

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

BIODISPONIBILITÉ ET EFFETS DU BISMUTH SUR LES ORGANISMES DU SOL

Par
ZOHRA OMOURI

Thèse présentée pour l'obtention du grade
de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr. Jacques Bernier
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Dre. Gaëlle Triffault-Bouchet
Centre d'expertise en analyse
environnementale du Québec

Examineur externe

Dr. Yann Berthelot
Entreprise Orbicon Suède

Directeur de recherche

Dr. Pierre Yves Robidoux
INRS-Institut Armand Frappier

Codirecteur de recherche

Pr. Michel Fournier
INRS-Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet de recherche.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Pierre Yves Robidoux de m'avoir accueillie dans son équipe de recherche, d'avoir cru en moi et de m'avoir confiée ce projet passionnant. Un grand merci Pierre Yves pour votre soutien et vos encouragements, surtout dans les moments les plus exaspérants.

Un grand merci à mon codirecteur le Pr. Michel Fournier pour votre soutien et votre aide tout au long de ce projet de doctorat. Vos encouragements dans les moments les plus difficiles m'ont permis de persévérer et d'arriver au bout de cette thèse.

Ma profonde reconnaissance à l'égard du Dr. Jalal Hawari professeur à l'école polytechnique de Montréal pour toute l'aide que vous m'avez apportée depuis le début de mon doctorat. Merci Jalal d'avoir cru en moi, d'avoir partagé avec moi vos connaissances inestimables et votre expertise dans les domaines de la chimie et de la recherche scientifique. Je tiens à vous remercier aussi pour votre amitié, vos conseils de rédaction et nos fructueuses discussions qui m'ont fait grandir professionnellement et personnellement.

Ma gratitude et mes remerciements vont également aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer le manuscrit de ma thèse. Merci au Pr Jacques Bernier d'avoir accepté de présider ce jury, au Dre. Gaëlle Triffault-Bouchet et au Dr. Yann Berthelot d'avoir accepté d'assumer le rôle d'examineurs externes. Ma profonde reconnaissance à chacun d'entre vous pour avoir consacré de votre temps à l'affinage et l'amélioration du manuscrit de ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères à tous les membres de l'ex-groupe d'écotoxicologie appliquée, de l'institut de recherche en biotechnologie du Conseil National de Recherche du Canada (IRB-CNRC) pour leur accueil chaleureux, leur assistance technique, leurs conseils et leur soutien. Merci au Dr. Geoffrey Sunahara, Manon Sarrazin, Julie Dumas, Sabine Dodard, Kathleen Savard, Mahsa Hamzeh, Punita Mehta et Sylvie Rocheleau.

Merci à Mme. Pauline Brousseau et Mme. Marlène Fortier de l'INRS-IAF de m'avoir initiée à la cytométrie en flux et d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions. Merci également à tous les étudiants post doctoraux, les étudiants au doctorat et les étudiants au maîtrise du laboratoire du Pr. Michel Fournier que j'ai eu le plaisir de connaître et de côtoyer le temps d'une réunion de laboratoire, d'un congrès ou d'une pause-café pour les pertinentes discussions et les précieux conseils et encouragements.

Mes sincères remerciements à Mr. Gwenaël Chamoulaud, directeur technique et responsable de l'équipement, faculté des sciences à NanoQAM de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de m'avoir conseillée et de m'avoir aidée à effectuer toutes les analyses chimiques. Je vous suis profondément reconnaissante Gwenaël pour m'avoir facilitée l'accès aux équipements nécessaires pour réaliser toutes les analyses chimiques indispensables pour mener à terme mon projet de doctorat.

Un grand merci à Mme. Lucie Bourget et Mr. Antoine W. Caron agents techniques à l'institut de recherche en biotechnologie du Conseil National de Recherche du Canada (IRB-CNRC) pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et aidée à utiliser leurs équipements. Merci Lucie et

Antoine pour votre bonne humeur, votre gentillesse, vos encouragements et vos enseignements.

Mes vifs remerciements à tout le personnel administratif de l'INRS-IAF, en particulier Mme. Anne Philippon pour votre aide et votre disponibilité.

Mes profonds remerciements à l'égard de tous les réviseurs anonymes qui ont pris le temps pour réviser mes articles. Merci pour leurs commentaires constructifs et leur participation à l'affinage des manuscrits.

Un clin d'œil spécial à mes amies du groupe du collectif. Merci Fatima Zahra, Diaraye, Michèle, Lurette, Katia et Maimouna pour votre soutien, vos encouragements, les belles sorties, les fêtes et les beaux événements (mariage, naissance, baptême) que nous avons célébré ensemble, les fous rires et les délicieux plats du quatre coin du monde que nous avons partagé.

Une pensée très particulière au Dre. Wassila Arras pour ton amitié, ta gentillesse, ton soutien et pour toutes les discussions que nous avons eu au tour d'un café ou d'une boîte à lunch!

Enfin, j'adresse mes profonds remerciements à ma famille et mes proches. Un grand merci à mes parents, à mes sœurs Dalila et Nassima, à mes frères Mohamed et Slimane pour votre soutien, votre confiance, votre présence malgré l'éloignement et vos encouragements. Merci à tous mes proches et mes amis qui m'ont encouragée depuis le début de ce long chemin.

RÉSUMÉ

Les composés à base de bismuth sont largement utilisés dans plusieurs industries telles que : les médicaments, les cosmétiques, les munitions et les additifs métallurgiques. Par conséquent, les concentrations de bismuth (Bi) pourraient augmenter considérablement dans les écosystèmes terrestres. En effet, des récentes études ont rapporté des concentrations de Bi très élevées dans des sols contaminés par diverses activités industrielles. Actuellement, la toxicité du Bi et les risques qu'il présente pour les organismes terrestres sont peu connus, très peu investigués et non réglementés. L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer la biodisponibilité du Bi dans les sols ainsi que ses effets aigus et chroniques chez le ver de terre *Eisenia andrei* et la plante *Lolium perenne* L.

Dans un premier temps, les effets du nitrate de Bi et du citrate de Bi sur la croissance et la germination de *Lolium perenne* ont été évalués sur papier filtre et en sols naturel et artificiel contaminés expérimentalement au laboratoire. Le nitrate de Bi inhibe plus sévèrement la germination et la croissance racinaire de la plante comparé au citrate de Bi, de plus il cause une plus forte diminution du pH des solutions aqueuses et du sol. Ainsi pour éviter l'effet inhibiteur des pHs trop acides sur la croissance des organismes étudiés, le citrate de Bi a été choisi pour la suite de l'étude. Les effets aigus du Bi (forme citrate) sur la létalité et la croissance du ver *Eisenia andrei* ont été investigués en sol naturel contaminé au laboratoire. Le Bi est létal pour les vers avec une $CL_{50} = 416$ mg/kg et une CSEO = 298 mg/kg.

Ensuite, l'étude a été portée sur l'évaluation des effets chroniques du Bi. Pour ce faire, les vers adultes ont été exposés en sol naturel contaminé. Les effets du Bi sur la reproduction et la croissance du ver *Eisenia andrei*, ainsi que sur la viabilité et l'activité phagocytaire des coelomocytes du ver ont été investigués. Les résultats révèlent que le Bi diminue la reproduction chez *Eisenia andrei*. Le paramètre de reproduction le plus sensible est le nombre de juvéniles, suivi du nombre de cocons éclos et du nombre total de cocons ($CI_{50} = 123.14$, 182.43 et > 289 mg/kg, respectivement). Les résultats relatifs à la viabilité et à l'activité phagocytaire des coelomocytes, montrent que des concentrations ≤ 289 mg Bi/kg sol n'affectent pas la viabilité des coelomocytes et présentent un faible effet immunotoxique.

Pour finir, l'évaluation de la biodisponibilité du Bi a été effectuée. Pour cela, nous avons eu recours à des méthodes d'extraction et d'analyses chimiques, pour mesurer les teneurs en Bi dans les échantillons de sol et les tissus d'*Eisenia andrei*. Les résultats obtenus montrent qu'après 14 jours et 28 jours d'exposition, la bioaccessibilité du Bi dans le sol en présence des vers est significativement plus élevée que celle obtenue dans le sol en absence des vers. De plus, des concentrations relativement élevées de Bi, soit jusqu'à 21.37 mg/kg tissu sec ont été accumulées dans les tissus des vers. Des biomolécules et des agents chélateurs produits par les vers de terre et/ou par les microorganismes vivants dans les intestins des vers ou dans le sol pourraient expliquer en partie cette augmentation.

Mots clés : Bismuth, sols contaminés, biodisponibilité, plante, germination, croissance, vers de terre, létalité, reproduction, phagocytose.

ABSTRACT

Bismuth-based compounds are widely used in several industries such as: drugs, cosmetics, ammunition and metallurgical additives. Consequently, bismuth (Bi) concentrations could increase significantly in terrestrial ecosystems. Indeed, recent studies have reported very high concentrations of Bi in soils contaminated by various industrial activities. Currently, the toxicity of Bi and the risks it presents for terrestrial organisms are little known, very little investigated and unregulated. The main objective of this thesis is to evaluate the bioavailability of Bi in soils as well as its acute and chronic effects on the earthworm *Eisenia andrei* and the plant *Lolium perenne* L.

Firstly, the effects of Bi nitrate and Bi citrate on the growth and germination of *Lolium perenne* were evaluated on filter paper and in artificial and natural soil artificially contaminated in the laboratory. Bi nitrate inhibits plant germination and root growth more than Bi citrate, and causes a severe decrease in the pH of aqueous solutions and soil. Thus, to avoid the inhibitory effect of acidic pHs on the growth of studied organisms, Bi citrate is chosen for the rest of the study. The acute effects of Bi (citrate form) on the lethality and growth of the earthworm *Eisenia andrei* were investigated in contaminated natural soil. Bi is lethal for earthworm with an $LC_{50} = 416$ mg/kg and a $NOEC = 298$ mg/kg.

Then, the study focused on the evaluation of chronic effects of Bi. For that purpose, adult earthworms were exposed in contaminated natural soil. The effects of Bi on the reproduction and growth of the earthworm *Eisenia andrei*, as well as on the viability and phagocytic activity of earthworm coelomocytes were investigated. The results reveal that Bi reduces reproduction in *Eisenia andrei*. The most sensitive reproduction parameter is the number of juveniles, followed by the number of hatched cocoons and the total number of cocoons ($IC_{50} = 123.14, 182.43$ and > 289 mg/kg, respectively). The results from the viability and phagocytic activity of coelomocytes show that concentrations ≤ 289 mg Bi/kg soil do not affect the viability of the coelomocytes and have a low immunotoxic effect.

Finally, the evaluation of the bioavailability of Bi was performed. For that end, we used chemical methods to extract and to measure Bi contents in soil samples and *Eisenia andrei* tissues. The results obtained showed that after 14 days and 28 days of exposure, bioaccessibility of Bi in the soil in the presence of earthworms is significantly higher than that obtained in the soil in the absence of earthworms. In addition, relatively high concentrations of Bi, up to 21.37 mg/kg dry tissue were accumulated in earthworm tissues. Biomolecules and chelating agents produced by earthworms and/or by microorganisms living in earthworm gut or soil may explain in part this increase.

Keywords: Bismuth, contaminated soil, bioavailability, plant, germination, growth, earthworms, lethality, reproduction, phagocytosis.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
1 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 BISMUTH	1
1.1.1 <i>Le bismuth dans les écosystèmes terrestres</i>	3
1.1.2 <i>La toxicité du bismuth</i>	6
1.2 BIODISPONIBILITE DES METAUX DANS LES SOLS	10
1.2.1 <i>Les concepts et définitions</i>	10
1.2.2 <i>L'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les sols</i>	15
1.3 ABSORPTION ET ACCUMULATION DES METAUX	16
1.4 PLANTES ET METAUX LOURDS	18
1.4.1 <i>Les mécanismes de défense des plantes au stress métallique</i>	19
1.4.2 <i>L'espèce Lolium perenne</i>	21
1.5 IMPORTANCE DES VERS DE TERRE DANS L'ECOSYSTEME DU SOL	22
1.5.1 <i>L'espèce Eisenia andrei</i>	23
1.5.2 <i>La reproduction chez le ver de terre</i>	26
1.5.3 <i>Le système immunitaire des vers de terre</i>	28
1.5.4 <i>La phagocytose</i>	30
1.6 HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....	31
2 CHAPITRE 2: PHYTOTOXICITY OF BISMUTH NITRATE AND BISMUTH CITRATE ON GERMINATION AND GROWTH OF <i>LOLIUM PERENNE</i> EXPOSED ON FILTER PAPER AND ON ARTIFICIALLY CONTAMINATED SOIL.....	33
2.1 ABSTRACT.....	35
2.2 INTRODUCTION.....	36
2.3 MATERIALS AND METHODS	37
2.3.1 <i>Chemicals and reagents</i>	37

2.3.2	<i>Soil characterization and samples preparation</i>	37
2.3.3	<i>Plant toxicity tests</i>	38
2.3.4	<i>Seed germination and root elongation test on filter paper</i>	38
2.3.5	<i>Germination and growth test in contaminated soil</i>	39
2.3.6	<i>Data analysis</i>	39
2.4	RESULTS	40
2.4.1	<i>Filter paper essays</i>	40
2.4.2	<i>Soil essays</i>	41
2.5	DISCUSSION.....	44
2.5.1	<i>Filter paper exposure</i>	44
2.5.2	<i>Soil exposure</i>	46
2.6	CONCLUSIONS	48
2.7	ACKNOWLEDGMENTS.....	48
2.8	REFERENCES.....	48
3	CHAPITRE 3: ACUTE TOXICITY OF BISMUTH TO THE EARTHWORM <i>EISENIA ANDREI</i>	51
3.1	ABSTRACT.....	53
3.2	INTRODUCTION.....	54
3.3	MATERIAL AND METHODS.....	56
3.3.1	<i>Chemicals and Reagents</i>	56
3.3.2	<i>Soil Characterization and Samples Preparation</i>	56
3.3.3	<i>Lethality Test</i>	57
3.3.4	<i>Extraction and Analysis of Bismuth</i>	58
3.3.5	<i>Statistical Analyses</i>	59
3.4	RESULTS AND DISCUSSION	59
3.4.1	<i>Lethality of Bi Citrate Spiked Sandy Soil to Eisenia andrei</i>	59
3.4.2	<i>Total and Bioaccessible Bi in Soil</i>	62
3.4.3	<i>Effect of pH on Bi Bioaccessibility in Soil</i>	65
3.5	CONCLUSIONS.....	66
3.6	ACKNOWLEDGEMENTS.....	67
3.7	REFERENCES.....	67
4	CHAPITRE 4: BIOAVAILABILITY AND CHRONIC TOXICITY OF BISMUTH CITRATE TO EARTHWORM <i>EISENIA ANDREI</i> EXPOSED TO NATURAL SANDY SOIL.....	70
4.1	ABSTRACT.....	72
4.2	INTRODUCTION.....	73
4.3	MATERIALS AND METHODS	75
4.3.1	<i>Chemicals and reagents</i>	75

4.3.2	<i>Soil characteristics and samples preparation</i>	75
4.3.3	<i>Extraction and analysis of bismuth</i>	77
4.3.4	<i>Earthworm reproduction test</i>	77
4.3.5	<i>Phagocytosis assay</i>	78
4.3.6	<i>Statistical analyzes</i>	79
4.4	RESULTS	79
4.4.1	<i>Total and bioaccessible Bi in soils and bioavailable Bi in earthworm tissue</i>	79
4.4.2	<i>Reproduction data</i>	82
4.4.3	<i>Biomarkers responses</i>	84
4.5	DISCUSSION	85
4.5.1	<i>Soil and tissue Bi concentrations</i>	85
4.5.2	<i>Effects of Bi on earthworm reproduction</i>	88
4.5.3	<i>Viability and phagocytosis responses</i>	89
4.6	CONCLUSIONS	90
4.7	FUNDING SOURCES	91
4.8	ACKNOWLEDGMENTS	91
4.9	REFERENCES	91
5	CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	96
	REFERENCES	104
	ANNEXES	115

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 TABLEAU RECAPITULANT CERTAINS COMPOSES A BASE DE BI UTILISES DANS DIFFERENTES INDUSTRIES.	2
TABLEAU 1.2 CONCENTRATIONS DE BI DANS DIVERS SOLS NON CONTAMINES.	4
TABLEAU 1.3 LES CONCENTRATIONS PUBLIEES DU BI DANS LES SOLS CONTAMINES.	5
TABLE 2.1 TOXICITY OF BI NITRATE AND BI CITRATE IN FILTER PAPER USING RYEGRASS ROOT ELONGATION AFTER 5 DAYS OF EXPOSURE.	45
TABLE 2.2 TOXICITY OF BI NITRATE AND BI CITRATE IN SPIKED ARTIFICIAL (OECD) AND NATURAL SOIL USING RYEGRASS AFTER 7 DAYS OF EXPOSURE.	47
TABLE 3.1 SUMMARY OF PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF NATURAL SOIL COLLECTED AT THE NON-CONTAMINATED AREA.	57
TABLE 3.2 ACUTE TOXICITY PARAMETERS ON <i>EISENIA ANDREI</i> AFTER 7 AND 14 DAYS (D) OF EXPOSURE IN BISMUTH SPIKED NATURAL SOIL.	60
TABLE 3.3 ACUTE EFFECT OF CITRIC ACID EXPOSURE IN SOIL TO THE EARTHWORM <i>EISENIA ANDREI</i>	61
TABLE 3.4 TOTAL AND BIOACCESSIBLE BISMUTH MEASURED IN SOIL SAMPLES AT THE BEGINNING (T=0) AND THE END OF EXPERIMENT (T = 14D) WITH AND WITHOUT THE PRESENCE OF <i>EISENIA ANDREI</i>	63
TABLE 3.5 VARIATION OF PH IN SOIL SAMPLES IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF EARTHWORMS.	66
TABLE 4.1 SUMMARY OF PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF NATURAL SOIL COLLECTED AT THE NON-CONTAMINATED AREA.	76
TABLE 4.2 TOTAL AND BIOACCESSIBLE BI MEASURED IN SOIL SAMPLES AT THE BEGINNING (T=0), AT 28 DAYS, AND AT THE END OF EXPERIMENT (T=56 D) IN THE ABSENCE AND IN THE PRESENCE OF <i>EISENIA ANDREI</i> (E. A) AND IN EARTHWORM TISSUES.	81
TABLE 4.3 RESPONSES OF EARTHWORM <i>EISENIA ANDREI</i> TO BI SPIKED NATURAL SOIL.	82
TABLE 4.4 REPRODUCTIVE TOXICITY ENDPOINTS USING <i>EISENIA ANDREI</i> AFTER 56 DAYS OF EXPOSURE IN NATURAL CONTAMINATED SOIL.	84

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 APERÇU DES CONCEPTS SCIENTIFIQUES DE LA BIODISPONIBILITE DES PRODUITS CHIMIQUES COMME EXPLIQUES PAR EHLERS <i>ET AL.</i> (2003), SEMPLE <i>ET AL.</i> (2004) ET REICHENBERG <i>ET AL.</i> (2006) D'APRES ORTEGA-CALVO <i>ET AL.</i> (2015).	11
FIGURE 1.2 DIAGRAMME CONCEPTUEL DU PROCESSUS DE LA BIODISPONIBILITE SELON ISO 17 402 MODIFIE D'APRES LANNO <i>ET AL.</i> (2004).	14
FIGURE 1.3 LA REPONSE DES PLANTES SUPERIEURES A LA TOXICITE DES METAUX LOURDS D'APRES MANARA (2012).	20
FIGURE 1.4 PHOTOGRAPHIE DE LA PLANTE <i>LOLIUM PERENNE</i> .	21
FIGURE 1.5 LES VERS DE TERRE <i>EISENIA ANDREI</i> ADULTES.	24
FIGURE 1.6 DIAGRAMME DU CYCLE DE VIE D' <i>EISENIA FETIDA ANDREI</i> ELEVE DANS DU FUMIER DE VACHE A UNE TEMPERATURE DE 25°C ET UNE HUMIDITE DE 75%, D'APRES VENTER <i>ET AL.</i> (1988) ET TRADUIT EN FRANÇAIS PAR BERTHELOT (2008).	25
FIGURE 1.7 (A) COUPE DORSALE DU SYSTEME DE REPRODUCTION DU VER DE TERRE D'APRES (WALLWORK, 1983). (B) ACCOUPLEMENT CHEZ LE VER DE TERRE.	27
FIGURE 1.8 LE SCHEMA GENERAL DES MECANISMES DE DEFENSE INNEE CHEZ LES VERS DE TERRE D'APRES ROUBALOVA <i>ET AL.</i> (2015).	29
FIGURE 2.1 EFFECTS OF BISMUTH NITRATE AND BISMUTH CITRATE ON <i>L. PERENNE</i> SEEDS AFTER 5 DAYS EXPOSURE ON FILTER PAPER.	41
FIGURE 2.2 (A) EFFECTS OF BI NITRATE ON SEEDS GERMINATION AND ROOT WET MASS OF <i>L. PERENNE</i> AFTER 7 DAYS OF EXPOSURE IN OECD SOIL. (B) VARIATION OF SOIL PH AT T=0 AND T=7 DAYS.	42
FIGURE 2.3 EFFECTS OF BI NITRATE ON <i>L. PERENNE</i> AFTER 7 DAYS OF EXPOSURE IN CONTAMINATED NATURAL SANDY SOIL. (A) GERMINATION AND ROOTS LENGTH. (B) SOIL PH. (C) ROOT WET MASS.	43
FIGURE 2.4 (A) EFFECT OF BI CITRATE ON SEEDS GERMINATION AND ROOT ELONGATION AFTER 7 DAYS OF EXPOSURE IN NATURAL SPIKED SOIL. (B) VALUES OF SOIL PH AT T=0 AND T=7 DAYS.	44
FIGURE 3.1 ADULT SURVIVAL RATE OF <i>EISENIA ANDREI</i> AFTER 7 AND 14 DAYS EXPOSURE IN BI CITRATE SPIKED NATURAL SANDY SOIL.	60
FIGURE 3.2 DEFORMATION AND DISCONNECTION OBSERVED ON THE SKIN OF THE POSTERIOR PART OF <i>EISENIA ANDREI</i> EXPOSED TO BISMUTH CITRATE SPIKED SOIL.	61
FIGURE 4.1 EFFECTS OF BISMUTH ON VARIOUS REPRODUCTIVE PARAMETERS USING EARTHWORM <i>EISENIA ANDREI</i> AFTER 56 DAYS OF EXPOSURE.	83
FIGURE 4.2 (A) EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATIONS OF BI ON THE VIABILITY AND PHAGOCYTTIC EFFICIENCY OF COELOMOCYTES IN <i>E. ANDREI</i> EXPOSED 28 DAYS IN SPIKED SOIL. (B) CONFOCAL MICROSCOPY OF <i>E. ANDREI</i> COELOMOCYTES CELLS PHAGOCYTTIZED FLUORESCENT LATEX BEADS.	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

As	Arsenic
Bi	Bismuth
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
Cl _p	Concentration inhibitrice pour un pourcentage p des organismes exposés
CL _p	Concentration létale pour un pourcentage p des organismes exposés
CSEO	Concentration sans effet observé
Cu	Cuivre
Fe	Fer
G	Gramme
GFAAS	Spectrométrie d'absorption atomique par four graphite
H	Heure
Hg	Mercure
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (spectrométrie d'émission atomique)
ISO	Organisation internationale de normalisation
Kg	Kilogramme
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
MTs	Métallothionéines
N	Azote
Nmol	Nanomole
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
Pb	Plomb
T	Tonne
Zn	Zinc

1 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Bismuth

Le bismuth (Bi) est un métal blanc cristallin avec une teinte rose argentée, un poids moléculaire de 208.9 et un nombre atomique de 83. Il appartient au même groupe que l'azote, le phosphore, l'arsenic et l'antimoine (15^e groupe) dans le tableau périodique. Il a deux états d'oxydation +3 et +5, cependant, la forme trivalente est la plus stable et la plus abondante dans les systèmes environnementaux, biologiques et géochimiques (Filella, 2010, Lambert *et al.*, 1997). Le Bi est considéré comme faisant partie des métaux rares. Dans la nature, le Bi se trouve sous forme de bismuthinite (bismuth sulfide, Bi_2S_3), de bismite (bismuth trioxyde, Bi_2O_3) et de bismuthite (bismuth carbonate, $\text{Bi}_2(\text{CO}_3)_2\text{O}_2$) (Claudio *et al.*, 2015). Cependant, la plupart du temps, il est extrait comme un sous-produit associé au plomb, à l'antimoine et au cuivre dans les minerais (Babula *et al.*, 2008). La production minière mondiale de Bi a augmenté de 5,700 t à 10,300 t entre 2005 et 2015 respectivement, dont la Chine est le principal producteur (U.S. Geological Survey, 2007, U.S. Geological Survey, 2017).

Le Bi est un élément non essentiel qui n'a aucun rôle biologique connu. Cependant, ses propriétés antimicrobiennes ont été reconnues et utilisées en médecine depuis plusieurs siècles. Les sels de Bi ont été utilisés dans le traitement des lésions cutanées et de la syphilis, il y a plus de 300 ans (Lambert *et al.*, 1997). Depuis, plusieurs médicaments à base de Bi ont été développés pour traiter les dysfonctionnements intestinaux, les ulcères, les diarrhées et les infections causées par la bactérie *Helicobacter pylori* (Lambert *et al.*, 1997, von Recklinghausen *et al.*, 2008). En outre, le Bi possède des propriétés physicochimiques uniques. Parmi les métaux, Il est l'élément le plus diamagnétique et il possède la conductivité thermique la plus basse après le mercure (Lide, 2005). Le Bi possède une large gamme de température entre le point de fusion ($T = 270\text{ °C}$) et le point d'ébullition ($T = 1560\text{ °C}$) et présente l'effet Hall le plus élevé (Bulte *et al.*, 2017). Toutes ces propriétés ont fait du Bi un élément très utilisé dans des procédés et produits industriels comme les alliages fusibles à basse température et dans les assemblages électroniques sensibles à la température. D'après Brown (2001), le bismuth est utilisé à 45% dans les alliages, 36% dans les usages pharmaceutiques et chimiques (cosmétiques, colorants), 17% comme additif métallurgique et 2% concernent d'autres usages. Depuis ces dernières années, le Bi est de plus en plus utilisé comme

alternative pour remplacer certains métaux toxiques comme le plomb et le mercure. En effet, le Bi a substitué au Pb dans la fabrication des munitions, plombs de pêche, graisses lubrifiantes, articles en cristal (Fahey *et al.*, 2006, Urgast *et al.*, 2012), les matériaux optiques (Maeder, 2013) et les tuyaux d'eau (Nagata, 2015). Par exemple, un alliage de Bi (97% de Bi et 3% d'étain) a été utilisé pour la production de munition pour fusils de chasse (Brown, 2001). Les balles de bismuth auraient la même puissance, la même précision et les mêmes propriétés balistiques que le plomb dont la toxicité et les risques pour l'environnement sont assez connus (Brown, 2001). Récemment, les nanoparticules à base de Bi ont suscité un intérêt croissant en raison de leur potentiel d'application dans la fabrication de produits cosmétiques (Cadevall *et al.*, 2016), pharmaceutiques (Hernandez-Delgadillo *et al.*, 2012, Nazari *et al.*, 2014) et industriels (Ding *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2009). Le tableau 1.1 présente un récapitulatif des composés à base de Bi et leur utilisation dans différentes industries.

Tableau 1.1 Tableau récapitulatif certains composés à base de Bi utilisés dans différentes industries.

