1983; Athey *et al.*, 1987). Les résultats obtenus lors de l'évaluation écotoxicologique d'un procédé de terrain sont présentés dans ce chapitre. Le procédé de biostimulation *ex situ* étudié a permis la réduction des concentrations en hydrocarbures aliphatiques dans un sol argileux et en conditions nordiques (Desrochers *et al.*, 1993).

Le but d'un processus de décontamination n'est pas de réduire les concentrations en polluants prioritaires à zéro, mais plutôt d'arriver à un état réaliste de restauration, où les contaminants ne seraient plus biodisponibles et où la toxicité enregistrée par les biotests ne serait pas supérieure à celle rencontrée dans un sol naturel. Dans cet objectif, les sols "non-contaminés" peuvent être employés comme base raisonnable de comparaison. Obtenir un sol non-contaminé (témoin négatif) près du site de restauration peut s'avérer difficile puisque les sites pollués sont en général, eux-mêmes, localisés dans des zones industrielles. Les caractéristiques pédologiques du sol sont également très variables, et leur influence sur la mesure de la toxicité n'est pas claire. Les échantillons trop éloignés du site ne peuvent donc pas être utilisés comme témoins négatifs. Les sols, présentant une complexité écologique (toxines naturelles, propriétés physico-chimiques), pourraient induire des effets toxiques sur les organismes des biotests, même s'ils sont considérés non-contaminés. En absence d'un témoin négatif, il est impossible de distinguer entre la toxicité résiduelle des polluants après décontamination et la toxicité inhérente d'un sol. Ainsi, pour étudier l'exposition indirecte via la contamination des eaux d'infiltration, une procédure d'élutriation a été utilisée.

Malheureusement, il n'y a que peu d'information sur le comportement des biotests aquatiques, développés pour tester les eaux de surface, vis-à-vis d'un éluviat de sol.

Puisqu'ils sont considérés comme "non-contaminés", les sols agricoles et forestiers pourraient être utilisés comme référence. Il est évident que ces sols ne sont pas exempts de toute contamination (dépôts atmosphériques ou contamination plus ponctuelle telle les résidus de pesticides), mais cette pollution peut souvent être considérée comme un bruit de fond. Seulement quelques études ont tenté de déterminer la génotoxicité de sols "non-contaminés" (Göggelmann et Spitzauer, 1983; Brown *et al.*, 1985; Jones et Peace, 1989) ou la sensibilité de quelques biotests à différents types de sol (Sheppard et Evenden, 1992; Sheppard *et al.*, 1993). Steen *et al.* (1994) ont observé que les extraits et les éluviats d'un sol forestier, à priori non pollué, inhibaient la croissance de racines de concombre. Les effets phytotoxiques ont été attribués à des composés organiques non-identifiés de faible poids moléculaire ($PM < 1000$).

Dans cette étude, les outils d'évaluation écotoxicologique ont permis d'évaluer (i) la toxicité inhérente de sols non-contaminés et (ii) l'efficacité de traitement d'un procédé biologique de restauration de sol à l'échelle du terrain. Quatre sols non-contaminés et quatre échantillons provenant d'une biopile de 1500 m³ pendant le traitement d'un sol de raffinerie pétrolière contaminé à l'origine de 2000 mg/kg d'huiles et graisses, ont été prélevés et analysés.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Sols étudiés

Quatre sols "non-contaminés" ont été échantillonnés dans la province de Québec dans des zones spécifiques où aucune contamination ponctuelle n'a été enregistrée. Afin d'être utile pour de nombreuses évaluations écotoxicologiques de sol, des sols ayant des origines et des caractéristiques pédologiques diverses doivent être analysées. Pour des raisons pratiques, la capacité effective d'échange cationique (CEC_{eff}), qui dépend de la texture du sol, de son pH et de son contenu en matière organique a été choisi comme critère de divergence. Le sol Urb provient d'une zone urbaine (île de Montréal); le sol AUr est un sol agricole également échantillonné en zone urbaine (île de Montréal); Le sol Agr est strictement agricole (Beauce); et le sol FOr est forestier (Outaouais). Chaque échantillon a été collecté dans la couche arable, soigneusement mélangé, tamisé sur 2 mm et conservé à 4°C.

Les quatre autres échantillons de sol ont été collectés au cours d'un procédé de biostimulation *ex situ* effectué au site d'une raffinerie de pétrole sur l'île de Montréal (Québec) de décembre 1991 à août 1992. Dans cette étude, 1500 m³ d'argile-limoneux, contaminés avec une concentration moyenne en diesel de 2000 mg/kg d'hydrocarbures pétroliers ayant une chaîne aliphatique de 12 à 24 carbones, ont été traités dans une cellule de traitement (60 m x 20 m x 1.8 m). La concentration en huiles et graisses minérales excédait le critère C du MENVIQ (Ministère de l'Environnement du Québec). Les critères A, B et C du MENVIQ sont fournis au tableau 5.1, et représentent les concentrations en dessous desquelles un sol est considéré: non contaminé (A), faiblement contaminé (B) et contaminé (C) (Ministère de l'Environnement du Québec, 1990). Avant d'être mis en pile les sols ont subi un pré-traitement. Les roches ont été enlevées du sol. Des nutriments, du gypse et de la sciure de bois ont été ajoutés pour améliorer respectivement la teneur en azote, la capacité de rétention d'eau, et la structure du sol. Le mélange mécanique du sol a permis de réduire la grosseur des agrégats et d'homogénéiser la contamination. La pile reposait sur une dalle de béton. Afin de réaliser le confinement des émissions, le traitement a été réalisé sur une base endiguée et une géomembrane recouvrait la pile. Pour stimuler la biodégradation, la pile a été aérée en continu à l'aide de conduites perforées reliées à des soufflantes. Cependant l'aération n'a débuté que quatre mois avant la fin du procédé pour éviter un refroidissement de la pile. Trois échantillons ont été prélevés dans la pile à différents moments de la biorestauration: le premier juste après le début du procédé (Dec91), le second cinq mois après (Apr92) et le dernier (Aug92) quand le critère B du MENVIQ pour les huiles et graisses minérales (1000 mg/kg) a été atteint. Une pile témoin de 100 m³, qui n'a reçu aucun traitement a également été étudiée; un échantillon (Ctl) a été prélevé en décembre 91 dans cette pile. Chaque échantillon représente un mélange de 8 sous-fractions prélevées à 0.6 m de profondeur, tamisées sur 2 mm et bien homogénéisées (séparateur en acier inoxydable). Les sous-fractions ont été prélevées à l'aide d'une tarière manuelle, combinée à un carottier A.M.S. (30 x 5 cm) et de deux tubes d'échantillonnage en laiton (15 x 5 cm) bouchés de plastique pour le transport. Les échantillons ont été conservés à -20°C avant la caractérisation écotoxicologique.

Tableau 5.1: Caractérisation chimique des sols "non-contaminés" et critères pour les sols du Ministère de l'Environnement du Québec (MENVIQ)

CONTAMINANT mg/kg (poids sec)	Sol				Critères du MENVIQ ^a		
	Urb	AUr	Agr	FOr	A	B	C
HUILES et GRAISSES	120	<25	<25	<25	100	1000	5000
HAP totaux	1	1.2	<0.1	<0.1	1	20	200
naphtalène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.5	5
acénaphthylène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	10	100
acénaphène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	10	100
fluorène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	10	100
phénanthrène	0.1	0.3	<0.1	<0.1	0.1	0.5	5
anthracène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	10	100
fluoranthène	0.2	0.3	<0.1	<0.1	0.1	10	100
pyrène	0.2	0.3	<0.1	<0.1	0.1	1	10
benzo(a)anthracène	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
chrysène	0.1	0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
benzo(b)fluoranthène	0.1	0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
benzo(k)fluoranthène	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
benzo(a)pyrène	0.1	0.1	<0.1	<0.1	0.1	10	100
indeno(1,2,3-cd)pyrène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
dibenzo(ah)anthracène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
benzo(ghi)perylène	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	1	10
PCP	<1	<1	<1	<1	0.1	1	10
MÉTAUX							
Aluminium	12600	19700	10900	10900			
Argent	<2	<2	<2	<2	2	20	40
Arsenic	4.5	4.7	2.2	0.5	5	50	100
Barium	72	106	20	208	200	500	2000
Béryllium	39	40	23	51			
Bore	10	<10	<10	<10			
Bismuth	<20	<20	<20	<20			
Cadmium	<1	<1	<1	<1	1.5	5	20
Calcium	33200	29600	377	4130			
Chrome	20	32	14	58	75	250	800
Cobalt	11	12	6	19	15	50	300
Cuivre	35	29	7	22	50	100	500
Étain	<10	<10	<10	<10	5	50	300
Fer	30300	8990	16900	36900			
Magnésium	11300	4580	4090	10800			
Manganèse	394	522	324	422			
Mercure	0.08	0.13	0.09	0.08	0.2	2	10
Molybdène	<2	<2	<2	<2	2	10	40
Nickel	30	29	21	33	50	100	500
Plomb	53	45	14	28	50	500	1000
Potassium	2900	2010	450	3750			
Sélénium	0.34	0.35	0.19	0.45	1	3	10
Sodium	200	150	<50	400			
Vanadium	26	42	11	60			
Zinc	83	84	43	121	100	500	1500

^aMinistère de l'Environnement du Québec (1990)

Valeurs > critère A du MENVIQ indiquées en gras

5.2.2 Caractérisation pédologique

Les caractérisations pédologiques des sols sont résumées au tableau 5.2. Le poids sec et le contenu en matière organique sont estimés par des méthodes standard (American Public Health Association, 1989). La méthode # 2540B a été utilisée pour la détermination du poids sec, alors que la quantité de matière organique a été estimée par la quantité de solides volatilisés à 600°C (méthode # 2540E). L'analyse de la taille des particules, la densité réelle et le pH du sol ont été déterminées selon les méthodes de Gee et Bauder (1986) et de McLean (1982). La méthode de l'hydromètre (ASTM) a été choisie pour déterminer les proportions d'argile et de limon dans le sol. Le nom de la texture a été obtenue à partir du triangle des textures (Gee et Bauder, 1986). La détermination de la capacité effective d'échange cationique (CEC_{eff}) a été modifiée de van Reeuwijk (1987): suite à la centrifugation (700 g, 20 min) de la solution de réaction (sol + thiouréa-Ag), le surnageant a été filtré sur borosilicate (0.7 μ m) avec un système en Téflon[®], dans le but d'éliminer les particules d'argile non sédimentées. L'argent présent dans le filtrat a été analysé par absorption atomique (Modèle Graphite Tube Atomizer 95 de Varian). Les analyses ont été réalisées en triplicatas, sauf pour la CEC_{eff} qui a été déterminée en duplicata.

Tableau 5.2: Caractéristiques pédologiques des sols Urb, AUr, Agr, FOr et Ctl

	Sols non-contaminés				Sol Ctl
	Urb	AUr	Agr	FOr	
Origine	urbaine	Agricole urbaine	Agricole	Forestière	Raffinerie de pétrole
Texture ^a	Terreau	Terreau	Terreau sableux	Terreau	Terreau argileux
Argile (%)	17.4	21.1	15.0	16.0	36.6
Limon (%)	39.5	38.9	6.0	47.0	31.0
Sable (%)	43.1	40.0	79.0	37.0	32.4
pH (H ₂ O)	7.8	7.5	4.8	5.2	7.5
Matière organique (%)	2.7	5.8	1.7	8.2	
CEC effective (me/100 g sol sec)	11.2	15.4	0.5	6.9	

^aObtenue à partir du triangle des textures (Gee et Bauder, 1986)

5.2.3 Caractérisation chimique

La caractérisation chimique a été effectuée dans le but de quantifier les huiles et graisses minérales, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le pentachlorophénol (PCP) et les métaux. Les mesures d'huiles et graisses et de HAP ne représentent que les fractions non-volatiles et semi-volatiles, puisque les composés volatiles ont pu s'évaporer pendant l'extraction.

5.2.3.1 Huiles et graisses minérales

La méthode standard d'extraction recommandée par l'APHA (#5520) (American Public Health Association, 1989) a été utilisée pour extraire les hydrocarbures pétroliers du sol. Le sol a été homogénéisé, subdivisé en sous-échantillons de 20 g, séché avec du sulfate de magnésium anhydre puis lavé en continu dans un solvant (1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroéthane) dans un extracteur de type soxhlet. L'extrait brut a été purifié sur une colonne de silice, avant d'être concentré (5 mL). Le gel de silice (100-200 mesh) a été au préalable activé 16 h à 150°C. Les analyses ont été réalisées avec un spectrophotomètre à infrarouge Pye-Unicam (PU9512). Un mélange benzène/hexadécane/isooctane (25/37.5/37.5%, v/v/v) a servi de standard de quantification. Un standard de récupération (hexadécane) ajouté aux extraits avant l'extraction et analysé par GC/MS (chromatographie en phase gazeuse HP5890 couplée à un spectromètre de masse MSD HP5970) a permis de déterminer l'efficacité d'extraction.

5.2.3.2 Hydrocarbures polycycliques aromatiques

Les HAP ont été quantifiés en suivant les méthodes d'évaluation des déchets de l'US-EPA (1986). Comme pour la quantification des huiles et graisses, les HAP ont été extraits au soxhlet (méthode #3540): 20 g de sol additionnés de *p*-terphényl (standard de récupération) ont été séchés avec du sulfate de sodium anhydre, extraits avec du chlorure de méthyle et purifiés sur une colonne de silice avec un mélange chlorure de méthylène/hexane (20/80%, v/v) avant d'être concentrés (2 mL) et analysés quantitativement par GC/MS d'après la méthode de l'US-EPA #8270.

5.2.3.3 Pentachlorophénol

Le pentachlorophénol (PCP) a été choisi, en plus des HAP, comme indicateur d'une contamination par des produits de préservation du bois. L'échantillon de 20 g de sol, ayant reçu un ajout dosé de tétrachlorophénol, a subi le même traitement que décrit ci-dessus pour

les HAP excepté que du méthanol a été utilisé pour la purification et que les échantillons ont été analysés par HPLC (SP8800, détection par UV à 210 nm).

5.2.3.4 Métaux

Après digestion du sol avec un mélange d'acide nitrique et chlorhydrique, les concentrations en métaux ont été déterminées suivant les méthodes standard de l'APHA (American Public Health Association, 1989). Le plomb a été analysé par spectrométrie d'absorption à la flamme (#3111), l'arsenic et le sélénium par spectrométrie d'absorption atomique électrothermale (#3113) et les autres métaux par spectrométrie d'émission au plasma (#3120).

5.2.4 Caractérisation écotoxicologique

5.2.4.1 Biotests

Chaque échantillon de sol a été divisé en deux fractions: une utilisée avec les biotests en contact direct (phase solide) et l'autre produisant un éluat pour les biotests en phase liquide. La batterie de biotests utilisée pour évaluer la phase solide est donnée au tableau 5.3 et celle utilisée pour les éluats de sol au tableau 5.4. La description complète de chaque test est donnée au chapitre 2 de la thèse. La procédure standard d'éluat décrite par le MENVIQ (Joubert, 1980) a été utilisée, mais de l'eau douce (pH = 7.2-7.6; dureté 40-48 mg CaCO₃/L; alcalinité = 30-35 mg CaCO₃/L) préparée d'après l'US-EPA (Greene *et al.*, 1989) a remplacé l'eau déminéralisée.

Tableau 5.3: Batterie de biotests en contact direct pour évaluation de la phase solide

Biotest	Espèce	Méthode	Variables de mesure	Type de toxicité Niveau Trophique
Microtox® en phase solide	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	(Microbics, 1991)	émission de lumière 20 min	Sublétale aigüe Protiste, décomposeur
Germination de graine d'orge	<i>Hordeum vulgare</i> L.	(OCDE, 1984)	inhibition germination 5 j	Sublétale Chronique Plante, producteur primaire
Croissance de la tige d'orge	<i>Hordeum vulgare</i> L.	(OCDE, 1984)	inhibition croissance 14 j	Chronique Plante, producteur primaire
Germination de graine de laitue	<i>Lactuca sativa</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1989) p. 84-89	inhibition germination 5 j	Sublétale Chronique Plante, producteur primaire
Mortalité du ver de terre	<i>Eisenia foetida</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1989) p. 78-83	mortalité 14 j	Létale aigüe Animal, consommateur primaire

Tableau 5.4: Batterie de biotests en phase liquide pour évaluation des éluviats de sol

Biotest	Espèce	Méthode	Variables de mesure	Type de toxicité Niveau Trophique
Microtox®	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	(Environment Canada, 1992b)	émission de lumière 15 min	Sublétale aiguë Protiste, décomposeur
Élongation radiculaire	<i>Lactuca sativa</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1989) p. 90-95	inhibition croissance 5 j	Sublétale chronique Plante, producteur primaire
Croissance phytoplancton	<i>Selenastrum capricornutum</i>	(Environment Canada, 1992a)	inhibition croissance 96 h	Sublétale chronique Plante, producteur primaire
Mortalité de Daphnie	<i>Daphnia magna</i>	(Environnement Canada, 1990)	mortalité 48 h	Létale aiguë Animal, consommateur primaire
SOS Chromotest ±S9	<i>Escherichia coli</i>	(Fish <i>et al.</i> , 1987)	FICV	Chronique génotoxicité Protiste, décomposeur

5.2.4.2 Analyses statistiques

La détermination de la LOEC et de la NOEC s'est faite par comparaison des effets entre les témoins négatifs (3 réplicats) et chacune des concentrations en sol ou éluviat (3 réplicats par concentration); Une analyse de variance suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey ont été utilisés avec les données satisfaisant les conditions d'égalité des variances, de Normalité et d'indépendance (germination et croissance de l'orge, germination de la laitue, mortalité du ver, croissance phytoplanctonique). Un test non paramétrique, test U de Mann-Whitney, a été utilisé pour comparer 2 à 2 les témoins négatifs et les échantillons quand les conditions n'étaient pas vérifiées (élongation radiculaire et mortalité des daphnies). La détermination de la LOEC et de la NOEC pour les deux tests Microtox® n'a pas été possible car les dilutions n'ont pas été répliquées. Dans ce cas, le seuil toxique a été approximé par la concentration produisant 25% d'inhibition (CI25). Une régression sur la partie linéaire des pourcentages d'inhibition de bioluminescence en fonction du logarithme des concentrations (logiciel fourni avec le Microtox®) a permis de prédire la CI25 (Microbics, 1991). De plus, pour être consistant avec les autres biotests, l'unité de concentration du sol pour le

Microtox[®] en phase solide (qui est normalement exprimée en g/100 mL de milieu réactif) a été converti en pourcentage (% p/v).