Composé de Bismuth	Utilisation	Référence
Bi (métal)	Balles de tir	Jenkins (2015)
	Energie solaire	Frazer <i>et al.</i> (2014)
	Alliages à bas point de fusion, fusibles, céramique, appareils électroniques	Kabata-Pendias (2010)
	Fabrication des munitions et des projectiles	Robinson <i>et al.</i> (1999) et Mann <i>et al.</i> (1994)
Nitrate de Bi	Catalyseur	Sheik Mansoor <i>et al.</i> (2016)
	Médicament anticancer	Yang Yang <i>et al.</i> (2016)
	Traitement des diarrhées chroniques et du choléra	Roscoe <i>et al.</i> (1890)

Composé de Bismuth	Utilisation	Référence
Citrate de Bi	Cosmétiques	Nan Yang <i>et al.</i> (2011)
Citrate de Bi et sulfate de Bi	Coloration des cheveux	Sampathkumar <i>et al.</i> (2009)
Subcitrate de Bi et Citrate de Bi	Eradication d' <i>Helicobacter pylori</i>	Lambert <i>et al.</i> (1997) et Alkim <i>et al.</i> (2017)
Subsalicylate de Bi (Pepto Bismol)	Traitement de diarrhée	Figueroa-Quintanilla <i>et al.</i> (1993)
Oxyde de Bi	Lunettes et matériaux optiques	Marzouk <i>et al.</i> (2015)
Oxyde nitrate de Bi	Antiseptique en chirurgie	Mohan (2010)
Oxychlorure de Bi	Pigment en cosmétique	Amneklev <i>et al.</i> (2016)
	Traitement de syphilis	Willcox (1948)
Nanoparticules de ferrite de bismuth	Dégradation du bleu de méthylène	Soltani <i>et al.</i> (2013)
Nanoparticules de bismuth zerovalent	Agent antimicrobien (Streptococcus mutant)	Hernandez-Delgadillo <i>et al.</i> (2012)
Bismuth dimercaptopropanol	Traitement des eaux usées	Badireddy <i>et al.</i> (2011)

1.1.1 Le bismuth dans les écosystèmes terrestres

Le Bi est un métal environ deux fois plus abondant que l'or sur la croûte terrestre (Babula *et al.*, 2008). Les concentrations moyennes de Bi dans la croûte terrestre, les sols non contaminés et les plantes cultivées dans des sols non contaminés sont respectivement d'environ 0.048, 0.2 et < 0.06 mg/kg (Bowen, 1979). Cependant, plusieurs études ont

mentionné différentes concentrations pour le Bi dans des sols de références et des sols non contaminés à travers le monde (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 Concentrations de Bi dans divers sols non contaminés.

Pays	Site/sol	Concentration en Bi (mg/kg)	Référence
Chine	Référence	0.04 – 1.2	Govindaraju (1994)
États-Unis	Référence	0.03 – 0.69	Govindaraju (1994)
Corée	Référence	0.9 – 1.8	Jung <i>et al.</i> (2002)
Canada	Référence	1.2 ± 1.6	(Berthelot <i>et al.</i> , 2008)

Les éruptions volcaniques sont les principales sources de la contamination naturelle des sols par le Bi. D'après Kabata-Pendias *et al.* (2007), le Bi pourrait être un bon traceur d'émissions volcaniques. Après l'éruption volcanique de Lakri (1783-1784), des concentrations élevées en Bi (dépôt total d'environ 0.14 t) ont été déposées sur la nappe de glace à Groenland (Ferrari *et al.*, 2000). Par ailleurs, en raison de l'utilisation croissante du Bi dans la fabrication de divers produits, les concentrations de Bi ont augmenté considérablement dans les écosystèmes terrestres. En effet, plusieurs études ont rapporté des concentrations en Bi très élevées dans les sols contaminés par diverses activités humaines comparativement au niveau de base (Tableau 1.3). Les sources de contamination des sols par le Bi sont multiples, par exemple l'exploitation des gisements miniers, la chasse et les activités d'entraînement militaires, les résidus industriels et l'épandage de produits phytosanitaires et de boues d'épuration des eaux usées (Tableau 1.2). Dans les sols agricoles, l'épandage des engrais et des boues d'épuration des eaux usées sont des sources importantes de Bi (Kabata-Pendias *et al.*, 2007). Les cosmétiques (24 %) et les plastiques (14 %) sont les principales sources du Bi mesuré dans les boues d'épuration des eaux usées (Amneklev *et al.*, 2015b). Eriksson (2001) avait rapporté des concentrations en Bi de 0.72 et de 0.18 en mg/kg de teneur en phosphate dans du fumier et des engrais phosphatés, respectivement. Des études récentes ont montré que les cendres résultantes de l'incinération de déchets industriels et hospitaliers pourraient être une source importante de propagation de Bi dans l'environnement. Des concentrations entre 1.1 et 489 mg Bi/kg ont été mesurées dans des échantillons de cendres prélevés après incinération de déchets hospitaliers (Zhao *et al.*, 2008). De plus, les résultats de l'étude de Zhao *et al.* (2008) ont montré que les cendres de fond et les cendres volantes contenaient les plus fortes concentrations de Bi. La volatilité du Bi et de ses composés après incinération à fortes températures pourrait expliquer les concentrations élevées de Bi dans les cendres volantes

(Hester *et al.*, 1994, Zhao *et al.*, 2008). Des échantillons de poussières atmosphériques prélevés dans six villes en Chine contenaient des concentrations élevées en Bi (0.9 – 4.6 mg/kg), comparativement à la valeur standard du niveau de base de Bi dans les sols qui était de 0.4 mg/kg (Xiong *et al.*, 2015). Selon les auteurs, diverses activités industrielles autour de ces villes sont les principales causes de cette contamination atmosphérique.

Tableau 1.3 Les concentrations publiées du Bi dans les sols contaminés.

Sols/site (Pays)	Quantité émise / Concentration de Bi total	Référence
Sols agricoles contaminés par les boues d'épuration des eaux usées (Europe)	8.5 t/an (en 2009 -2011)	Amneklev <i>et al.</i> (2016)
Sols agricoles contaminés par les boues d'épuration des eaux usées (États-Unis)	5.5 t/an (en 2004)	Amneklev <i>et al.</i> (2016)
Sols de la zone de drainage des décharges des mines (Portugal)	3.6 mg/kg	Antunes <i>et al.</i> (2016)
Sols de site d'entraînement militaire (Canada)	28.8 – 184.8 mg/kg	Berthelot <i>et al.</i> (2008)
Sols de champs de tire (Suisse)	8 – 5140 mg/kg	Johnson <i>et al.</i> (2005)
Sols de site de décharge de mine (Corée)	42 – 1510 mg/kg	Jung <i>et al.</i> (2002)
Sols de jardins ménagers au tour de la mine (Corée)	4 – 186 mg/kg	Jung <i>et al.</i> (2002)
Sols cultivables (France)	0.13 – 0.75 mg/kg	T. Sterckeman <i>et al.</i> (2002)
Sols d'ancienne zone minière (Angleterre)	12.2 – 20.2 mg/kg	Li <i>et al.</i> (1993)
Sols près d'une fonderie de Cu et Pb (Japon)	0.45 – 122 mg/kg	Asami <i>et al.</i> (1992)

En dépit de la réalité que les concentrations de Bi dans les écosystèmes terrestres et aquatiques ne cessent d'augmenter, en général, peu de données existent sur les caractéristiques chimiques et biochimiques du Bi, sa toxicité et son comportement dans les environnements terrestres et aquatiques (Bini *et al.*, 2014, Filella, 2010, Nan Yang *et al.*, 2011). Le devenir des contaminants comme les métaux dans l'environnement est affecté par une variété de phénomènes physico-chimiques et biologiques. Les sols naturels sont des écosystèmes hétérogènes et dynamiques, caractérisés par un environnement biogéochimique complexe qui jouent un rôle essentiel dans le devenir et l'impact des polluants. La mobilité et la répartition du Bi dans le sol pourraient être influencées par plusieurs facteurs. D'après Hou *et al.* (2005) la teneur en matière organique, la concentration en aluminium et la teneur en allophane sont les paramètres clés de la mobilité et la rétention du Bi dans le sol. L'affinité du Bi pour certains composés du sol comme l'oxyde de fer (Fe_2O_3) pourrait expliquer en partie sa distribution dans les différentes couches du sol (Manaka, 2006). De même, Thibault Sterckeman *et al.* (2004) avaient montré que les concentrations de Bi dans le sol, corrélaient positivement avec la fraction minérale fine du sol et les concentrations de fer et en partie associé à la matière organique. De plus, le Bi est un élément à propriété chalcophile, qui a tendance à cohabiter avec certains métaux tels, le Cd, Cu, Pb et Zn (Asami *et al.*, 1992).

1.1.2 La toxicité du bismuth

Actuellement les effets écotoxiques du Bi restent mal connus et peu investigués. En revanche, l'utilisation du Bi dans la fabrication de nouveaux produits et comme substitut pour remplacer des métaux toxiques tels le Pb et le Hg ne cesse d'augmenter. Par exemple, au Canada et aux États-Unis, les balles de Bi ont été approuvées comme substitut non toxique au Pb depuis 1997 et 1994, respectivement (Fahey *et al.*, 2006, Urgast *et al.*, 2012). En effet, plusieurs compagnies fabriquent des balles à base de Bi composées de 97% de Bi et 3% étain (Mann *et al.*, 1994), et 94% Bi et 6% étain (Bourjaily, 2014). La revue de la littérature sur les effets toxiques du Bi et des composés à base de Bi sur la santé humaine et animale a montré des opinions divergentes. Le processus d'approbation des munitions à base de Bi a été basé sur les résultats d'une série d'études effectuées par Sanderson et ses collaborateurs (Fahey *et al.*, 2006). La première étude de G.C. Sanderson *et al.* (1992) avait conclu que l'ingestion de balles composées de 100 % de Bi ne provoquait aucun effet aigu chez le canard colvert (*Anas platyrhynchos*). Ensuite, les auteurs ont testé les effets chroniques de balles de Bi

après ingestion chez le canard colvert (G.C. Sanderson, 1997). Cette étude avait montré que 30 jours après l'ingestion le Bi n'affectait pas la croissance et la reproduction chez le canard colvert (G.C. Sanderson, 1997). De plus, des grenailles composées de 39.05% tungstène, 44.49% bismuth et 16.46% étain ingérées par des canards colverts (*Anas platyrhynchos*), ne provoquaient aucun effet aigu après 32 jours (Ringelman *et al.*, 1993). Dans l'étude de Kraabel *et al.* (1996), les auteurs avaient implanté des grenailles contenant 44.49 % de Bi dans les muscles pectoraux des canards (*Anas platyrhynchos*). Après une période de huit semaines, aucun effet aigu n'a été détecté sur la santé des canards, tandis que des réactions inflammatoires mineures localisées dans les muscles cibles ont été observées. En comparant les effets de grenailles de Pb, de Fe et de Bi/Sn (98.35 % de Bi) incorporées dans les muscles au niveau de la poitrine des canards (*Anas platyrhynchos*), après une année les concentrations de Bi mesurées dans le foie (0.19 µg Bi/g tissu frais) et les reins (1.8 µg Bi/g tissu frais) étaient plus élevées que celles de Pb et de Fe, mais aucun effet histologique lié à ces concentrations a été observé sur ces organes (G. C. Sanderson *et al.*, 1998). Chez le rat, l'administration par voie intra-trachéale de doses de 0.8, 4 et 20 mg Bi/kg hebdomadairement pendant 13 semaines avait provoqué des inflammations et des lésions pulmonaires (Sano *et al.*, 2005). Urgast *et al.* (2012) ont montré que l'implantation de granules d'alliage de Bi dans les muscles des membres postérieurs de rat, a induit l'augmentation des concentrations de Bi dans le sang et l'urine, mais aussi que le Bi biomobilisé pourrait causer des inflammations autour de la zone entourant l'implant. Une autre étude a révélé que chez des rats implantés avec des pastilles de Bi (composées de 91 % Bi et 9 % Sn) par voie intramusculaire et voie intracrânienne, aucune augmentation de Bi n'a été détectée dans les premiers 2 – 4 mois. Toutefois, après 12 mois d'implantation, l'analyse par autométallographie a révélé des teneurs en Bi très élevées dans les reins, mais aussi dans les cellules de Leydig productrices de testostérone, les neurones et la moelle épinière notamment (Stoltenberg *et al.*, 2003). Ensuite, Hutson (2005) a observé une diminution significative dans la viabilité des macrophages testiculaires de rats après 24 h d'exposition *in vitro* à des concentrations de citrate de Bi $\geq 6.25 \mu\text{M}$, ce qui expliquerait la baisse des niveaux de testostérone. Une autre étude a montré que chez des rats contaminés par voie intrapéritonéale avec 500 mg de subnitrate de bismuth/kg, le Bi a provoqué une diminution significative de la testostérone sérique et un risque potentiel d'altération de la reproduction chez les mâles, après deux semaines (Stoltenberg *et al.*, 2002). En général, ces études montrent l'importance de la durée d'exposition pour une réelle estimation de la toxicité du Bi. Par exemple, il serait plus adéquat d'évaluer les effets chroniques et aigus des alliages

de Bi comme les balles de fusils de chasse sur des périodes de 12 mois et plus. Il faudrait prendre en considération que la bio-mobilisation du Bi pourrait dépendre du type du composé à base de Bi testé. Le Bi sous forme d'alliage prendrait probablement plus de temps pour atteindre les organes cibles que d'autres composés comme les sels de Bi. D'autre part, le manque de données sur les concentrations de Bi de base chez les animaux sauvages, rend difficile la détermination des concentrations sécuritaires.

Chez les humains, le Bi est considéré comme le métal le moins toxique, il demeure largement utilisé dans des applications médicales, pharmaceutiques et cosmétiques. Son utilisation est souvent justifiée par son efficacité comme agent antimicrobien, sa faible solubilité et sa faible absorption par les cellules humaines. Néanmoins, les effets et les mécanismes d'action du Bi restent peu connus. Cependant, l'exposition à des doses élevées pourrait provoquer des effets néfastes chez les humains. Dans les années 1970, l'épidémie d'encéphalopathie qui a eu lieu en France a été associée à l'ingestion de médicaments à base de sels de Bi incluant, le sous nitrate de Bi, le subcarbonate de Bi et le subgallate de Bi (Slikkerveer *et al.*, 1989, Supino-Viterbo *et al.*, 1977). Des problèmes de mémoire, de marche, de comportement, d'insomnie, de crampes musculaires et psychiatriques ont été développés chez les patients atteints (Slikkerveer *et al.*, 1989). Le traçage histochimique chez des patients souffrants d'intoxication au Bi a montré que le Bi s'était accumulé dans les neurones, le cervelet, le thalamus et l'hippocampe (Stoltenberg *et al.*, 2001). D'après cette étude, le Bi pourrait s'accumuler principalement dans les lysosomes au niveau des neurones. Les effets d'exposition des humains aux balles et cartouches utilisées dans les munitions sont peu documentés. Cependant, chez un chasseur qui a accidentellement reçu des balles composées de 93% de Bi, des concentrations de Bi fort élevées de 38 et 1300 nmol/L ont été mesurées dans le sang et l'urine, respectivement (Urgast *et al.*, 2012). Quatre années après l'accident, les concentrations du Bi dans le sang et l'urine restaient très élevées, soit 19 et 720 nmol/L, comparativement à 0.05 nmol/L de Bi dans le sang et l'urine des personnes non exposées. Les fortes concentrations de Bi pourraient s'expliquer par la biomobilisation du Bi à partir des fragments de balles non retirés chez la personne atteinte.

Les effets du Bi sur les organismes aquatiques ont été aussi mentionnés dans certaines études. Khangarot *et al.* (2009) ont observé que le Bi (forme nitrate de Bi) provoque des effets aigus chez deux espèces d'eau douce *Cypris subglobosa* et *Tubifex tubifex*, les CL₅₀ rapportées étaient de 37.08 et 0.66 mg/L après 48 h et 96 h d'exposition, respectivement.

Tandis que, le Bi utilisé comme catalyseur dans les revêtements ne présentait aucune toxicité aiguë pour l'algue unicellulaire *Dunaliella tertiolecta*, le crustacé *Artemia salina* et le poisson *Sparus aurata* (larves) après 96 h, 24 h et 96h, respectivement (Pretti *et al.*, 2013) .

Dans le cas des plantes terrestres, la contamination par les métaux lourds est devenue une préoccupation environnementale majeure. L'eau, le sol et les dépôts aériens sont les principales sources de contaminations des plantes par les métaux. Par exemple, les sols sont de plus en plus contaminés par le Bi en raison de l'utilisation d'engrais, de pesticides, de déchets municipaux, de compost, ainsi que les rejets provenant des fonderies et des mines. En général, la capacité des plantes à tolérer et à accumuler les métaux lourds est assez connue. Cependant, à des concentrations très élevées, les métaux lourds provoquent des dommages sévères et affectent la croissance et la productivité des plantes. Les effets toxiques de divers métaux lourds sur les plantes ont été largement rapportés dans plusieurs études (Benzarti *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2015, Wong *et al.*, 1982), tandis que peu d'études existent sur la phytotoxicité et les mécanismes d'action du Bi. Cespedes *et al.* (2003) ont étudié les effets de différentes concentrations (de 0.5 à 250 μM) de trois herbicides de bismuthines contenant des cycles aromatiques hétérocycliques sur trois plantes *Lactuca sativa*, *Trifolium pratense*, et *Lolium multiflorum*, après 48, 72 et 120 h d'exposition sur papier filtre. Leur étude avait conclu que ces composés avaient un effet inhibiteur sur la germination et la respiration des plantes. Les effets d'autres composés à base de Bi ont été rapportés récemment. Le nitrate de Bi ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_2$) diminuait significativement la germination et la croissance racinaire à des concentrations $\geq 4 \mu\text{M}$ et $\geq 1 \mu\text{M}$, respectivement chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, après deux semaines d'incubation en milieu de culture Murashige et Skoog (Nagata, 2015). Les auteurs ont aussi suggéré que le Bi pourrait perturber l'homéostasie du Fe en augmentant son accumulation dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* et en causant une carence en Fe au niveau de la partie supérieure de la plante.

De nos jours, le Bi reste classé comme un métal peu toxique et sans risque pour la santé humaine et la santé de l'environnement (Al-Hossainy *et al.*, 2015, Jenkins, 2015, Sano *et al.*, 2005). La faible toxicité du Bi est souvent justifiée par la faible solubilité du Bi (métal) et des composés à base de Bi en solution aqueuse, bien que la toxicité ne corrèle pas toujours avec la solubilité des contaminants dans l'eau. En effet, la toxicité d'un contaminant pour un organisme du sol dépend essentiellement de sa biodisponibilité.

1.2 Biodisponibilité des métaux dans les sols

La biodisponibilité des contaminants dans le sol est le critère le plus pertinent pour évaluer la toxicité, déterminer les risques et établir des réglementations pertinentes pour la réhabilitation des sites contenant des déchets dangereux (Alexander, 2000). En plus, l'étude de la biodisponibilité permet une gestion plus efficace des sols contaminés, en réduisant le temps et les coûts de l'évaluation (Ehlers *et al.*, 2003).

1.2.1 Les concepts et définitions

La biodisponibilité est un concept complexe, qui a été définie différemment par diverses disciplines. Cette différence provient du fait que la biodisponibilité se rapporte à la fois à un ensemble de notions liées à la biologie, la chimie, l'environnement et la toxicologie, et que chaque discipline a sa propre définition de la biodisponibilité en fonction de sa compréhension de ces notions. Plus encore, la signification de la biodisponibilité pourrait varier même en fonction de la spécialité de l'auteur (Berthelot, 2008). Ainsi, l'absence d'une définition unifiée et consensuelle pour ce concept a créé beaucoup de confusion et d'ambiguïté pour les scientifiques (Semple *et al.*, 2004). Dans ce contexte, Ortega-Calvo *et al.* (2015) ont montré que la définition et la compréhension de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les sédiments diffèrent selon différentes écoles de pensée (Figure 1.1). La figure 1.1 montre qu'à partir des mêmes processus, plusieurs théories ont été présentées par les scientifiques pour expliquer la biodisponibilité. Ehlers *et al.* (2003) n'ont pas fourni une définition explicite de la biodisponibilité. Ils ont plutôt décrit le processus de la biodisponibilité comme un ensemble d'interactions physiques, chimiques et biologiques qui détermine l'exposition d'un organisme en se basant sur le rapport de National Research Council (2003). Dans ce cas, la biodisponibilité est déterminée par un processus séquentiel incluant :

- Phase A : processus d'interactions du contaminant avec les différentes phases du sol/sédiment ;
- Phases B et C : processus impliqués dans le transport du contaminant vers le récepteur et son interaction avec la cellule biologique ;
- Phase D : processus impliqués dans le passage du contaminant à travers la membrane cellulaire.

Semple *et al.* (2004) avaient proposé deux concepts pour expliquer le processus de la biodisponibilité, la bioaccessibilité et la biodisponibilité. Ils ont défini la biodisponibilité (phase D Figure 1.1) comme « la fraction du contaminant qui est librement disponible à traverser la membrane cellulaire d'un organisme à partir du milieu que l'organisme habite à un temps donné ». Tandis que la bioaccessibilité (phases de A à D Figure 1.1) a été présentée comme « le composé qui est disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme à partir de l'environnement, si l'organisme a accès au produit chimique ». Dans ce cas, la bioaccessibilité inclue des phénomènes au-delà de ceux impliqués dans la biodisponibilité. Elle inclut ce qui est biodisponible réellement à un moment donné et ce qui est potentiellement biodisponible (fraction du composé facilement désorbée).

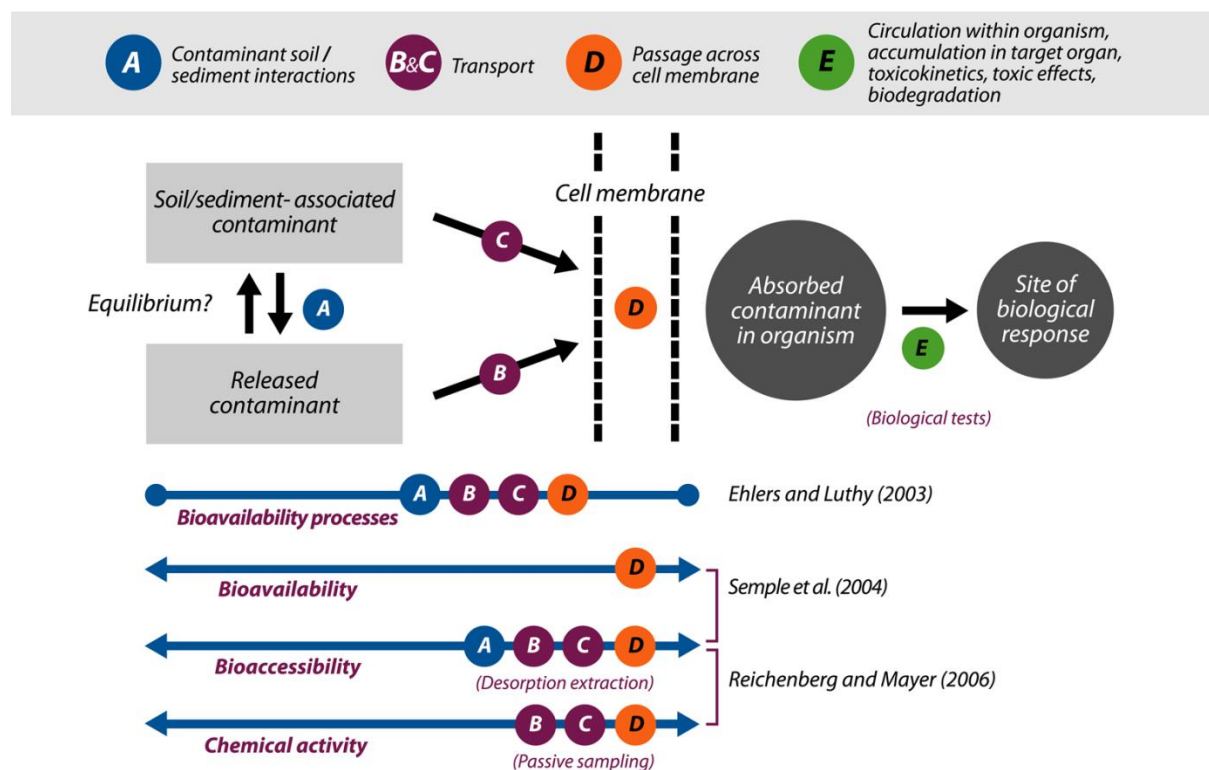


Figure 1.1 Aperçu des concepts scientifiques de la biodisponibilité des produits chimiques comme expliqués par Ehlers *et al.* (2003), Semple *et al.* (2004) et Reichenberg *et al.* (2006) d'après Ortega-Calvo *et al.* (2015).

De leur côté, Reichenberg *et al.* (2006) ont utilisé les concepts de bioaccessibilité et d'activité chimique pour décrire la biodisponibilité. Ces auteurs ont introduit le concept de l'activité chimique (phases B, C et D) qui est étroitement liée à la concentration librement dissoute du contaminant. D'après les auteurs, l'activité chimique d'un composé est basée sur la quantification du potentiel des processus physicochimiques spontanés, tels la diffusion, la sorption et la partition. En plus, plusieurs autres définitions de la biodisponibilité ont été rapportées. Par exemple, Harmsen *et al.* (2005) avaient proposé une définition plus opérationnelle de la biodisponibilité. D'après eux, la biodisponibilité serait la fraction d'un produit chimique absorbée par un organisme d'essai, qui entraîne l'accumulation (biodisponibilité environnementale) et/ou des effets toxiques (biodisponibilité toxicologique), durant la durée de l'essai à partir de l'unité de sol évaluée. Cependant, tel qu'illustré par la Figure 1.1, la phase E (qui représente le sort du contaminant une fois dans l'organisme) n'a été considérée dans aucune des théories proposées pour expliquer la biodisponibilité. En réalité, seulement la fraction d'un contaminant qui passe à travers la membrane biologique est considérée comme biodisponible (Lanno *et al.*, 2004, Ortega-Calvo *et al.*, 2015). De ce fait, il s'avère important d'inclure le rôle du récepteur biologique dans la définition et l'évaluation du processus de la biodisponibilité.

Dans le contexte de ce projet de thèse, nous considérons le concept de la biodisponibilité des contaminants dans le sol tel que défini par Peijnenburg *et al.* (1997) et ISO (2008). Ces auteurs ont décrit, la biodisponibilité comme un processus dynamique qui se déroule en trois phases consécutives (Figure 1.2). La première phase est appelée la disponibilité environnementale (également connue sous le nom de la bioaccessibilité), elle désigne la fraction du contaminant dans le sol entraînée par le phénomène de désorption qui est régi par les processus physico-chimiques du sol. Comme le montre la figure 1.2, la disponibilité environnementale comprend la fraction dissoute réellement disponible, et la fraction potentiellement accessible qui pourrait être libérée dépendamment des conditions environnantes. Cette phase relève des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. En général, la bioaccessibilité d'un contaminant pourrait varier en fonction des propriétés physico-chimiques du sol, du pH, de la teneur en matière organique, de la teneur en argile, de la granulométrie et des interactions avec d'autres contaminants. Les organismes vivants du sol influencent également la bioaccessibilité d'un contaminant. Cette influence peut être directe ou indirecte en modulant les caractéristiques chimiques du sol comme le pH et la teneur en

matière organique ou en stimulant la croissance des microorganismes qui libèrent le contaminant séquestré dans la matière organique du sol. La deuxième phase correspond à la biodisponibilité environnementale qui représente la fraction du contaminant absorbée par l'organisme suivant les processus d'absorption spécifiques à chaque organisme. À ce stade, les paramètres biologiques deviennent prépondérants, car la biodisponibilité d'un même contaminant est variable selon le récepteur biologique. La troisième phase nommée la biodisponibilité toxicologique représente quant à elle la concentration interne du contaminant dans l'organisme qui est reliée aux effets toxiques et à l'accumulation du contaminant dans l'organisme. Cependant, bien que ces trois phases de la biodisponibilité soient assez reconnues par la communauté scientifique, la relation structurelle entre elles reste peu connue et moins étudiée. Probablement en raison de l'absence de méthode standardisée, unique et directe pour mesurer chacune de ces phases, en plus des limites des approches statistiques traditionnelles pour traiter explicitement les hypothèses structurelles (Beaumelle *et al.*, 2016). Par conséquent, la biodisponibilité reste très peu utilisée dans les processus d'évaluation des sols contaminés, en dépit d'une large reconnaissance que les effets toxiques d'un contaminant sont induits par la concentration réellement biodisponible pour les organismes du sol, plutôt que par la concentration totale (Lanno *et al.*, 2004, Mahbub *et al.*, 2017, Ortega-Calvo *et al.*, 2015, Peijnenburg *et al.*, 1997).

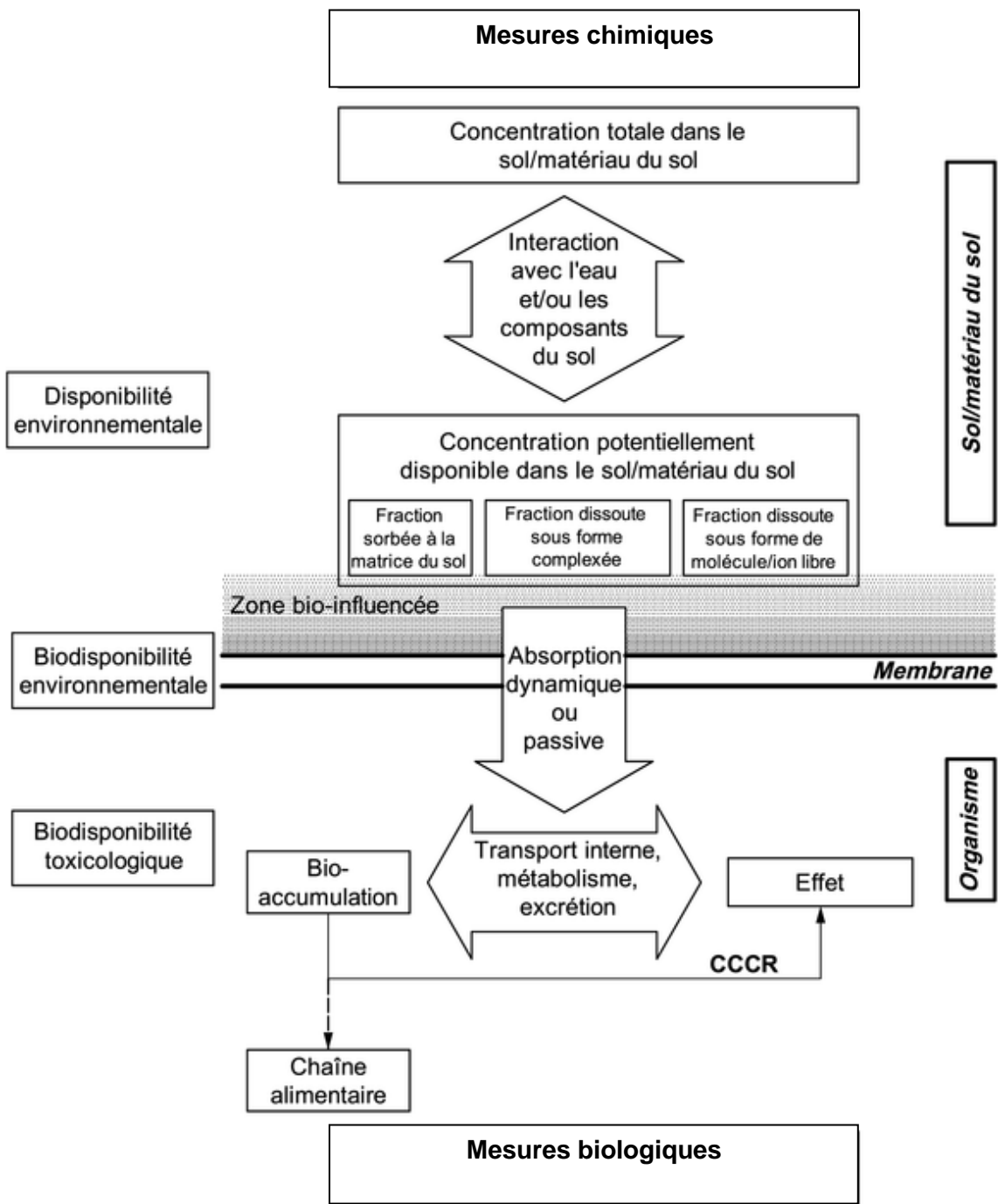


Figure 1.2 Diagramme conceptuel du processus de la biodisponibilité selon ISO 17 402 modifié d'après Lanno *et al.* (2004).

CCCR : charge critique du corps en résidu.

1.2.2 L'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les sols

L'étude de la biodisponibilité des métaux dans les sols est assez complexe, en raison de la complexité et l'hétérogénéité de ces matrices et des interactions biota-sol-contaminant. Par conséquent, le recours à une gamme large et variée de tests biologiques et de mesures chimiques est nécessaire afin de comprendre les effets néfastes de ces contaminants sur les organismes et l'écosystème. Les mesures chimiques consistent à déterminer la fraction du contaminant disponible pour les organismes, tandis que, les tests de toxicité permettent d'évaluer les effets de tous les contaminants biodisponibles, y compris ceux qui ne sont pas détectés par les analyses chimiques. Lanno *et al.* (2004) ont même avancé que seul le récepteur biologique peut déterminer si un toxique est biodisponible ou non. De ce fait, un outil chimique ne peut être considéré comme une mesure de la biodisponibilité qu'en conjonction avec un indicateur biologique auquel il doit être corrélé (Berthelot *et al.*, 2008, Lanno *et al.*, 2004). Plus encore, il serait important de réexaminer le fait que les concentrations inférieures aux limites de détection des outils de mesure ne présentent aucun risque pour les récepteurs biologiques et l'environnement.

Dans le sol, les métaux se présentent sous quatre différentes formes. Une forme faisant partie de la structure du solide, une forme liée à la structure du solide par précipitation ou adsorption, une forme liée aux matières organiques par complexation et une partie soluble dans l'eau interstitielle. Pour les vers de terre, la fraction d'un produit chimique qui est effectivement biodisponible pour absorption dermale est censée résider dans l'eau interstitielle ainsi que dans la fraction rapidement mobilisable. De ce fait, différents agents chimiques peuvent être employés afin d'extraire et d'estimer les concentrations des contaminants dans l'eau interstitielle (Allen *et al.*, 2002). Cependant, il est important de prendre en considération la nature du contaminant et la fraction à extraire dans le choix du type d'extractant à utiliser. De plus, l'évaluation de la biodisponibilité des métaux pour les vers de terre est plus compliquée que pour les plantes en raison de l'existence de plusieurs voies d'exposition aux contaminants chez les vers de terre. En effet, les méthodes utilisées pour évaluer la disponibilité environnementale ne sont pas appropriées pour évaluer la fraction du contaminant absorbée par ingestion.

1.3 Absorption et accumulation des métaux

L'absorption et l'accumulation des métaux par les organismes du sol sont des processus complexes qui varient selon les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol, les concentrations de métaux bioaccessibles, les interactions entre les divers contaminants présents dans le sol et les conditions environnementales. De plus, des facteurs liés à l'organisme lui-même tels que l'espèce, l'âge, le stade de développement, sa capacité d'adaptation et la voie d'exposition pourraient influencer l'absorption des métaux (van Gestel *et al.*, 2009). Dans le cas du Bi, certaines études avaient rapporté que sa biodisponibilité et son absorption par les organismes du sol pourraient être influencées par plusieurs facteurs tels que, la texture du sol et sa teneur en matière organique (Jung *et al.*, 2002), la teneur en argile du sol, le taux du carbone organique et la concentration en aluminium dans le sol (Berthelot *et al.*, 2009) et le pH (Li *et al.*, 1993). En outre, certains organismes du sol peuvent jouer un rôle dans l'augmentation de la mobilité et de la bioaccessibilité du Bi pour les organismes récepteurs. En effet, Feldmann *et al.* (1999) avaient montré que la méthylation du Bi par les bactéries augmente sa disponibilité et sa toxicité dans les environnements terrestres. D'autres études ont mentionné l'importance des microorganismes du sol dans l'augmentation de la disponibilité du Bi pour l'absorption par les plantes (Tsang *et al.*, 1994, Tyler, 2005). Il convient de mentionner que les invertébrés du sol comme les vers de terre pourraient aussi avoir un impact sur l'augmentation des concentrations de Bi disponibles pour absorption par les organismes du sol. Cette hypothèse est basée sur les résultats de l'étude menée par Sizmur *et al.* (2011) qui a montré l'impact des vers de terre sur l'augmentation du flux de métaux (As, Cu, Pb, Zn) disponibles pour absorption par les plantes.

Chez les vers de terre, l'absorption des contaminants, dont les métaux, peut se faire par voie cutanée et par ingestion. La fraction du contaminant présente dans l'eau interstitielle est absorbée par voie dermale, alors que la fraction du contaminant adsorbée/désorbée et séquestrée dans le sol ou les composantes du sol est accessible par ingestion (Le Roux *et al.*, 2016, W. K. Ma *et al.*, 2009). Toutefois, la contamination par ingestion de sol est soumise aux effets des conditions gastro-intestinales (digestions enzymatiques, différence de pH, etc.). En outre, une étude récente a mentionné que chez les vers de terre, les contaminants hydrophiles pénètrent principalement à travers la peau, alors que les contaminants hydrophobes pénètrent via le tube digestif (Le Roux *et al.*, 2016).

Les plantes absorbent les métaux qui sont en solutions autour de la zone racinaire *via* des systèmes d'absorption pour cations essentiels qui comprennent différents transporteurs métalliques (Babula *et al.*, 2008, Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). Des agents chélateurs secrétés par les racines des plantes jouent un rôle très important dans l'absorption des ions métalliques (Shenker *et al.*, 2001, Tangahu *et al.*, 2011).

Une fois dans l'organisme, le contaminant peut être métabolisé et excrété, accumulé dans d'autres tissus, séquestré ou transporté dans l'organisme jusqu'aux sites d'action du toxique (Lanno *et al.*, 2004). Les vers de terre peuvent tolérer et accumuler des concentrations élevées de métaux (Vijver *et al.*, 2007). La capacité des vers de terre à tolérer et à accumuler des concentrations élevées de métaux est due à deux mécanismes intracellulaires. Le premier implique la rétention des métaux dans des granules de phosphate insolubles appelées chlorosomes (A. J. Morgan *et al.*, 1982). Le second fait intervenir des ligands riches en soufre capables de lier les métaux comme les métallothionéines (MTs) (J. E. Morgan *et al.*, 1990). La mesure des doses corporelles critiques est souvent effectuée, pour évaluer les concentrations internes de métaux absorbés par les vers de terre. Ces doses corporelles critiques ont été définies par McCarty *et al.* (1993) comme étant des concentrations internes de contaminants qui sont associées à des indicateurs d'effets sous-létaux ou létaux. À différencier de la bioaccumulation qui est la mesure directe des concentrations des produits chimiques dans les tissus des organismes exposés après équilibre entre l'absorption et l'élimination. Selon certains auteurs, les doses corporelles critiques seraient les mesures les plus pertinentes pour refléter la toxicité des métaux chez des invertébrés terrestres et aquatiques (Conder *et al.*, 2003, Leonard *et al.*, 2013, Yang Wen *et al.*, 2015). Les doses corporelles critiques représenteraient davantage la biodisponibilité toxicologique tandis que la bioaccumulation serait considérée comme un intermédiaire entre la biodisponibilité environnementale et la biodisponibilité toxicologique (Berthelot, 2008). Ainsi, les doses corporelles critiques correspondent aux concentrations de contaminants au niveau des sites d'activité toxique quand les quantités de toxiques sont au-dessus du seuil de toxicité. Cependant, elles incluent aussi les concentrations secrétées et/ou séquestrées qui sont considérées comme inactives de point de vue toxicologique (Conder *et al.*, 2003). En revanche, la bioaccumulation représente les quantités de contaminants accumulées dans les tissus qui ne contiennent pas de sites d'induction de toxicité ou quand les concentrations sont sous le seuil de toxicité. De plus, les doses corporelles critiques de métaux

lourds chez les vers de terre peuvent être un indicateur des risques de transfert trophique vers leurs prédateurs (Eijsackers *et al.*, 1993).

Les plantes sont connues pour être des organismes bioaccumulateurs, elles sont largement utilisées dans le processus de décontamination des sols contaminés appelé phytoremédiation. En effet, plusieurs études ont montré que les plantes dont l'espèce *L. perenne* ont une grande capacité d'accumuler les métaux (Bidar *et al.*, 2007, Kamari *et al.*, 2012). En cas de pollution métallique les phytochélatines qui sont l'équivalent des MTs chez le ver de terre sont fortement impliquées.

1.4 Plantes et métaux lourds

Il existe deux types de métaux, les métaux essentiels (appelés aussi micronutriments) qui sont indispensables pour la croissance des plantes (*e.g.* Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo et Ni), et les métaux non essentiels (*e.g.* Cd, Sb, Cr, Pb, As, Co, Ag, Se et Hg) qui n'ont aucune fonction biologique connue (Emamverdian *et al.*, 2015, Gaur *et al.*, 2004). Les métaux essentiels sont indispensables en très faibles quantités pour assurer leur rôle dans plusieurs processus physiologiques majeurs chez les plantes comme la respiration, la photosynthèse et l'assimilation des micronutriments (Kabata-Pendias *et al.*, 2001), mais aussi dans la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques et des métabolites secondaires (Rengel, 1999). Cependant, la présence de fortes concentrations en métaux essentiels et non essentiels dans les sols peut entraîner la réduction et l'inhibition de la croissance des plantes (Zengin *et al.*, 2005). De plus, les métaux lourds sont des polluants persistants, non biodégradables ayant une grande capacité de bioaccumulation chez les plantes. De nos jours, la phytotoxicité de plusieurs métaux lourds comme l'As, Pb, Hg, Ni, Zn et Cr est très bien documentée (Emamverdian *et al.*, 2015, Ovecka *et al.*, 2014). En effet, les métaux lourds à des niveaux toxiques peuvent affecter, la croissance et la germination des plantes, la teneur en chlorophylle et en proline (Zengin *et al.*, 2005) et les systèmes antioxydants (Schützendübel *et al.*, 2002). Les métaux lourds non essentiels peuvent aussi perturber le bon fonctionnement des métaux essentiels dans les biomolécules comme les pigments et les enzymes (Ali *et al.*, 2013).

L'absorption des métaux lourds chez les plantes est influencée par plusieurs facteurs : l'espèce végétale, la biodisponibilité du métal, les propriétés chimiques du métal, la zone racinaire, les propriétés du sol et les conditions environnementales (Tangahu *et al.*, 2011).

Parmi les propriétés du sol, le pH et l'activité biologique jouent un rôle crucial dans la mobilité, la biodisponibilité et l'absorption des ions métalliques.

Dans le processus d'évaluation des sols contaminés par des métaux lourds, les plantes sont considérées comme des espèces bioindicatrices très importantes. Elles permettent d'évaluer la biodisponibilité et les effets des contaminants présents dans le sol, en plus de leur rôle dans la dépollution des sols contaminés soit la phytoremédiation. Les plantes accumulatrices de métaux sont largement utilisées dans les stratégies d'élimination des métaux toxiques y compris les déchets radionucléides à partir des sols ou des eaux contaminées avec un bon rapport coût-efficacité (Cristaldi *et al.*, 2017, Lone *et al.*, 2008, Raskin *et al.*, 1997).

1.4.1 Les mécanismes de défense des plantes au stress métallique

Les plantes sont des organismes sessiles qui possèdent des mécanismes de défense particulièrement flexibles leur permettant de contrer les stress biotiques et abiotiques. Le système phytoimmunitaire se distingue par un grand nombre de molécules impliquées dans les réponses aux stress (Benhamou *et al.*, 2012). Ainsi, la stratégie défensive des plantes est basée sur des modifications considérables de l'activité métabolique des cellules végétales. Des concentrations élevées de métaux lourds peuvent agir comme un facteur de stress qui entraîne de graves anomalies morphologiques, métaboliques et physiologiques chez les plantes. La réponse des plantes aux stress incluant la toxicité par les métaux lourds, implique plusieurs mécanismes dont certains sont illustrés dans la figure 1.3. Ils consistent en (i) la détection des stimuli des stress externes, (ii) la transduction du signal et la transmission du signal dans la cellule, (iii) le déclenchement des mesures appropriées pour contrebalancer les effets des stimuli de stress en modulant l'état physiologique, biochimique et moléculaire des cellules (Singh *et al.*, 2016). Le stress est perçu au niveau cellulaire puis il se transmet à la plante entière. Il déclenche des réponses à plusieurs niveaux de la plante. Par exemple, au niveau moléculaire la réponse se manifeste par l'altération de l'expression des gènes, au niveau cellulaire des modifications dans le métabolisme et la perturbation de la perméabilité de la membrane cellulaire et au niveau de la plante la réponse se manifeste par une baisse de la croissance, des anomalies foliaires et l'accélération de la sénescence.

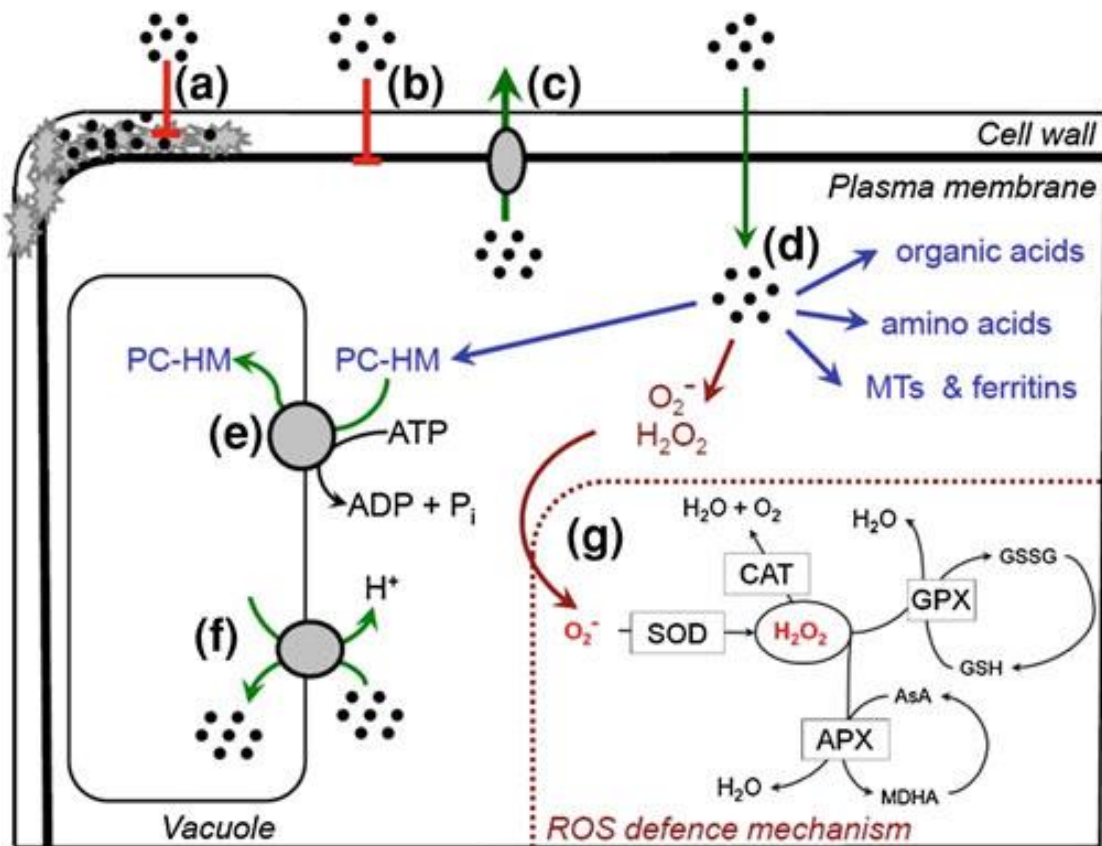


Figure 1.3 La réponse des plantes supérieures à la toxicité des métaux lourds d'après Manara (2012).

(a) Ions métalliques se liant à la paroi cellulaire et aux exsudats racinaires ;(b) Réduction de l'afflux de métal à travers la membrane plasmique ; (c) Efflux membranaire pompage dans l'apoplaste ; (d) la chélation des métaux dans le cytosol par des ligands tels que : les phytochélatines, les métallothionéines, les acides organiques et les acides aminés ; (e) Transport des complexes métal-ligand à travers le tonoplaste et accumulation dans la vacuole ; (f) Séquestration dans la vacuole par les transporteurs de tonoplastes ; (g) Induction de ROS et les mécanismes de défense contre le stress oxydatif. Les ions métalliques sont représentés par les points noirs.

La phytotoxicité des métaux lourds peut s'exercer par divers mécanismes. Ces mécanismes comprennent la compétition pour l'absorption de cations nutritifs au niveau des racines en raison de leurs similitudes, l'interaction avec le groupement (-SH) de protéines fonctionnelles pour les rendre inactives ou le déplacement des cations essentiels à partir de leur sites de liaisons spécifiques ce qui conduit à l'inhibition de la fonction (DalCorso *et al.*, 2013). Les racines sont les premiers organes impliqués dans l'interaction avec les ions métalliques. Plusieurs études ont rapporté que la diminution de la croissance racinaire chez diverses

espèces végétales exposées aux métaux lourds est induite par la diminution de l'activité mitotique (Thounaojam *et al.*, 2012).

1.4.2 L'espèce *Lolium perenne*

Le ray-grass ou *Lolium perenne* L. (Figure 1.4) est une espèce monocotylédone vivace qui appartient à la grande famille des *Poaceae* connue aussi sous le nom de graminées. Elle est considérée comme l'une des espèces de graminées fourragères la plus importante au monde (Soto-Barajas *et al.*, 2013). Le ray-grass est largement utilisé dans les mélanges à gazon en raison de son rendement fourragé de haute qualité, sa germination rapide et sa reproduction très facile (sexuée et asexuée). Cette espèce est connue par sa répartition géographique très large, grâce à sa capacité d'adaptation à de nombreuses conditions climatiques et à sa remarquable résistance au pâturage et au piétinement (Hoffman *et al.*, 2012). En plus, le ray-grass possède des caractéristiques esthétiques appréciées, et un système racinaire développé qui permet de renforcer la structure du sol (Ghariani *et al.*, 2004).



Figure 1.4 Photographie de La plante *Lolium perenne*.

Le choix de *Lolium perenne* pour notre projet est basé sur sa facilité à être cultivé dans les conditions de laboratoire d'une part. D'autre part, cette plante a été utilisée comme espèce modèle dans plusieurs protocoles standardisés pour évaluer la phytotoxicité des contaminants du sol (ASTM, 1999, US EPA, 1982). Récemment, il a été rapporté que *Lolium perenne* est l'une des espèces les plus tolérantes aux métaux lourds (Rabêlo *et al.*, 2016). Bidar *et al.*

(2007) avaient conclu que cette espèce fait partie des plantes les plus appropriées pour la gestion des sols pollués par les métaux.

1.5 Importance des vers de terre dans l'écosystème du sol

Les vers de terre sont des organismes clés des écosystèmes terrestres. Ils constituent 60% à 80% de la biomasse animale du sol et ils vivent dans presque tous les types de sols à l'exception des milieux extrêmes (Edwards *et al.*, 1992, Rida, 1994). Les vers de terre ont été classifiés en trois groupes majeurs en fonction de leur mode de vie et leur contribution au service de l'écosystème du sol (Edwards *et al.*, 1996).

- ✓ Les épigés : Ces espèces vivent à la surface des sols, dans les couches de litière et dans les matières organiques en décomposition. Les épigés se nourrissent principalement de la litière et ingèrent peu de sol. Ces vers sont de petite taille, de couleur rougeâtre et hautement mobiles avec des courts cycles de vie. Dans ce groupe, on trouve entre autres les espèces *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ainsi que *Lumbricus rubellus*.
- ✓ Les anéciques : Les vers appartenant à ce groupe vivent dans des galeries verticales allant jusqu'à 3 m de profondeur à l'intérieur des couches minérales du sol. Les anéciques se nourrissent des feuilles et de matériaux organiques à partir de la surface du sol et ingèrent un peu de sol. Ils sont les plus gros vers, de couleur sombre sur la surface dorsale et ont des cycles de vie relativement lents. Parmi les espèces appartenant à ce groupe, on retrouve *Lumbricus terrestris*.
- ✓ Les endogés : Ces espèces vivent dans des galeries horizontales qu'ils creusent principalement dans les premiers 10 - 15 cm du sol. Ils se nourrissent principalement de sol. Les endogés sont de couleur blanchâtre, lents, de taille variable avec des cycles de vie de durées intermédiaires. Ce groupe comprend plusieurs espèces par exemples, *Aporrectodea caliginosa* et *Allolobophora icterica*.

Les vers de terre sont aussi appelés les ingénieurs de l'écosystème, ils jouent un rôle majeur dans le fonctionnement de la pédogenèse du sol. Leur activité affecte les propriétés biotiques et abiotiques du sol. Ils participent à la formation et la structuration du sol par la

décomposition et la minéralisation de la matière organique (Edwards *et al.*, 1996) l'amélioration de la porosité, de l'aération et de l'agrégation du sol (Lemtiri *et al.*, 2014), l'amélioration de la rétention et de la distribution de l'eau dans les couches supérieures du sol (Ernst *et al.*, 2009), et l'augmentation de la disponibilité des nutriments dans le sol (Yasmin *et al.*, 2010). Par exemple, les vers de terre augmentent la biodisponibilité de l'azote (N) soit en le libérant directement via leurs urines, leurs excréments, leurs mucus et leurs corps après décomposition, soit indirectement via la minéralisation de la matière organique (Bityutskii *et al.*, 2002). En améliorant l'aération, la fertilité et la rétention de l'eau du sol, les vers de terre stimulent la croissance des microorganismes du sol (Binet *et al.*, 1998, Lemtiri *et al.*, 2014) et augmentent la diversité, la production et la croissance des plantes (Eisenhauer *et al.*, 2009, van Groenigen *et al.*, 2014).

Les vers de terre occupent une place très importante dans la chaîne alimentaire, ils représentent une source de protéines pour de nombreux animaux, aussi bien les vertébrés que les invertébrés (Ireland, 1983, Yasmin *et al.*, 2010). Ainsi, ils jouent un rôle clé dans le processus de bioamplification de plusieurs contaminants du sol (Yasmin *et al.*, 2010). Des récentes études ont rapporté le rôle des vers de terre dans les stratégies de restauration et de remédiation des sols contaminés (Blouin *et al.*, 2013, Parra *et al.*, 2010). En effet, les vers de terre sont capables de tolérer et d'accumuler des concentrations importantes de composés chimiques dans leur tissu (Hopkin, 1989, Le Roux *et al.*, 2016). En outre, ils sont considérés comme des bioindicateurs importants de la qualité des sols, en raison de leur abondance et ils font partie intégrante du système pédologique et parce qu'ils sont faciles à identifier et à collecter (USDA-NRCS, 2009). Parmi les espèces de ver de terre, *Eisenia andrei* et *Eisenia fetida* font partie des organismes d'essais standards les plus utilisés en écotoxicologie terrestre.