5.3 Résultats et discussion

L'analyse chimique des sols "non-contaminés" n'a mis en évidence aucune contamination puisque les concentrations étaient presque toujours en dessous du critère A du MENVIQ. Les résultats de caractérisation chimique des sols "non-contaminés" sont donnés au tableau 5.1. Les résultats d'analyse chimique et d'activité biologique ont été déjà publiés (Samson *et al.*, 1994). Ces études ont démontré que le critère B du MENVIQ pour les huiles et graisses minérales avait été atteint (en dessous de 1000 mg/kg). La contamination en hydrocarbure a diminué pendant le biotraitement de $2,112 \pm 615$ mg/kg ($n = 8$) dans l'échantillon Dec91 ($1,782$ mg/kg ($n = 1$)) détecté dans l'échantillon Ctl), à $1,512$ ($n = 1$) et 688 ± 228 mg/kg ($n = 8$) pour Apr92 et Aug92 respectivement (Samson *et al.*, 1994). Ces résultats mettent en évidence l'importante hétérogénéité de la contamination. L'hétérogénéité du sol a été confirmée par l'étude d'autres paramètres tels la granulométrie et la microbiologie (Desrochers *et al.*, 1993; Samson *et al.*, 1994).

Pour chaque sol, le résultat des biotests montrant une réponse positive est donné au tableau 5.5. Pour cinq des biotests utilisés, aucune réponse toxique n'a été observée avec les sols testés; il s'agit de la germination de la laitue (phase solide), le Microtox[®], l'élongation racinaire de la laitue et l'inhibition de croissance phytoplanctonique (élutriat). L'absence d'effet sur la bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* a déjà été mis en évidence et a été attribuée à la très faible solubilité ou toxicité de ces composés (Eisman *et al.*, 1991). Les autres résultats ont montré que les biotests étaient sensibles aux sols même si la contamination était très faible ou en dessous du critère A du MENVIQ. Ces observations seront discutées test par test.

Tableau 5.5: Résultats de toxicité des sols non-contaminés et contaminés pendant le biotraitement pour chacun des biotests produisant une réponse positive.

	Sols non-contaminés				Biopile			
	Urb	AUr	Agr	FOr	Ctl	Dec91	Apr92	Aug92
Microtox® phase solide								
MT ^a (%)	97	85	83	100	91	93	93	94
CI25 (% p/v)	0.35	1.73	2.81	0.12	0.34	0.79	0.45	0.49
Germination orge								
MT (%)	0	0	0	0	0	28	18.6	0
NOEC/LOEC (% p/p)						56/100	56/100	
Mortalité ver								
MT (%)	0	0	0	0	0	n.d. ^b	100	0
NOEC/LOEC (% p/p)							56/100	
Mortalité daphnie								
MT (%)	0	0	40	0	0	0	0	40
NOEC/LOEC (% v/v)			32/56					18/32
SOS Chromotest								
FICV	1.5	1.3	1.7	1.5	1.7 ^c	1.7	2.5	2.5
Probabilité ^d	<0.01		<0.01	<0.01		<0.05	<0.01	<0.01
NOEC/LOEC (% v/v)	10/50		10/50	10/50		2/10	1/2	1/2
SOS Chromotest +S9								
FICV	1.5	1.2	1.2	1.0	1.0	1.5 ^c	1.9	1.9
Probabilité ^d	<0.01						<0.01	<0.01
NOEC/LOEC (% v/v)	10/50						10/50	10/50

^aAmplitude de la toxicité

^bNon déterminé

^cNon génotoxique même si FICV > 1.5. A620 (Absorbance avant correction pour la viabilité cellulaire) non significativement ($\alpha = 0.05$) supérieure au témoin.

^dProbabilité de Tukey pour A620

5.3.1 Biotests en phase solide

5.3.1.1 Microtox[®] en phase solide

Les concentrations en sols "non-contaminés" correspondant à 25% de réduction dans la lumière émise par *P. phosphoreum* (tableau 5.5) indique que la toxicité apparente de ces sols se classe entre toxique et très toxique. Les valeurs d'inhibition d'émission de lumière en fonction des concentrations sont données à la figure 5.1a. Le sol FOr s'est révélé apparemment très toxique pour *P. phosphoreum*, ayant inhibé l'émission de lumière dès 0.3% (p/v). Ce résultat est surprenant puisque ce sol provenait d'une zone forestière et présentait de très faibles niveaux en contaminants (tableau 5.1). En comparant les courbes de toxicité des sols "non-contaminés" (figure 5.1a) aucune tendance concernant l'effet du pH, de la CEC ou de la texture n'est suggérée.

Pour le sol contaminé avec les produits pétroliers, les CI25 étaient comprises entre 0.4 et 0.8% (p/v) (tableau 5.5). De plus, en comparant les courbes de réponse de chaque échantillon de sol (figure 5.1b), la décontamination ne semble pas modifier l'effet produit par le sol. Ces échantillons de sol sont apparus moins toxiques que les sols "non-contaminés" Urb et FOr.

Cependant, le fait que tous les sols testés, contaminés ou non, ont produit un effet suggère que le sol lui-même interfère avec le test. Ceci a d'ailleurs été observé lors d'essais (cf chapitre 2).

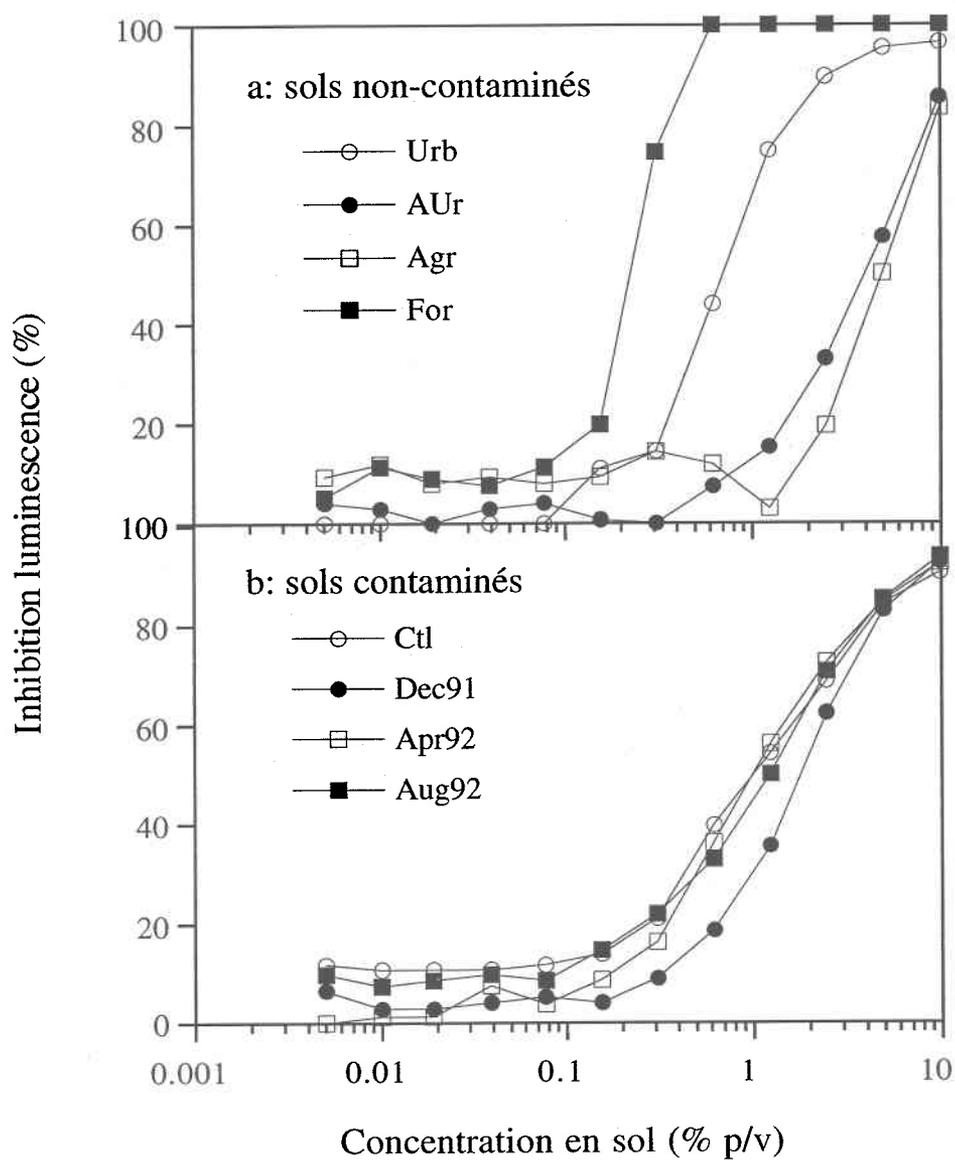


Figure 5.1: Inhibition d'émission de lumière, telle que mesurée par le Microtox[®] en phase solide après 20 min d'exposition avec les sols "non-contaminés" (a) et les sols contaminés échantillonnés pendant le biotraitement (b)

5.3.1.2 Germination de graines et croissance de pousses d'orge

Le design de ce biotest exploite à la fois les capacités de croissance des pousses et de germination des graines d'orge (*Hordeum vulgare*). La croissance des pousses d'orge a été stimulée (20%) par le sol "non-contaminé" AUr. Le sol Ctl de la pile témoin et les sols biotraités ont également stimulé la croissance: 40% pour Ctl et 100% pour Dec91, Apr92 et Aug92. Cette augmentation pour les échantillons biotraités peut être en partie expliquée par l'addition de nutriments afin d'aider les micro-organismes à dégrader les polluants. Sheppard *et al.* (1993) indiquent que l'addition de nutriments est une variable clef influençant le biotest mesurant les effets sur un cycle de vie de la plante *Brassica rapa*, et ont observé que le type de sol a un effet significatif sur le poids sec des pousses. La présence de composés associés à la contamination en hydrocarbures, tel l'acide naphthénique, peut également avoir stimulé la croissance (Fattah et Wort, 1970). Même si la fertilité du sol a été améliorée (peut-être par les nutriments), la germination de graines d'orge a été significativement inhibée par deux des sols contaminés (figure 5.2). Cet effet d'inhibition a été le plus important avec l'échantillon Dec91 et a diminué dans les échantillons suivants. Il apparaît que la procédure de traitement (amendements par exemple) a eu un effet négatif sur la germination de graines d'orge et que cet effet a diminué pendant le biotraitement. Une attention particulière devrait être apportée à la comparaison des réponses de germination et de croissance de graines d'orge. Un même sol peut affecter une même espèce de deux manières différentes: inhibition de la germination et stimulation de la croissance des pousses.

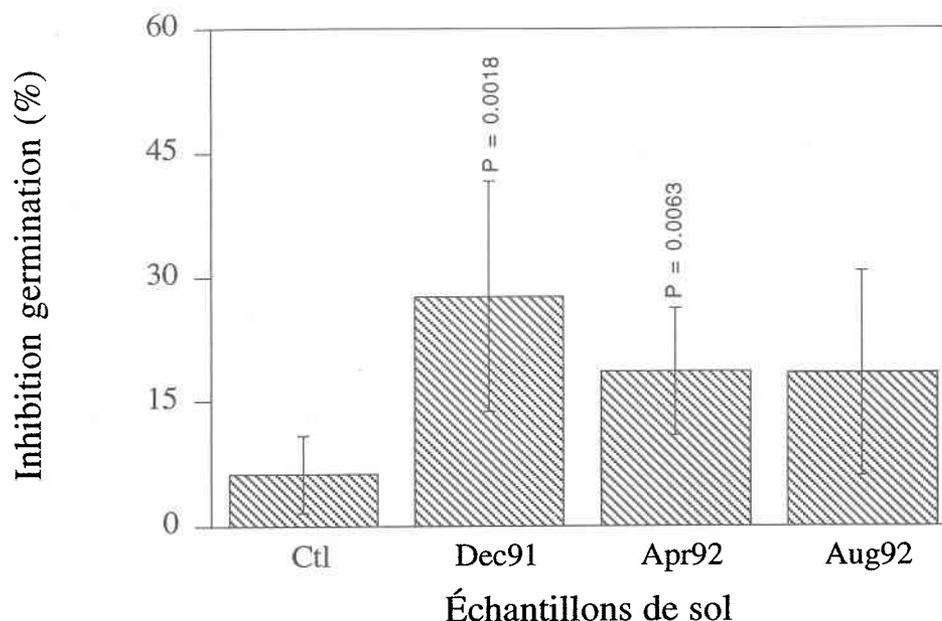


Figure 5.2: Inhibition de germination de graines d'orge (*Hordeum vulgare*) après 14 j, pour les échantillons contaminés (concentration en sol de 100%) à différents temps de traitement. Moyennes (n = 3) ± écarts types. Probabilité de Tukey indiquée pour différence significative avec témoin négatif.

5.3.1.3 Mortalité des vers

Aucun effet toxique n'a été détecté lorsque les vers (*Eisenia foetida*) ont été placés en contact avec les sols "non-contaminés". Une différence significative entre les taux de survie de *Lumbricus terrestris* dans des sols variés a pourtant été remarquée (Sheppard et Evenden, 1992). Cette différence a été reliée aux natures acide (pH 5.1-5.9) et sableuse du sol, bien que dans notre étude, *E. foetida* ne semble sensible ni aux conditions acides (pH 4.8) ni à la texture sableuse du sol Agr. L'échantillon Apr92 a été fatal pour les vers et la courbe dose-réponse est très abrupte (figure 5.3): tous les animaux sont morts dans le réplicata de sol 100%. La mortalité des vers n'a pas été observée dans les échantillons Ctl et Aug92 (Dec91 n'a pas été analysé). Ce résultat peut être associé à une apparition transitoire de toxicité pendant le biotraitement ou avec une mauvaise sélection des échantillons bien qu'une attention particulière a été prise pour randomiser et homogénéiser les échantillons.

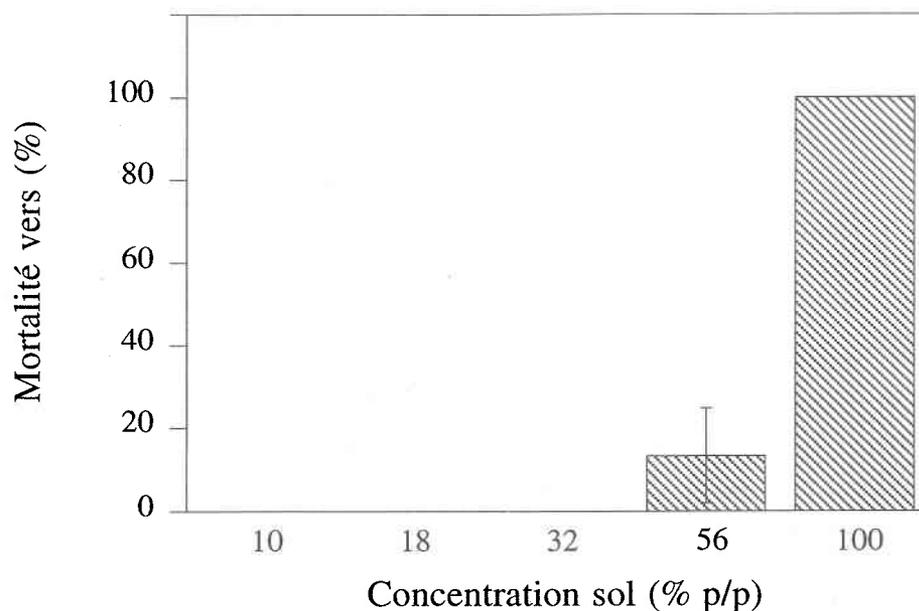


Figure 5.3: Mortalité des vers (*Eisenia foetida*) après 14 j à différentes concentrations du sol Apr92. Moyennes (n = 3) ± écarts types.