1.5.1 L'espèce *Eisenia andrei*

Depuis le début des années 80, l'espèce *Eisenia andrei* (Figure 1.5) est l'une des espèces les plus utilisées en écotoxicologie pour évaluer la toxicité des sols contaminés. Elle a été choisie par de nombreux organismes internationaux comme bioindicateur des écosystèmes terrestres et plusieurs tests ont été standardisés afin d'évaluer les toxicités aiguës et chroniques des contaminants (ISO, 2008, ISO, 2012, OECD, 1984, OECD, 2004). *Eisenia andrei* représente un bon modèle, malgré le fait qu'il est l'une des espèces de vers de terre les moins sensibles (Ribera *et al.*, 2001, Velki *et al.*, 2012). Le choix de cette espèce est justifié par

plusieurs raisons. D'après la classification proposée par Marcel B. Bouché en 1971, *Eisenia andrei* fait partie de la catégorie des vers épigés (Wallwork, 1983). Il est donc classé parmi les vers de terre qui vivent à la surface du sol, qui sont les moins protégés et les plus exposés aux conditions climatiques défavorables et aux contaminants. Durant leur vie, les vers de terre passent par quatre stades de développement qui sont cocons, juvéniles, sub-adultes et adultes (Pelosi *et al.*, 2008). Les vers de terre sont considérés comme adultes lorsque le clitellum est bien apparent. Le cycle de vie d'*Eisenia andrei* est relativement court (Figure 1.6), il atteint la maturité sexuelle en 7 à 8 semaines ce qui facilite l'étude des effets de contaminants sur les vers adultes. Son importante fécondité (2-5 cocons/ver/semaine pouvant produire plusieurs juvéniles) permet aussi d'étudier les effets sur la reproduction de la première, ainsi que de la deuxième génération. En plus, *Eisenia andrei* est facile à cultiver dans des conditions contrôlées au laboratoire et tolère une gamme variée de type de sol (Edwards *et al.*, 1992, Yasmin *et al.*, 2010).



Figure 1.5 Les vers de terre *Eisenia andrei* adultes.

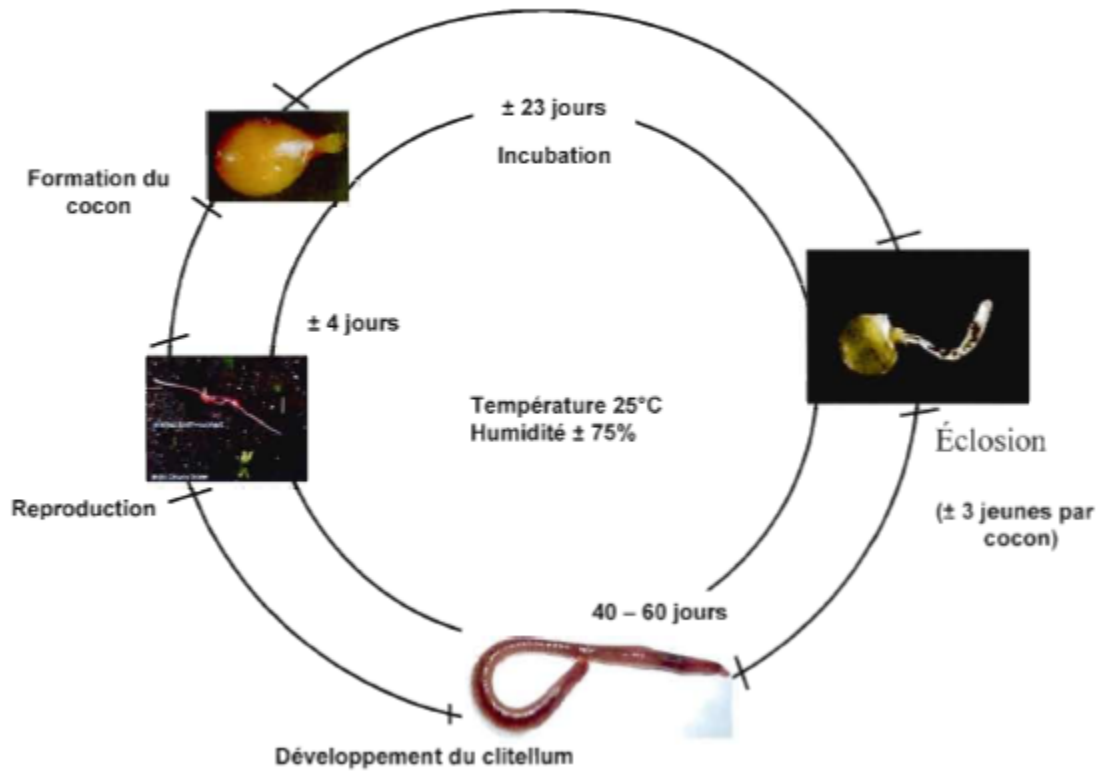


Figure 1.6 Diagramme du cycle de vie d'*Eisenia fetida andrei* élevé dans du fumier de vache à une température de 25°C et une humidité de 75%, d'après Venter *et al.* (1988) et traduit en français par Berthelot (2008).

1.5.2 La reproduction chez le ver de terre

Les vers de terre sont hermaphrodites, chaque ver possède à la fois des testicules et des ovaires. Cependant, les différents gamètes sont bien séparés afin d'éviter l'autofécondation. L'étude de Domínguez *et al.* (2003), sur la reproduction uniparentale chez deux espèces de ver de terre *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, a montré que seulement un cas d'autofécondité a été observé sur les 84 vers étudiés.

Le système de reproduction mâle est composé de deux paires de testicules et de deux paires d'entonnoirs séminaux lesquels sont entourés par trois paires de vésicules séminales (Figure 1.7 A). Le système reproductif femelle est composé d'une paire d'ovaires qui se situe directement dans la cavité coelomique (Figure 1.7 A). Lors de l'accouplement (Figure 1.7 B), le sperme des deux individus est échangé et emmagasiné dans des réceptacles appelés spermathèques. Par la suite, chacun des vers secrète un tube de mucus qui formera un cocon autour de son clitellum. Lorsque l'enveloppe de mucus passe par les gonopores femelles, des œufs sont déchargés à l'intérieur. Ensuite, du sperme est libéré des spermathèques à l'intérieur du même cocon. Le cocon se referme, quitte le ver et se retrouve directement dans le sol. Environ trois semaines plus tard, le cocon va éclore et selon les espèces un nombre variable de juvéniles sortiront. Parmi les espèces appartenant au groupe des épigés, plusieurs auteurs ont montré que le ver *Eisenia andrei* présente les taux de croissance et de fécondité les plus importants (Domínguez *et al.*, 2003, Elvira *et al.*, 1997).

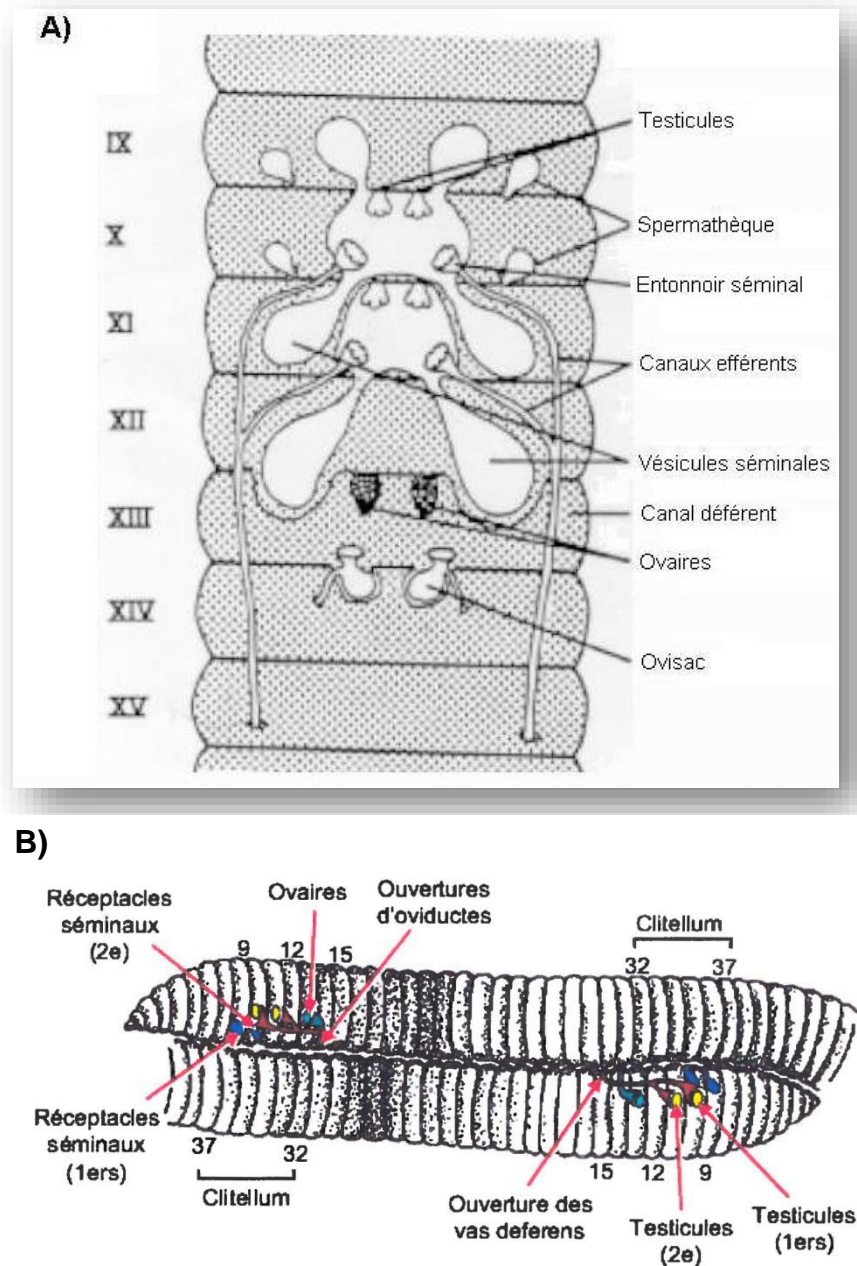


Figure 1.7 (A) Coupe dorsale du système de reproduction du ver de terre d'après (Wallwork, 1983). (B) Accouplement chez le ver de terre.

La reproduction chez les vers de terre pourrait être directement compromise par les conditions environnementales défavorables et les contaminants présents dans le sol. Il a été largement rapporté que la croissance et la fécondité des vers de terre sont fortement influencées par plusieurs facteurs comme la température et la teneur en eau du sol (Lee, 1985, Sims *et al.*, 1999), la quantité et la qualité de la matière organique (Lofs-Holmin, 1983), le pH

(Curry, 1998) et le type et la texture de sol (Curry, 1998, Edwards *et al.*, 1996). De plus, plusieurs auteurs ont montré que la reproduction chez les vers de terre peut être altérée par les métaux (Savard *et al.*, 2007, Sivakumar, 2015), les pesticides (Yasmin *et al.*, 2010), les matériaux énergétiques (Robidoux *et al.*, 2000) et les nanoparticules (Schlich *et al.*, 2012).

Pour ces raisons, les paramètres de reproduction ont été choisis par plusieurs organismes de standardisation afin d'évaluer les effets chroniques des conditions environnementales défavorables ou des contaminants présents dans le sol. Ainsi, plusieurs méthodes standardisées ont été développées par exemple :

- OECD ligne directive 222 (2004) : Test de reproduction chez les vers de terre (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*).
- ISO 11268-2 (1993) : Qualité du sol, effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*), Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.

1.5.3 Le système immunitaire des vers de terre

Chez les oligochètes, le liquide coelomique joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire. Le liquide coelomique est principalement composé de deux types de coelomocytes, les amœbocytes et les chloragocytes (leucocytes). Les amœbocytes sont séparés à leur tour en deux groupes, les hyalines et les granulaires. Les coelomocytes peuvent être distingués selon leur morphologie, leur origine morphogénétique et leur fonction (Bilej *et al.*, 1993, Stein *et al.*, 1977). D'après Hamed *et al.* (2002), les amœbocytes dérivent de la doublure mésenchymateuse du coelome, tandis que les chloragocytes se différencient des cellules chloragocènes qui couvrent les surfaces coelomiques de l'appareil digestif et des vaisseaux sanguins majeurs (Affar *et al.*, 1998). La réponse immunitaire chez les vers de terre comprend des éléments cellulaires et humoraux (Figure 1.8). Au cours de la réponse immunitaire cellulaire les coelomocytes sont impliqués dans la phagocytose, les processus inflammatoires, le rejet de greffe et la coagulation du liquide coelomique (Dhainaut *et al.*, 2001, Gupta *et al.*, 2014). Cependant, la première barrière non spécifique contre les agents agresseurs chez les vers de terre est la peau. L'épiderme de la peau est formé de cellules de soutien, de cellules basales et de cellules sécrétrices. Le mucus sécrété contient de nombreuses macromolécules à activité antimicrobienne incluant des glycoprotéines, des mucopolysaccharides, des lectines et des hémocyanines (Pan *et al.*, 2010). Au cours de la réponse humorale les coelomocytes secrètent des lysozymes, des agglutinines, des peroxydases, des protéases, des phénoloxydases et des

facteurs antimicrobiens (fétidines, lysénines, eiseniapore, facteur cytolitique cœlomique) (Gupta *et al.*, 2014).

Dans des conditions de stress, les vers exercent une pression sur la cavité cœlomique et les cœlomocytes sont rapidement expulsés des pores du segment dorsal interne du corps. De ce fait, plusieurs méthodes non invasives ont été développées pour extruder le liquide cœlomique contenant les cœlomocytes en utilisant le courant électrique (Roch, 1979), l'éthanol (Eyambe *et al.*, 1991), et la stimulation par ultrason (Hendawi *et al.*, 2004). Le système immunitaire est extrêmement sensible aux conditions variables de l'environnement, et à la présence de contaminants et d'agents pathogènes. Ainsi, des changements subtils dans certains composants du système immunitaire, pourraient être utilisés comme indicateurs précoces de l'immunotoxicité (Brousseau *et al.*, 1997, Fournier *et al.*, 2000). Parmi les paramètres liés à l'immunité cellulaire, la phagocytose a été largement utilisée comme critère d'évaluation sous-létal de la toxicité des contaminants du sol chez le ver de terre (Belmeskine *et al.*, 2011, Irizar *et al.*, 2015).

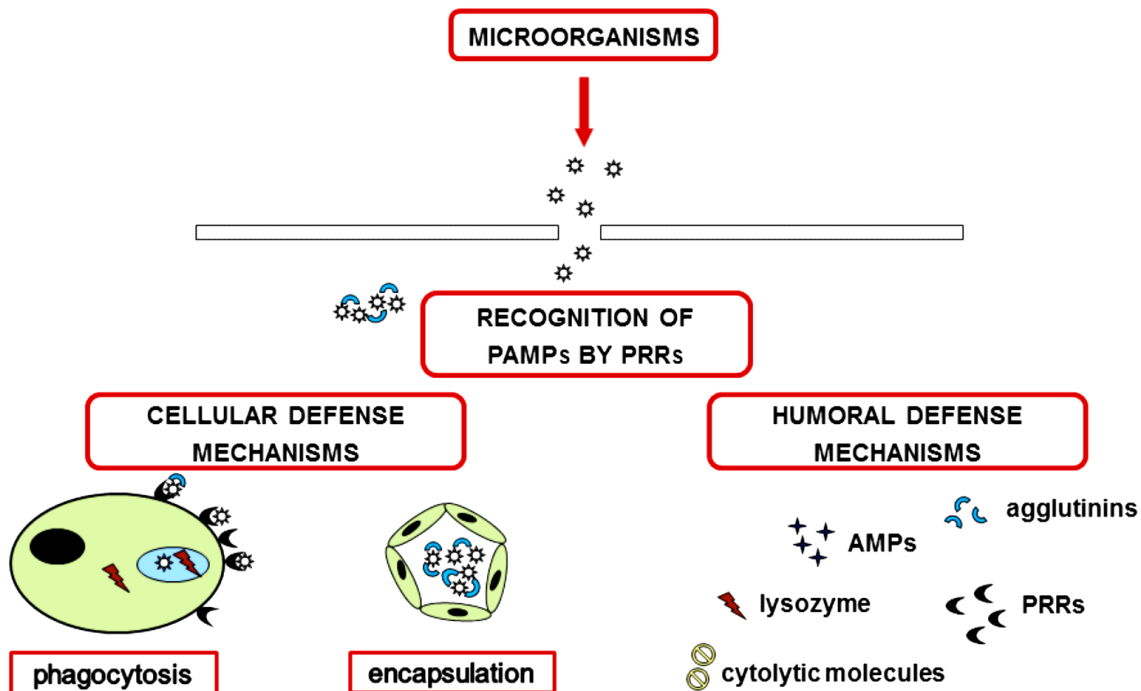


Figure 1.8 Le schéma général des mécanismes de défense innée chez les vers de terre d'après Roubalová *et al.* (2015).

La première barrière protectrice des vers de terre est la peau en combinaison avec le mucus sécrété qui contient divers facteurs antimicrobiens. Les microorganismes envahisseurs sont reconnus par les deux formes de récepteurs de reconnaissance (PRRs) solubles et liés à la membrane qui détectent les profils moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs).

1.5.4 La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme de défense interne présent chez les vertébrés et les invertébrés. Elle se déroule en quatre étapes : la reconnaissance, l'adhésion, l'ingestion et la destruction des particules étrangères. Il a été rapporté que la composition et les caractéristiques fonctionnelles des cœlomocytes de vers de terre peuvent varier en réponse à plusieurs facteurs environnementaux, y compris les changements saisonniers (Kurek *et al.*, 2003), la température (Cygil *et al.*, 2007) et le stress causé par les métaux lourds (Kwadrans *et al.*, 2008). De plus, plusieurs études ont démontré que diverses substances chimiques peuvent affecter l'activité phagocytaire des cœlomocytes. Parmi ces substances, il y a entre autres les métaux lourds (Sauvé *et al.*, 2005), les biphényles polychlorés (BPC) (Ville *et al.*, 1995), les polychlorodibenzo-p-dioxines et les polychlorodibenzofuranes (Belmeskine *et al.*, 2011).

1.6 Hypothèse et objectifs

La production mondiale du bismuth ne cesse d'augmenter en raison de son utilisation dans la fabrication de plusieurs produits tels les médicaments, les cosmétiques, les additifs métallurgiques, les alliages fusibles à basse température et les produits phytosanitaires. De plus, le Bi est de plus en plus utilisé comme alternative non toxique pour remplacer certains métaux dont l'écotoxicité est assez reconnue, comme le plomb et le mercure. Par conséquent, les concentrations de bismuth pourraient augmenter considérablement dans les environnements terrestres. En effet, des concentrations de Bi très élevées ont été mesurées dans différents types de sols (sols agricoles, sols des sites de chasse et d'entraînement militaires, sols situés à proximité des sites miniers) comme mentionnées dans la section 1.1.1. Les organismes terrestres sont ainsi de plus en plus exposés à des concentrations de Bi qui dépassent largement les niveaux de base. Cependant, parmi les métaux, la toxicité et le devenir du Bi dans l'environnement restent parmi les moins étudiés. Actuellement, les effets du bismuth et les risques qu'il présente pour les organismes terrestres sont peu connus, très peu investigués et non réglementés.

L'hypothèse de recherche de ce projet de doctorat est que les concentrations de Bi accessibles dans les sols contaminés sont suffisamment élevées pour altérer la croissance et la reproduction des organismes terrestres. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet est d'évaluer la biodisponibilité du Bi dans les sols contaminés, ainsi que ses effets aigus et chroniques sur le ver de terre *Eisenia andrei* et la plante *Lolium perenne* L. Pour ce faire, trois objectifs spécifiques sont fixés :

- 1) Déterminer les effets aigus du Bi chez la plante *Lolium perenne* (germination et croissance racinaire) et le ver *Eisenia andrei* (léthalité et croissance). Dans ce cas, des essais d'exposition *in vivo* et *in vitro* de courte durée sont effectués afin de déterminer les concentrations à effet aigu.
- 2) Déterminer les effets chroniques du Bi chez le ver de terre *Eisenia andrei*. Pour ce faire, les vers de terre adultes sont exposés à un sol naturel de référence contaminé artificiellement au laboratoire.
 - 2.1) Évaluer les effets du Bi sur la reproduction et la croissance du ver *Eisenia andrei*.
 - 2.2) Évaluer les effets du Bi sur la viabilité et l'activité phagocytaire des cellules immunitaires (coelomocytes) du ver *Eisenia andrei*.

- 3) Évaluer la biodisponibilité du Bi dans le sol et les tissus des vers exposés. En plus des tests biologiques, des méthodes d'extraction et d'analyses chimiques sont utilisées afin de mesurer les concentrations de Bi bioaccessible dans le sol et les concentrations de Bi accumulées dans les tissus de vers *Eisenia andrei*.

2 CHAPITRE 2: PHYTOTOXICITY OF BISMUTH NITRATE AND BISMUTH CITRATE ON GERMINATION AND GROWTH OF *LOLIUM PERENNE* EXPOSED ON FILTER PAPER AND ON ARTIFICIALLY CONTAMINATED SOIL

Zohra Omouri^{a,c*}, Jalal Hawari^{b,c}, Michel Fournier^a, Pierre Yves Robidoux^{a,c,d}

^aINRS-Institut Armand Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

^bPresent address École Polytechnique de Montréal, Département des génies civil, géologique et des mines, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

^cNational Research Council of Canada, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2

^d Present address AGAT Laboratoires, 9720 Route Transcanadienne, St. Laurent, Québec, Canada, H4S 1V9

L'article a été soumis au journal ***Chemosphere*** le 22 janvier 2018

Contribution de l'étudiant

J'ai rédigé le manuscrit, effectué toutes les corrections demandées par les réviseurs et soumis l'article. De plus, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats et participé à la planification des expériences.

Le Dr. Jalal Hawari a participé à la correction de l'article. Mon directeur de recherche le Dr. Pierre Yves Robidoux et mon codirecteur le Dr. Michel Fournier ont participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

Résumé de l'article en français

La phytotoxicité du citrate de Bi et du nitrate de Bi sur le ray-grass a été évaluée à l'aide de tests sur papier filtre et en sol standardisés. Les paramètres étudiés comprennent la germination des graines et la croissance des racines et des feuilles. Les résultats ont montré que le nitrate de Bi semblait être plus toxique que le citrate de Bi et que la croissance des racines était plus sensible que la germination des graines et la croissance des feuilles. Le test sur papier filtre a indiqué que le nitrate de Bi diminuait significativement l'élongation racinaire ($CI_{50} = 60.34$ mg/L) aux concentrations testées ≥ 30.35 mg/L et la germination des graines à 485 mg/L. Pour sa part, le citrate de Bi diminuait significativement l'élongation racinaire ($CI_{50} = 139.5$ mg/L) et la germination des graines à des concentrations ≥ 99.52 mg/L et 398.08 mg/L, respectivement. Les données obtenues en sol artificiel OCDE contaminé avec le nitrate de Bi ont indiqué une réduction significative de la masse racinaire à 485 mg/kg de sol, mais aucun effet significatif n'a été observé sur la masse des feuilles et la germination des graines à des concentrations ≤ 485 mg/kg de sol. Dans le sol naturel, le nitrate de Bi a réduit significativement la masse et l'élongation racinaire à des concentrations ≥ 4.8 et 48.5 mg/kg de sol, respectivement. Alors qu'aucun effet n'a été observé sur la germination des graines et la masse des feuilles. Le sol naturel additionné de citrate de Bi n'a montré aucune diminution significative de la germination des graines et de la croissance des racines à des concentrations ≤ 398 mg/kg. La toxicité des sels de Bi chez le ray-grass varie selon la matrice dans l'ordre suivant : papier-filtre > sol naturel > sol artificiel de l'OCDE. Nous supposons que la phytotoxicité du Bi est liée à la biodisponibilité de Bi qui est à son tour contrôlée par la solubilité du sel de Bi, en plus des propriétés physicochimiques de la matrice testée.

2.1 Abstract

Phytotoxicity of Bi citrate and Bi nitrate on perennial ryegrass were evaluated using standardized filter paper and soil tests. Endpoints included seeds germination, and root and shoot growth. The results showed that Bi nitrate seemed to be more toxic than Bi citrate, and root growth more sensitive than seeds germination and shoot growth. Filter paper test indicated that Bi nitrate significantly decreased root elongation ($IC_{50}=60.34$ mg/L) at tested concentrations ≥ 30.35 mg/L and seedling germination at 485 mg/L. Bi citrate decreased significantly root elongation ($IC_{50}=139.5$ mg/L) and seedling germination at concentration ≥ 99.52 mg/L and at 398.08 mg/L, respectively. Data from OECD artificial soil spiked with Bi nitrate indicated a significant reduction on root mass at 485 mg/kg soil but no significant effect was observed on shoot mass and germination at concentration ≤ 485 mg/kg soil. In natural soil, Bi nitrate reduced significantly root mass and root elongation at concentration ≥ 4.8 and 48.5 mg/kg soil, respectively. No effect was however observed on seeds germination and shoot mass. Natural soil spiked with Bi citrate showed no significant decrease in seed germination and root growth at concentrations ≤ 398 mg/kg. The toxicity of Bi salts on perennial ryegrass varied with the matrix in the following order: filter paper > natural soil > OECD artificial soil. We assume that Bi phytotoxicity is related to Bi bioavailability which in turn is controlled by solubility of the Bi salt in addition to the physicochemical properties of the tested matrix.

Keywords: Bismuth salts, soil contamination, *Lolium perenne L.*, Germination, Growth.

2.2 Introduction

Bismuth (Bi) is a rare metal, it is about twice as abundant as gold in the earth's crust (Babula *et al.*, 2008). According to Bowen (1979) average concentrations of Bi in uncontaminated soils and in edible plants grown in uncontaminated soils are 0.2 µg/g and <0.06 µg/g dry soil, respectively. Although, Bi salts have been used for over 300 years, e.g. in the treatment of skin lesions and syphilis (Lambert *et al.*, 1997), Bi remains one of the least understood and least studied element in the periodic table (Nan Yang *et al.*, 2011). Some of the most widely used Bi salts in various industrial and medicinal applications include Bi nitrate and Bi citrate. Many studies reported that Bi nitrate has been used in the treatment of chronic diarrhea and cholera (Roscoe *et al.*, 1890), in the anticancer treatment (Yang Yang *et al.*, 2016), and as a catalyst (Sheik Mansoor *et al.*, 2016). On the other hand, Bi citrate was used in the treatment of *Helicobacter pylori* infection (Lambert *et al.*, 1997), hair dye (Sampathkumar *et al.*, 2009), and cosmetics (Nan Yang *et al.*, 2011). Thus, the increased use of Bi based compounds in various industrial applications could lead to an increase in the concentrations of this metal in terrestrial and aquatic ecosystems. Indeed, Amneklev *et al.* (2016) reported an increase of 300 % in Bi measured at water treatment plants in Stockholm in 2007 compared to 2006, due to excessive use of Bi salts in cosmetic products. Furthermore, this study showed that the spreading of sewage sludge in agricultural soils in Europe and in the United States constitutes an important source of Bi contamination of soils. In addition, phosphate fertilizers used for soil amendment could be considered as another potential source of Bi contamination of soils (Eriksson, 2001). Recently, some studies reported that ashes and dust from the incineration of industrial and hospital waste, could be another entry route for Bi into the environment (Xiong *et al.*, 2015, Zhao *et al.*, 2008). According to Zhao *et al.* (2008), in China Bi concentration ranging between 1.1 and 489 mg/kg have been found in ash samples collected in hospital waste incinerators. Xiong *et al.* (2015) reported that atmospheric dust samples from six Chinese cities contained high Bi concentrations (0.9 – 4.6 mg/kg) compared to the background concentration of Bi in soils (0.4 mg/kg). Old metal mining and smelters can also act as a potential source of Bi contamination of soil and water resources (Li *et al.*, 1993). Jung *et al.* (2002) reported an average total Bi concentration of 436 mg/kg in soil samples from a mining dump sites in Korea and 21 mg/kg in household garden soils around this area. Despite documented increasing levels of Bi concentrations in soil environments, toxicity and environmental fate of Bi towards plants remains relatively unknown.