5.3.2 Biotests sur éluutriats

5.3.2.1 Croissance phytoplanktonique

Le seul effet détecté avec ce biotest a été la stimulation de la croissance de l'algue (*Selenastrum capricornutum*) avec les éluutriats des sols "non-contaminés" AUr et Agr. La stimulation a été maximum à 32% (v/v) d'éluutriat et a correspondu à une augmentation dans la densité cellulaire de 58% et 95% pour les sols AUr et Agr respectivement. Ce phénomène assez commun avec les algues (Hino, 1984; Thomas *et al.*, 1986; Nyholm et Källqvist, 1989; Wren et McCarroll, 1990; van Ewijk et Hoekstra, 1993), a déjà été observé avec des éluutriats de sol (Thomas *et al.*, 1986), et est expliqué par une présence accrue de sels minéraux et de nutriments essentiels dans les sols agricoles. Cependant il faut attirer l'attention sur ce phénomène de stimulation de croissance qui s'est également produit avec la croissance de l'orge (sol AUr et sols contaminés). Dans les biotests exploitant la croissance de plante, la stimulation peut masquer certains effets toxiques et aussi indiquer la possible eutrophisation des eaux de surface. Cependant ces problèmes ne peuvent être considérés tant

qu'aucune étude n'aura été menée afin de vérifier si la stimulation de plante observée pendant l'exécution d'un biotest reflète l'eutrophisation. Aucun effet détectable n'a été mesuré avec les éluviats de sol contaminés. En plus de la faible solubilité des hydrocarbures pétroliers, il a été montré que l'huile brute perdait ses effets toxiques sur la croissance de *Selenastrum* après seulement 48 h dans un modèle d'écosystème d'eau douce (Werner *et al.*, 1985).

5.3.2.2 Mortalité des daphnies

La mortalité de *Daphnia magna* a été observée en présence des éluviats des sols "non-contaminés" Agr et biotraités Aug92 (figure 5.4). Puisque les concentrations en contaminants testés dans le sol Agr étaient particulièrement faibles (tous les contaminants choisis pour l'analyse étaient en dessous des limites de détection, tableau 5.1), les effets observés ne peuvent être attribués à l'un de ces contaminants. Cependant un mélange de composés organiques peut contribuer à la toxicité vis-à-vis de *D. magna*, même si chacun des composés du mélange est présent à une concentration extrêmement faible (Deener *et al.*, 1988). De plus, l'analyse chimique ne pouvait être exhaustive, et puisque le sol Agr est d'origine agricole, des fertilisants et/ou des pesticides peuvent être présents. Ce sol présentait aussi une très faible CEC_{eff} et un pH acide. Un taux maximum de mortalité de 40%, une LOEC de 56% et une NOEC de 32% ont été déterminés pour le sol Agr.

L'éluviat de l'échantillon Aug92 a produit la mortalité significative de *D. magna* (tableau 5.5 et figure 5.4). Malgré un taux de mortalité supérieur à celui du sol Agr, les seuils plus importants du sol Aug92, déterminés à 32% pour la LOEC et 18% pour la NOEC, indiquent qu'un effet toxique a apparemment été produit par cet échantillon. De plus, cet effet ne peut être attribué aux caractéristiques du sol contaminé puisqu'aucun effet n'a été détecté avec les échantillons Ctl, Dec91 et Apr92. Bien que des études précédentes ont mis en évidence l'effet nocif des huiles brutes sur des espèces de daphnies (Wong *et al.*, 1981; Wong *et al.*, 1983), les effets présentement observés ne peuvent être nécessairement attribués à ce type de composés. Comme il l'a été observé avec le test de mortalité du vers, un ou des composés toxiques ont pu être formés ou devenir biodisponibles à la fin du procédé. Une apparition transitoire de la toxicité mesurée par le test d'immobilisation de *D. magna* a déjà été montrée durant la biorestauration d'un site contaminé aux HAP (Hund et Traunspurger, 1994); cette augmentation temporaire de l'effet toxique a été expliquée par la formation possible de composés intermédiaires pour lesquels les daphnies ont semblé posséder des sites spécifiques de réaction.

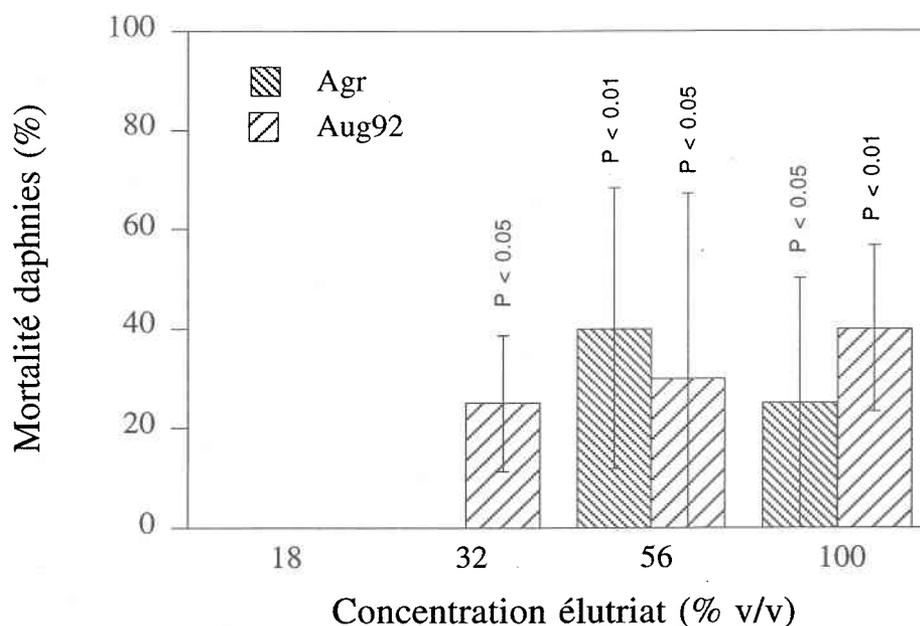


Figure 5.4: Mortalité de daphnies (*Daphnia magna*) après 48 h, à différentes concentrations en échantillons Agr et Aug92. Moyennes (n = 4) ± écarts types. Probabilité de Mann-Whitney indiquée pour différence significative avec témoin négatif.

5.3.2.3 SOS Chromotest

Le SOS Chromotest, à la fois en présence et en absence de la fraction d'activation de foie de rat (S9), s'est révélé être le biotest le plus sensible de la batterie puisque six des huit sols testés étaient positifs.

Trois sols "non-contaminés" (Urb, Agr et For) ont donné une réponse positive en absence de S9, alors qu'un seul (Urb) l'était toujours après activation de l'échantillon. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur des sols agricoles avec les test utilisant *Salmonella* et *Aspergillus* (Göggelmann et Spitzauer, 1983; Brown *et al.*, 1985; Jones et Peace, 1989), démontrant que ces types de sol peuvent avoir un niveau inhérent d'activité mutagénique. La présence de HAP mutagènes (fluoranthrène, benzo(a)pyrène et benzo(a)anthracène) dans le sol Urb, même à très faible concentration (tableau 5.1), peut en partie expliquer la génotoxicité détectée par le SOS Chromotest en présence de S9 (Mersch-Sundermann *et al.*,

1992). Malheureusement, les concentrations transférées dans l'élutriat n'ont pas été analysées. Göggelmann et Spitzauer (1983) ont établi une relation entre les HAP à très faible concentration dans les sols et l'activité génotoxique. La contamination atmosphérique semble être l'explication la plus plausible dans le cas des sols urbains. Des études ont montré que les particules atmosphériques sont génotoxiques car elles transportent des HAP (Tokiwa *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1980). De plus, il a été démontré sur base de données historiques que ces particules atmosphériques sont responsables de la contamination du sol en HAP (Jones *et al.*, 1989). Quelques HAP ont été détectés dans le sol AUr, mais ce sol n'a pas rencontré le critère pour le classer génotoxique.

Les HAP ne sont pas les seuls composés pouvant être impliqués, puisque tous les types de sol, c. à d. urbain, forestier et agricole, sont apparus génotoxiques. De nombreux composés naturels ou d'origine anthropogénique pourraient être responsables de l'activité génotoxique: (i) dépôts atmosphériques (contamination de type nitroaromatiques par exemple) (Tokiwa *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1980), (ii) pesticides (Kada *et al.*, 1974), (iii) composés naturellement présents dans les plantes tels anthraquinones (Brown *et al.*, 1977), benzoxazinones et dérivés (Hashimoto *et al.*, 1979), composants de la fougère (Evans, 1984), (iv) composés naturellement présents dans les micro-champignons du sol, comme les mycotoxines du *Fusarium* qui peuvent être carcinogéniques (Schoental, 1984).

Le niveau inhérent de génotoxicité retrouvé dans les sols "non-contaminés" démontre la grande variabilité de réponse du SOS Chromotest lorsque des sols présentant des propriétés physico-chimiques différentes sont testés. Cependant, la présence de composés qui interférait avec la réaction enzymatique du test pourrait entraîner la génération de faux-positifs. Peu d'information est disponible sur l'utilisation d'élutriats de sol avec le SOS Chromotest. Dans le but d'augmenter la confiance en ce test lorsqu'il est utilisé pour évaluer des polluants dans les sols, un nombre important de sols non-contaminés devraient être testés. Ceci fournirait une valeur fiable de niveau inhérent de génotoxicité donnée par le SOS Chromotest.

De la génotoxicité, principalement attribuable à des agents actifs directement, a été détectée dans les échantillons de sol pendant le traitement (tableau 5.5). Les résultats de FICV pour les échantillons Ctl et Dec91 sont comparables à la génotoxicité inhérente des sols "non-contaminés". Par contre, la génotoxicité relevée avec les élutriats des échantillons Apr92 et Aug92 était plus importante que celle des sols "non-contaminés", à la fois en terme de seuil

toxique (LOEC/NOEC) et d'amplitude de la génotoxicité (FICV). Bien que ces sols étaient contaminés aux hydrocarbures pétroliers (diesel), les HAP n'y ont pas été détectés (Samson *et al.*, 1994). Cependant, des HAP, même présents en quantité minime, pourraient contribuer à la génotoxicité détectée. Ainsi il a été montré que des HAP en combinaison avec des composés aliphatiques, comme le dodécane, avaient une activité carcinogénique (Goldschmidt, 1981; Kipling, 1984). De plus l'augmentation évidente de la génotoxicité de l'élutriat de sol pendant le traitement suggère l'apparition d'un ou plusieurs composés mutagéniques ou d'une biodisponibilité accrue des composés déjà présents. L'apparition transitoire de la mutagénicité pendant la biodégradation de HAP a déjà été notée (Wang *et al.*, 1990), et une activité mutagénique a été observée pendant l'évaluation d'un déchet de raffinerie de pétrole pour lequel l'analyse chimique n'avait pu identifier la présence de composés génotoxiques (Donnelly *et al.*, 1985).

5.4 Conclusion

Peu de biotests ont été développés pour le contact direct, et la toxicologie terrestre n'est pas encore un domaine très étudié. La caractérisation écotoxicologique de sols "non-contaminés" a démontré qu'un sol peut posséder un niveau inhérent de (géo)toxicité. Trois biotests (Microtox[®] en phase solide, mortalité des daphnies et SOS Chromotest) ont réagi à des facteurs physico-chimiques inconnus (composants de l'élutriat, présence naturelle de composés toxiques par exemple) alors que les autres biotests n'y ont pas été sensibles. La méthodologie analytique pour l'utilisation de certains biotests nécessite cependant d'être améliorée. Le Microtox[®] en phase solide ne semble pas approprié pour prédire la toxicité pendant la restauration de sol. Plus de recherche est nécessaire pour connaître les facteurs qui influencent la réponse de ce biotest.

La contamination du sol avant traitement n'a pas produit d'effets toxiques sur les organismes utilisés dans les biotests. Cependant, pendant le procédé, il y a eu apparition de toxicité. L'interprétation globale des résultats a été rendue difficile du fait de leur hétérogénéité d'un test à l'autre et d'un échantillon à l'autre. Cette hétérogénéité est due à l'important volume de la biopile, 1500 m³, qui entraîne des variations dans la distribution des contaminants, des agents structurants et des nutriments et rend difficile le contrôle de la température, de l'aération et de l'humidité pendant la phase de biodégradation. Certains biotests n'ont pas détecté d'effet toxique durant le traitement; d'autres en ont révélé soit au cours, soit à la fin du traitement. Un outil permettant l'intégration de ces résultats et leur comparaison avec ceux des sols non-contaminés est donc nécessaire.

6 INDICE ÉCOTOXICOLOGIQUE POUR LES SOLS (IES) ET NIVEAU ÉCOTOXICOLOGIQUE ACCEPTABLE POUR LES SOLS (NEAS)

6.1 Introduction

L'hétérogénéité des résultats de toxicité durant le procédé de traitement de sol étudié au chapitre 5, autant au cours du traitement qu'entre les différents biotests, a rendu difficile l'interprétation des résultats. Le développement d'un outil permettant l'intégration des résultats a donc été suggéré. Ce chapitre propose une approche nouvelle pour évaluer et comparer la toxicité de sols contaminés en utilisant deux concepts: l'Indice écotoxicologique pour les sols (IES) et le niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS). Afin qu'une évaluation écotoxicologique soit valide, il est important de travailler avec une batterie de biotests représentative des différents types de toxicité et niveaux trophiques (Ahlf et Förstner, 1988; Hund et Traunspurger, 1994). Cette batterie doit refléter les effets toxicologiques pouvant survenir dans l'environnement. Étant donné qu'un nombre croissant de biotests dans une batterie rend la comparaison de différents échantillons de plus en plus compliquée, le développement d'un outil permettant de les intégrer est nécessaire.

6.1.1 Indice écotoxicologique pour les sols (IES)

Un indice permettant l'évaluation et la comparaison du potentiel toxique d'effluents industriels a été développé récemment (Costan *et al.*, 1993). En intégrant les résultats de biotests de dépistage, l'indice PEEP (*Potential Ecotoxic Effect Probe*) considère la persistance de la toxicité (biodégradabilité), la (multi)spécificité de l'impact toxique, aussi bien que le débit de l'effluent, et fournit une valeur numérique. Sur le modèle de l'indice PEEP, nous proposons maintenant un nouvel indice qui permettrait la gestion de données écotoxicologiques sur les sols. La (multi)spécificité de l'impact toxique, l'ampleur de l'effet toxique et la persistance de l'effet toxique après dilution du sol sont considérées dans l'Indice écotoxicologique pour les sols (IES).

6.1.2 Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS)

Si des évaluations écotoxicologiques doivent être réalisées afin de juger de l'efficacité de procédés de décontamination, il est important d'établir un point de référence en fonction de la

réponse des biotests à différents sols "non-contaminés" (voir chapitre 5). Pour ce faire, le concept d'un Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS) est introduit dans cette étude. Le NEAS est une valeur calculée à partir des résultats de sols non-contaminés obtenus avec une batterie spécifique de biotests. Avec l'objectif d'être utile pour de nombreuses évaluations écotoxicologiques de sol, le NEAS doit être établi avec des sols ayant des origines et des caractéristiques pédologiques diverses. Chaque modification apportée à la batterie nécessite une nouvelle détermination du NEAS. Dans le but de fournir une valeur numérique au NEAS, l'Indice écotoxicologique pour les sols (IES), qui considère les données obtenues de tous les biotests pour un sol, est requis. Pour chaque sol non-contaminé, le résultat de chaque biotest est intégré en utilisant la formule de l'IES, et la moyenne des valeurs obtenues donne le NEAS pour la batterie. La même formule de l'IES est appliquée aux résultats des sols contaminés, et les valeurs obtenues peuvent être comparées à la valeur du NEAS.

Les objectifs ont été (i) de définir un Indice écotoxicologique pour les sols (IES) et un Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS), (ii) de fournir une valeur de NEAS associée à la batterie de biotests, et (iii) d'évaluer avec ces outils l'efficacité du traitement biologique du sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers (cf. chapitre 5).

6.2 Modèle théorique

6.2.1 Variables de mesures et formules de calcul

Alors que les réponses aiguës des biotests sont souvent exprimées par des concentrations médianes (CI50 ou CL50), les réponses chroniques sont plutôt exprimées par des valeurs seuils ou chroniques dérivées des concentrations de LOEC/NOEC. Toutes les variables mesurées produisent une information valide, mais pour un sol ou un éluat de sol (échantillons non concentrables), il n'est pas toujours possible d'estimer la concentration médiane. La persistance de l'effet toxique après dilution du sol a été donnée par le seuil toxique en unités (géno)toxiques (TU) (Sprague et Ramsay, 1965; Horning et Webber, 1985). Pour chaque biotest, la moyenne géométrique de la NOEC et de la LOEC a été déterminée et utilisée pour calculer le seuil toxique comme suit:

$$TU = \frac{100\%}{\sqrt{LOEC \times NOEC}} \quad (1)$$

En conséquence une augmentation dans les valeurs de TU indique une augmentation dans la toxicité apparente.

Cependant, le seuil toxique ne tient pas compte de la pente de la courbe dose-réponse et de la toxicité effective qu'un échantillon de sol produit. La toxicité maximale observée fournit une information additionnelle au seuil toxique en donnant l'impact toxique d'un échantillon. L'amplitude de l'effet toxique (MT) est donc donnée par l'effet maximum produit pour un échantillon en termes de pourcentage d'inhibition ou de mortalité, sans tenir compte de la concentration en sol ou en éluat.

La valeur de toxicité (T) introduit dans une formule les deux concepts de seuil toxique et d'amplitude de l'effet toxique. La toxicité T d'un sol ou d'un éluat de sol pour un biotest donné est le seuil (géo)toxique (TU) pondéré par l'amplitude de l'effet toxique (MT), tel qu'exprimé par la formule (2).

$$T = \frac{TU \times MT}{100} \quad (2)$$

Cette valeur mesurée permet de différencier deux sols produisant le même seuil toxique (TU), mais des amplitudes de l'effet toxique inégales, puisqu'ils ne produiraient pas le même impact.

Dans le but d'uniformiser les variables mesurées le FICV maximal du SOS Chromotest a été transformé en valeur relative (%) tel que montré dans l'équation (3).

$$MT = FICV \times 20\% \quad (3)$$

Les valeurs de FICV varient en théorie de 1.5 (critère pour la génotoxicité) à 25, mais une réponse de 5 reflète généralement un échantillon très génotoxique. Une valeur de MT de 100% est donc attribuée aux FICV supérieurs ou égaux à 5, et pour les valeurs inférieures à 5, un facteur de multiplication de 20 est utilisé pour transformer les FICV en MT.

6.2.2 Calcul de l'IES

La formule de l'IES est basée sur le concept et la structure de l'indice PEEP (Costan *et al.*, 1993) et tient compte de (i) la (multi)spécificité de l'impact toxique, (ii) l'ampleur de l'effet toxique et (iii) la persistance de l'effet toxique après dilution du sol ou seuil toxique. Ces facteurs sont intégrés dans la formule suivante:

$$S = \text{Log}_{10} \left[1 + n \times \frac{\sum_{i=1}^N T_i}{N} \right] \quad (4)$$

où S est la valeur numérique de l'IES pour un échantillon de sol testé, N est le nombre de biotests dans la batterie, n est le nombre de biotests enregistrant une réponse (géo)toxique et T_i est la toxicité particulière (obtenue de l'équation (2)) pour chacun des i biotests. Le coefficient n dans la formule de l'IES pénalise les sols avec des effets multitrophiques ou multispécifiques. Par exemple pour une toxicité moyenne ($\sum T_i/N$), le plus grand nombre de réponses toxiques positives va produire la plus forte valeur d'IES. La formule de l'IES considère donc l'impact multitrophique comme une menace plus sérieuse que l'agression d'une espèce unique. Les valeurs finales de l'IES sont exprimées en logarithmes décimaux. Une telle transformation permet que l'échelle des IES n'excède pas 10 ($\text{Log}_{10} 10^{10} = 10$) même si en théorie l'échelle des toxicités (T) pourrait varier de zéro à l'infini. Un exemple de calcul de l'IES est donnée dans la section 6.3 *Résultats et discussion*. De plus, le lecteur peut se référer à Costan *et al.* (1993) pour plus de détails.

6.2.3 Calcul du NEAS

Une valeur de Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS) pour une batterie complète de biotest peut être calculée comme suit. Les valeurs de toxicité (T_{ij}) déterminées par chaque biotest i pour chacun des sols non-contaminés sont utilisées pour calculer les valeurs S_j de chaque sol j en utilisant la formule de l'IES (4). La moyenne de ces valeurs S_j donne le NEAS. Le calcul détaillé pour la présente étude est donnée dans la section 6.3 *Résultats et discussion*. Dans le but de connaître la variation des réponses toxiques des différents sols "non-contaminés", l'écart type a été calculé. Pour un échantillon de sol donné, une valeur de S plus grande que celle du NEAS indique que le sol est toxique, alors qu'une valeur plus petite indique un effet plus faible que la toxicité inhérente d'un sol.

6.3 Résultats et discussion

L'Indice écotoxicologique pour les sols (IES) et le Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS) sont des outils d'analyse de danger et de risque pour évaluer la toxicité des sols. Ils ne peuvent remplacer les résultats de chacun des tests de la batterie, mais les rassemblent simplement pour aider la prise de décision. Les valeurs de toxicité des échantillons de sol non-contaminés ainsi que de ceux prélevés durant le traitement ont été utilisées dans ce chapitre pour fournir une valeur de NEAS et évaluer l'efficacité du biotraitement des sols contaminés aux hydrocarbures. Le tableau 5.5 fournit les valeurs numériques nécessaires aux calculs de l'indice pour chaque échantillon de sol. Étant donné qu'une recherche plus approfondie sur la conception du Microtox[®] en phase solide est requise avant de l'utiliser dans une évaluation écotoxicologique, les résultats obtenus durant la présente étude n'ont pas été intégrés dans les calculs de IES et NEAS. Le calcul détaillé des valeurs de T et de S sont donnés ci-après comme exemple numérique avec l'échantillon de sol Apr92. La toxicité T est obtenue pour chaque biotest à partir des résultats de toxicité (tableau 5.5). D'après les résultats de germination de graine d'orge, le seuil toxique TU pour l'échantillon Apr92 était de 1.34 ($= 100/(100 \times 56)^{1/2}$, équation 1). Le seuil toxique TU est alors pondéré en le multipliant par l'amplitude de l'effet toxique MT (= 18.6%), donnant une toxicité T de 0.25 ($= 1.34 \times 18.6/100$, équation 2). Pour les résultats du SOS Chromotest, le FICV de cet échantillon en absence de S9 est simplement converti en pourcentage en le multipliant par 20, donnant une valeur de 50 ($= 2.5 \times 20$, équation 3). Les valeurs T pour chaque test, disponibles au tableau 6.1 sont intégrées par la formule de l'IES pour fournir une valeur de S de 1.21 pour l'échantillon Apr92 ($= \text{Log}[1+4 \times (0.25+1.34+34.79+1.66)/10]$, équation 4), où la toxicité moyenne ($= 38.04/10$) a été multipliée par le nombre de tests positifs (= 4). La stimulation a été ignorée pour les tests de croissance de pousses d'orge et d'algues. Dans de tels cas, la valeur de T est zéro. la formule de l'IES permet le calcul de la valeur S pour chacun des sols "non-contaminés" (tableau 6.1). La valeur du NEAS de 0.10 est donnée par la moyenne arithmétique de ces valeurs de S ($= (0.19+0+0.17+0.05)/4$).

Le NEAS, qui sert de point de référence permettant l'interprétation des valeurs de S obtenues pour chaque échantillon de sol contaminé pendant le biotraitement, a été calculé à 0.10 pour la batterie de dix biotests (Microtox[®] en phase solide exclu). Un écart type de 0.09 a été calculé, indiquant la grande variabilité dans la toxicité des sols "non-contaminés", mais

l'intervalle de confiance n'a pas été calculé puisque les conditions statistiques requises ne peuvent être vérifiées. Étant donné qu'il n'y avait pas assez d'échantillon Dec91 pour exécuter deux des biotests (germination de la laitue et mortalité du ver), une autre valeur de NEAS pour comparaison avec cet échantillon a été calculée. Enlever ces deux biotests de la batterie a donné une valeur de NEAS de 0.12.

Tableau 6.1: valeurs de toxicité T et calculs de l'Indice écotoxicologique des sols (S)

Tests	Valeurs de T				Valeurs de T			
	Sols Non-contaminés				Sols de la Biopile			
	Urb	AUr	Agr	FOr	Ctl	Dec91	Apr92	Aug92
Phase Solide								
Croissance plante orge	0	0	0	0	0	0	0	0
Germination graine orge	0	0	0	0	0	0.38	0.25	0
Germination graine laitue	0	0	0	0	0		0	0
Mortalité ver	0	0	0	0	0		1.34	0
Élutriat								
Microtox [®]	0	0	0	0	0	0	0	0
Élongation radiculaire	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance phytoplancton	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalité daphnie	0	0	0.94	0	0	0	0	1.67
SOS Chromotest - S9	1.33	0	1.50	1.33	0	7.65	34.79	34.93
SOS Chromotest + S9	1.33	0	0	0	0	0	1.66	1.69
Valeurs de S	0.19	0	0.17	0.05	0	0.48 ^a	1.21	1.10

^aValeur obtenue avec N = 8 biotests. Germination graine de laitue et mortalité de ver non réalisés.

La valeur de S obtenue pour l'échantillon Ctl de sol contaminé aux hydrocarbures aliphatiques est inférieure au NEAS, alors que celle des échantillons Dec91, Apr92 et Aug92 y sont supérieures (tableau 6.1). Il y a donc indication que l'échantillon prélevé avant traitement ne présentait pas de toxicité plus importante que celle relevée dans des sols urbains, agricoles ou forestiers. En conséquence la contamination de 2000 mg/kg d'hydrocarbures, même si elle se situe entre les critères B et C du MENVIQ, ne semble pas présenter de danger; malgré tout d'autres considérations concernant le devenir des

contaminants (par exemple bioaccumulation, bioconcentration, biotransformation, mobilité) devraient être prises en compte. Puisqu'aucune réplication des échantillons n'a été effectuée, une différence statistiquement significative entre les valeurs de S de Dec91, Apr92 et Aug92 et le NEAS n'a pu être établie. Cependant les valeurs de S pour Apr92 et Aug92 sont supérieures au NEAS d'un ordre de grandeur (échelle logarithmique), indiquant que des facteurs inconnus ont augmenté la toxicité apparente du sol durant la biodégradation. Ces effets ont été d'autant plus détectable qu'aucun effet n'était mesurable avant traitement. Il y a donc de bonnes indications que l'évaluation écotoxicologique a révélé des conditions néfastes, principalement associées à la toxicité animale et à la génotoxicité, qui n'ont pas été détectées par l'évaluation chimique. Puisque la valeur de S était plus importante pour l'échantillon Apr92 que pour Aug92, cette apparition de la toxicité était peut-être transitoire. Dans ce cas, l'arrêt du biotraitement a été trop précoce pour permettre une détoxification complète. Les amendements (nutriments, gypse et brin de scie) ont augmenté la valeur de S au début du traitement (Dec91), mais pas d'une façon inquiétante. L'absence d'analyse statistique rend la comparaison avec le NEAS difficile pour cet échantillon. Cependant, la libération de certains composés du bois a pu être responsable des effets observés avec le sol amendé de brin de scie ou avec le sol forestier. En effet, l'inhibition de l'activité méthanogénique a été causée par de la résine et des composés de l'écorce (Sierra-Alvarez *et al.*, 1994). Malgré l'absence d'analyse statistique, le potentiel de l'indice, associé au NEAS, pour refléter les résultats d'une batterie complète de biotests a été démontré.

6.4 Conclusion

L'indice IES et la valeur du NEAS définis dans ce chapitre, ont fourni un moyen d'évaluer écotoxicologiquement un sol contaminé et l'efficacité d'un biotraitement. L'indice IES fournit une variable globale pour les mesures écotoxicologiques. Lorsqu'il est associé au NEAS, il permet d'apprécier l'ampleur de la détoxification pendant un procédé de décontamination. Il pourrait également être utile comme outil environnemental pour l'établissement de carte de toxicité ou pour le classement des contaminants dans la préparation des futures directives. Un nombre plus important de sols "non-contaminés" analysés et la réplication des analyses, permettraient l'analyse statistique et en conséquence, rendraient ces outils plus précis.

Le concept de NEAS, introduit dans cette étude, peut permettre la différenciation entre la toxicité intrinsèque du sol et la toxicité des contaminants. De plus, avec le concept de NEAS, les biotests développés pour les eaux de surface (Microtox[®], croissance phytoplanktonique, mortalité de daphnies) peuvent être utilisés pour l'évaluation des éluviats de sol. Une valeur numérique de 0.10 a été calculée pour la batterie de biotests utilisée dans cette étude.

La contamination du sol avant traitement n'a pas produit d'effets toxiques sur les organismes utilisés dans les biotests. Cependant, pendant le procédé, il y a eu apparition de toxicité. L'intérêt d'effectuer un biotraitement dans une telle situation reste évident si les facteurs suivants sont considérés. La biodégradation des polluants est un phénomène naturel qui peut survenir sans l'intervention humaine, mais le procédé de traitement permet le contrôle dans les mouvements des contaminants et augmente les taux de biodégradation. Les résultats de cette étude suggèrent que les procédures utilisées dans ce traitement industriel (amendements, agents stabilisants, etc...) ont pu avoir des effets sur les biotests utilisés. Ceci démontre la nécessité d'une évaluation écotoxicologique, en plus de la caractérisation chimique, pendant le biotraitement d'un sol.

7 CONCLUSION GÉNÉRALE ET RECOMMANDATIONS

L'objectif de ce projet a été d'évaluer la relation biodécontamination-détoxication sur des systèmes sol/liquide, en appliquant l'évaluation écotoxicologique par le biais d'une batterie de biotests standardisés. Une approche pratique sur trois systèmes biologiques a permis d'étudier l'applicabilité et les limites de l'évaluation écotoxicologique, et de connaître l'efficacité de détoxication des biotraitements. Un système expérimental simple de colonnes sol/liquide de biodégradation de composés dérivés de la créosote a été étudié avec un biotest. Par ailleurs, un système expérimental de simulation d'épandage de boue après "biolixiviation" des métaux lourds, et un système à grande échelle de biodégradation *ex situ* d'hydrocarbures aliphatiques contaminant un sol ont été ensuite étudiés avec une batterie complète de biotests. Les conclusions et recommandations pour chaque objectif de recherche sont présentées dans ce chapitre.

1 - Une batterie incluant cinq biotests en contact direct avec le sol et cinq mesurant la toxicité d'échantillons aqueux a été élaborée. Cette batterie inclut les tests suivants: Microtox[®] en phase solide, germination de graine d'orge, croissance de la tige d'orge, germination de graine de laitue, mortalité du ver de terre, Microtox[®], élongation radiculaire, croissance phytoplanctonique, mortalité de daphnie et SOS Chromotest \pm S9.

2 - L'hypothèse selon laquelle la décontamination est accompagnée d'une réduction de la toxicité a été vérifiée dans un système contrôlé en colonnes. L'utilisation d'un seul biotest pour effectuer l'évaluation a restreint la conclusion à l'efficacité de biotraitabilité du système. Ainsi, il ne peut être affirmé que les métabolites formés n'ont pas d'effets sur d'autres espèces ou ne présentent pas d'activité mutagène, par exemple.

L'abaissement dans les concentrations en métaux lourds par le traitement de biolixiviation des boues s'est également accompagné d'une diminution des effets toxiques mesurés par les biotests de la batterie.

L'hypothèse selon laquelle la décontamination est accompagnée d'une réduction de la toxicité a été rejetée dans le cas étudié du suivi d'un traitement industriel de biostimulation du sol

contaminé aux hydrocarbures. L'apparition d'effets toxiques a été observée avec certains biotests (germination de graine d'orge, mortalité du ver et des daphnies, SOS Chromotest), confirmant la nécessité d'utiliser une batterie diversifiée pour évaluer un procédé de traitement. Il faut toutefois réaliser la grande hétérogénéité des paramètres physico-chimiques et biologiques qui se retrouvent dans une biopile de 1500 m³.

L'évaluation écotoxicologique a donc prouvé qu'elle pouvait être un outil fiable pour connaître l'efficacité de détoxification d'un procédé biotechnologique, mais il est important de rester conscient de ses limites. Principalement, l'évaluation écotoxicologique, telle qu'appliquée, ne peut fournir de relation de causalité entre l'élimination des contaminants et celle des effets toxiques. Ainsi, la réduction des effets toxiques ne peut être directement expliquée par la diminution des métaux dans les boues. De même, la cause de l'apparition d'effets toxiques au cours du traitement du sol ne peut être déterminée par l'évaluation écotoxicologique. Il s'agit d'une méthode de détection globale des effets toxiques, qui peuvent être dus à la contamination initiale, aux agents de la biodégradation, aux métabolites, ou aux changements survenus dans la biodisponibilité des contaminants.

3 - L'application de la batterie de biotests en contact direct pour évaluer les boues d'épuration a été rendue possible par simulation de l'épandage agricole. Cependant, les deux tests de germination ont été sensibles à la présence des boues, même traitées, aux taux d'épandage supérieurs à ceux pratiqués en agriculture (> 18 g de boue par L de sol). Dans ce cas, il n'a pas été possible de distinguer l'effet physico-chimique des boues de l'effet d'une contamination résiduelle après traitement. Ce phénomène a également été observé avec l'ensemble des biotests (excepté SOS Chromotest) exécutés sur les éluviats de boue, quelque soit la concentration, rendant l'éluviat moins intéressante que le contact direct.

La capacité du traitement de biolixiviation à réduire la toxicité des boues a été confirmée par l'étude de la bioaccumulation des métaux dans les vers et les pousses d'orge. Les analyses de bioaccumulation ont aussi permis de démontrer que le traitement des boues a diminué les concentrations biodisponibles en cuivre, zinc et manganèse.

4 - L'existence d'une éventuelle "toxicité" inhérente des sols a été détectée par certains biotests. Ainsi, le Microtox[®] en phase solide, le test de mortalité des daphnies et le SOS Chromotest ont réagi à des facteurs physico-chimiques inconnus (particules du sol, composants de l'éluviat, présence naturelle de composés toxiques par exemple) alors que les

autres biotests n'y ont pas été sensibles. Cette sensibilité des tests est importante à considérer si l'objectif de la décontamination est d'éliminer la toxicité due aux contaminants.

5 - L'indice écotoxicologique pour les sols (IES) et le Niveau écotoxicologique acceptable pour les sols (NEAS) définis dans cette recherche, ont fourni des moyens d'évaluer écotoxicologiquement le sol contaminé aux hydrocarbures et de juger de l'efficacité du biotraitement. L'indice IES fournit une variable globale pour les mesures écotoxicologiques qui tient compte de la (multi)spécificité de l'impact toxique, de l'ampleur de l'effet toxique et de la persistance de l'effet toxique après dilution du sol. Lorsqu'il est associé au NEAS, il permet d'apprécier l'ampleur de la détoxification pendant un procédé de décontamination. Il pourrait également être utile comme outil environnemental pour l'établissement de cartes de toxicité ou pour le classement des contaminants dans la préparation des futures directives. Le NEAS est un point de référence calculé à partir de la réponse des différents biotests de la batterie à des sols non-contaminés de textures différentes. Un nombre plus important de sols non-contaminés analysés et la réplication des analyses, permettrait l'analyse statistique et en conséquence, rendrait ces outils plus précis.