Lolium perenne L. (*L. perenne*), commonly called perennial ryegrass is one of the most important forage and turf grasses in the world (Soto-Barajas *et al.*, 2013). It is widely used due to its high quality forage yield, rapid germination, long season production, ability to adapt to many climatic conditions and to its remarkable resistance to grazing and trampling (Hoffman *et al.*, 2012). Perennial ryegrass is used as a model species in standardized toxicity assessment methods (ASTM, 1999, US EPA, 1982). In general, plants can tolerate and bioaccumulate soil contaminants such as heavy metals. However, exposure to high concentrations of metals can cause inhibitory effects on growth and germination of plants such as perennial ryegrass. Some metals such as copper, nickel, manganese, lead, cadmium decrease root growth of ryegrass (Wong *et al.*, 1982). Bonnet *et al.* (2000) showed that zinc affects the detoxification enzyme activity (e.g. ascorbate peroxidase, superoxide dismutase). Chromium decreases the growth of *Lolium perenne* L. and causes the loss of leaves pigmentation (Vernay *et al.*, 2007). Currently, despite the wide use of Bi in several industries, little data is available on the effects of Bi based compounds on terrestrial plants exposed to the metal through contaminated water, contaminated soil and soil fertilization.

In this study, we investigated the toxic effects of Bi nitrate and Bi citrate on germination, root elongation and growth of the *L. perenne* plant, using filter paper and contaminated soil exposure tests. We also compared the toxicity data from Bi nitrate and Bi citrate to gain some insights on Bi bioavailability to *L. perenne* for each tested salt.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Chemicals and reagents

Bismuth (III) citrate ($C_6H_5BiO_7$), Bismuth (III) nitrate pentahydrate ($Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$), cadmium chloride hemi(pentahydrate) ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$) were purchased from Sigma. ASTM Type II water was obtained using a Millipore Super-Q water purification system or Zenopure Mega-90. Glassware and polyethylene containers were washed with acetone, soaked in nitric acid solution (10%, v/v), and rinsed with deionized water.

2.3.2 Soil characterization and samples preparation

The natural sandy soil used in this study was collected from a site located in a non-contaminated area from the Canadian Forces Base in Valcartier (Qc, CAN). After collection, soil was passed through a 2 mm sieve to remove rocks, roots, and other large fragments.

Preliminary toxicity tests (*i.e.* plant germination, earthworm lethality test) were carried out to confirm that the background level was not toxic. Physical and chemical characteristics of this soil are 0.7 % clay, 2.0 % total organic carbon, 97.6 % sand, 1.6 % silt, 5.96 pH, 0.05 mg/kg bismuth, < 5 mg/kg arsenic, < 0.5 mg/kg Cadmium, 2 mg/kg cobalt, 180 mg/kg magnesium, < 0.02 mercury, < 5 mg/kg lead and 31 mg/kg Zinc. Soil was spiked by adding bismuth nitrate or bismuth citrate to soil to obtain the selected nominal concentrations. A negative control (soil without Bi nitrate/Bi citrate) was prepared by adding Type II water only to the soil. Spiked soils were mixed for 20 ± 2 h in a rotary mixer to obtain a homogeneous distribution of the metal. The soil was then rehydrated to 60% of its water holding capacity (WHC). The WHC was determined by saturating the soil with Type II water and by measuring the water content as described previously by Robidoux *et al.* (2000). Water content was determined by measuring the loss of soil weight after drying for 18 h at 105 °C in an oven. After hydration, the soil samples were then mixed overnight in a rotary mixer, and kept at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) for 2 weeks for aging. Soil aliquots were taken at the beginning and at the end of the experiments to determine the moisture content, and pH. The pH of the soil samples was measured using a 1:5 (v:v) soil/water suspension (ISO, 1994). In addition, an artificial soil was prepared by mixing 70% sand, 20% kaolin clay, and 10% de sphagnum peat as described by OECD (1984). The pH of the mixture was adjusted to 6.5 ± 0.5 by addition of calcium carbonate (CaCO_3).

2.3.3 Plant toxicity tests

Filter paper and soil tests were used to assess toxicity of Bi nitrate and Bi citrate on perennial ryegrass plant. Perennial ryegrass seeds used in this study were obtained from Pickseed Canada Inc. (St-Hyacinthe, Quebec, Canada).

2.3.4 Seed germination and root elongation test on filter paper

The effects of Bi nitrate and Bi citrate on seed germination and root elongation of perennial ryegrass were assessed following the US EPA (1989) method described for lettuce root elongation. In the present study we replaced lettuce by *Lolium perenne L.* Three replicates were carried out for each test concentration and six replicates for the negative control (deionized water without Bi nitrate or Bi citrate). Briefly, five seeds were placed in a glass petri dish (100 X 15 mm) containing a filter paper (Whatman grade 3) impregnated with 4 ml of Bi nitrate or Bi citrate aqueous solution or deionized water for the negative control. Petri dishes were then incubated in the dark at 24 ± 2 °C for 5 days. After exposure, the percentage of

germination was calculated and the root elongation was measured. Bi nitrate and Bi citrate concentrations were prepared separately using a series of dilutions from a stock solution of 485 and 398.01 mg/L nominal concentration, respectively, in order to use identical Bi concentrations. The cadmium (as $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) was used as reference toxicant with concentrations ranging from 1.56 to 110 mg Cd/L.

2.3.5 Germination and growth test in contaminated soil

Toxicity assays in natural and artificial contaminated soil were carried out according to the recommendations of US EPA (1982) and ASTM (1999) standardized protocols. Soil assays were performed in 3 or 4 triplicate, including controls. Perennial ryegrass seeds were sown in pots containing 200 g of soil. Each pot was placed in a sealed plastic bag to maintain soil moisture, and then incubated in a growth chamber (Conviron Inc., Winnipeg, Manitoba, Canada) at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark. After 48 h, the exposure conditions were changed and a photoperiod of 16 h light (5000 ± 500 lux; $25 \pm 2^\circ\text{C}$): 8h dark ($20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) was used. Seedling emergence, root elongation and wet mass of shoot and root were measured after 7 days of exposure. Artificial soil (OECD) and natural sandy soil were spiked with nominal Bi nitrate concentrations ranging from 15.5 to 485 mg/kg and from 4.8 to 485 mg/kg dry soil, respectively. The Bi citrate was tested on natural sandy soil only with nominal concentrations ranging between 3.98 to 398 mg/kg dry soil. Negative control containing deionized water only was performed for each test experiment.

2.3.6 Data analysis

All data were expressed as the average \pm standard deviation (SD). Toxicity endpoints such as inhibitory effect concentration (e.g. IC_{25} and IC_{50}), were determined using the ToxCalc (Version 5.0; Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA). Program JMP IN (v 4.04, SAS Institute Inc.) was used to run an ANOVA followed by a test multiple comparisons in order to identify treatments with significant differences compared to the control (Dunnett's; $p < 0.05$).

2.4 Results

2.4.1 Filter paper essays

The effects of Bi nitrate and Bi citrate on seed germination and root elongation of the ryegrass after 5 days of exposure on filter paper are shown in Figure 2.1. Bi nitrate decreased significantly ($p < 0.05$) the root elongation of ryegrass at tested concentrations ≥ 30.3 mg/L and completely inhibited growth at 485 mg/L (Figure 2.1 A). However, seed germination is less sensitive to Bi nitrate. The percentage of germination decreased significantly only at the highest concentration tested 485 mg Bi nitrate/L with 40% germination compared to 100% germination in the control. In addition, Figure 2.1(B) shows that the pH of Bi nitrate decreased as a function of Bi nitrate concentrations up to reach 2.18 at the highest tested concentration 485 mg Bi nitrate/L. Figure 2.1 (C) presents the effects of Bi citrate on germination and root elongation of ryegrass. The results showed also that root growth was more sensitive to Bi citrate than seeds germination. The percentage of germination decreased significantly ($p < 0.05$) compared to control at 398.1 mg Bi citrate/L with a 53.3 % germination, whereas, root elongation decreased significantly ($p < 0.05$) at tested concentration ≥ 99.52 mg Bi citrate/L. Figure 2.1 (D) shows the pH decrease of Bi citrate following the increase of Bi citrate concentrations. The pH decrease of Bi citrate was slightly less compared to pH decrease of Bi nitrate.

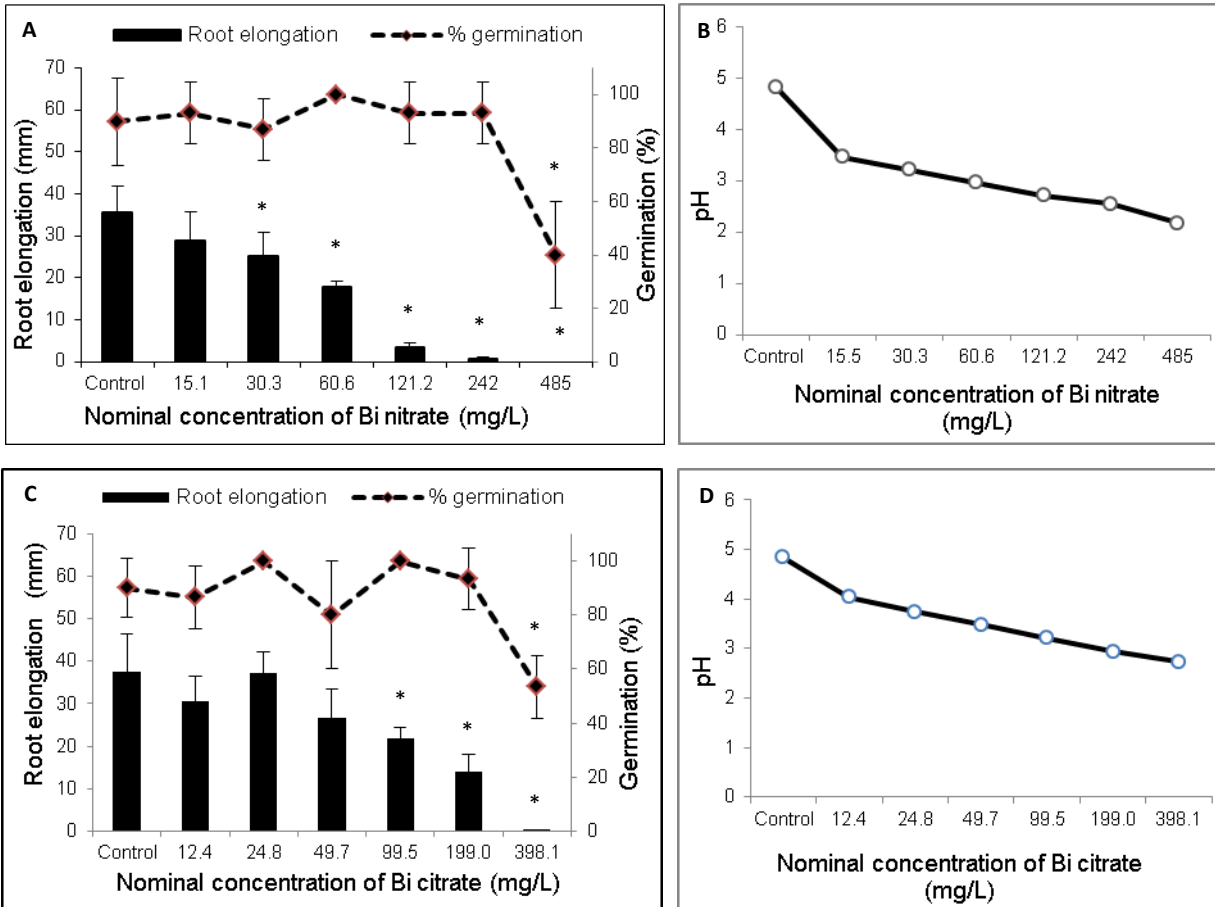


Figure 2.1 Effects of bismuth nitrate and bismuth citrate on *L. perenne* seeds after 5 days exposure on filter paper.

(A) Effects of bismuth nitrate on germination and root elongation. (B) pH of bismuth nitrate aqueous solutions tested. (C) Effects of bismuth citrate on germination and root elongation. (D) pH of bismuth citrate aqueous solutions tested. Values are mean \pm SD ($n = 3 - 6$). * Mean value is significantly different compared to control ($p < 0.05$).

2.4.2 Soil assays

The results obtained after 7 days of exposure of ryegrass seeds in artificial (OECD) soil contaminated with Bi nitrate are shown in Figure 2.2. At concentrations ≤ 485 mg /kg dry soil, Bi nitrate did not seem to affect ryegrass seeds germination (Figure 2.2 A), while the root wet mass was reduced significantly at 485 mg Bi nitrate/kg dry soil compared to control (OCDE soil without Bi nitrate). The root wet mass decreased from 2.4 ± 0.6 mg in control to 1.3 ± 0.5 mg at 485 mg Bi nitrate/kg dry soil. However, no significant effect was observed using the shoot wet mass (data not shown). At the beginning of experiment ($t=0$), soil pH decreased slightly and not

significantly with the rise of Bi nitrate in soil, from 5.85 in control to 5.72 at 485 mg Bi nitrate/kg dry soil (Figure 2.2 B) . Similar values were observed at the end of the experiment (t=7 days).

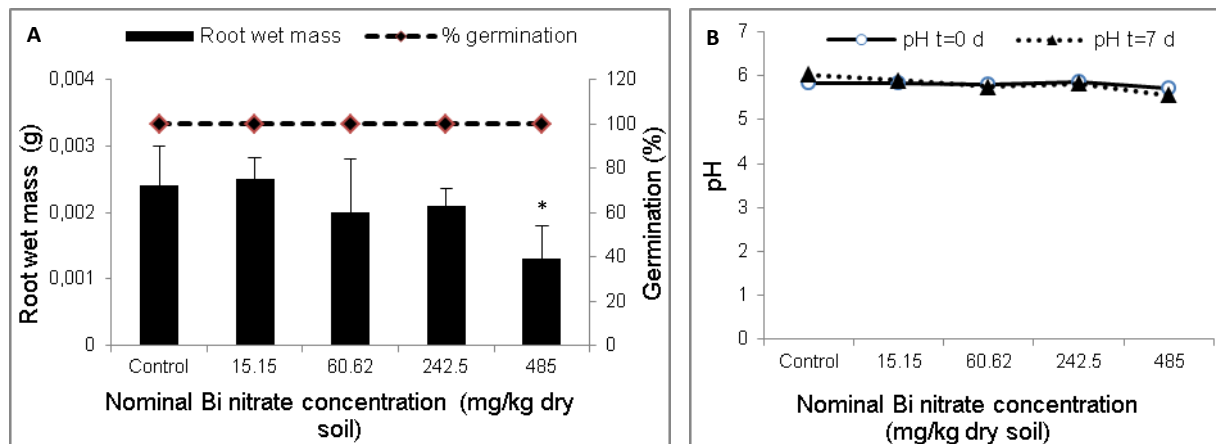


Figure 2.2 (A) Effects of Bi nitrate on seeds germination and root wet mass of *L. perenne* after 7 days of exposure in OECD soil. (B) Variation of soil pH at t=0 and t=7 days.

* Mean value is significantly different compared to control ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm SD, N=4.

The results of experiment carried out in natural sandy soil contaminated with Bi nitrate are presented in Figure 2.3. After 7 days of exposure, Bi nitrate did not affect seedling germination of ryegrass at tested concentration ≤ 48.5 mg/kg dry soil (Figure 2.3 A), whereas, a significant decrease ($p < 0.05$) in root elongation was observed at tested concentration of 485 mg Bi nitrate/kg dry soil compared to control (Figure 2.3A). Indeed, average root elongation reduced from 48.5 mm in control to 22.5 mm at 485 mg/kg dry soil. The root biomass was the most sensitive endpoint using Bi nitrate (Figure 2.3 C). Root wet mass decreased significantly ($p < 0.05$) at all tested concentration (≥ 4.8 mg Bi nitrate/kg dry soil). Average root biomass decreased from 0.000875 g in control to 0.000167 g at 485 mg Bi nitrate/kg dry soil. At t=0 d, soil pH decreased as a function of the Bi nitrate concentration in soil from 5.95 to 4.05 for control and 485 mg Bi nitrate/kg dry soil, respectively. Furthermore, the same pattern was observed in soil pH at the end of experiment (t= 7 d). In addition, no significant difference was observed in the pH values measured at the beginning (t=0) compared to those measured at the end (t=7 d) of the test experiment (Figure 2.3B).

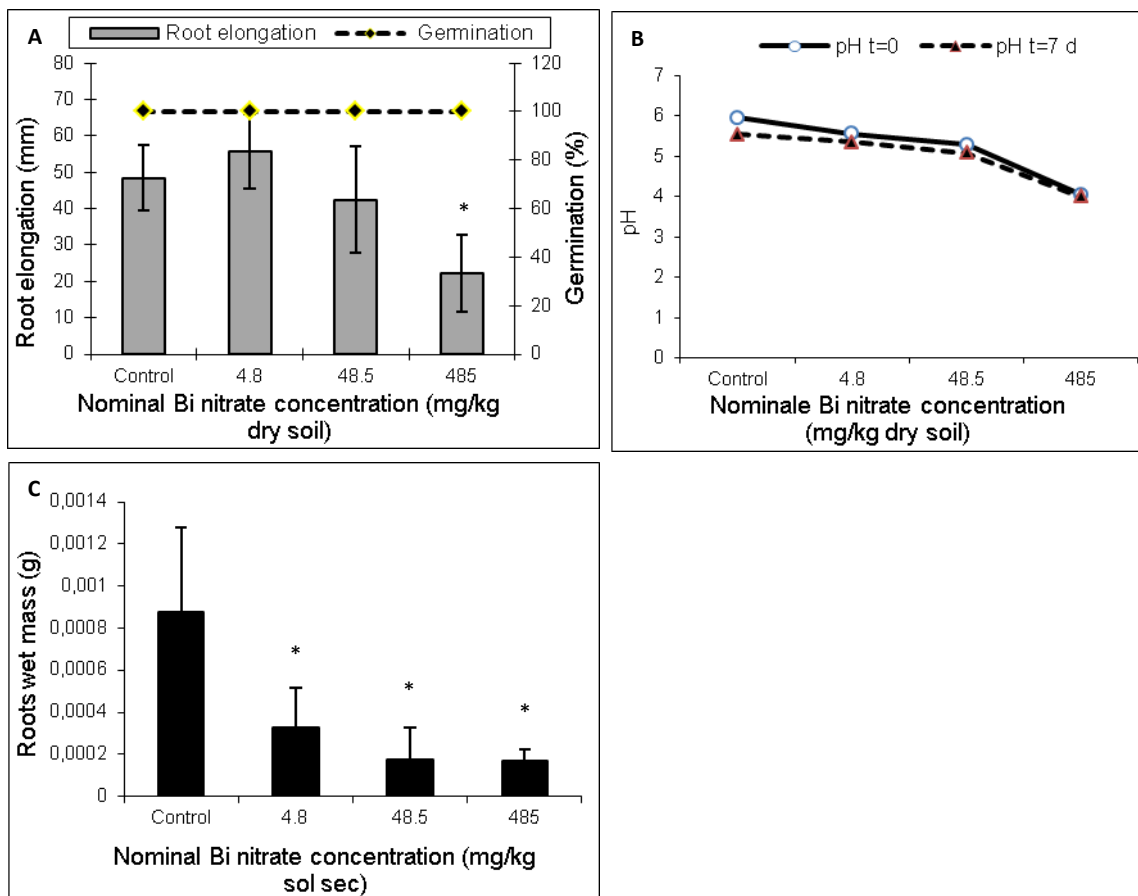


Figure 2.3 Effects of Bi nitrate on *L. perenne* after 7 days of exposure in contaminated natural sandy soil. (A) Germination and roots length. (B) Soil pH. (C) Root wet mass.

* significantly different from control. Values are expressed as mean \pm SD, N=4.

Results obtained from *L. perenne* seeds exposed 7 days in natural soil contaminated with Bi citrate are summarized in Figure 2.4. Root elongation slightly decreased but not significantly as function of Bi citrate soil concentration. Similar results were observed for root wet mass (data not shown). At t=0 soil pH was 5.52 at 398 mg Bi citrate/kg dry soil compared to 5.36 for the control (Figure 2.4 B). After 7 days, the pH values were similar to those obtained at the beginning of the test experiment (t=0).

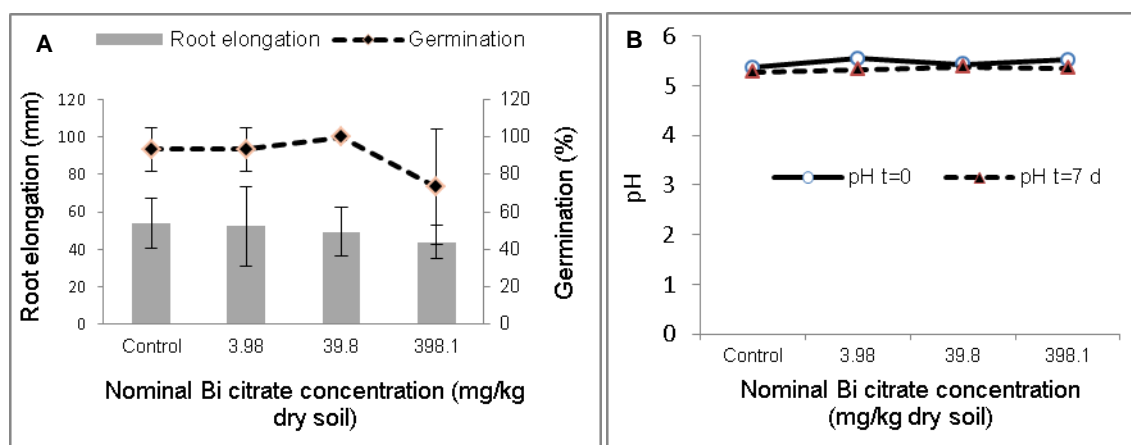


Figure 2.4 (A) Effect of Bi citrate on seeds germination and root elongation after 7 days of exposure in natural spiked soil. (B) Values of soil pH at t=0 and t=7 days.
 Data expressed as mean \pm standard deviation (SD), N = 3-4.

2.5 Discussion

This study shows that bismuth phytotoxicity depends on the type of bismuth salt used (Bi nitrate or Bi citrate), the type of exposure test (filter paper vs soil test experiments) and the type of substrate (artificial or natural sandy soil) employed.

2.5.1 Filter paper exposure

The data from paper filter exposure indicate that for the same Bi metal nominal concentrations (6.5, 13.1, 26.1, 52.2, 104.4, 208.9 mg Bi/L deionized water), Bi nitrate was more toxic than Bi citrate (Figure 2.1). IC_{25} and IC_{50} were largely lower for Bi citrate than Bi nitrate (Table 2.1). This effect may be explained in part by lower water solubility and thence lower bioavailability of Bi citrate than Bi nitrate. Indeed, some authors reported that Bi nitrate was relatively more water soluble compared to Bi citrate (Briand *et al.*, 1999, Larrañaga *et al.*, 2016). Similarly, Cespedes *et al.* (2003) reported that growth inhibitory and cytotoxic effects of three derivatives of Bi (III) on three different plants (*Lactuca sativa L.*, *Lolium multiflorum* and *Trifolium pretense*) exposed on a filter paper increased when the Bi-containing compound was more soluble in water.

Table 2.1 Toxicity of Bi nitrate and Bi citrate in filter paper using ryegrass root elongation after 5 days of exposure.

Bi treatment	Root elongation (mm)	
	IC ₂₅ (95% CI) (mg/L)	IC ₅₀ (95% CI)(mg/L)
Bi nitrate	23.79 (5.9 - 46.0)	60.34 (45.88 - 77.115)
Bi citrate	45.22 (24.55 - 100.92)	139.5 (70.67 -238.07)
Cd chloride (reference toxicant)	6.22 (2.35 – 11.16)	21.91 (13,07 - 29,14)

IC₂₅ : estimated concentration (linear interpolation) that inhibit growth by 25%.

IC₅₀ : estimated concentration (linear interpolation) that inhibit growth by 50%.

On the other hand, the drastic decrease of soil pH in Bi nitrate aqueous solutions compared to Bi citrate aqueous solutions could contribute to the observed effects. *L. perenne* can tolerate a wide range of soil pH ranging from 4.5 to 8.4 (Alberta Agriculture and Forestry, April 2004). The pH of the aqueous Bi nitrate and Bi citrate solutions tested at high concentration was more acidic than the tolerated limit (Figure 2.1 B and C), up to 2.2 and 3, respectively. In this case, the decrease in pH caused by Bi salts could affect growth and germination of plant. Thus, the effects caused by acidic pH can interfere with the effects caused by bioavailable Bi. Results of this study indicated also that seeds germination was the less sensitive endpoints affected by Bi nitrate and Bi citrate compared to the root elongation. As shown in Figure 2.1, germination was inhibited in a significant manner ($p < 0.05$) only at the highest concentrations tested i.e. 485 and 398.08 mg/L for Bi nitrate and Bi citrate, respectively. Similarly, Nagata (2015) reported that Bi nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_2$) affected more *Arabidopsis thaliana* root growth than shoot growth and seeds germination. The authors showed also that Bi accumulated in root was 7-fold higher compared to the shoot, suggesting the decrease of Bi transport mechanism to reduce transport of Bi to shoot. Furthermore, Nagata (2015) suggested that Bi might perturb Fe homeostasis by inducing Fe accumulation in *Arabidopsis thaliana* root. The lower sensibility of seed germination compared to root and shoot growth in several plant species exposed to metals had been widely reported (Kang *et al.*, 2016, Kapustka *et al.*, 1995). However, despite the large number of studies on the inhibitory effects of several metals on the germination and growth of plants, the mechanisms involved remain poorly understood. Cespedes *et al.* (2003) suggested that inhibition of mitochondrial respiration and interaction in cell proliferation process or energetic

pathways might be the mechanisms by which bismuthine derivatives inhibit seedling growth. Other recent studies reported that inhibition of specific enzymatic reactions is one of the main mechanisms behind metal toxicity on seed germination (Kang *et al.*, 2016, Sethy *et al.*, 2013).

2.5.2 Soil exposure

The results indicated that Bi nitrate was more toxic in natural sandy soil compared to artificial (OECD) soil. Data showed also that root growth was the most sensitive endpoint to Bi nitrate exposure compared to germination and shoot growth. IC₂₅ and IC₅₀ for root wet mass in natural soil and OECD soil were 1.01 and 292.8 and 3.05 and > 485 mg/kg respectively (Table 2.2). Differences in toxicity may be explained by higher Bi bioavailability to *L. perenne* in natural sandy soil than in artificial soil due to variations in the physicochemical and biological properties of the two soils. The artificial soil used in this study contained less sand (70%) with high content of clay (20 %) and sphagnum peat (10 %), while the natural sandy soil (97.6 % sand) used had low clay content (0.7 %) and low total organic carbon (2 %). Thereby, soil texture and composition may partly influence Bi bioaccessibility and phytotoxicity. It has been reported that bioavailability and uptake of Bi by plant from soil could be influenced by several soil factors such as organic matter content and soil texture (Jung *et al.*, 2002). Hou *et al.* (2005) reported that the amount of Bi (added as Bi nitrate) retained in different samples of soil depends on surface area, on organic matter and aluminum content of soil. In another study, Berthelot *et al.* (2009) found that total Bi concentration and clay content enhanced Bi bioaccessibility in soil but total organic carbon and amorphous aluminium oxide had an inverse effect on Bi bioaccessibility. However, total carbon content seems to be the most important soil parameter to influence soil Bi bioaccessibility (Berthelot *et al.*, 2009).