6 - Chaque biotest de la batterie a pu être évalué pour sa capacité à détecter des effets toxiques dans des matrices solides (sol ou boue) ou durant un procédé de traitement. Les observations qui ont été faites pendant ce projet ainsi que les éventuelles recommandations sont compilées ci-après test par test:

- Germination et croissance de graines: Les tests de germination de graines de laitue (*Lactuca sativa*) et d'orge (*Hordeum vulgare*) et de croissance des pousses d'orge ont donné des résultats intéressants avec les matrices solides. Ces tests sont sensibles à la contamination, tolérants aux différents sols non-contaminés et faciles à réaliser. La germination de l'orge a été plus sensible au traitement du sol alors que celle de la laitue l'a été plus à l'épandage des boues.

- Mortalité des vers (*Eisenia foetida*): ce test simple à exécuter s'est également révélé un outil de détection sensible. Les vers ne semblent pas être affectés par la texture du sol, les amendements au traitement du sol, ni par la présence des boues. Au contraire, la matière organique présente dans les boues a contribué à leur croissance et les vers en ont éliminé l'odeur nauséabonde. Ces vers s'avèrent donc excellents pour évaluer des boues dans les conditions d'épandage testées. Des effets sublétaux, tels la bioaccumulation, peuvent

également être étudiés en utilisant cette procédure, puisque les vers peuvent facilement être séparés du sol après l'exposition. Cependant, la mort en cascade des individus d'un même réplicat a été observée. Il est donc suggéré de séparer les individus.

- Microtox® en phase solide (*Photobacterium phosphoreum*): ce test n'a pu être utilisé au sein de la batterie étant donné que la présence des particules de sol semblait interférer avec la lecture photométrique de la bioluminescence. Des essais infructueux ont également été obtenus avec une procédure du SOS Chromotest adaptée aux phases solides. Cette fois encore l'interférence des particules avec la lecture colorimétrique n'a pas permis l'utilisation du test. Des recherches plus approfondies sur la conception de ces tests sont requises.

- Microtox® (*Photobacterium phosphoreum*): ce biotest très rapide a été un très bon indicateur des effets toxiques produits par les eaux souterraines et les éluviats de boue. Il serait cependant intéressant, pour une question de représentativité, d'utiliser une bactérie luminescente indigène du sol (issue du génie génétique). L'utilisation d'un tel organisme éviterait l'addition importante de sels au milieu réactionnel qui peuvent influencer la spéciation des métaux et donc modifier les effets des éluviats.

- Élongation racinaire de la laitue (*Lactuca sativa*): une importante variabilité a été observée aux faibles concentrations en éluviat. L'enroulement des racines lorsqu'elles poussent, c. à d. lorsque les concentrations en inhibiteurs sont faibles, a pu causer des difficultés à les mesurer. Il est donc suggéré de canaliser la pousse des racines.

- Croissance phytoplanctonique (*Selenastrum capricornutum*): le test mesurant les effets sur la croissance de l'algue *S. capricornutum* a été infructueux durant les trois études. Pendant l'évaluation des sols, les éluviats n'ont produit que des effets de stimulation de la croissance, rendant difficile l'interprétation. L'apparition massive de bactéries pendant l'incubation des algues en présence des éluviats de boue a empêché leur dénombrement et suggère que la population algale soit absolument axénique et l'échantillon stérile. La présence de sels (amendements) pendant le traitement en colonne n'a pas permis l'utilisation des algues, qui y sont sensibles, pour évaluer les contaminants. Ces résultats suggèrent que le test de croissance phytoplanctonique est difficilement applicable à l'évaluation de sols, de boues et de traitements comprenant des amendements de sels.

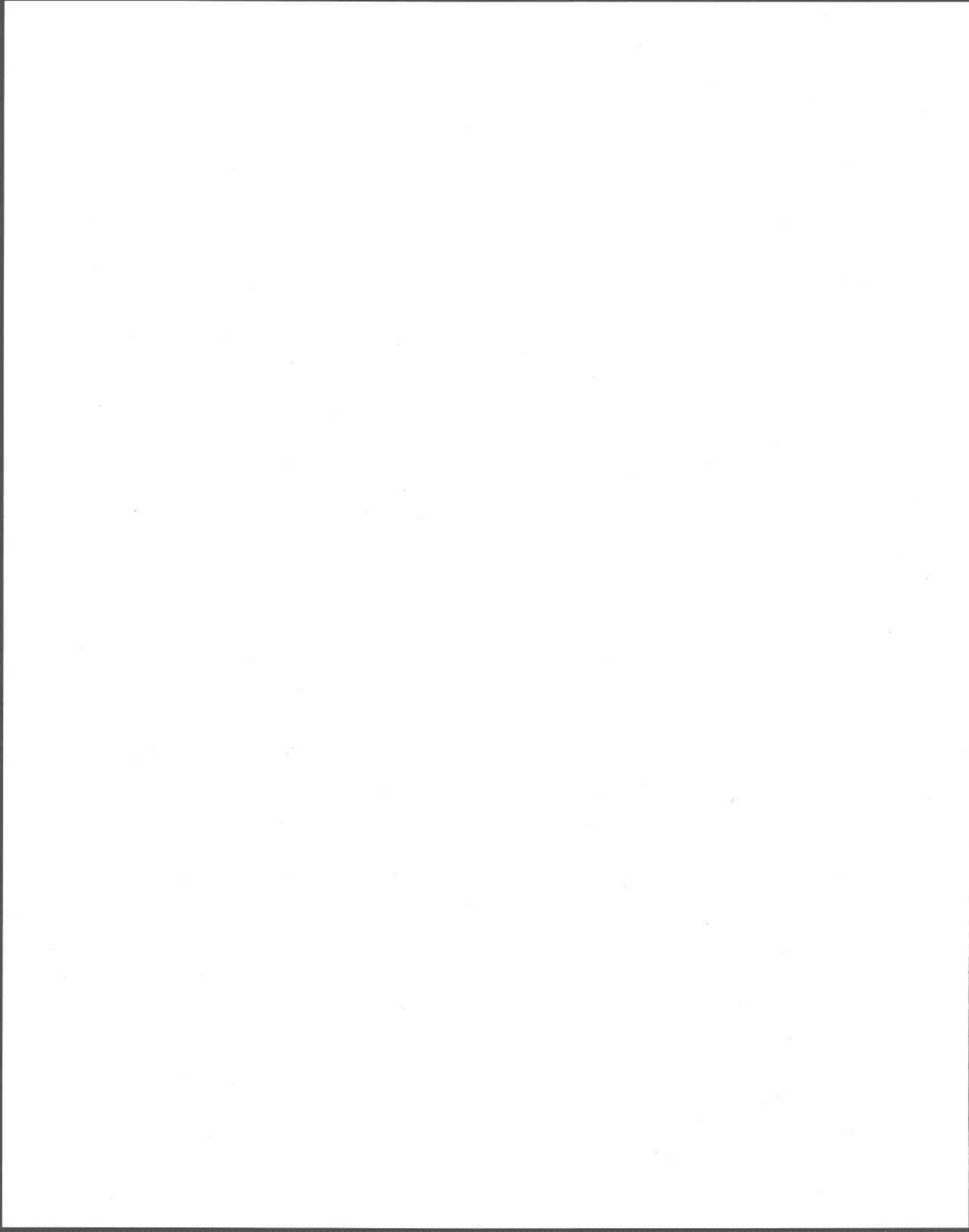
- Mortalité des daphnies (*Daphnia magna*): ce biotest est sensible, puisqu'il a permis de détecter l'apparition d'effets produits par les éluviats de sol pendant le biotraitement des

hydrocarbures. Cependant certaines limitations doivent être considérées au moment de l'utilisation de ce test: (i) les résultats doivent absolument être comparés à un sol témoin car les daphnies sont sensibles à la présence d'élutriats de sol non-contaminés et (ii) la conductivité de l'échantillon doit être surveillée car elle semble influencer la mortalité. De plus, une forte variabilité des résultats, apparemment due au nombre réduit d'organismes employés, a été observée, rendant difficile l'analyse statistique.

-SOS Chromotest: ce test a fourni des résultats intéressants au cours de l'étude des sols, puisqu'il a permis de détecter l'apparition d'effets en cours de traitement. Cependant, il peut également détecter des effets avec des sols "non-contaminés" indiquant qu'il ne peut être appliqué à des échantillons d'élutriat de sol sans contrôles appropriés.

Les effets de la manipulation des échantillons d'élutriat de boue sur la toxicité ont été vérifiés avec le Microtox®. L'irradiation, ainsi que la congélation à -20°C pendant 3 mois, ont eu pour effet de diminuer les effets toxiques mesurés par le Microtox®. L'effet de la congélation a été confirmé par le test d'élongation radiculaire. Aucune interaction entre l'irradiation et le traitement des boues ou la congélation et le traitement des boues n'a été détectée, ce qui a permis l'évaluation du traitement par la comparaison des échantillons manipulés de façons identiques. Il est parfois difficile d'éviter la manipulation des échantillons, mais il est nécessaire de connaître quels en sont les effets et, s'ils existent, de s'assurer qu'ils n'interfèrent pas avec le traitement.

7 - L'étude a également permis la caractérisation toxicologique de certains des composés étudiés dans les conditions de contamination du sol ou de l'eau. Ce type de caractérisation n'avait pas ou peu fait l'objet d'études jusqu'à présent. Ainsi, une contamination du sol de l'ordre de 2000 mg/kg d'huiles et graisses minérales, identifiées comme étant des hydrocarbures aliphatiques de 14 à 24 carbones, n'a eu d'effet sur aucun des biotests de la batterie, ce qui porte à croire que cette contamination est sans danger direct. Le phénanthrène et le fluorène, isolément en phase aqueuse, ont produit des effets inhibiteurs de l'émission de la luminescence chez *P. phosphoreum*, bien que leur solubilité est relativement faible. Par contre, le carbazole s'est révélé faiblement toxique aux concentrations solubles. L'effet de la contamination en métaux des boues n'a pu, par la procédure utilisée, être distinguée de l'effet des boues.



BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, C. K. et R. C. Sims (1991). Evaluation of interphase transfer, chemical alteration, and detoxification in treatability testing for remediation of contaminated soil. Dans: *Air & Waste Management*. Vancouver, BC.
- Adema, D. M. M. (1978). *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59(2):125-134.
- Ahlf, W. et U. Förstner (1988). Toxicant screening in soil using bioassays. Dans: K. Wolf, W. J. van den Brink et F. J. Colon (éds), *Contaminated Soil'88*. Hamburg, Germany, Kluwer Academic Publishers, p. 459-466.
- Al-Bashir, B., T. Cseh, R. Leduc et R. Samson (1990). Effect of soil/contaminant interactions on biodegradation of naphtalene in flooded soil under denitrifying conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:414-418.
- Alabaster, J. S., D. Calamari, M. Grande, T. B. Hasselrot, R. Lloyd et V. Mitrovic (1973). Water quality criteria for european freshwater fish: report on monohydric phenols and inland fisheries. *Water Research*, 7:929-941.
- Alexander, M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211:132-138.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego, Academic Press, 302 p.
- Alloway, B. J. (1990). *Heavy metals in soils*. Glasgow, Blackie, 339 p.
- Alloway, B. J. et A. P. Jackson (1991). The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils. *Science of the Total Environment*, 100:151-176.
- American Public Health Association (1989). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. Washington, APHA, 1585 p.
- Ames, B. N., F. D. Lee et W. E. Durston (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3):782-786.
- Ames, B. N., J. McCann et E. Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31:347-364.
- Aprill, W., R. C. Sims, J. L. Sims et J. E. Matthews (1990). Assessing detoxification and degradation of wood preserving and petroleum wastes in contaminated soil. *Waste Management & Research*, 8:45-65.

- Athey, L. A., J. N. Thomas, J. R. Skalski et W. E. Miller (1987). *Role of Acute Toxicity Bioassays in the Remedial Action Process at Hazardous Waste Sites*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/8-87/044.
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1):180-209.
- Attar, E. N. et E. J. Maly (1982). Acute toxicity of cadmium, zinc, and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11:291-296.
- Babich, H. et G. Stotsky (1986). Environmental factors affecting the utility of microbial assays for the toxicity and mutagenicity of chemical pollutants. Dans: B. J. Dutka et G. Bitton (éds), *Toxicity testing using microorganisms*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 9-42.
- Baird, D. J., I. Barber, M. Bradley, P. Calow et A. M. V. M. Soares (1989). The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, 188/189:403-406.
- Baird, D. J., I. Barber, M. Bradley, A. M. V. M. Soares et P. Calow (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21:257-265.
- Banta, A. M. (1921). A convenient culture medium for daphnids. *Science*, 53:557-558.
- Barkay, T., D. F. Shearer et B. H. Olson (1986). Toxicity testing in soil using microorganisms. Dans: B. J. Dutka et G. Bitton (éds), *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 133-155.
- Battista, J. R., E. C. Donnelly, T. Ohta et G. C. Walker (1990). The SOS response and induced mutagenesis. *Mutation and the Environment*. Willey-Liss, p. 169-178.
- Baudouin, M. F. et P. Scoppa (1974). Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(6):745-751.
- Beaubien, A., L. Lapierre, A. Bouchard et C. Jolicoeur (1986). A multispecies toxicity assessment procedure using flow Microcalorimetry: Comparison with other toxicity evaluation methods. *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 1(2):187-200.
- Becker, D. S. et T. C. Ginn (1995). Effects of storage time on toxicity of sediments from Puget Sound, Washington. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(5):829-835.
- Belfroid, A., W. Seinen, K. Vangestel et J. Hermens (1993). The acute toxicity of chlorobenzenes for earthworms (*Eisenia andrei*) in different exposure systems. *Chemosphere*, 26(12):2265-2277.
- Belkin, S., M. Stieber, A. Tiehm, F. H. Frimmel, A. Abeliovich, P. Werner et S. Ulitzur (1994). Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons' biodegradation. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9:303-309.

- Bellavere, C. et J. Gorbi (1981). A comparative analysis of acute toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Biomphalaria glabrata*, and *Brachydanio rerio*. *Environmental Technology Letters*, 2:119-128.
- Benmoussa, H., R. D. Tyagi, P. G. C. Campbell et J. F. Blais (1994). Lixiviation biologique des métaux lourds et stabilisation des boues municipales. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 29(1):39-52.
- Benton, M. J., M. L. Malott, S. S. Knight, C. M. Cooper et W. H. Benson (1995). Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(3):411-414.
- Bergström, L., A. McGibbon, S. Day et M. Snel (1991). Leaching potential and decomposition of clopyralid in swedish soils under field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:563-571.
- Biesinger, K. E. et G. M. Christensen (1972). Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 29:1691-1700.
- Bitton, G. et B. Koopman (1986). Biochemical tests for toxicity screening. Dans: G. Bitton et B. J. Dutka (éds), *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 27-55.
- Black, J. A., W. J. Birge, A. G. Werterman et P. C. Francis (1983). Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Fundamental and Applied Toxicology*, 3:353-358.
- Blais, J.-F., J. C. Auclair et R. D. Tyagi (1992a). Cooperation between two *Thiobacillus* strains for heavy-metal removal from municipal sludge. *Canadian Journal of Microbiology*, 38:181-187.
- Blais, J.-F., R. D. Tyagi et J. C. Auclair (1992b). Bioleaching of trace metals from sewage sludge by indigenous sulfur-oxidizing bacteria. *Journal of Environmental Engineering*, 118(5):690-707.
- Blais, J. F., R. D. Tyagi et J. C. Auclair (1993). Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth kinetics. *Water Research*, 27(1):101-110.
- Blaise, C. R. (1986). Micromethod for acute aquatic toxicity assessment using the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 1:377-385.
- Blum, D. J. W. et R. E. Speece (1991a). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Research Journal of Water Pollution Control Federal*, 63(3):198-207.
- Blum, D. J. W. et R. E. Speece (1991b). Quantitative structure-activity relationships for chemical toxicity to environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22:198-224.
- Bossert, I., W. M. Kachel et R. Bartha (1984). Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4):763-767.

- Brown, J. P., P. S. Dietrich et R. J. Brown (1977). Frameshift mutagenicity of certain naturally occurring phenolic compounds in the *Salmonella*/microsome test: activation of anthraquinone and flavonol glycosides by gut bacterial enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 5:1489-1492.
- Brown, K. W. et K. C. Donnelly (1983). Influence of soil environment on biodegradation of a refinery and a petrochemical sludge. *Environmental Pollution (Series B)*, 6:119-132.
- Brown, K. W. et K. C. Donnelly (1988). *The stability and mobility of mutagenic activity from wastewater and sludge in agricultural soils*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/S1-88/002.
- Brown, K. W., K. C. Donnelly, J. C. Thomas et P. Davol (1985). Mutagenicity of three agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 41:173-186.
- Bulich, A. A. (1979). Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environment. Dans: L. L. Markings et R. A. Kimerle (éds), *Aquatic Toxicology*. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, p. 98.
- Bulich, A. A. (1986). Bioluminescence assays. Dans: G. Bitton et B. J. Dutka (éds), *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 57-74.
- Bulich, A. A., M. W. Greene et D. L. Isenberg (1981). Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents. Dans: *Aquatic toxicology and hazard assessment: fourth conference ASTM STP 737*, D. R. Branson et K. L. Dickson (éds), p. 338-347. American Society for Testing and Materials.
- Butler, G. C. (1984). Developments in ecotoxicology. *Ecological Bulletins*, 36:9-12.
- Cairns, J., J. et B. R. Niederlehner (1995). *Ecological Toxicity Testing: Scale, Complexity and Relevance*. Boca Raton, FL, Lewis, 228 p.
- Callahan, C. A., M. A. Shirazi et E. F. Neuhauser (1994). Comparative toxicity of chemicals to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(2):291-298.
- Calleja, A., J. M. Baldasano et A. Mulet (1986). Toxicity analysis of leachates from hazardous wastes via Microtox and *Daphnia magna*. *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 1(1):73-83.
- Carlson, C. E. A. et G. M. Morrison (1992). Fractionation and toxicity of metals in sewage sludge. *Environmental Technology*, 13:751-759.
- Carlson, C. L., D. C. Adriano, K. S. Sajwan, S. L. Abels, D. P. Thoma et J. T. Driver (1991). Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air, and Soil Pollution*, 59:231-240.
- Carlson-Ekval, C. E. A. et G. M. Morrison (1995). Toxicity of copper in the presence of organic substances in sewage sludge. *Environmental Technology*, 16(3):243-251.