Table 2.2 Toxicity of Bi nitrate and Bi citrate in spiked artificial (OECD) and natural soil using ryegrass after 7 days of exposure.

Bi salt treatment/substrat	Root elongation (mm)		Root wet mass (g)	
	IC ₂₅ (mg/kg)	IC ₅₀ (mg/kg)	IC ₂₅ (mg/kg)	IC ₅₀ (mg/kg)
Bi nitrate/ OECD soil	nd	nd	292.8	> 485
Bi nitrate/ Natural soil	71.7	315.1	1.01	3.05
Bi citrate /Natural soil	nd	nd	nd	nd

IC₂₅ : estimated concentration (linear interpolation) that inhibit growth by 25% . IC₅₀ : estimated concentration (linear interpolation) that inhibit growth by 50%. nd : not determined.

Results from Bi nitrate spiked soil showed a decrease in soil pH in natural sandy soil, whereas pH does not change in artificial soil. However, soil pH did not decrease drastically such as observed in the case of filter paper assays. Soil is a very complex matrix and multiple factors could influence soil pH such as mineral content, acid and base-forming ions in soil and soil texture. Indeed, it has been reported that soils with high clay and organic matter content have a greater buffering capacity and have generally the capacity to resist to a drop or rise in pH compared to sandy soils (McCauley *et al.*, 2009). Berthelot *et al.* (2009) investigated a site highly contaminated with mixture of metals and explosive concluded that Bi bioaccessibility was not affected by the pH ranging from 5.35 to 7.96. Conversely, Hou *et al.* (2006) reported that the mobile fraction of Bi in soil increased with increasing pH. Soils organisms may play a role in the release of Bi into the aqueous phase of the soil thus increasing its availability and uptake by plants. Tsang *et al.* (1994) reported that Bi released from non-sterile soil contaminated with Bi was much higher compared to sterile soil, suggesting that soil microorganisms influence the release of Bi in soil. Thereby, differences in biological properties between the natural soil and the artificial soil used in this study could affect Bi availability and hence Bi plant toxicity. Thus, it can be concluded that the availability and toxicity of Bi on ryegrass depend on the combination of various factors such as Bi salt solubility and soil physicochemical and biological characteristics.

2.6 Conclusions

The present study compares the toxic effects of Bi nitrate and Bi citrate to ryegrass using paper filter, artificial and natural sandy soil. The results showed that Bi phytotoxicity varies depending on the substrate physicochemical properties, type of Bi salt used, bismuth route of exposure and type of assays employed, i.e. filter paper and type of soil assays employed. In addition, both filter paper and soil toxicity tests results indicated that Bi nitrate was more toxic to ryegrass than Bi citrate, probably due in part to relatively higher Bi nitrate water solubility and hence Bi bioavailability. Furthermore, phytotoxic effects showed that root growth was the more sensitive to Bi salts than seedling germination and shoot growth. However, the mechanisms of Bi toxicity leading to the inhibition of germination and growth require more investigations.

2.7 Acknowledgments

We thank Sabine Dodard of the NRC Canada, Montreal for technical assistance. We are also grateful to Drs Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from Defence Research and Development Canada–Valcartier (Canadian Ministry of National Defence) for their support of this project.

2.8 References

- Alberta Agriculture and Forestry (April 2004) Perennial Ryegrass Seed Production in Western Canada.), p 15.
- Amneklev J, Augustsson A, Sörme L & Bergbäck B (2016) Bismuth and Silver in Cosmetic Products: A Source of Environmental and Resource Concern? *Journal of Industrial Ecology* 20(1):99-106.
- ASTM (1999) Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests. (E-1963-98, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.).
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L & Kizek R (2008) Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6(4):189-213.
- Berthelot Y, Trottier B & Robidoux PY (2009) Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index. *Environ Int* 35(1):83-90.
- Bonnet M, Camares O & Veisseire P (2000) Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J Exp Bot* 51(346):945-953.
- Bowen HJM (1979) Environmental Chemistry of the Elements. *Academic Press, London, UK*:333.
- Briand GG & Burford N (1999) Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chem Rev* 99(9):2601-2658.

- Cespedes CL, Lemus A, Salazar JR, Cabrera A & Sharma P (2003) Herbicidal, plant growth inhibitory, and cytotoxic activities of bismuthines containing aromatic heterocycles. *J Agric Food Chem* 51(10):2923-2929.
- Eriksson J (2001) *Concentrations of 61 Trace Elements in Sewage Sludge, Farmyard Manure, Mineral Fertiliser, Precipitation and in Oil and Crops*. Swedish Environmental Protection Agency. <https://books.google.ca/books?id=rUIHcgAACAAJ>
- Hoffman L, DaCosta M, Ebdon JS & Zhao J (2012) Effects of drought preconditioning on freezing tolerance of perennial ryegrass. *Environmental and Experimental Botany* 79:11-20.
- Hou H, Takamatsu T, Koshikawa MK & Hosomi M (2005) Migration of silver, indium, tin, antimony, and bismuth and variations in their chemical fractions on addition to uncontaminated soils. *Soil Science* 170(8):624–639.
- Hou H, Takamatsu T, Koshikawa MK & Hosomi M (2006) Concentrations of Ag, In, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan. *European Journal of Soil Science* 57(2):214-227.
- ISO (1994) Soil Quality — Determination of pH. International Standard ISO 10390.).
- Jung MC, Thornton I & Chon HT (2002) Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu-W mine in Korea. *Sci Total Environ* 295(1-3):81-89.
- Kang I-M & Kong IC (2016) Effects of properties of metal-contaminated soils on bacterial bioluminescence activity, seed germination, and root and shoot growth. *SpringerPlus* 5:272.
- Kapustka LA, Lipton J, Galbraith H, Cacula D & Lejeune K (1995) Metal and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest montana uplands contaminated by smelter emissions: II. Laboratory phytotoxicity studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(11):1905-1912.
- Lambert JR & Midolo P (1997) The actions of bismuth in the treatment of Helicobacter pylori infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 Suppl 1:27-33.
- Larrañaga MD, Lewis RJ & Lewis RA (2016) *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. Wiley. <https://books.google.ca/books?id=KPrfCwAAQBAJ>
- Li X & Thornton I (1993) Arsenic, antimony and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. *Environ Geochem Health* 15(2-3):135-144.
- McCauley A, Jones C & Olson-Rutz K (2009) Soil pH and Organic Matter, Module 8. (Nutrient management. Extension service. Montana State University).
- Nagata T (2015) Growth inhibition and IRT1 induction of Arabidopsis thaliana in response to bismuth. *Journal of Plant Biology* 58(5):311-317.
- OECD (1984) Test No. 207 Earthworm, Acute Toxicity Tests. (OECD Publishing).
- Robidoux PY, Svendsen C, Caumartin J, Hawari J, Ampleman G, Thiboutot S, Weeks JM & Sunahara GI (2000) Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (Eisenia andrei) reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10.1002/etc.5620190709.
- Roscoe HE & Schorlemmer C (1890) *A TREATISE ON CHEMISTRY*. D. APPLETON AND COMPANY, New York
- Sampathkumar K & Yesudas S (2009) Hair dye poisoning and the developing world. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* 2(2):129-131.
- Sethy SK & Ghosh S (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine* 4(2):272-275.
- Sheik Mansoor S, Aswin K, Logaiya K & Sudhan SPN (2016) Bismuth nitrate as an efficient recyclable catalyst for the one-pot multi component synthesis of 1,4-dihydropyridine derivatives through unsymmetrical Hantzsch reaction. *Journal of Saudi Chemical Society* 20(Supplement 1):S100-S108.

- Soto-Barajas MC, Gómez J, Vázquez de Aldana BR & Zabalgogezcoa I (2013) Incidence and identification of endophytes *Epichloë/Neotyphodium* in wild populations of *Lolium perenne*. (Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e.V. Verlag, Braunschweig), p 33-38.
- Tsang KW, Dugan PR & Pfister RM (1994) Mobilization of Bi-ion, Cd-ion, Pb-ion, Th-ion, and U-ion from contaminated soil and the influence of bacteria on the process. *Emerging Technologies in Hazardous Waste Management IV*, ACS Symposium Series, Vol 554. p 78–93.
- US EPA (1982) Early Seedling Growth Toxicity Test. in *Number EG-13*. Office of Toxic Substances, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC).
- US EPA (1989) Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites. in *EPA/600/3-88/029*.
- Vernay P, Gauthier-Moussard C & Hitmi A (2007) Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere* 68(8):1563-1575.
- Wong MH & Bradshaw AD (1982) A Comparison of the Toxicity of Heavy Metals, Using Root Elongation of Rye Grass, *Lolium perenne*. *The New Phytologist* 91(2):255-261.
- Xiong QL, Zhao WJ, Guo XY, Shu TT, Chen FT, Zheng XX & Gong ZN (2015) Dustfall Heavy Metal Pollution During Winter in North China. *Bull Environ Contam Toxicol* 95(4):548-554.
- Yang N & Sun H (2011) *Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects*. 414-420 p
- Yang Y, Zhou S, Ouyang R, Yang Y, Tao H, Feng K, Zhang X, Xiong F, Guo N, Zong T, Cao P, Li Y & Miao Y (2016) *Improvement in the Anticancer Activity of 6-Mercaptopurine via Combination with Bismuth(III)*. 1539-1545 p
- Zhao L, Zhang F-S, Wang K & Zhu J (2008) Chemical properties of heavy metals in typical hospital waste incinerator ashes in China. *Waste Management* 29(3):1114-1121.

3 CHAPITRE 3: ACUTE TOXICITY OF BISMUTH TO THE EARTHWORM *EISENIA ANDREI*

Zohra Omouri^{1, 3, *}, Jalal Hawari², Michel Fournier¹, Pierre Yves Robidoux^{3, 4}

¹INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Canada

²Department of Civil, Geological and Mining Engineering, Polytechnic Montreal, Montreal, Canada

³National Research Council of Canada, Montreal, Canada

⁴AGAT Laboratories, Montreal, Canada

Email address:

zohra.omouri@hotmail.com (Z. Omouri), jalal.hawari@polymtl.ca (J. Hawari), Michel.Fournier@iaf.inrs.ca (M. Fournier), robidoux@agatlabs.com (P. Y. Robidoux)

*Corresponding author

L'article a été publié dans le journal **International Journal of Ecotoxicology and Ecobiology** 2017; 2(3): 125-133 (soumis le 30 mai 2017 et accepté le 3 juillet 2017).

Contribution de l'étudiant

J'ai rédigé le manuscrit, effectué toutes les corrections demandées par les réviseurs et soumis l'article. De plus, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats et participé à la planification des expériences.

Le Dr. Jalal Hawari a fourni des conseils techniques et il a participé à la correction de l'article. Mon directeur de recherche le Dr. Pierre Yves Robidoux et mon codirecteur le Dr. Michel Fournier ont participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

Résumé de l'article en français

Le bismuth (Bi) est de plus en plus utilisé dans plusieurs applications industrielles, y compris la production d'alliages, de médicaments, de cosmétiques et de munitions. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur le devenir du Bi dans l'environnement et ses effets écotoxicologiques. La présente étude décrit la toxicité aiguë de Bi à 14 jours, ajouté comme citrate de Bi dans un sol naturel sablonneux, chez le ver de terre adulte *Eisenia andrei*. Les concentrations totales de Bi mesurées étaient de 298.0, 399.5, 431.0 et 469.5 mg Bi/kg de sol sec. Les données indiquent que le Bi était toxique pour *Eisenia andrei*, comme déterminé par CL₅₀ et LOEC, c'est-à-dire 416.0 et 399.5 mg Bi/kg de sol sec, respectivement. À 14 jours en présence d'*Eisenia andrei*, la fraction du Bi bioaccessible dans le sol, telle que déterminée dans les extraits KNO₃ aqueux de sol, a augmenté d'un facteur allant de 1.6 à 30.0 par rapport à celles mesurées au début de l'expérience. De plus, cette étude montre qu'une augmentation du pH causée par la présence de vers de terre dans le sol s'accompagne d'une augmentation de la bioaccessibilité de Bi et donc de la toxicité. Par exemple, lorsque la bioaccessibilité du Bi augmentait de 0.262 à 7.516 mg Bi/kg de sol sec, le taux de mortalité augmentait de 0 à 79%. En supposant qu'il y a au moins deux voies par lesquelles le ver *Eisenia andrei* accroît la bioaccessibilité du Bi; une voie est guidée par la mobilité, les interactions biochimiques (mucus) et biologiques (bactéries) d'*Eisenia andrei* avec les constituants du sol, et l'autre voie est marquée par la libération du Bi accumulé dans les corps des vers de terre après leur mort.

3.1 Abstract

Bismuth (Bi) is increasingly used in several industrial applications including the production of alloys, drugs, cosmetics and munitions formulations. However, little information is available on the environmental fate and ecotoxicological effects of Bi. The present study describes 14 days acute toxicity of Bi, added as Bi citrate to a natural sandy soil, to the adult earthworm *Eisenia andrei*. Total measured Bi concentrations were 298.0, 399.5, 431.0, and 469.5 mg Bi/kg dry soil. Data indicates that Bi was toxic to *Eisenia andrei*, as determined by LC₅₀ and LOEC, i.e., 416.0 and 399.5 mg Bi/kg dry soil, respectively. At 14 days in the presence of *Eisenia andrei* the bioaccessible fraction of Bi in soil, as determined in KNO₃ aqueous soil extracts, increased by a factor ranging from 1.6 to 30.0 compared to those measured at the beginning of experiment. Moreover, this study shows that an increase in pH caused by the presence of earthworm in soil was accompanied by increase in Bi bioaccessibility and consequently toxicity. For example, when Bi bioaccessibility increased from 0.262 to 7.516 mg Bi/kg dry soil, the mortality rate increased from 0 to 79 %. Assuming that there were at least two routes by which *Eisenia andrei* enhanced Bi bioaccessibility; one route was guided by the mobility, the biochemical (mucus) and the biological (bacteria) interactions of *Eisenia andrei* with soil constituents, and the other route was marked by the death of earthworms and the release of the accumulated Bi from the carcass.

Keywords: Bismuth, Bioaccessibility, Soil, Acute Toxicity, *Eisenia andrei*

3.2 Introduction

Bismuth (Bi) is a nonessential element that occurs naturally in soil at low concentrations ranging between 0.048 and 0.2 $\mu\text{g/g}$ [1]. It has two oxidation states (+3 and +5), but in environmental, biological and geochemical samples Bi is found mainly in the trivalent oxidation state [2]. Some of the industrial applications of Bi include manufacturing of drugs, cosmetics, hair dye formulations, and low melting solders. Bismuth has also been used as non-toxic replacement for lead (Pb) in the manufacturing of munitions formulations, hunting shots, fishing sinkers, plumbing fixtures [3, 4]. With new industrial applications for Bi taking place, global bismuth production increased from 5,880 tons to 13,600 tons between 2000 and 2014 [5, 6]. Hence, Bi concentrations in soils and aquatic environments could increase considerably and become a serious environmental problem. Indeed, samples of soil and biomass collected from Canadian military training sites showed the presence of Bi in high concentrations (e.g. up to 184.8 mg Bi/kg dry soil) and was attributed to the use of Bi-containing munitions at their training sites [7, 8]. Johnson, et al. [9] reported Bi concentrations ranging between 8 and 5140 mg/kg dry soil in soil samples taken from shooting ranges in Switzerland. Furthermore, Amneklev, et al. [10] reported an increase of 300 % in Bi measured at water treatment plants in Stockholm in 2007 compared to 2006. Despite the fact that Bi content of soils increase quickly due to its increased use in industrial, pharmaceutical and cosmetic production, currently, little information is available on the ecotoxicological effects, transformation, and transport of Bi in terrestrial ecosystems. Natural soil is a dynamic heterogeneous ecosystem characterized by having a complex environmental biogeochemical system that can play a critical role in determining the fate and ecological impact of pollutants on living organisms including earthworms. According to Hou, et al. [11] the mobility and availability of Bi in soil is governed by its binding and interaction mechanisms with soil chemical constituents such as organic matter, carbonates, pH and other metal oxides. A previous soil column study, with Bi deposited on the soil surface and exposed to water precipitation for 18 months, showed that the metal is retained mostly within the top 0-2 cm of the column [12].

Some toxicity studies showed that Bi as one of the least harmful metals to human and wild animal life [13-16]. Others suggested that more experimental evidences are needed on the environmental behavior and toxicity of Bi [4, 17]. The lack of ecotoxicological studies has often been justified by the low concentration of Bi in environmental ecosystems as well the low solubility of Bi compounds [2]. However, the evidence on the release of Bi from munitions, shotshell, smelting activities and cosmetics to the environment as well the uptake of the metal

by soil organisms were reported by some studies. For example, Berthelot, et al. [18] reported that exposing earthworm *Eisenia andrei* to soil samples contaminated with a mixture of metals and explosives, Bi was found to be among the most accumulated metal in the earthworm tissues (up to 22.8 mg Bi/kg dry tissue). A study on metals uptake from soil and accumulation in plants at an old antimony mine demonstrates high tolerance of plants to metals including Bi [19]. Furthermore, the application of sewage sludge of urban wastewater on arable land increase considerably the Bi content in the soil [10].

Earthworms are one of the most abundant organisms in soil. Through their movement in soil, earthworms are expected to introduce changes in the composition and properties of soil as a result of soil mixing and interactions with soil organic and inorganic constituents [20]. Earthworms can interact with the soil matrix and absorb metallic pollutants by at least two different routes; a dermal route where metal intake proceeds through the integument, and an oral route *via* which the metal enters the earthworm with the soil and pore water through its digestive tract. Whether the intake of metals by earthworms occurs internally or externally, either mechanism is bound to provide some useful insights into the accessibility and the toxic effects of the metals. The oligochaete *Eisenia andrei* is commonly used by ecotoxicologists to assess the acute and chronic toxicity of contaminants to soil. Also a database on the toxic effects of several metals on this species is already available. For example, Peijnenburg, et al. [21] reported that *E. andrei* can tolerate and accumulate high concentrations of metals (e.g., As, Cd, and Pb), causing a high risk of transferring contaminants to predators at higher trophic levels such as birds, reptiles, and mammals.

The aim of the present study is to investigate the acute toxicity effects of bismuth, added as bismuth citrate to a natural sandy soil, to the earthworm *E. andrei* and also to provide some insights into the role of earthworm presence in enhancing solubility and bioaccessibility of bismuth citrate in soil to eventually help understand the environmental fate and ecological impact of the metal.

3.3 Material and Methods

3.3.1 Chemicals and Reagents

Bismuth (III) citrate ($C_6H_5BiO_7$) and citric acid ($C_6H_8O_7$) were purchased from Sigma. The HNO_3 and HCl were of analytical grade. The standard reference soils TILL-2 and TILL-4 were obtained from CANMET Mining and Mineral Sciences Laboratories, Ottawa, ON, Canada. Information on preparation of soil, extraction of soil, and chemical characteristics of the two reference soil samples TILL-2 and TILL-4 are available on the Natural Resources Canada website (<http://www.nrcan.gc.ca/mining-materials/certified-reference-materials/certificate-price-list/8137>). ASTM Type II water was obtained using a Millipore Super-Q water purification system or Zenopure Mega-90. Glassware and polyethylene containers were washed with acetone, soaked in nitric acid solution (10%, v/v), and rinsed with deionized water.

3.3.2 Soil Characterization and Samples Preparation

The natural sandy soil used in this study was obtained from the Canadian Forces Base in Valcartier (Qc, CAN). The soil was collected from a site located in a non-contaminated area. This soil is representative of soils from Canadian range training area and similar soils were used in earlier toxicological studies to consider higher bioavailability of compounds [22-24]. After collection, soil was sieved (2 mm) to remove rocks, roots, and other large particles, then subjected to a battery of preliminary toxicity tests (i.e. plant germination, earthworm lethality test) to confirm that the soil was not toxic. Physical and chemical characteristics of this soil are shown in Table 3.1. Soil was spiked by adding bismuth citrate ($C_6H_5BiO_7$) in the powder form to soil samples separately to target the following nominal concentrations 450, 500, 550, and 600 mg Bi/kg dry soil. The nominal concentrations selected were based on the results of preliminary lethality tests (data not shown). A control (soil without Bi citrate) was prepared by adding Type II water only to the soil. Four replicates for each Bi concentration tested were prepared. Spiked soils were mixed for 20 ± 2 h in a rotary mixer to obtain a homogeneous distribution of Bi citrate. The soil was then hydrated to 75% of its water holding capacity (WHC). WHC was determined by saturating the soil with Type II water and by measuring the water content as described previously by Robidoux, et al. [25]. Water content was determined in separate studies, by measuring the loss of soil weight after drying for 18 h at 105 °C in an oven. After hydration, the soil samples were then mixed overnight in a rotary mixer, and kept at room temperature for 2 weeks to stabilize. Soil aliquots were taken at the start ($t= 0$) and end of the exposure period

(t=14 days), to determine total and bioaccessible Bi, moisture content, and pH. The pH of the soil samples was measured using a 1:5 (v:v) soil/water suspension [26].

Table 3.1 Summary of physical and chemical characteristics of natural soil collected at the non-contaminated area.

Parameter	Measurement
pH	5.96
Humidity (%)	7.5
Total organic carbon (%)	2
Sand (%)	97.6
Silt (%)	1.6
Clay (%)	0.7
Silver (mg/kg)	< 2
Arsenic (mg/kg)	< 5
Barium (mg/kg)	11
Cadmium (mg/kg)	< 0.5
Cobalt (mg/kg)	2
Magnesium (mg/kg)	180
Mercury (mg/kg)	<0.02
Molybdenum (mg/kg)	<1
Nickel (mg/kg)	1
Lead (mg/kg)	<5
Zinc (mg/kg)	31
Bismuth (mg/kg)	<0.05

3.3.3 Lethality Test

Earthworms (*E. andrei*) used in this study were obtained from Carolina Biological Supply (Burlington, NC) and were initially used to establish laboratory culture. Earthworms were incubated in a bedding (Magic Products, Amherst Junction WI) supplemented with a dry grain-based food (Magic Worm Food, Magic Products) and maintained at 20 ± 1 °C with 70% humidity, and a light-to-dark cycle of 16:8 h. For this toxicity test, only adult earthworms (ranging from 300 to 600 mg wet weight each) with well-developed clitellum were used. The earthworm lethality test was performed according to the OECD [27] method. In brief, after acclimation for 2 days in a non-contaminated soil, ten *E. andrei* were washed, individually weighed and placed in

1-L glass jar containing 350 g of spiked natural soil, with four replicates per concentration. The glass jars were closed using a geotextile and lids with 1.6-mm air holes. The number of surviving *E. andrei* was recorded after 7 and 14 d of exposure. In addition, monitoring of morphological changes and skin damage of surviving earthworms were recorded at the end of the test.

Control group, three in all, each containing soil amended with citric acid in the presence of *E. andrei*, were prepared to determine the effect of citrate on soil pH and on *E. andrei* survival. The three tested concentrations of citric acid were 200, 500, and 900 mg citric acid/kg dry soil. These citric acid concentrations matched the lowest, average and the highest citrate concentrations found in the tested concentrations of bismuth citrate including preliminary tests. The number of surviving *E. andrei* was recorded after 7 and 14 d of exposure. Soil pH was measured at the beginning and end of each experiment. Another control group included soil and bismuth citrate, in the absence of *E. andrei*, was prepared to determine the effect of earthworm presence on the soil pH and to help understand their role on Bi bioaccessibility.

3.3.4 Extraction and Analysis of Bismuth

First, solubility of Bi citrate in water was determined. Bi citrate was added to get 398, 39.8 and 3.9 mg/L of deionized water (containing 208, 20.8 and 2.08 mg Bi, respectively). The mixture was stirred overnight at room temperature then filtered through a 0.45 μm Millipore polytetrafluoroethylene membrane. The filtrate was acidified at 2% (v/v) with HNO_3 for subsequent analysis by Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Agilent Technologies 5100). Total Bi was extracted using the nitric acid (HNO_3) digestion method as described by Sauvé, et al. [28]. Briefly, soil samples were dried at 105 $^\circ\text{C}$ for 18 \pm 2 h, then about 0.5 g dry soil was digested in 10 mL of concentrated HNO_3 for 90 min at 85 $^\circ\text{C}$. The bioaccessible portion of Bi in soil was assessed using KNO_3 aqueous solution, as described previously [18, 28]. Briefly, 20 mL of 0.01 M KNO_3 solution was added to 10 g dry soil for subsequent shaking overnight (50 rpm). The resulting mixture in each extraction case was centrifuged (11000g) separately for 15 min. The supernatant was then filtered through a 0.45 μm Millipore membrane. Concentrations of total and bioaccessible Bi in soil extracts were determined using ICP-OES. Validation of the extraction and analysis method was performed using two standard reference soils TILL-2 and TILL-4.

3.3.5 Statistical Analyses

Data were analyzed using the ToxCalc program (Version 5.0; Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA). The toxicity endpoints such as point estimates (lethal concentration e.g., LC₁₀, LC₂₅ and LC₅₀) were obtained by the maximum likelihood-probit regression method. The no observed effect concentration (NOEC) and lowest observed effect concentration (LOEC) were estimated using the parametric hypothesis test (Bonferroni's Multiple Comparison Test). Normality of survival data was tested by the Shapiro-Wilk test and equality of variance using Bartlett's test. ToxCalc program include other statistical methods of analysis such as parametric hypothesis test (e.g., Dunnett's Multiple Comparison Test, Williams Multiple Comparison Test) and nonparametric hypothesis test (e.g. Steel's Many-One Rank Tests, Wilcoxon's, Two-Sample Test).

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Lethality of Bi Citrate Spiked Sandy Soil to *Eisenia andrei*

The use of artificially contaminated soil allows investigators to control the exposure concentrations, and generate LC₅₀, LC₂₅, NOEC, and LOEC values. Table 3.2 and Figure 3.1 show that Bi was toxic to *E. andrei*. Data in Figure 3.1 indicate that from 399.5 to 469.5 mg Bi/kg dry soil measured total concentrations, the survival of *E. andrei* decreased after 7 and 14 d of exposure. The lethal effect was time dependent, the rate of *E. andrei* survival decreased from 77.0, 67.5, and 67.5 at 7 d to 57.5, 32.5, and 21 at 14 d for 399.5, 431, and 469.5 mg Bi/kg dry soil total concentration, respectively. The results from the control confirmed that the natural soil used in this study was not toxic to the earthworm. Furthermore, the results of control test with citric acid (concentrations range from 200 to 900 mg citric acid/kg dry soil) showed that citric acid did not cause any lethal effects on the earthworms (Table 3.3). Table 3.2 presents the acute toxicity parameters on *E. andrei* after 7 and 14 d of exposure in bismuth spiked natural soil. The 14 d LC₅₀ was 416 mg Bi/kg, and no effect observed at 298 mg/kg.

Table 3.2 Acute toxicity parameters on *Eisenia andrei* after 7 and 14 days (d) of exposure in bismuth spiked natural soil

Toxicity parameters	At 7 d (mg/kg)	At 14 d (mg/kg)
NOEC	298	298
LOEC	399.5	399.5
LC ₁₀	364.88	340.56
LC ₂₅	423.45	374.42
LC ₅₀	499.61	416.00

NOEC: no observed effect concentration.