- Carpenter, S. R., J. F. Kitchell et J. R. Hodgson (1985). Cascading trophic interactions and lake productivity. *BioScience*, 35(10):634-638.
- Carver, J. H., M. L. Machado et J. A. MacGregor (1986). Application of modified Salmonella/microsome prescreen to petroleum-derived complex mixtures and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). *Mutation Research*, 174:247-253.
- Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3:351-368.
- Chaney, R. L. (1990). Public health and sludge utilization. *BioCycle*, 31(October 1990):68-73.
- Chang, A. C., T. C. Granato et A. L. Page (1992). A methodology for establishing phytotoxicity criteria for chromium, copper, nickel, and zinc in agricultural land application of municipal sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*, 21(4):521-535.
- Chiang, T. C., C. A. Valkenberg, D. A. Miller et G. W. Sovocool (1989). *Performance testing of method 1312*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/4-89/022.
- Codina, J. C., A. Perezgarcia, P. Romero et A. Devicente (1993). A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25(2):250-254.
- Connor, M. S. (1984). Monitoring sludge-amended agricultural soils. *BioCycle*, 25(1):47-51.
- Costan, G., N. Burmingham, C. Blaise et J. F. Ferard (1993). Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8:115-140.
- Costello, M. J. et P. Read (1994). Toxicity of sewage sludge to marine organisms: a review. *Marine Environmental Research*, 37:23-46.
- Crosby, D. G. et R. K. Tucker (1966). Toxicity of aquatic herbicides to *Daphnia magna*. *Science*, 154:289-291.
- Cunningham, J. D., J. A. Ryan et D. R. Keeney (1975). Phytotoxicity in and metal uptake from soil treated with metal-amended sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*, 4(4):455-460.
- Curry, J. P. (1988). The ecology of earthworms in reclaimed soils and their influence on soil fertility. Dans: C. A. Edwards et E. F. Neuhauser (éds), *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, The Netherlands, SPB Academic Publishing, p. 251-261.
- Daley, P. S. (1989). Cleaning up sites with on-site process plants. *Environmental Science and Technology*, 23(8):912-916.

- Dasappa, S. M. et R. C. Loehr (1991). Toxicity Reduction in contaminated soil bioremediation processes. *Water Research*, 25(9):1121-1130.
- Davis, J. G., L. R. Hossner et N. Persaud (1993). Elemental toxicity effects on germination and growth of pearl millet seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 16(10):1957-1968.
- Davis, R. D. et C. H. Carlton-Smith (1984). An investigation into the phytotoxicity of zinc, copper and nickel using sewage sludge of controlled metal content. *Environmental Pollution (Series B)*, 8:163-185.
- Davol, P., K. C. Donnelly, K. W. Brown, J. C. Thomas, M. Estiri et D. H. Jones (1989). Mutagenic potential of runoff water from soils amended with three hazardous industrial wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8:189-200.
- Dean, B. J. (1978). Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research*, 47:75-97.
- Dean, R. B. et M. J. Suess (1985). The risk to health of chemicals in sewage sludge applied to land. *Waste Management & Research*, 3:251-278.
- Deener, J. W., T. L. Sinnige, W. Seinen et J. L. M. Hermens (1988). The joint acute toxicity to *Daphnia magna* of industrial organic chemicals at low concentrations. *Aquatic Toxicology*, 12:33-38.
- Deichmann, W. M. B. et S. Witherup (1944). The acute and comparative toxicity of phenol and *o*-, *m*- and *p*-cresols for experimental animals. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 80:233-240.
- DeLeon, I. R., J. B. Ferrario et C. J. Byrne (1988). Bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by the clam, *Rangia cuneata*, in the vicinity of a creosote spill. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41:872-879.
- Desrochers, R., T. Hawke, C. H. Nelson, R. Samson, M. St-Cyr et Michaud (1993). Biodégradation aérobie en conditions nordiques dans un sol argileux contaminé aux hydrocarbures. Dans: *3rd Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation*, p. 539-563. Québec, Canada.
- Dietrich, A. M., S. A. Chesnutt, L. A. Stone et D. L. Gallagher (1993). Determination of organic pollutants in land applied municipal wastewater sludges by toxicity characteristic leaching procedure (TCLP) and extraction procedure toxicity test (EP). *Water Environment Research*, 65(5):612-619.
- Donnelly, K. C., C. S. Anderson, J. C. Thomas, K. W. Brown, D. J. Manek et S. H. Safe (1992). Bacterial mutagenicity of soil extracts from a bioremediation facility treating wood-preserving waste. *Journal of Hazardous Materials*, 30:71-81.
- Donnelly, K. C., K. W. Brown, C. S. Anderson, G. C. Barbee et S. H. Safe (1990a). Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16:238-245.

- Donnelly, K. C., K. W. Brown et D. G. DiGiullio (1988a). Mutagenic characterization of soil and water samples from a superfund site. *Nuclear and Chemical Waste Management*, 8:133-141.
- Donnelly, K. C., K. W. Brown, M. Estiri, D. H. Jones et S. Safe (1988b). Mutagenic potential of binary mixtures on nitro-polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 24:345-356.
- Donnelly, K. C., K. W. Brown et B. R. Scott (1983). The use of short-term bioassays to monitor the environmental impact of land treatment of hazardous wastes. Dans: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. CLaxton, N. Chernoff et S. Nesnow (éds), *The Application of Short Term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures*. NY, Plenum, p. 59-78.
- Donnelly, K. C., K. W. Brown et J. C. Thomas (1990b). Bacterial mutagenicity of leachate water from municipal sewage sludge-amended soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:443-451.
- Donnelly, K. C., K. W. Brown, J. C. Thomas, P. Davol, B. R. Scott et D. Kampbell (1985). Evaluation of the hazardous characteristics of two petroleum wastes. *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, 2(2):191-208.
- Donnelly, K. C., P. D. Davol, K. W. Brown, M. Estiri et J. C. Thomas (1987). Mutagenic activity of two soils amended with a wood-preserving waste. *Environmental Science and Technology*, 21:57-64.
- Drewes, C. D., E. P. Vining et C. A. Callahan (1988). Electrophysiological detection of sublethal neurotoxic effects in intact earthworms. Dans: C. A. Edwards et E. F. Neuhauser (éds), *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, The Netherlands, SPB Academic Publishing, p. 355-366.
- Dudka, S. et A. Chlopecka (1990). Effect of solid-phase speciation on metal mobility and phytoavailability in sludge-amended soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 51:153-160.
- Dutka, B. J. et K. K. Kwan (1981). Comparison of three microbial toxicity screening tests with the Microtox test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 27:753-757.
- Dutka, B. J. et K. K. Kwan (1988). Battery of screening tests approach applied to sediment extracts. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 3:303-314.
- Eder, E., C. Deininger et W. Kütt (1989). Genotoxicity of monofunctional methanesulphonates in the SOS Chromotest as a function of alkylation mechanisms. A comparison with the mutagenicity in *S.typhimurium* TA100. *Mutation Research*, 211:51-64.
- Edwards, C. A. (1983). *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Commission of the European Communities, EUR 8714 EN.

- Eijsackers, H. (1994). Ecotoxicology of soil organisms: seeking the way in a pitch-dark labyrinth. Dans: M. H. Donker, H. Eijsackers et F. Heimbach (éds), *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Boca Raton, FL, Lewis, p. 3-32.
- Eisman, M. P., S. Landon-Arnold et C. M. Swidoll (1991). Determination of petroleum hydrocarbon toxicity with Microtox. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47:811-816.
- Elder, J. F. et P. V. Dresler (1988). Accumulation and bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in a nearshore estuarine environment near a Pensacola (Florida) creosote contamination site. *Environmental Pollution*, 49:117-132.
- Environment Canada (1992a). *Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using Freshwater Alga Selenastrum capricornutum*. Environment Canada, EPS 1/RM/25.
- Environment Canada (1992b). *Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (Photobacterium phosphoreum)*. Environment Canada, EPS 1/RM/24.
- Environnement Canada (1990). *Méthode d'Essai Biologique: Méthode de Référence pour la Détermination de la Létalité Aiguë d'Effluents chez Daphnia magna*. Environnement Canada, SPE 1/RM/14.
- Erickson, D. C., R. C. Loehr et E. F. Neuhauser (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Research*, 27(5):911-919.
- Evans, I. A. (1984). Braken carcinogenicity. Dans: C. E. Searle (éd.) *Chemical carcinogens*. Washington, DC, ACS Monograph 182, p. 1171-1204.
- Fattah, Q. A. et D. J. Wort (1970). Effect of light and temperature on stimulation of vegetative and reproductive growth of bean plants by naphthenates. *Agronomy Journal*, 62:576-577.
- Fender, N. M. (1985). Earthworm in the western US. Part 1. Genus *Eisenia* Malm, 1877. *Megadrilogica*, 4(5):117-120.
- Fish, F., I. Lampert, G. Halachmi, G. Riesenfeld et M. Herzberg (1987). The SOS Chromotest kit: a rapid method for the detection of genotoxicity. *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 2:135-147.
- Forbes, V. E. et T. L. Forbes (1994). *Ecotoxicology in Theory and Practice*. London, Chapman & Hall, 247 p.
- Forge, T. A., M. L. Berrow, J. F. Darbyshire et A. Warren (1993). Protozoan bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals, using the common soil ciliate *Colpoda steinii*. *Biology and Fertility of Soils*, 16(4):282-286.
- Foth, H. D. (1990). *Fundamentals of Soil Science*. New York, Wiley, 360 p.
- Fresquez, P. R., R. E. Francis et G. L. Dennis (1990). Sewage sludge effects on soil and plant quality in degraded, semiarid grassland. *Journal of Environmental Quality*, 19:324-329.

- Garberg, P., E.-L. Akerblom et G. Bolcsfoldi (1988). Evaluation of a genotoxicity test measuring DNA-strand breaks in mouse lymphoma cells by alkaline unwinding and hydroxyapatite elution. *Mutation Research*, 203:155-176.
- Gee, G. W. et J. W. Bauder (1986). Particle-size analysis. Dans: A. Klute (éd.) *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, p. 383-411.
- Gersich, F. M., F. A. Blanchard, S. L. Applegath et C. N. Park (1986). The precision of daphnid (*Daphnia magna* Straus, 1820) static acute toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 15:741-749.
- Giesy, J. P., R. L. Graney, J. L. Newsted, C. J. Rosiu et A. Benda (1988). Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit river sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7:483-498.
- Goats, G. C. et C. A. Edwards (1988). The prediction of field toxicity of chemicals to earthworms by laboratory methods. Dans: C. A. Edwards et E. F. Neuhauser (éds), *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, The Netherlands, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, p. 283-294.
- Göggelmann, W. et P. Spitzauer (1983). Mutagenic activity in agricultural soils. Dans: H. F. Stich (éd.) *Carcinogens and Mutagens in the Environment III. Naturally Occurring Compounds: Epidemiology and Distribution*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 177-183.
- Goldschmidt, B. M. (1981). Nonnitrogenous carcinogenic industrial chemicals. Dans: J. M. Sontag (éd.) *Carcinogens in Industry and the Environment*. New York, NY, Marcel Dekker, p. 283-343.
- Greene, J. C., C. L. Bartels, W. J. Warren-Hicks, B. R. Parkhurst, G. L. Linder, S. A. Peterson et W. E. Miller (1989). *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA 600/3-88/029.
- Greer, C. W., J. Hawari et R. Samson (1990). Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Archives of Microbiology*, 154:317-322.
- Gunkel, J., K. Ronnpagel et W. Ahlf (1993). Suitability of microbial bioassays for bound contaminants. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 21(4):215-220.
- Hartenstein, R. (1982). Effect of aromatic compounds, humic acids and lignins on growth of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 14:595-599.
- Hashimoto, Y., K. Shudo, T. Okamoto, M. Nagao, Y. Takahashi et T. Sugimura (1979). Mutagenicities of 4-hydroxy-1,4-benzoxazinones naturally occurring in maize plants and of related compounds. *Mutation Research*, 66:191-194.
- Hass, B. S., E. E. Brooks, K. E. Schumann et S. S. Dornfeld (1981). Synergistic, additive, and antagonistic mutagenic responses to binary mixtures of benzo(a)pyrene and

- benzo(e)pyrene as detected by strains TA98 and TA100 in the *Salmonella*/microsome assay. *Environmental Mutagenesis*, 3:159-166.
- Hastings, J. W. et K. H. Nealson (1977). Bacterial bioluminescence. *Annual Reviews in Microbiology*, 31:549-595.
- Hayes, W. J. (1991). Introduction. Dans: W. J. Hayes et E. R. Laws (éds), *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego, CA, Academic Press, p. 1-38.
- He, Q. B. et B. R. Singh (1993). Plant availability of cadmium in soils. 2. Factors related to the extractability and plant uptake of cadmium in cultivated soils. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 43(3):142-150.
- Heimbach, F. (1988). A comparison of laboratory methods for toxicity testing with earthworms. Dans: C. A. Edwards et E. F. Neuhauser (éds), *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, The Netherlands, SPB Academic Publishing, p. 329-335.
- Heitzer, A. et G. S. Sayler (1993). Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 11(8):334-343.
- Hermens, J., F. Busser, P. Leeuwangh et A. Musch (1985). Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum*: the Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:17-25.
- Hino, S. (1984). Algal growth stimulation by heterotrophic bacteria with lake sediment extract. *Japanese Journal of Phycology*, 32:124-129.
- Hoffmann, G. R. (1982). Mutagenicity testing in environmental toxicology. *Environmental Science and Technology*, 16(10):560A-574A.
- Hollstein, M., J. McCann, F. A. Angelosanto et W. W. Nichols (1979). Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 65:133-226.
- Hooda, P. S. et B. J. Alloway (1994). The plant availability and DTPA extractability of trace metals in sludge-amended soils. *Science of the Total Environment*, 149(1-2):39-51.
- Horning, W. B. et C. I. Webber (1985). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/2-85/014.
- Horowitz, M. (1976). Application of bioassay techniques to herbicide investigations. *Weed Research*, 16:209-215.
- Hsu, F. H. et C. H. Chou (1992). Inhibitory effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of miscanthus species. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 33(4):335-342.
- Huisman, O. et R. D'Ari (1981). An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E.coli*. *Nature*, 290:797-799.

- Hulm, S. C., D. L. Castle, K. Cook, A. Self et M. Wood (1991). Evaluation of soil microbial biomass methodology. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 30(3-4):183-192.
- Hulzebos, E. M., D. M. M. Adema, E. M. Dirvenvanbreemen, L. Henzen, W. A. Vandis, H. A. Herbold, J. A. Hoekstra, R. Baerselman et C. A. M. Vangestel (1993). Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(6):1079-1094.
- Hund, K. et W. Traunspurger (1994). Ecotox - Evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29(2):371-390.
- Hund, K., L. Zelles, I. Scheunert et F. Korte (1988). A critical estimation of methods for measuring side-effects of chemicals on microorganisms in soils. *Chemosphere*, 6:1183-1188.
- Ishida, M. (1972). Phytotoxic metabolites of pentachlorobenzyl alcohol. Dans: F. Matsumura, G. M. Boush et T. Misato (éds), *Environmental Toxicology of Pesticides*. New York, Academic Press, p. 281-306.
- Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima et M. Asamoto (1988). Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats - an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*, 9(3):387-394.
- Jenkins, R. J., J. Scheybeler, M. L. Smith, R. Baird, M. P. Lo et R. T. Haug (1981). Metal removal and recovery from municipal sludge. *Journal - Water Pollution Control Federation*, 53(1):25-32.
- Jones, K. C. et E. A. Peace (1989). The Ames mutagenicity assay applied to a range of soils. *Chemosphere*, 18(7-8):1657-1664.
- Jones, K. C., J. A. Stratford, K. S. Waterhouse, E. T. Furlong, W. Giger, R. A. Hites, C. Schaffner et A. E. Johnston (1989). Increase in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environmental Science and Technology*, 23:95-101.
- Joubert, G. (1980). *Protocole de lixiviation de déchets solides pour bioessais*. Ministère de l'Environnement du Québec.
- Juste, C. et P. Soldâ (1986). Heavy metal availability in long term experiments. Dans: R. D. Davis, H. Haeni et P. L'Hermite (éds), *Factors Influencing Sludge Utilisation Practices in Europe*. London, Elsevier, p. 13-25.
- Kada, T., M. Moriya et Y. Shirasu (1974). Screening of pesticides for DNA interactions by "Rec-Assay" and mutagenesis testing, and frameshift mutagens detected. *Mutation Research*, 26:243-248.
- Kaiser, K. L. E. et J. M. Ribo (1988). *Photobacterium phosphoreum* toxicity bioassay. II. Toxicity data compilation. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 3:195-237.