LOEC: lowest observed effect concentration.

LC₁₀: estimated lethal concentration for 10% of exposed earthworms.

LC₂₅: estimated lethal concentration for 25% of exposed earthworms.

LC₅₀: estimated lethal concentration for 50% of exposed earthworm.

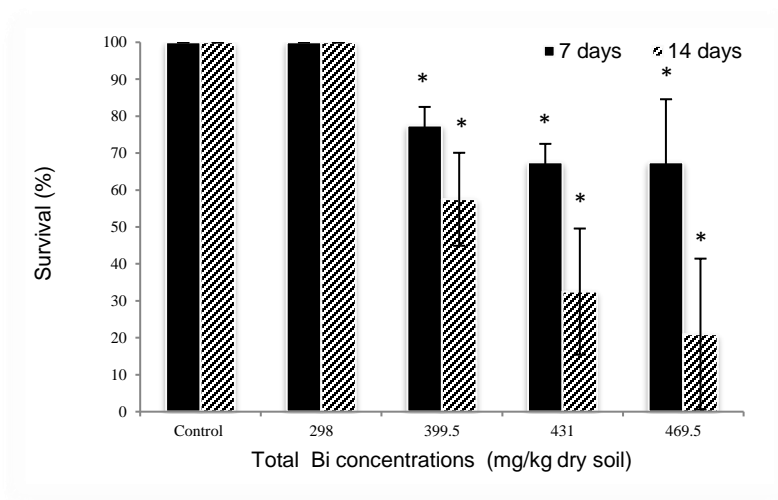


Figure 3.1 Adult survival rate of *Eisenia andrei* after 7 and 14 days exposure in Bi citrate spiked natural sandy soil.

Values are expressed as mean \pm SD (Standard deviation), n = 4. *: Significantly different from the control ($p < 0.05$).

Table 3.3 Acute effect of citric acid exposure in soil to the earthworm *Eisenia andrei*.

Citric acid concentrations (mg/kg dry soil)	Survival (%) *	
	7 d	14 d
Control (0)	100(0)	100(0)
200	100 (0)	100 (0)
500	100 (0)	100 (0)
900	97.5 (5)	97.5 (5)

* Survival data are expressed as mean (SD), n=4.

The earthworms exposed to Bi were getting shorter in size, with deformed and cut skins. The severity of the effect on the decrease of the body length was concentration-dependent. Skin deterioration and deformation were observed mainly in the posterior part of earthworm (Figure 3.2). This can be explained by the fact that the chloragogenous tissue surrounding the posterior alimentary canal is the main area of metal accumulation in earthworms. He, et al. [29] observed similar effects, such as smaller head size and shorter body length in zebrafish embryos exposed to bismuth–asparagine coordination polymer due to changes in expression of genes involved in cell migration and growth. Other researchers showed that high doses of Bi (form colloidal bismuth subcitrate) might induce epithelial cells death in rats by destabilizing the cell membrane [30].

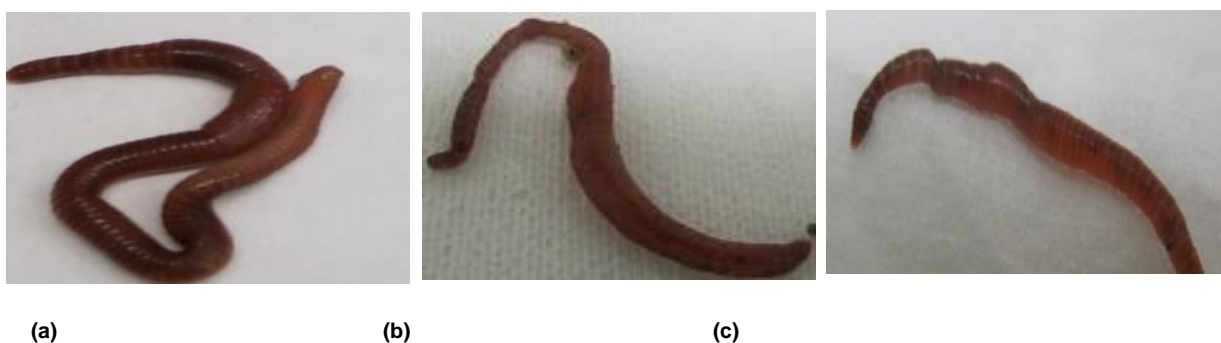


Figure 3.2 Deformation and disconnection observed on the skin of the posterior part of *Eisenia andrei* exposed to bismuth citrate spiked soil.

a (Control), b(431 mg Bi/kg dry soil), c (469.5 mg Bi/kg dry soil).

In addition, the results of the present study showed that Bi was more toxic to *E. andrei* than Pb. Indeed, the LC₅₀ of Pb reported by Berthelot (2008) [8] was 579 mg Pb/kg dry soil in a sandy soil after 28 d exposure, which is higher than that obtained for Bi after 14 d in the present study (416 mg Bi/kg dry soil). Khangarot and Das [31] have also showed similar comparisons

for freshwater ostracod *Cypris subglobosa*, the 48 h LC₅₀ were 37.08 and 40.19 mg/L for Bi (form Bi nitrate) and Pb, respectively. Furthermore, Bi is found to be more toxic to *Tubifex tubifex* species with a 96 h LC₅₀ = 0.662 mg de Bi/L [32]. However, it should be mentioned that despite its wide utilization in the ammunition, pharmaceutical and cosmetic industry, Bi remains the least studied metal in the environment under the pretext of the low solubility of the metal and its salts [9, 33, 34]. Because of this, many considered the element to be unavailable for uptake by living organisms, and thus less harmful to the environment [2, 35]. In contrast, the present study has shown that bioaccessibility and bioavailability of Bi in soil was, to some extent, linked to the presence of earthworm *E. andrei* and its interaction with the metal, rather than to its water solubility. It is known that the bioavailability of metals to earthworms is complex because of the existence of multiple routes of exposure. Literature reports are still debating whether the dermal or the ingestion route is the dominant mechanism for the uptake/absorption of metals by earthworms [36, 37]. Reputedly, the route of metal uptake depends on the form of metal ions and how the metal partitions itself in soil. Pore water exchangeable metal that is extracted by a weak aqueous salt solution (e.g. KNO₃, NaNO₃) passes to the receptor through dermal uptake, but sequestered metal is rather mobilized by the ingestion and digestion mechanism [38, 39]. One of the key mechanisms involved in the dermal intake route presumably involves the complexation of Bi with the chemical constituents in the skin including polysaccharides, lipids, and proteins through their HS-, NH-, or OH-containing functionalities. Also the –OH in bismuth citrate can potentially interact with earthworm biological tissues through H-bonding. Such interactions would lead to morphological and physiological changes in the skin thus causing toxic effects and eventually death of *E. andrei*. The second mechanism concerns the Bi sequestered, or irreversibly sorbed to soil that might become potentially bioavailable for inner cellular intake through the digestive gut. The presence of Bi inside the earthworm might also lead to a disruption in the inter and intra cellular functions and the enzymatic processes responsible for earthworm survival.

3.4.2 Total and Bioaccessible Bi in Soil

From the solubility test Bi citrate was found poorly soluble in water, the amount of Bi measured was < than 4 mg Bi/L. Table 3.4 shows total and bioaccessible Bi as measured by ICP-OES in extracts of soil obtained by digestion with HNO₃ and by extraction with KNO₃, respectively. Potassium nitrate is a neutral salt that is known to displace other metal ions in soil [40], which in the present study K⁺ presumably displaced Bi⁽⁺⁾ ions. Average percent recovery of total Bi from contaminated soil, calculated as the ratio of measured total concentrations and calculated nominal

concentrations, varied between 66.05 ± 3.05 % and 78.84 ± 2.20 % (Table 3.4). However, recoveries of Bi in the two reference soils TILL-4 and TILL-2 were ranging between 84.98 ± 6.08 % and 91.66 ± 23.62 %, respectively (data not shown). Compared to the sandy soil, the higher Bi recoveries obtained using the standard reference soil was probably caused by intrinsic variations in the physical and chemical characteristics of the soils. For example, the standard reference soil had finer texture (≤ 0.074 mm) compared to the sandy soils used in the present study (≤ 2 mm). In the case of the standard reference soil, HNO_3 completely dissolved the fine soil particles, thus enhancing recovery of Bi. This was not observed using the sandy soil, where nitric acid failed to dissolve the sand particles. The link between extractability of heavy metals from soil and the size of soil particles was reported earlier [11, 41, 42].

Table 3.4 Total and bioaccessible bismuth measured in soil samples at the beginning (t=0) and the end of experiment (t = 14d) with and without the presence of *Eisenia andrei*.

Nominal Bi(mg/kg)	Total Bi ^a *(mg/kg)	Totalrecovery* (%)	Bioaccessible Bi ^b *(mg/Kg) At t=0	Bioaccessible Bi ^b * (mg/kg) at t=14 d	
				Without <i>E. andrei</i>	With <i>E. andrei</i>
0 (Control)	< DL	ND	< DL	< DL	< DL
450	298 (13.58)	66.05 (3.05)	0.165 (0.009)	0.111 (0.001)	0.262 (0.031)
500	399.5 (9.19)	79.9 (2.20)	0.194 (0.008)	0.171 (0.028)	0.974 (0.076)
550	431 (11.31)	76.67 (3.26)	0.212 (0.024)	0.185 (0.001)	3.96 (1.845)
600	469.5 (11.96)	77.52 (2.14)	0.250 (0.014)	0.167 (0.001)	7.516 (1.411)

* Values are expressed as mean (SD), N=3. When Bi was not detected, results are presented as < 0.05 detection limit (DL); a; extracted by HNO_3 ; b: extracted by aqueous KNO_3 .

However, it is widely acknowledged that the total content of metals in soil is not a relevant parameter to determine potential risks from soil contamination. In general, the potential toxicity of a metal in soil depends rather on its concentration in soil aqueous phase, the nature of its association with other soluble species, and on the ability of soil to release the metal from the solid phase [43]. Table 3.4 shows that for similar total contents of Bi, the bioaccessible fraction of the metal in soil varied with time and with the presence of earthworm *E. andrei*. After 14 d in the absence of earthworms, the bioaccessible Bi fraction decreased, probably due to soil aging accompanied with some sort of complexation of the metal with other soil chemical constituents. In contrast, in the presence of earthworms, Bi bioaccessibility increased considerably after 14 d of incubation (Table 3.4). The amount of Bi bioaccessible in soil at t=0 d was ≤ 0.250 mg/kg dry soil, which is too low to cause lethal effects to *E. andrei*. According to the 14 d toxicity data shown in (Table 3.2), the no observed effect concentration (NOEC) (298 mg Bi/kg dry soil) corresponded to 0.262 mg Bi/kg dry soil bioaccessible concentration. However, a significant lethal effect was observed at 399.5 mg Bi/kg soil with a bioaccessible fraction reaching 0.974 mg Bi/kg soil (Table

4). The lethal effect of Bi on *E. andre* is caused by the increase in Bi bioaccessible fraction in soil, and not according to the total content of metal in soil (Table 3.4 and Figure 3.1). In line with the results of this study, Berthelot [8] has also found that bioaccessibility of Bi in soil doesn't correlate with measured total concentrations, but rather is influenced by changes in the physical, chemical and biological characteristics of soil. At day 0, the bioaccessible Bi fraction in soil increased slightly with increasing total concentrations of bismuth citrate. Average bioaccessible fraction of Bi increased from 0.165 to 0.250 mg/kg dry soil when the average measured total Bi increased from 298 to 469.5 mg/kg dry, respectively (Table 3.4). While after 14 d, bioaccessible fraction of Bi measured in soil with earthworm *E. andreii* was much higher than those measured in soil in the absence of earthworms. The results showed also that measured bioaccessible Bi concentrations at 14 d were higher than those obtained at t=0 before the addition of earthworms (Table 3.4). For example, after 14 d exposure, bioaccessible concentrations of Bi in soil with earthworms were 1.6, 5.0, 18.6, and 30.0 times higher than the values measured at t=0 d using the following Bi total concentrations 298.0, 399.5, 431.0, and 469.5 mg Bi/kg dry soil, respectively. Meanwhile the bioaccessible Bi fraction in soil with earthworm increased by a factor of 2.4, 5.7, 21.4, and 45.0 after 14 d, compared to those measured after 14 d in soil without earthworms. Experimental evidence gathered thus far confirmed that the lethal effect observed in earthworms was caused by the high concentrations of Bi made bioaccessible in the presence of *E. andreii* in the soil. In the absence of earthworms, the fraction of bioaccessible Bi decreased in soil, possibly caused by adsorption of the metal onto soil. Increased Bi bioaccessibility in the presence of earthworms could be attributed to the digestive mechanism connected to the earthworm gut. Ma, et al. [39] reported that the increase in bioaccessibility of arsenic, copper, and zinc in soil in the presence of *E. andreii* is caused by metal sequestration carried out by enzymatic digestion. Furthermore, a novel test, namely, simulated earthworm gut, recently developed based on the enzymatic composition of the gastrointestinal fluid of *E. andreii* appeared to be most promising for predicting availability of metals in soil than chemical extraction methods [44]. The concentration of bioaccessible Bi recorded in the present study due to *E. andreii* activity was greater than those reported by Wen, et al. [45] for Cr, Co, Ni, Zn, Cu, Cd, and Pb using *E. fetida*. This was possibly caused by a stronger affinity of Bi to form chelating complexes with metallophores and other biomolecule produced by earthworm. On the other hand, some studies suggested that the earthworms could stimulate the growth of soil bacterial populations that enzymatically degrade soil organic matter causing the release of the organically bound metal [45-47]. Bi bioaccessibility increased significantly following the death of the earthworms. *E. andreii* can accumulate high concentrations of Bi within its body. After decomposition, high metal burdens might return to the

soil, thus causing the observed increase in bioaccessible Bi concentrations in soil with the death rate of earthworms. Similar results have been reported by Ireland [48] for the high quantities of lead and zinc extracted from decayed earthworm *Dendrobaena rubida*. As mentioned above, evidence gathered thus far suggest that earthworms increase the availability and mobility of Bi in soil, but the mechanism responsible for this increase is not clear yet. One may speculate that Bi (III) ion coming out of the citrate salt might form some sort of complexes with sulfhydryl, hydroxyl, or amine-containing ligands in the chemical fabric of the earthworm.

3.4.3 Effect of pH on Bi Bioaccessibility in Soil

Table 3.5 summarizes pH measurements obtained in the soil toxicity assays. At the beginning of the experiment ($t=0$), soil pH decreased slightly from 5.85 ± 0.06 to 5.24 ± 0.03 for control (soil without Bi citrate) and the highest bismuth citrate concentration tested (469.5 mg/kg dry soil), respectively. After 14 days, in the absence of *E. andrei* in contaminated soil pH did not change drastically. However, in the presence of *E. andrei* soil pH increased significantly compared to pH values obtained at $t=0$, as Bi citrate concentration increased. For example, in the assay with the control pH increased from $5,85 \pm 0,058$ to 6.01 ± 0.162 whereas in the assay with 499.5 mg Bi/kg dry soil pH increased from $5,24 \pm 0,03$ to 7.30 ± 0.18 (Table 3.5). The observed increase in soil pH in the presence of earthworms is consistent with the findings of several other studies on metals bioaccessibility including As, Cu, Pb, Zn and Cd in soil [18, 49, 50]. In this study, the values of contaminated soil pH in the presence of earthworm increased from 0.16 to 2.06 units. Similarly Wen, et al. [47] have found that soil pH increased from 0.2 to 1.1 due to earthworm (*Eisenia fetida*) activity. This noticeable increase in soil pH by earthworm has been attributed to the granules of calcium carbonate produced by the calciferous glands located into the earthworm esophagus [51]. Indeed, Garcí'a-Montero, et al. [52] showed that the increase of calcium carbonate content in earthworm casts cannot be explained by the original carbonate level in soil but rather by the synthesis of calcite granules by earthworms. On the other hand, Schrader [53] reported the role of cutaneous mucus secreted by three earthworm species to increase and neutralize the pH of their environment. Another study by Salmon [54] showed that an increase in nitrogen associated with earthworm alkaline urine lead to an increase in soil pH. Thus, the increase of soil pH caused by earthworm activities could influence mobility and availability of metals as Bi in soil. Several literature reports consider pH as a primary factor in determining bioaccessibility and availability of metals in soil, and thus their toxic effects to the living organism [55, 56]. The decline in heavy metals availability in soil with increasing soil pH has been reported earlier [57, 58]. In contrast, the results of this study showed that the fraction of Bi bioaccessible in

soil, and consequently the fraction of Bi bioavailable to uptake by soils organisms increased despite the pH rise induced by earthworm activity. The rise in soil pH might increase the mobility of metals including Bi, due to an increase in the number of pH-dependent cation-exchange sites on the soil surface as suggested by Hou, et al. [11]. Indeed, the present Bi study showed an increase in earthworm lethality with the increase of soil pH (Figure 3.2 and Table 3.5). However, it is worth mentioning here that besides soil pH, other physico-chemical properties of soil and biological parameters in the earthworm could play significant roles in determining Bi bioaccessibility and thus toxicity. Among other heavy-metal-chelating metallophores produced by earthworms might be responsible for the increase in Bi bioaccessibility in soil, as proposed by Wen, et al. [45] for Zn, Cu and Cr.

Table 3.5 Variation of pH in soil samples in the presence and absence of earthworms.

Measured total Bi concentrations(mg/kg dry soil)	pH*		
	0 d	14 d without <i>E. andrei</i>	14 d with <i>E. andrei</i>
0 (Control)	5.85 (0.058)	5.95 (0.072)	6.01 (0.162)
298	5.44 (0.020)	5.74 (0.036)	6.40 (0.072)
399.5	5.32 (0.011)	5.35 (0.035)	7.03 (0.105)
431	5.25 (0.015)	5.37 (0.025)	7.31 (0.251)
469.5	5.24 (0.030)	5.36 (0.023)	7.30 (0.179)

* Values of pH (H₂O) measured in suspension of soil in water are expressed as mean ± SD, n=4.

3.5 Conclusions

The present study demonstrated that bismuth is toxic to *E. andrei* and the extent of its lethality was tied to its bioaccessibility. In general the results showed that Bi bioaccessibility and pH increased drastically in the presence of earthworms. Mobility and other physiological and biochemical activities associated with *E. andrei* might have been partially responsible for the noticeable increase in Bi bioaccessibility in soil. Enhanced bioaccessibility of Bi could have been caused by intrinsic microbial and other enzymatic activities associated with the earthworms and by the release of the metal after ingestion and digestion of soil containing Bi. To say the least, the production of chelating agents such as metallophores by *E. andrei* might enhance Bi solubility and thus its bioaccessibility. Finally, since Bi was found to be more toxic than Pb to *E. andrei*, it would be highly recommended to follow cautious procedures while handling and using Bi and its salts. Some may argue that Bi-containing chemicals should not be considered harmful based on their very poor water solubility (< 4mg/L for Bi citrate). However, because of the potential exposure of bismuth to various interaction mechanisms in the environment, e.g., interactions with chemical constituents in soil and with nearby biological receptors, then bismuth should be considered as a potential labile health hazard.

3.6 Acknowledgements

We thank Dr Geoffrey Sunahara and Manon Sarrazin from the Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute – National Research Council of Canada for helpful guidance and technical assistance. We are also grateful to Drs Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from Defence Research and Development Canada – Valcartier (Canadian Ministry of National Defence) for their support of this project.

3.7 References

- [1] H. J. M. Bowen, *Environmental chemistry of the elements*. London; New York: Academic Press, 1979.
- [2] M. Filella, "How reliable are environmental data on 'orphan' elements? The case of bismuth concentrations in surface waters," *Journal of Environmental Monitoring*, 2010.
- [3] *Migratory Bird Hunting; Extension of Decision on the Conditional Approval of Bismuth-Tin Shot as Nontoxic for the 1996–97 Season*, 61, 1996.
- [4] D. S. Urgast, Ellingsen, D.G., B. Berlinger, E. Eilertsen, Friisk, G., V. Skaug, Thomassen, Y., Beattie, J.H., and I.-S. Kwun, Feldmann, J., "Multi-elemental bio-imaging of rat tissue from a study investigating the bioavailability of bismuth from shotgun pellets," *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012.
- [5] U.S. Geological Survey, "Mineral Commodity Summaries 2002, <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2002/mcs2002.pdf>," 2002.
- [6] U.S. Geological Survey, "Mineral Commodity Summaries 2016, <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2016/mcs2016.pdf>," 2016.
- [7] A. Marois, A. Gagnon, S. Thiboutot, G. Ampleman, and M. Bouchard, "Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînement, Base des Forces canadiennes, Valcartier," Defence Research and Development Canada Valcartier, Department of National Defence Canada DRDC-VALCARTIER-TR-2004-206, 2004.
- [8] Y. Berthelot, "Évaluation de la biodisponibilité des métaux et des matériaux énergétiques dans des sols provenant de sites d'entraînement militaire," Doctorat, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, 2007.
- [9] C. A. Johnson, H. Moench, P. Wersin, P. Kugler, and C. Wenger, "Solubility of Antimony and Other Elements in Samples Taken from Shooting Ranges," *Journal of Environmental Quality*, 2005.
- [10] J. Amneklev, A. Augustsson, L. Sörme, and B. Bergbäck, "Bismuth and Silver in Cosmetic Products: A Source of Environmental and Resource Concern?," *Journal of Industrial Ecology*, vol. 20, pp. 99-106, 2016.
- [11] H. Hou, T. Takamatsu, M. K. Koshikawa, and M. Hosomi, "Concentrations of Ag, In, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan," *European Journal of Soil Science*, 2006.
- [12] H. Hou, T. Takamatsu, M. K. Koshikawa, and M. Hosomi, "Migration of silver, indium, tin, antimony, and bismuth and variations in their chemical fractions on addition to uncontaminated soils," *Soil Science*, vol. 170, pp. 624-639, 2005.
- [13] J. R. Lambert and P. Midolo, "The actions of bismuth in the treatment of Helicobacter pylori infection," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 11 Suppl 1, pp. 27-33, Apr 1997.
- [14] G. C. Sanderson, W. L. Anderson, G. L. Foley, K. L. Duncan, L. M. Skowron, J. D. Brawn, *et al.*, *Acute toxicity of ingested bismuth alloy shot in game-farm mallards. Toxicity of ingested bismuth alloy shot in game-farm mallards : chronic health effects and effects on reproduction* vol. 35. Champaign, IL :: Illinois Natural History Survey, 1997.
- [15] J. K. Ringelman, M. W. Miller, and W. F. Andelt, "Effects of Ingested Tungsten-Bismuth-Tin Shot on Captive Mallards," *The Journal of Wildlife Management*, 1993.
- [16] L. A. Tillman, F. M. Drake, J. S. Dixon, and J. R. Wood, "Safety of bismuth in the treatment of gastrointestinal diseases," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* vol. 10, pp. 459–467 1996.

- [17] N. S. Fahey, "The use of science in environmental policy making and the implications for health: A case study of bismuth shotshells," University of Waterloo, Ontario, Canada, 2005.
- [18] Y. Berthelot, É. Valton, A. Auroy, B. Trottier, and P. Y. Robidoux, "Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils," *Chemosphere*, vol. 74, pp. 166-177, 12// 2008.
- [19] C. Wei, Q. Deng, F. Wu, Z. Fu, and L. Xu, "Arsenic, antimony, and bismuth uptake and accumulation by plants in an old antimony mine, China," *Biological Trace Element Research*, 2011.
- [20] C. Edwards, "The Importance of Earthworms as Key Representatives of the Soil Fauna," in *Earthworm Ecology*, ed: CRC Press, 2004, pp. 3-11.
- [21] W. J. G. M. Peijnenburg, R. Baerselman, A. C. de Groot, T. Jager, L. Posthuma, and R. P. M. Van Veen, "Relating Environmental Availability to Bioavailability: Soil-Type-Dependent Metal Accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 44, pp. 294-310, 11// 1999.
- [22] P. Y. Robidoux, J. Hawari, G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, *et al.*, "TNT, RDX, and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil," *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 43, pp. 379-88, Nov 2002.
- [23] K. Savard, Y. Berthelot, A. Auroy, P. A. Spear, B. Trottier, and P. Y. Robidoux, "Effects of HMX-Lead Mixtures on Reproduction of the Earthworm *Eisenia Andrei*," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 53, pp. 351-358, 2007.
- [24] P. Y. Robidoux, P. Gong, M. Sarrazin, G. Bardai, L. Paquet, J. Hawari, *et al.*, "Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 58, pp. 300-13, Jul 2004.
- [25] P. Y. Robidoux, C. Svendsen, J. Caumartin, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, *et al.*, "Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test," *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000.
- [26] ISO, "Soil Quality — Determination of pH. International Standard ISO 10390," ed, 1994.
- [27] OECD, "Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests," ed: OECD Publishing, 1984.
- [28] S. Sauvé, M. B. McBride, and W. H. Hendershot, "Speciation of Lead in Contaminated Soils," *Environmental Pollution*, 11/12/ 1997.
- [29] N. He, X. Li, D. Feng, M. Wu, R. Chen, T. Chen, *et al.*, "Exploring the toxicity of a bismuth-asparagine coordination polymer on the early development of zebrafish embryos," *Chemical Research in Toxicology*, Jan 18 2013.
- [30] B. Leussink, J. F. Nagelkerke, B. van de Water, A. Sillerveer, G. B. van der Voet, A. Srinivasan, *et al.*, "Pathways of proximal tubular cell death in bismuth nephrotoxicity," *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002.
- [31] B. S. Khangarot and S. Das, "Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models," *Journal of Hazardous Materials*, 2009.
- [32] B. S. Khangarot, "Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Muller)," *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 46, pp. 906-12, Jun 1991.
- [33] C. R. Hammond, "The elements," in *Handbook of Chemistry and Physics, 87th ed.*, D. R. E. Lide, Ed., ed CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2007, pp. 4.1–4.42.
- [34] A. Slikkerveer and F. A. Wolff, "Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds," *Medical Toxicology Adverse Drug Experience*, vol. 4, pp. 303-23, Sep-Oct 1989.
- [35] V. Rodilla, A. T. Miles, W. Jenner, and G. M. Hawsworth, "Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 115, pp. 71–83, 1998.
- [36] J. J. Scott-Fordsmand, D. Stevens, and M. McLaughlin, "Do earthworms mobilize fixed zinc from ingested soil?," *Environmental Science and Technology*, vol. 38, pp. 3036–9, 2004.
- [37] M. G. Vijver, J. P. M. Vink, C. J. H. Miermans, and C. A. M. van Gestel, "Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms," *Soil Biology and Biochemistry*, 1// 2003.
- [38] T. Sizmur and M. E. Hodson, "Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? – A review," *Environmental Pollution*, vol. 157, pp. 1981-1989, 7// 2009.
- [39] W. K. Ma, B. A. Smith, G. L. Stephenson, and S. D. Siciliano, "Development of a simulated earthworm gut for determining bioaccessible arsenic, copper, and zinc from soil," *Environmental Toxicology and Chemistry*, Jul 2009.