- Keddy, C., J. C. Greene et M. A. Bonnell (1994). *A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada*. Environment Canada, Scientific Series No. 198.
- Keddy, C. J., J. C. Greene et M. A. Bonnell (1995). Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30(3):221-251.
- Kenaga, E. E. (1978). Test organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals. *Environmental Science and Technology*, 12(12):1322-1329.
- Kenaga, E. E. (1981). Comparative toxicity of 131,596 chemicals to plant seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5:469-475.
- Khargarot, B. S. et P. K. Ray (1987). Correlation between heavy metal acute toxicity values in *Daphnia magna* and Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38:722-726.
- Khargarot, B. S. et P. K. Ray (1988). The confirmation of a mammalian poison classification using a water flea (*Daphnia magna*) screening method. *Archiv fuer Hydrobiologie*, 113(3):447-456.
- Kim, B. J. et C. S. Gee (1993). Hazardous waste treatment technologies. *Water Environment Research*, 65(4):430-441.
- Kipling, M. D. (1984). Soots, tars, and oils as causes of occupational cancer. Dans: C. E. Searle (éd.) *Chemical carcinogens*. Washington, DC, ACS Monograph 182, p. 165-174.
- Kirkham, M. B. (1975). Uptake of cadmium and zinc from sludge by barley grown under four different sludge irrigation regimes. *Journal of Environmental Quality*, 4(3):423-426.
- Klassen, C. D., M. O. Amdur et J. Doull (1986). *Casarett and Doull's Toxicology*. NY, Macmillan, 974 p.
- Kreuzig, R. et M. Bahadir (1991). Analytical methods of data gathering for risk assessment of contaminated soils in agricultural production. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 31-32:629-637.
- Kusk, K. O. (1981). Comparison of the effects of aromatic hydrocarbons on a laboratory alga and natural phytoplankton. *Botanica Marina*, 24:611-613.
- Kwan, K. K. et B. J. Dutka (1992). A novel bioassay approach: direct application of Toxi-Chromotest and SOS-Chromotest to sediments. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 7:49-60.
- Lake, D. L. (1986). Sludge disposal to land. Dans: J. N. Lester (éd.) *Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes. II. Treatment and disposal*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 91-130.

- Lake, D. L., P. W. W. Kirk et J. N. Lester (1984). Fractionation, characterization, and speciation of heavy metals in sewage sludge and sludge-amended soils: A review. *Journal of Environmental Quality*, 13(2):175-183.
- Landrum, P. F. et J. A. Robbins (1990). Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. Dans: R. Baudo, J. P. Giesy et H. Muntau (éds), *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Ann Arbor, USA, Lewis, p. 237-263.
- LeBlanc, G. A. (1980). Acute toxicity of priority pollutants to water flea (*Daphnia magna*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 24:684-691.
- Lebsack, M. E., A. D. Anderson, G. M. DeGraeve et H. L. Bergman (1981). Comparison of bacterial luminescence and fish bioassay results for fossil-fuel process waters and phenolic constituents. Dans: *Aquatic toxicology and hazard assessment: fourth conference ASTM STP 737*, D. R. Branson et K. L. Dickson (éds), p. 348-356. American Society for Testing and Materials.
- Lee, M. D., J. M. Thomas, R. C. Borden, P. B. Bedient, C. H. Ward et J. T. Wilson (1988). Biorestauration of aquifers contaminated with organic compounds. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 18(1):29-89.
- Legault, R., C. Blaise, D. Rokosh et R. Chongkit (1994). Comparative assessment of the SOS chromotest kit and the Mutatox test with the *Salmonella* plate incorporation (Ames test) and fluctuation tests for screening genotoxic agents. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9(1):45-57.
- Legret, M., L. Divet et P. Marchandise (1987). Mobilité et extraction des métaux lourds associés aux boues de stations d'épuration. *Water Research*, 21(5):541-547.
- Lester, J. N., R. M. Sterritt et W. W. Kirk (1983). Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes. II. Sludge treatment and disposal. *Science of the Total Environment*, 30:45-83.
- Lewis, P. A. et W. B. Horning (1991). Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:1351-1357.
- Lichtenstein, E. P. et K. R. Schulz (1960). Epoxidation of aldrin and heptachlor in soils as influenced by autoclaving, moisture, and soil types. *Journal of economic entomology*, 53(2):192-197.
- Little, J. W. et D. W. Mount (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29:11-22.
- Liu, D. (1986). Biodegradation tests. Dans: B. J. Dutka et G. Bitton (éds), *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 157-173.
- Luo, Y. M. et D. L. Rimmer (1995). Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 88(1):79-83.

- Ma, T.-H., S. S. Sandhu, T. D. Chen et T.-W. Kim (1991). Synergism and antagonism of genotoxic effects among the chemicals commonly found in the hazardous waste sites. Dans: *22nd Annual Scientific Meeting of the Environmental Mutagen Society*, vol. 0(19), p. 45-46. Kissimmee, Florida, USA. Environ. Mol. Mutagen. Suppl.
- Ma, W. (1982). The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metal in earthworms. *Pedobiologia*, 24:109-119.
- Ma, W. (1984). Sublethal toxic effects of copper on growth, reproduction and litter breakdown activity in the earthworm *Lumbricus rubellus*, with observations on the influence of temperature and soil pH. *Environmental Pollution (Series A)*, 33:207-219.
- MacDonald, J. A. et B. E. Rittmann (1993). Performance standards for *in situ* bioremediation. *Environmental Science and Technology*, 27(10):1974-1979.
- Madsen, E. L. (1991). Determining *in situ* biodegradation. *Environmental Science and Technology*, 25(10):1663-1672.
- Malecki, M. R., E. F. Neuhauser et R. C. Loehr (1982). The effect of metals on the growth and reproduction of *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia*, 24:129-137.
- Malins, D. C., M. M. Krahn, M. S. Myers, L. D. Rhodes, D. W. Brown, C. A. Krone, B. B. McCain et S.-L. Chan (1985). Toxic chemical in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*). *Carcinogenesis*, 6:1463-1469.
- Matsuoka, A., T. Sofuni, N. Miyata et M. Ishidate (1991). Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrene, fluorene and mononitrofluorenes in cultured chinese hamster cells. *Mutation Research*, 259:103-110.
- Matthews, P. J. (1984). Control of metal application rates from sewage sludge utilization in agriculture. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 14(3):199-250.
- Mayer, A. M. et A. Poljakoff-Mayber (1989). *The Germination of Seeds*. Oxford, Pergamon, 270 p.
- McDaniel, W. (1992). Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues (method 200.3). Dans: J. Creed, O. Evans, L. Lobring, T. Martin et B. Potter (éds), *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples*. Smoley, p. 25-32.
- McDaniels, A. E., A. L. Reyes, L. J. Wymer, C. C. Rankin et G. N. Stelma (1990). Comparaison of the Salmonella (Ames) test, Umu test and the SOS Chromotest for detecting genotoxins. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16:204-215.
- McLean, E. O. (1982). Soil pH and lime requirement. Dans: A. Klute (éd.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Madison, Wisconsin USA, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, p. 199-224.

- Mersch-Sundermann, V., S. Mochayed et S. Kevekordes (1992). Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation Research*, 278:1-9.
- Microbics (1991). *Microtox manual*. Carlsbad, CA, Microbics Corporation, 125 p.
- Miller, W. E., S. A. Peterson, J. C. Greene et C. A. Callahan (1985). Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites. *Journal of Environmental Quality*, 14(4):569-574.
- Millette, D., J.F. Baker, Y. Comeau, B.J. Butler, E.O. Frind, B. Clément et R. Samson (1995a). Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds: a factorial batch experiment. *Environmental Science and Technology*, 29: 1944-1952.
- Millette, D., J.F. Baker, Y. Comeau, B.J. Butler, E.O. Frind, B. Clément et R. Samson (1995b). Biodegradation of mixtures of creosote-related compounds in saturated columns 1. Substrate interaction. Soumis à *Journal of Contaminant Hydrology*.
- Ministère de l'Environnement du Québec (1990). *Guide des Méthodes de Conservation et d'Analyses des Échantillons d'Eau et de Sol*. MENVIQ, QEN/SD/14/1.
- Morgan, J. E. et A. J. Morgan (1988). Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environmental Pollution*, 54:123-138.
- Morgan, P. et R. J. Watkinson (1989). Hydrocarbons degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 305-333.
- Moriarty, F. (1983). *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems*. London, Academic Press, 233 p.
- Mount, D. I. et T. J. Norberg (1984). A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3:425-434.
- Mueller, J. G., D. P. Midsaugh, S. E. Lantz et P. J. Chapman (1991). Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: Chemical and biological assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5):1277-1285.
- Naudin, S., J. Garric, E. Vindimian, M. Bray, B. Migeon, B. Vollat et G. Lenon (1995). Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30(1):54-62.
- Neuhauser, E. F., R. C. Loehr, M. R. Malecki, D. L. Milligan et P. R. Durkin (1985). The toxicity of selected organic chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Journal of Environmental Quality*, 14(3):383-388.
- Neuhauser, E. F., M. R. Malecki et R. C. Loehr (1984). Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia foetida* after exposure to sublethal concentrations of metals. *Pedobiologia*, 27:89-97.

- Nyholm, N. et T. Källqvist (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8:689-703.
- Oake, R. J., C. S. Booker et R. D. Davis (1984). Fractionation of heavy metals in sewage sludges. *Water, Science and Technology*, 17:587-598.
- OCDE (1984). *Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques #208. Plantes Terrestres, Essai de Croissance*. Organisation pour la Coopération et le Développement économiques.
- Olivier, P. et D. Marzin (1987). Study of genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS Chromotest. *Mutation Research*, 189:263-269.
- Olver, J. W., W. C. Kreye et P. H. King (1975). Heavy metal release by chlorine oxidation of sludges. *Journal - Water Pollution Control Federation*, 47:2490-2497.
- Park, K. S., R. C. Sims, W. J. Doucette et J. E. Matthews (1988). Biological transformation and detoxification of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in soil systems. *Journal Water Pollution Control Federation*, 60(10):1822-1825.
- Paul, E. A. et F. E. Clark (1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego, CA, Academic Press, 273 p.
- Pennak, R. W. (1989). Cladocera. Dans: R. W. Pennak (éd.) *Fresh-Water Invertebrates of the United States: Protozoa to Mollusca*. New York, Wiley, p. 369-409.
- Pipe, R. K. et M. N. Moore (1986). Arylsulphatase activity associated with phenanthrene induced digestive cell deletion in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal*, 18:557-564.
- Plotkin, S. et N. M. Ram (1984). Multiple bioassays to assess the toxicity of a sanitary landfill leachate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13:197-206.
- Poels, C. L. M., U. Gruntz, P. Isnard, D. Riley, M. Spiteller, W. ten Berge, W. Veerkamp et W. J. Bontinck (1991). Hazard assessment of chemical contaminants in soil. *Chemosphere*, 23(1):3-24.
- Porcella, D. B. (1983). *Protocol for Bioassessment of Hazardous Waste Sites*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/2-83-054.
- Quillardet, P., C. de Bellecombe et M. Hofnung (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation Research*, 147:79-95.
- Quillardet, P. et M. Hofnung (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147:65-78.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'ari et M. Hofnung (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:5971-5975.
- Qureshi, A. A., K. W. Flood, S. R. Thompson, S. M. Janhurst, C. S. Inniss et D. A. Rokosh (1982). Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. Dans: *Aquatic toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference ASTM*, J. G. Pearson, R. B. Foster et W. E. Bishop (éds), p. 179-195. Philadelphia, PA. ASTM.
- Rao, S. S. (1988). *Ceriodaphnia reticulata* seven-day survival and reproduction test. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 3:239-244.
- Ratsch, H. C. (1983). *Interlaboratory root elongation testing of toxic substances on selected plant species*. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/3-83-051.
- Reteuna, C., P. Vasseur, R. Cabridenc et H. Lepailleur (1986). Comparison of respiration and luminescent tests in bacterial toxicity assessment. *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 1(2):159-168.
- Rhett, R. G., J. W. Simmers et C. R. Lee (1988). *Eisenia foetida* used as a biomonitoring tool to predict the potential bioaccumulation of contaminants from contaminated dredged material. Dans: C. A. Edwards et E. F. Neuhauser (éds), *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, The Netherlands, SPB Academic Publishing, p. 321-328.
- Ribo, J. M. et K. L. E. Kaiser (1983). Effects of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlations with acute and sublethal effects on other organisms. *Chemosphere*, 11/12:1421-1442.
- Ritter, W. F. et R. W. Scarborough (1995). A review of bioremediation of contaminated soils and groundwater. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Environmental Science and Engineering*, 30(2):333-357.
- Roberts, B. L. et W. Dorough (1984). Relative toxicities of chemicals to earthworm *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3:67-78.
- Roca, J. et F. Pomares (1991). Prediction of available heavy metals by six chemical extractants in a sewage sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 22:2119-2136.
- Ross, S. M. (1994). *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. Chichester, UK, Wiley, 469 p.
- Rossi, S. S. et J. M. Neff (1978). Toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbons to the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Marine Pollution Bulletin*, 9:220-223.
- Rossman, T. G., M. Molina, L. Meyer, P. Boone, C. B. Klein, Z. Wang, F. Li, W. C. Lin et P. L. Kinney (1991). Performance of 133 compounds in the lambda prophage induction endpoint of the microscreen assay and a comparison with *S. typhimurium* mutagenicity and rodent carcinogenicity assays. *Mutation research*, 260:349-367.

- Rudd, T. (1987). Sludge Treatment. Dans: J. N. Lester (éd.) *Heavy Metals in Wastewater and Sludge Treatment Processes. II. Treatment and Disposal*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 41-67.
- Sadusky, M. C. et R. S. Wentsel (1991). Toxicity of brass powder to corn and the relationship to soil fractionation of copper and zinc. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 22:1817-1829.
- Samson, R., T. Cseh, J. Hawari, C. W. Greer et R. Zaloum (1990). Biotechnologies appliquées à la restauration de sites contaminés avec exemple d'application d'une technique physico-chimique et biologique pour les sols contaminé par des BPC. *Sciences et Techniques de l'Eau*, 23(1):15-23.
- Samson, R., C. W. Greer, T. Hawkes, R. Desrochers, C. H. Nelson et M. St-Cyr (1994). Monitoring an aboveground bioreactor at a petroleum refinery site using radiorespirometry and gene probes: Effects of winter conditions and clayey soil. Dans: R. E. Hinchee, B. C. Alleman, R. E. Hoeppe et R. N. Miller (éds), *Hydrocarbon Bioremediation*. Boca Raton, FL, Lewis, p. 329-333.
- Savino, J. F. et L. L. Tanabe (1989). Sublethal effects on phenanthrene, nicotine, and pinane on *Daphnia pulex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42:778-784.
- Schaeffer, D. J., D. K. Cox et R. A. Deem (1987). Variability of test systems used to assess ecological effects of chemicals. *Water, Science and Technology*, 19(11):39-45.
- Scheunert, I., A. Attar et L. Zelles (1995). Ecotoxicological effects of soil-bound pentachlorophenol residues on the microflora of soils. *Chemosphere*, 30(10):1995-2009.
- Schiewe, M. H., E. G. Hawk, D. I. Actor et M. M. Krahn (1985). Use of a bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42:1244-1248.
- Schoental, R. (1984). Fusarial mycotoxins and cancer. Dans: C. E. Searle (éd.) *Chemical carcinogens*. Washington, D.C., USA, ACS Monograph 182, p. 1137-1167.
- Schultz, T. W., L. M. Kyte et J. N. Dumont (1978). Structure-toxicity correlations of organic contaminants in aqueous coal-conversion effluents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 7:457-463.
- Scott, D. S. et H. Horlings (1975). Removal of phosphates and metals from sewage sludges. *Environmental Science and Technology*, 9(9):849-851.
- Seaker, E. M. et W. E. Sopper (1988). Municipal sludge for minespoil reclamation: I. Effects on microbial populations and activity. *Journal of Environmental Quality*, 17(4):591-597.
- Sheppard, S. C. et W. G. Evenden (1992). Optimized design for earthworm survival tests in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(5):648-655.

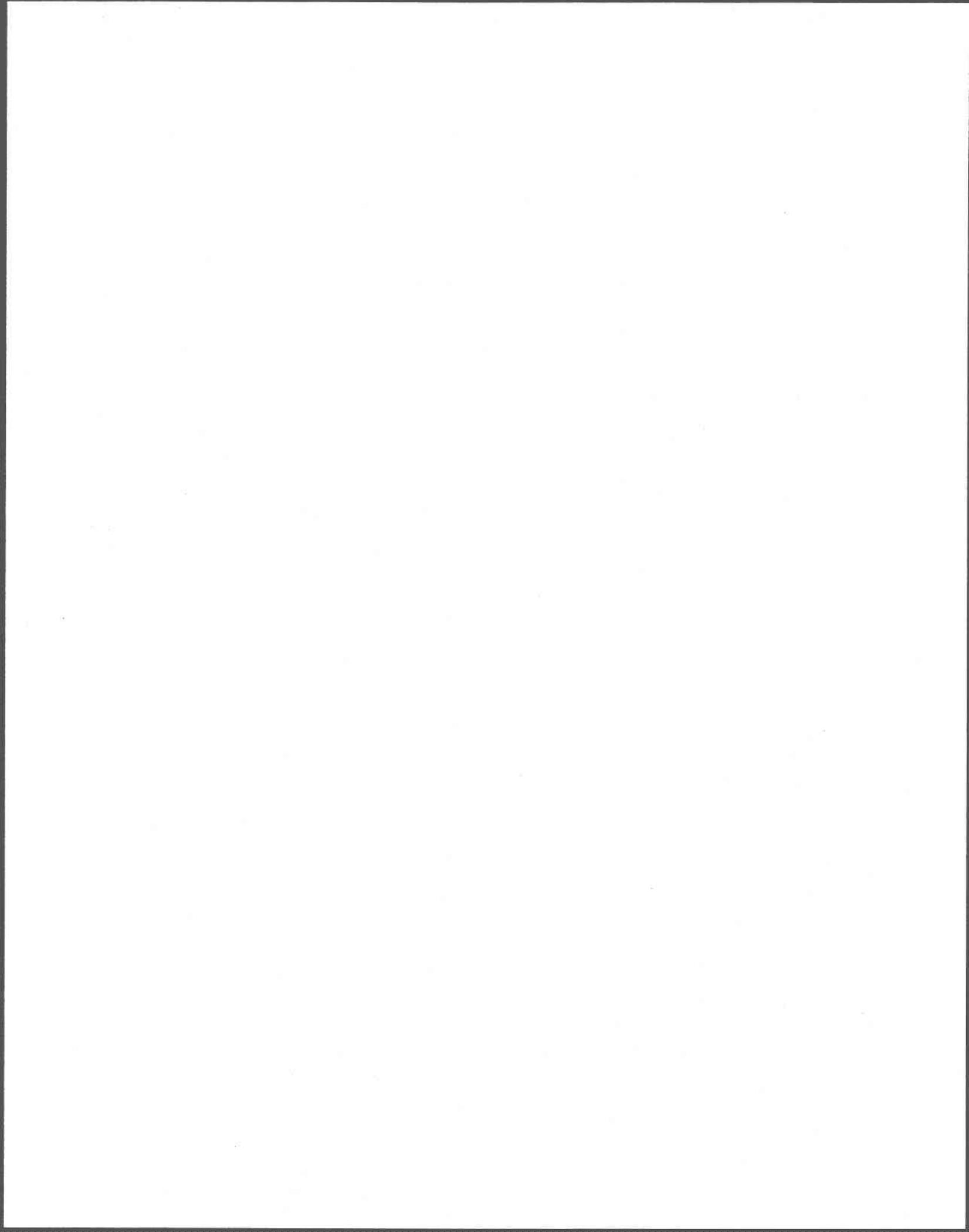
- Sheppard, S. C., W. G. Evenden, S. A. Abboud et M. Stephenson (1993). A plant life-cycle bioassay for contaminated soil, with comparison to other bioassays: mercury and zinc. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25(1):27-35.
- Sheppard, S. C., C. Gaudet, M. I. Sheppard, P. M. Cureton et M. P. Wong (1992). The development of assessment and remediation guidelines for contaminated soils, a review of the science. *Canadian Journal of Soil Science*, 72(4):359-394.
- Sierra-Alvarez, R., J. A. Field, S. Kortekaas et G. Lettinga (1994). Overview of the anaerobic toxicity caused by organic forest industry wastewater pollutants. *Water Science and Technology*, 29(5-6):353-363.
- Simmers, J. W., R. G. Rhett, S. H. Kay et J. M. Marquenie (1986). Bioassay and biomonitoring assessments of contaminant mobility from dredged material. *Science of the Total Environment*, 56:173-182.
- Simmon, V. F., H. S. Rosenkranz, E. Zeiger et L. A. Poirier (1979). Mutagenic activity of chemical carcinogens and related compounds in the intraperitoneal host-mediated assay. *Journal of the National Cancer Institute*, 62(4):1979.
- Sims, R. C. (1986). Loading rates and frequencies for land treatment systems. Dans: *Land treatment: A hazardous waste management alternative*, R. C. Loehr et J. F. Malina (éds), p. 151-170. Austin, TX.
- Sims, R. C. (1990). Soil Remediation techniques at uncontrolled hazardous waste sites. A critical review. *Journal of Air and Waste Management Association*, 40(5):704-732.
- Sorensen, D. L., L. Hastings et R. C. Sims (1986). Comparison of Microtox with selected soil microbial activity indicators as acute toxicity tests in hazardous waste land treatment. Dans: *Abstracts of the annual meeting of the American Society for microbiology*, p. 241. 86th annual meeting of the American society for microbiology.
- Southworth, G. R., J. J. Beauchamp et P. K. Schmieder (1979). Bioaccumulation of carbazoles: a potential effluent from synthetic fuels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 23:73-78.
- Spjotvol, E. et M. R. Stoline (1973). An extension of the T-method of multiple comparison to include the cases with unequal sample sizes. *Journal of the American Statistical Association*, 68(344):975-978.
- Sprague, J. B. et B. A. Ramsay (1965). Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 22(2):425-432.
- Steen, A.-B., H. Borén et A. Grimvall (1994). Phytotoxic organic compounds in spruce forest soil: chemical analyses combined with seedling bioassays. Dans: M. H. Donker, H. Eijssackers et F. Heimbach (éds), *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Boca Raton, FL, Lewis, p. 163-177.
- Sterritt, R. M. et J. N. Lester (1980). The value of sewage sludge to agriculture and effects of the agricultural use of sludges contaminated with toxic elements: A review. *Science of the Total Environment*, 16:55-90.

- Streibig, J. C. et P. Kudsk (1993). *Herbicide Bioassays*. Boca Raton, Florida, CRC Press,
- Svenson, A. et L. Kaj (1989). Photochemical conversion of chlorinated phenolic substances in aquatic media as studied by AOX and microtox tests. *The Science of Total Environment*, 78:89-98.
- Symons, B. D. et R. C. Sims (1988). Assessing detoxification of a complex hazardous waste, using the Microtox bioassay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17:497-505.
- Tagatz, M. E., G. R. Plaia, C. H. Deans et E. M. Lores (1983). Toxicity of creosote-contaminated sediment to field and laboratory-colonized estuarine benthic communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2:441-450.
- Tessier, A., P. G. C. Campbell et M. Bisson (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51(7):844-851.
- Thellen, C., C. Blaise, Y. Roy et C. Hickey (1989). Round Robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiologia*, 188/189:259-268.
- Thomas, J. M., L. A. Athey et J. R. Skalski (1990). Statistical approaches to screening hazardous waste sites for toxicity. Dans: D. Friedman (éd.) *Waste Testing and Quality Assurance*. Philadelphia, Pennsylvania, USA, ASTM (special technical publication, n° 1062), p. 140-162.
- Thomas, J. M. et J. F. Cline (1985). Modification of the Neubauer technique to assess toxicity of hazardous chemicals in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4:201-207.
- Thomas, J. M., J. R. Skalski, J. F. Cline, M. C. McShane, J. C. Simpson, W. E. Miller, S. A. Peterson, C. A. Callahan et J. C. Greene (1986). Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5:487-501.
- Tjell, J. C. (1986). *Trace metal regulation for sludge utilization in agriculture: a critical review*. Communauté Européenne EUR 1986, EUR10361.
- Tokiwa, H., S. Kitamori, K. Takahashi et Y. Ohnishi (1980). Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates. *Mutation Research*, 77:99-108.
- Tonelli, Q. J., R. P. Custer et S. Sorof (1979). Transformation of cultured mouse mammary glands by aromatic amines and amides and their derivatives. *Cancer Research*, 39:1784-1792.
- True, C. J. et A. A. Heyward (1990). Relationship between Microtox test results, extraction methods, and physical and chemical compositions of marine sediment samples. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 5:29-45.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1:151-173.

- Tyagi, R. D., J. F. Blais, B. Boulanger et J. C. Auclair (1993). Simultaneous municipal sludge digestion and metal leaching. *Journal of Environmental Science and Health*, A28(6):1361-1379.
- Tyagi, R. D. et D. Couillard (1989). Bacterial leaching of metals from sludge. Dans: P. E. Cheremisinoff (éd.) *Encyclopedia of Environmental Control Technology. Vol. 3. Wastewater Treatment Technology*. Houston, TX, Library of Environmental Pollution Control Technology, Gulf, p. 557-590.
- Tyagi, R. D., D. Couillard et F. Tran (1988). Heavy metals removal from anaerobically digested sludge by chemical and microbiological methods. *Environmental Pollution*, 50:295-316.
- US-EPA (1986). *Test Methods for Evaluating Solid Waste. Volume 1B: Laboratory Manual for Physical/chemical Methods*. U.S. Environmental Protection Agency, PB88-239223.
- van Deelen, C. L. (1987). Methods for assessing the risk of environmental contamination. Dans: *Environmental Technology*, K. J. A. de Waal et W. J. van den Brink (éds), p. 671-681. Amsterdam, The Netherlands. Martinus Nijhoof Publishers.
- van Ewijk, P. H. et J. A. Hoekstra (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when subtoxic stimulus is present. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25:25-32.
- van Gestel, C. A. M. (1992). Validation of earthworm toxicity tests by comparison with field studies: a review of benomyl, carbendazim, carbofuran, and carbaryl. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23:221-236.
- van Gestel, C. A. M., W. C. Ma et C. E. Smit (1991). Development of QSARs in terrestrial ecotoxicology: earthworm toxicity and soil sorption of chlorophenols, chlorobenzenes and dichloroanilines. *Science of the Total Environment*, 109/110:589-604.
- van Loon, J. C. (1985). *Selected Methods of Trace Metal Analysis: Biological and Environmental Samples*. New York, NY, Wiley, (Chemical Analysis, vol. 80)
- van Reeuwijk, L.P. (1987). *Procedures for Soil Analysis, 2nd ed.* International Soil Reference and Information Centre, Wageningen, The Netherlands.
- van Straalen, N. M. et C. A. J. Denneman (1989). Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18:241-251.
- Vega, S., M. Calisay et N. V. Hue (1992). Manganese toxicity in cowpea as affected by soil pH and sewage sludge amendments. *Journal of Plant Nutrition*, 15(2):219-231.
- Vlams, J., D. E. Williams, J. E. Corey, A. L. Page et T. J. Ganje (1985). Zinc and Cadmium uptake by barley in field plots fertilized seven years with urban and suburban sludge. *Soil Science*, 139(1):81-87.
- Vogelbein, W. K., J. W. Fournie, P. A. van Veld et R. J. Huggett (1990). Hepatic neoplasms in the mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote-contaminated site. *Cancer Research*, 50:5978-5986.

- von der Hude, W., C. Behm, R. Gürtler et A. Basler (1988). Evaluation of the SOS chromotest. *Mutation Research*, 203:81-94.
- Wang, C. Y., M.-S. Lee, C. M. King et P. O. Warner (1980). Evidence for nitroaromatics as direct-acting mutagens of airborne particulates. *Chemosphere*, 9:83-87.
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air, and Soil Pollution*, 59:381-400.
- Wang, X., X. Yu et R. Bartha (1990). Effects of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environmental Science and Technology*, 24:1086-1089.
- Wangenheim, J. et G. Bolcsfoldi (1988). Mouse lymphoma L5178Y Thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis*, 3(3):193-205.
- Webber, J. (1972). Effects of toxic metals in sewage on crops. *Water Pollution Control*, 71:404-413.
- Webber, M. D. (1988). Contrôle de la concentration des métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: L'approche canadienne. *Sciences et Techniques de l'Eau*, 21(1):45-51.
- Webber, M. D., A. Kloke et J. C. Tjell (1984). A review of current sludge use guidelines for the control of heavy metal contamination in soils. Dans: P. L'Hermite et H. Ott (éds), *Processing and Use of Sewage Sludge*. Dordrecht, Holland, Reidel, p. 371-386.
- Weissenfels, W. D., H.-J. Klewer et J. Langhoff (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soils particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36:689-696.
- Wen, G., T. E. Bates et R. P. Voroney (1995). Evaluation of nitrogen availability in irradiated sewage sludge, sludge compost and manure compost. *Journal of Environmental Quality*, 24(3):527-534.
- Wentzel, R. S. et M. A. Guelta (1987). Toxicity of brass powder in soil to the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6:741-745.
- Werner, M. D., V. D. Adams, V. A. Lamara et N. L. Winters (1985). Responses of model freshwater ecosystems to crude oil. *Water Research*, 19(3):285-292.
- Wershaw, R. L. (1993). Model for Humus in soils and sediments. *Environmental Science and Technology*, 27(5):814-816.
- Wick, C. B. et G. E. Pierce (1990). Developments in Industrial Microbiology. 9. An integrated approach to development and implementation of biodegradation systems for treatment of hazardous organic wastes. *Journal of Industrial Microbiology*, 31(suppl. No.5):81-96.
- Wild, S. R. et K. C. Jones (1992). Polynuclear aromatic hydrocarbon uptake by carrots grown in sludge-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, 21:217-225.

- Wild, S. R., S. P. McGrath et K. C. Jones (1990). The polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) content of archived sewage sludges. *Chemosphere*, 20(6):703-716.
- Wild, S. R., J. P. Obbard, C. I. Munn, M. L. Berrow et K. C. Jones (1991). The long-term persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural soil amended with metal-contaminated sewage sludges. *Science of the Total Environment*, 101:235-253.
- Wong, C. K., F. R. Engelhardt et J. R. Strickler (1981). Survival and fecundity of *Daphnia pulex* on exposure to particulate oil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 26:606-612.
- Wong, C. K., J. R. Strickler et F. R. Engelhardt (1983). Feeding behavior of *Daphnia pulex* in crude oil dispersions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31:152-157.
- Wong, L. et J. G. Henry (1983). Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 18:151-162.
- Wong, P. T. S. et P. Couture (1986). Toxicity screening using phytoplankton. Dans: B. J. Dutka et G. Bitton (éds), *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Boca Raton, FL, CRC Press, .
- Wren, M. J. et D. M. McCarroll (1990). A simple and sensitive bioassay for the detection of toxic materials using a unicellular green alga. *Environmental Pollution*, 64:87-91.
- Wu, X. et I. Aasen (1994). Models for predicting soil zinc availability for barley. *Plant and Soil*, 163(2):279-285.
- Zar, J. H. (1984). *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall, 718 p.
- Zelles, L., I. Scheunert et F. Korte (1986). Comparison of methods to test chemicals for side effects on soil microorganisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 12:53-69.



ANNEXE A

Espèces pour lesquelles existent des méthodes expérimentales standardisée de biotests

Cette annexe reproduit le tableau récapitulatif des méthodes standardisées de biotests pour le milieu terrestre. Ce tableau a été extrait d'un rapport publié par Environnement Canada (Keddy *et al.*, 1994). Les auteurs ont passé en revue toutes les procédures disponibles dans la littérature scientifique et ont sélectionné celles satisfaisant des critères considérés comme essentiels (procédure détaillée, toxiques de référence). L'évaluation détaillée de ces biotests a été publiée par les mêmes auteurs (Keddy *et al.*, 1995).

Table 1. Species with test methods from recognised standards organizations and the literature for assessing soil quality (ASTM= American Society for Testing and Materials, EC= Environment Canada, ISO= International Standards Organization, OECD= Organization for Economic Cooperation and Development, USEPA= United States Environmental Protection Agency).

Organism group	Species	Organization/ Reference	Test type
ALGAE			
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC, Lower and Sutton (1987)	chronic, growth, reproduction
TERRESTRIAL VASCULAR PLANTS			
			chronic tests
	<i>Allium cepa</i>	USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<i>Avena sativa</i>	OECD USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seedling emergence, growth seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<i>Brassica alba</i> <i>B. campestris</i> var. <i>chinensis</i> <i>B. napus</i> <i>B. rapa</i>	OECD	seedling emergence, growth
	<i>B. oleracea</i>	USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<i>Cucumis sativa</i>	ASTM, Holst and Ellwanger (1982) ASTM, USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA	seed germination, seedling emergence seed germination, root elongation seedling growth

Organism group	Species	Organization/ Reference	Test type
TERRESTRIAL VASCULAR PLANTS (continued)			
	<u>Daucus carota</u>	USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<u>Glycine max</u>	USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<u>Lactuca sativa</u>	ASTM, USEPA, Greene et al. (1989) ASTM, Greene et al. (1989), Holst and Ellwanger (1982) OECD Holst and Ellwanger (1982), USEPA	seed germination, root elongation seed germination, seedling emergence seedling emergence, growth seedling growth
	<u>Lepidium sativum</u>	OECD USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seedling emergence, growth seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<u>Lolium perenne</u>	OECD	seedling emergence, growth
	<u>Lycopersicon esculentum</u>	USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
	<u>Oryza sativa</u>	OECD	seedling emergence, growth
	<u>Phaseolus aureus</u>	OECD	seedling emergence, growth
	<u>Raphanus sativa</u>	ASTM ASTM OECD	seed germination, seedling emergence seed germination, root elongation seedling emergence, growth
	<u>Sorghum bicolor</u>	OECD	seedling emergence, growth

Organism group	Species	Organization/ Reference	Test type
TERRESTRIAL VASCULAR PLANTS (continued)			
	<u>Tradescantia</u> spp.	ASTM	flower production
	<u>Trifolium ornithopodioides</u>	OECD	seedling emergence, growth
	<u>T. pratense</u>	ASTM ASTM	seed germination, root elongation seed germination, seedling emergence
	<u>Triticum aestivum</u>	ASTM ASTM OECD	seed germination, root elongation seed germination, seedling emergence seedling emergence, growth
	<u>Vicia sativa</u>	OECD	seedling emergence, growth
	<u>Zea mays</u>	USEPA Holst and Ellwanger (1982), USEPA Holst and Ellwanger (1982)	seed germination, root elongation seedling growth seed germination, seedling emergence
EARTHWORMS			
	<u>Eisenia andrei</u>	ISO, Greene et al. (1989) ISO	acute, survival chronic, reproduction
	<u>E. foetida</u>	ISO, OECD Eirkson et al. (1987) ISO	acute, survival chronic, survival chronic, reproduction
	<u>Lumbricus terrestris</u>	Eirkson et al. (1987)	chronic, survival, growth
	<u>L. rubellus</u>	Eirkson et al. (1987)	chronic, survival, growth
SPRINGTAILS (Collembola)			
	<u>Folsomia candida</u>	OECD	chronic, reproduction, survival, offspring emergence