- [40] E. Meers, G. Du Laing, F. M. G. Tack, and M. G. Verloo, "Heavy Metal Displacement by Exchangeable Bases (Ca, Mg, K, Na) in Soils and Sediments," *Soil Science*, 2009.
- [41] J. Qian, X.-q. Shan, Z.-j. Wang, and Q. Tu, "Distribution and plant availability of heavy metals in different particle-size fractions of soil," *Science of The Total Environment*, 8/30/ 1996.
- [42] A. Matthews, C. Omono, and S. Kakulu, "Comparison of Digestion Methods for the Determination of Metal Levels in Soils in Itakpe, Kogi State, Nigeria," *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, vol. 13, pp. 42-48, 2012.
- [43] G. S. R. Krishnamurti and R. Naidu, "Solid-Solution Speciation and Phytoavailability of Copper and Zinc in Soils," *Environmental Science and Technology*, 2002.
- [44] B. A. Smith, B. Greenberg, and G. L. Stephenson, "Comparison of biological and chemical measures of metal bioavailability in field soils: Test of a novel simulated earthworm gut extraction," *Chemosphere*, vol. 81, pp. 755-766, Oct 2010.
- [45] B. Wen, X.-y. Hu, Y. Liu, W.-s. Wang, M.-h. Feng, and X.-q. Shan, "The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils," *Biology and Fertility of Soils*, 2004.
- [46] A. Rada, A. El Gharnali, M. Elmeray, and J. L. Morel, "Bioavailability of cadmium and copper in two soils from the sewage farm of Marrakech city (Morocco): effect of earthworms," *Agricultura Mediterranea* vol. 126, pp. 364-368, 1996.
- [47] B. Wen, Y. Liu, X.-y. Hu, and X.-q. Shan, "Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils," *Chemosphere*, May 2006.
- [48] M. P. Ireland, "The effect of earthworm *Dendrobaena rubida* on the solubility of lead, zinc, and calcium in heavy metal contaminated soil in Wales," *Journal of Soil Science*, 1975.
- [49] Y. Ma, N. M. Dickinson, and M. H. Wong, "Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability," *Biol Fertil Soils*, vol. 36, pp. 79-86, 2002.
- [50] M. Udovic, Z. Plavc, and D. Lestan, "The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA," *Chemosphere*, 11// 2007.
- [51] K. E. Lee, *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*: Academic Press, 1985.
- [52] L. G. Garcí'a-Montero, I. Valverde-Asenjo, M. A. Grande-Ortíz, C. Menta, and I. Hernando, "Impact of earthworm casts on soil pH and calcium carbonate in black truffle burns," *Agroforest Syst*, vol. 87, pp. 815-826, 2013.
- [53] S. Schrader, "Influence of earthworms on the pH conditions of their environment by cutaneous mucus secretion," *Zoologischer Anzeiger* vol. 233, pp. 211-219, 1994.
- [54] S. Salmon, "Earthworm excreta (mucus and urine) affect the distribution of springtails in forest soils," *Biology and Fertility of Soils*, 2001.
- [55] S. Sauvé, W. Hendershot, and Allen Herbert E., "Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter," *Environmental Science and Technology*, 2000.
- [56] D. J. Spurgeon and S. P. Hopkin, "Effects of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*," *Pedobiologia*, vol. 40, pp. 80-96, 1996.
- [57] M. A. Kashem and B. R. Singh, "Metal availability in contaminated soils: I. Effects of flooding and organic matter on changes in Eh, pH and solubility of Cd, Ni and Zn," *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, vol. 61, pp. 247-255, 2001.
- [58] J. S. Rieuwerts, I. Thornton, M. E. Farago, and M. R. Ashmore, "Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals," *Chemical Speciation & Bioavailability*, vol. 10, pp. 61-75, 1998/01/01 1998.

4 CHAPITRE 4: BIOAVAILABILITY AND CHRONIC TOXICITY OF BISMUTH CITRATE TO EARTHWORM *EISENIA ANDREI* EXPOSED TO NATURAL SANDY SOIL

Zohra Omouri^{a,c*}, Jalal Hawari^{b,c}, Michel Fournier^a, Pierre Yves Robidoux^{a,c,d}

^aINRS-Institut Armand Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

^bPresent address École Polytechnique de Montréal, Département des génies civil, géologique et des mines, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

^c National Research Council of Canada, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2

^d Present address AGAT Laboratoires, 9720 Route Transcanadienne, St. Laurent, Québec, Canada, H4S 1V9

L'article a été publié dans le journal **Ecotoxicology and Environmental Safety** 147 (2018) 1–8 (soumis le 5 avril 2017 et accepté le 3 août 2017).

Contribution de l'étudiant

J'ai rédigé le manuscrit, effectué toutes les corrections demandées par les réviseurs et soumis l'article. De plus, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats et participé à la planification des expériences.

Le Dr. Jalal Hawari a fourni des conseils techniques et il a participé à la correction de l'article. Mon directeur de recherche le Dr. Pierre Yves Robidoux et mon codirecteur le Dr. Michel Fournier ont participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

Résumé de l'article en français

La présente étude décrit la biodisponibilité et les effets chroniques du bismuth chez le ver de terre *Eisenia andrei* en utilisant le test de reproduction de l'OCDE. Des vers de terre adultes ont été exposés en sol naturel sableux contaminé artificiellement avec du citrate de bismuth. Les concentrations totales moyennes de bismuth dans le sol obtenues par digestion avec du HNO_3 se situaient entre 75 et 289 mg/kg. Les résultats indiquent que le bismuth a diminué significativement tous les paramètres de reproduction chez *Eisenia andrei* à des concentrations ≥ 116 mg/kg. Cependant, le nombre de cocons éclos et le nombre de juvéniles semblent être plus sensibles que le nombre total de cocons, tel que déterminé par CI_{50} ; c'est-à-dire 182, 123 et > 289 mg/kg, respectivement. Le bismuth n'a pas affecté la croissance et la survie d'*Eisenia andrei* et a eu peu d'effet sur l'efficacité phagocytaire des cœlomocytes. Le faible effet immunotoxique pourrait s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes, à savoir la séquestration du bismuth par des composés liant les métaux. Après 28 jours d'exposition, les concentrations de bismuth dans les tissus des vers de terre augmentaient avec l'augmentation des concentrations de bismuth dans le sol atteignant un état stationnaire de 21.37 mg/kg de tissu sec pour 243 mg Bi/kg de sol sec exprimée en teneur totale. Les données indiquent également qu'après 56 jours d'incubation, les fractions moyennes de bismuth disponible extraites avec une solution aqueuse de KNO_3 dans le sol sans vers de terre variaient de 0.0051 à 0.0229 mg/kg, tandis que dans le sol avec des vers de terre, la concentration de bismuth variait entre 0.310 et 1.347 mg/kg. Nous présumons que les mucus et les agents chélateurs produits par les vers de terre et par les microorganismes du sol et/ou vivants dans l'intestin des vers de terre pourraient expliquer l'amplification de la bioaccessibilité du Bi. Tandis que, d'absorption des contaminants du sol par voie dermale et ingestion chez les vers de terre de expliquerait l'accumulation du Bi dans les tissus des vers.

4.1 Abstract

The present study describes bioavailability and chronic effects of bismuth to earthworms *Eisenia andrei* using OECD reproduction test. Adult earthworms were exposed to natural sandy soil contaminated artificially by bismuth citrate. Average total concentrations of bismuth in soil recovered by HNO₃ digestion ranged from 75 to 289 mg/kg. Results indicate that bismuth decreased significantly all reproduction parameters of *Eisenia andrei* at concentrations ≥ 116 mg/kg. However, number of hatched cocoons and number of juveniles seem to be more sensitive than total number of cocoons, as determined by IC₅₀; i.e., 182, 123 and > 289 mg/kg, respectively. Bismuth did not affect *Eisenia andrei* growth and survival, and had little effect on phagocytic efficiency of coelomocytes. The low immunotoxicity effect might be explained by the involvement of other mechanisms i.e. bismuth sequestered by metal-binding compounds. After 28 days of exposure bismuth concentrations in earthworms tissue increased with increasing bismuth concentrations in soil reaching a stationary state of 21.37 mg/kg dry tissue for 243 mg Bi/kg dry soil total content. Data indicate also that after 56 days of incubation the average fractions of bismuth available extracted by KNO₃ aqueous solution in soil without earthworms varied from 0.0051 to 0.0229 mg/kg, while in soil with earthworms bismuth concentration ranged between 0.310 to 1.347 mg/kg dry soil. We presume that mucus and chelating agents produced by earthworms and by soil or/and earthworm gut microorganisms could explain this enhancement, as well as the role of dermal and ingestion routes of earthworms uptake to soil contaminant in Bi accumulation.

Keywords: Trace metals; Soil assessment; Bioaccessibility; Earthworms; Reproduction; Phagocytosis

4.2 Introduction

Earthworms are the most abundant soil organisms, they represent around 60-80 % of the soil biomass (Rida, 1994). They are able to modify physical, chemical and biological properties of soil, as a result of their activities and their interactions with soil organic and inorganic constituents (Edwards, 2004; Lemtiri et al., 2014). Earthworm activities in soil enhance organic matter decomposition and nutriment cycling and influence soil structure and porosity. Thus by improving soil aeration, soil fertility and food availability earthworms affect the distribution and activity of soil biota (Cao et al., 2015; Salmon, 2001). The role of earthworms in metal pollution monitoring is widely recognized in terrestrial ecosystems. Earthworms are one of the best bioindicators of trace metals, because they can biotransform and bioaccumulate metal ions in their body (Usmani and Kumar, 2015).

Bismuth (Bi) is a rare metal in soil, its average background concentration in uncontaminated soil is 0.2 µg/g (Bowen, 1979). Bismuth compounds are widely used in various industrial applications including manufacturing of drugs, cosmetics and fusible alloys. For some years, Bi has been increasingly used as non-toxic alternative to lead (Pb) in various other industrial applications such as ammunition formulations, hunting shot, fishing sinkers and plumbing fixtures (Fahey and Tsuji, 2006; Urgast et al., 2012), water pipes (Nagata, 2015). Such increased industrial and medicinal use of Bi could increase considerably the concentration of this element in soils and aquatic environment. For example, some studies showed that samples of soil collected from military training areas contain high concentrations of Bi, up to 187 times higher than concentrations measured in background samples (Marois et al., 2004), reaching 184.8 mg/kg dry soil (Berthelot et al., 2008) and ranging between 8 and 5140 mg/kg (Johnson et al., 2005). Despite its increased presence in the environment, no data are currently available on the chronic toxic effects of Bi on terrestrial invertebrates such as earthworms. A recent study on the acute toxicity of Bi to the earthworm reported that the 14 d LC₅₀ was 416 mg Bi/kg dry soil, and no effect observed at 298 mg/kg dry soil (Omouri et al., 2016). In general, little is known about the fate, behavior, transport and ecotoxicological effects of Bi in terrestrial ecosystems. However, a survey of literature reports studying the toxic effect of Bi based compounds on human and wild animal health showed contradictory opinions. Some studies reported that Bi is a harmless metal to humans and wild animal health (Sano et al., 2005; Tillman et al., 1996; Yadav et al., 2012). While others showed that Bi may reduce sperm metabolism and contribute to infertility in men (Ghaffari and Motlagh, 2011) and may accumulate in mouse neuronal tissue (Larsen et al., 2005).

Heavy metals are the most common soil contaminants. Currently, it is widely recognized that measuring metal bioavailability provides a better indicator of metal toxicity than using total metal concentrations in contaminated soil (Lanno et al., 2004; Mahbub et al., 2017b; Mahbub et al., 2017c). However bioavailability is a very complex concept, different definitions for bioavailability exist across many disciplines including pharmacology and toxicology, thus creating ambiguity and confusion for environmental scientists (Semple et al., 2004). In the present study, we considered the concept of bioavailability as defined by Peijnenburg et al. (1997) and ISO (2008). According to these authors there are three phases for assess bioavailability of metals in soil. In the first, environmental availability (also referred to as bioaccessibility) is considered to designate the fraction of metal in soil resulting from a physicochemically driven desorption process; in the second, environmental bioavailability represents the fraction of metal taken up by the organism following the uptake processes, and thirdly, toxicological bioavailability represents the internal concentration of the contaminant related to toxic effects. Although the three fraction of availability are widely recognized, structural relationship between them has been less investigated. This is probably due to the absence of a single, standardized and direct method to actually measure each fraction and the limits or inability of traditional statistical approaches to explicitly address structural assumptions (Beaumelle et al., 2016). Earthworms are exposed to soil metals by two uptake routes, the first *via* the dermal surface of the dissolved fraction in pore water and the second by direct ingestion of the fraction adsorbed/desorbed and sequestered in soil particles (Le Roux et al., 2016; Ma et al., 2009). Current methods to evaluate environmental availability are not suitable to assess the portion of metal absorbed by the earthworms *via* the ingestion route. This lack of assessment method indicates the obstacles encountered to measure and to predict the actual fraction of bioaccessible metal to earthworms. Furthermore, it is known that once the chemical crosses the cellular membrane, others processes like storage, transformation and elimination take place. Ultimately, toxicological bioavailability represents the internal concentration of metal causing the biological responses and the toxic effects. Therefore in the absence of direct methods to evaluate toxicological bioavailability, biological measurement as biomarkers and toxicological endpoints (e.g. reproduction, growth) continue to be widely used practices. Reproduction parameters have been recommended by some authors as more suitable to evaluate chemicals effects on earthworm's populations (Mahbub et al., 2017a; Žaltauskaitė and Sodienė, 2010). In addition, the use of biomarker approach to estimate the sublethal effects of contaminants such as metals has increased sharply in recent years. Several studies have reported that various metals (e.g. mercury, cadmium, zinc, lead, copper) affected the viability and phagocytic activity

of earthworm coelomocytes (Fugère et al., 1996; Fuller-Espie et al., 2011; Sauvé and Fournier, 2005).

The aims of the present study were to investigate bioavailability and sublethal toxic effects of bismuth on the earthworm *Eisenia andrei*, in terms of reproduction parameters, growth and phagocytosis activity of immune cells.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Chemicals and reagents

Bismuth (III) citrate ($C_6H_5BiO_7$), formaldehyde 37%, and phosphate buffer solution (PBS) were purchased from Sigma–Aldrich. The HNO_3 and HCl were of analytical grade. The standard reference soils TILL-2 and TILL-4 used in this study were provided by Mining and Mineral Sciences Laboratories, Ottawa, Canada. Information on physical and chemical characteristics of the two reference soils TILL-2 and TILL-4 are available on the Natural Resources Canada website (<http://www.nrcan.gc.ca/mining-materials/certified-reference-materials/certificate-price-list/8137>). Deionized water (ASTM Type II) was obtained using a Millipore Super-Q water purification system or Zenopure Mega-90. Glassware and polyethylene containers were washed with acetone, soaked in nitric acid solution (10%, v/v), and rinsed with deionized water.

4.3.2 Soil characteristics and samples preparation

The natural sandy soil used in this study was obtained from Canadian Forces Base Valcartier (Qc, CAN) located approximately at 25 km north of Quebec city (latitude: 46.90, longitude: 71.49 and altitude: 170 meters). The soil was collected from a site located in a non-contaminated area at 0-15 cm deep. This soil is representative of soil from Canadian range training area and similar soils were used in earlier toxicological studies to consider higher bioavailability of explosive and metals (Dodard et al., 2013; Robidoux et al., 2004; Savard et al., 2007). Physical and chemical characteristics of this soil are shown in Table 4.1. Soil was spiked by adding bismuth citrate ($C_6H_5BiO_7$) in the powder form to soil samples separately to obtain the following nominal concentrations: 100, 150, 200, 250, 300 and 350 mg Bi/kg dry soil. The nominal concentrations selected were based on the results of preliminary lethality tests (data not shown). A negative control (without Bi citrate added) was prepared by adding deionized water only to the soil. Four replicates for each Bi concentration tested were prepared. Spiked soils were mixed for 20 ± 2 h in a rotary mixer to obtain a homogeneous distribution of Bi citrate.

The soil was then rehydrated with deionized water to 75% of its water holding capacity (WHC) by adding 46 ml/500 g dry soil. WHC was determined by saturating the soil with deionized water and measuring the water content (Robidoux et al., 2000). Water content was determined in separate studies, by measuring the loss of soil weight after drying for 18 h at 105 °C in an oven.

Table 4.1 Summary of physical and chemical characteristics of natural soil collected at the non-contaminated area.

Parameter	Measurement
pH	5.96
Humidity (%)	7.5
Total organic carbon (%)	2
Sand (%)	97.6
Silt (%)	1.6
Clay (%)	0.7
Argent (ppm)	< 2
Arsenic (ppm)	< 5
Barium (ppm)	11
Cadmium (ppm)	< 0.5
Cobalt (ppm)	2
Magnesium (ppm)	180
Mercury (ppm)	<0.02
Molybdenum (ppm)	<1
Nickel (ppm)	1
Lead (ppm)	<5
Zinc (ppm)	31
Bismuth (ppm)	<0.05

After hydration, the soil samples were mixed overnight in a rotary mixer, and kept at room temperature for 2 weeks to stabilize. Soil aliquots were measured at the start (t= 0), at t = 28 d and end of the exposure test (t = 56 d), to determine total and bioaccessible Bi, moisture content, and pH. The pH of the soil samples was taken using a 1:5 (v:v) suspension of soil in water (ISO, 2004).

4.3.3 Extraction and analysis of bismuth

Total recoverable Bi in soil was determined as described by Sauvé et al. (1997). Briefly, soil samples were dried at 105 °C for 18 ±2 h, then aliquots (0.5 g) of the dry soil were digested in 10 mL of concentrated HNO₃ for 90 min at 85 °C. The bioaccessible fraction of Bi in soil at t=0, t=28 d and t=56 d was determined using the weak KNO₃ (0.01M) neutral salt aqueous solution as performed by Berthelot et al. (2008); Sauvé et al. (1998). Approximately 20 mL of 0.01 M KNO₃ solution was added to 10 g soil (dry weight). The samples were then shaken overnight with a rotary mixer (50 revolutions per minute) and centrifuged (11000 g) for 15 min at 20 °C. The supernatant was filtered through a 0.45 µm Millipore polytetrafluoroethylene membrane. The filtrates were acidified with HNO₃ (2% v/v) and conserved at 4 °C until analysis by Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Agilent Technologies 5100) or by Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS, Varian, SpectrAA 220 Z). Validation of the extraction and analysis method was performed using the two standard reference soils TILL-2 and TILL-4.

The extraction of Bi from earthworm tissue after 28 days of exposure was achieved following a digestion procedure with concentrated HNO₃ and HCl (CEAEQ., 2003). The earthworms were first frozen, then lyophilized and crushed. Aliquots (100 mg) of the tissue were treated with 3 mL of concentrated HNO₃ and incubated overnight at room temperature. The resulting tissue was treated with concentrated HCl (1mL) and heated for 45 min at 105 °C using the digestion system (DigiPREP MS SCP Science). Then added 5mL of deionized water and heated at 80 °C for 30 min. Finally, the tissue mixture was cooled at room temperature and filtered through a 0.45 µm Millipor polytetrafluoroethylene membrane. The filtrates were diluted with deionized water up to 50 mL and Bi contents were determined by ICP-OES.

4.3.4 Earthworm reproduction test

Earthworms (*Eisenia andre*) used in this study were obtained from Carolina Biological Supply (Burlington, NC) and was initially used to establish laboratory culture. Earthworms were incubated in a bedding (Magic Products, Amherst Junction WI) supplemented with a dry grain-based food (Magic Worm Food, Magic Products) and maintained at 20 ± 1 °C with 70% humidity, and a light-to-dark cycle of 16:8 h. Only adult earthworms (ranging from 300 to 600 mg wet weight each) with well-developed clitellum were used.

Earthworm reproduction test was performed according to the Organisation for Economic Co-operation and Development Earthworm Reproduction test (OECD, 2004). After 24 h acclimation in clean natural soil, ten worms were individually rinsed, weighted and added to each replicate glass jar containing 500 g of the natural amended soil. The number of surviving *E. andrei* as well as the wet mass per replicate were recorded at 28 d. The soils containing cocoons were returned to jars for another 28 d. The adult worms (per replicate) were depurated for 24 h on wet filter paper at room temperature in the dark to eliminate gut content. Then adult worms were rapidly used for phagocytosis assay mentioned below or frozen and stored at -80 °C until acid digestion to evaluate Bi body content. At the end of experiment (56 days), soils were sieved over 0.5, 1 and 2 mm mesh sieves, and the number of hatched and non-hatched cocoons as well as the number of juveniles were recorded. The pH and the water content were measured at 0, 28 and 56 days.

4.3.5 Phagocytosis assay

4.3.5.1 Coelomocytes extrusion

Coelomocytes were extruded based on the electric method described by Massicotte et al. (2003). In brief, a single worm was inserted into a 15-ml tube containing 3 ml of *Lumbricus* balanced salt solution (LBSS) prepared as reported by Brousseau et al. (1997). The liquid medium with the earthworm in the tube was submitted to a 6 V current for 20- 30 s using aluminium wires. Then, the worm was removed from the tube and the solution was gently shaken. Total number of cells and initial cell viability were determined by diluting 25 µl of cell suspension with 25µl of 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich, USA). The resulting cell suspension was placed into an improved Neubauer haemocytometer and was microscopically observed (Massicotte et al., 2003; Sauvé et al., 2002).

4.3.5.2 Phagocytosis measurement

Phagocytic activity of extruded coelomocytes was measured based on the flow-cytometric method developed by Brousseau et al. (1999) and as described elsewhere (Belmeskine et al., 2012; Massicotte et al., 2003). In brief for each cell suspension, 1.716 µm fluorescent latex beads (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) were added in a bead: cell ratio of 100:1. The cell suspensions containing the beads were then incubated for 18 h in the dark at room temperature. To remove the beads that were not phagocyted, the cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin (BSA) and centrifuged at 150 g, 4°C and for 8 min. The cells collected in the pellet were then resuspended in 500 µl of hemataill (Fisher

Scientific, Ottawa, Ont, Canada) containing 0.185% formaldehyde and 0.2% sodium azide. The number of beads phagocytosed per cell was measured by flow cytometry (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) in FL1 and for each sample, the fluorescence of 10000 events was recorded. The results were expressed as the percentage of cells that engulfed one bead and more (phagocytic activity) or three beads and more (phagocytic efficiency).

4.3.6 Statistical analyzes

Reproduction data were analyzed using the ToxCalc program (Version 5.0; Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA). The toxicity endpoints such as point estimates (inhibition concentration IC_{25} and IC_{50}) were obtained by the linear interpolation method. The no observed effect concentration (NOEC) and lowest observed effect concentration (LOEC) were estimated using the parametric hypothesis test (Dunnett's Test). Normality of survival data was tested by the Shapiro-Wilk test and equality of variance using Bartlett's test. The program JMP IN (v 4.04, SAS Institute Inc.) was used to analyze viability, phagocytosis and pH data. First, an ANOVA was applied followed by a multiple comparisons test (Dunnett's test) in order to detect treatment leading to significant differences compared with the controls. A level of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all statistical tests.

4.4 Results

4.4.1 Total and bioaccessible Bi in soils and bioavailable Bi in earthworm tissue

Total and bioaccessible Bi measured in soil samples at $t=0$, after 28 days, and at the end of experiment ($t=56$ d) in the presence and absence of *Eisenia andrei* and in earthworm tissue are shown in Table 4.2. The average percentage recovery of total Bi from soil, calculated as the ratio of total measured concentrations and calculated nominal concentrations, varied between 75 ± 3.04 and 84.8 ± 7.48 % (Table 4.2). Recoveries of total Bi in the two reference soils TILL-2 and TILL-4 ranged between 97.95 ± 8.90 % and 87.08 ± 5.09 %, respectively (data not shown). The recovery percentage obtained, indicate that the HNO_3 digestion method can be considered as a good method to recover total Bi from soil. The average fraction of bioaccessible Bi extracted by the KNO_3 method at $t=0$ increased with increasing total Bi concentrations in soil, from 0.0054 to 0.1056 mg bioaccessible Bi/kg dry soil for 75 and 289 mg total Bi/kg dry soil, respectively. However, after 56 days in soil without *E. andrei* the fraction of Bi bioaccessible decreased compared to the values measured at $t=0$ (Table 4.2). At 28 d in the presence of *E.*

andrei bioaccessible Bi concentrations in soil increased significantly reaching 1.864 mg/kg (Table 4.2). Concentrations of Bi bioaccessible measured after 28 days incubation in soil with earthworms increased by a factor of 32.59, 39.38, 36.37, 28.98, 18.97 and 17.75 compared to those measured at 0 day for 75, 116, 166, 212, 243 and 289 mg total Bi/kg dry soil, respectively. Similar trends were observed comparing the concentrations of Bi bioaccessible obtained at 56 days in soil with *E. andrei* to those obtained at t=0 d and at t=56 d in the absence of earthworms. The results showed also that in soil with earthworm after removal of adult earthworms at the mid-term (28 d), the fraction of Bi bioaccessible did not change drastically at 56 days. Bi body burdens study revealed that the earthworm absorb relatively high concentrations (6-21 mg/kg) of Bi until it reached the stationary state (Table 4.2). The average Bi concentration measured in earthworms tissue after 28 days incubation was 6.48, 16.05, 15.45, 21.30, 21.37, 21.26 mg/kg dry earthworm tissue for 0.176, 0.382, 0.582, 1.049, 1.328, to 1.864 mg Bi bioaccessible/kg dry soil.

Table 4.2 Total and bioaccessible Bi measured in soil samples at the beginning (t=0), at 28 days, and at the end of experiment (t=56 d) in the absence and in the presence of *Eisenia andrei* (E. a) and in earthworm tissues.

Nominal Bi (mg/kg soil)	Total Bi (mg/kg soil) ^(a)	Total recovery (%)	Bioaccessible Bi with E. a (mg/kg soil) ^(b)			Bioaccessible Bi without E.a. t=56 d (mg/kg soi) ^(c)	Bi body burdens t=28 d (mg/kg tissue) ^(d)
			t=0 d	t=28 d	t=56 d		
0 (control)	<LD	ND	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
100	75 (3.0)	75 (3.04)	0.0054 (0.0018)	0.176 (0.058)	0.310 (0,177)	0.0051 (0.0015)	6.48 (1.35)
150	116 (2.5)	77.3 (1.70)	0.0097 (0.0009)	0.382 (0.097)	0.584 (0,285)	0.0090 (0.0030)	16.05 (2.18)
200	166 (19.1)	83 (1.70)	0.0160 (0.0025)	0.582 (0.058)	0.636 (0,075)	0.0102 (0.0035)	15.45 (3.4)
250	212 (18.7)	84.8 (7.48)	0.0362 (0.0010)	1.049 (0.294)	1.132 (0,209)	0.0156 (0.0030)	21.30 (4.19)
300	243 (26.1)	81 (8.72)	0.0709 (0.0190)	1.328 (0.610)	1.006 (0,432)	0.0229 (0.0053)	21.37 (10.09)
350	289 (21.4)	82.5 (6.12)	0.1056 (0.0107)	1.864 (0.169)	1.347 (0.244)	0.0229 (0.0041)	21.26 (2.12)

Note: Data are reported as mean ± (SD), n = 3–4. When a contaminant was not detected, results are presented as: <limit of detection (LD). (a) Bi extracted from soil with HNO₃. (b) and (c) Bi extracted from soil with KNO₃.(d) Bi extracted from earthworm tissue.

4.4.2 Reproduction data

The survival data reported in Table 4.3 showed that total Bi concentrations ranging from 75 to 289 mg/kg dry soil were not lethal to *Eisenia andrei*. Furthermore, Bi concentrations tested did not caused weight loss in earthworms after 28 d of exposure in natural sandy soil spiked with bismuth citrate. No significant difference (Dunnett's test, $p < 0.05$) in percentage growth of earthworms (average percentage of initial minus final body weight) was observed in Bi treatments compared to control (soil without Bi citrate added). As Table 4.3 indicates, the presence of earthworms in soil lead to increase in pH values. The pH values at 56 d in soil with *E. andrei* were much higher compared to those measured at $t=0$ as well as to those measured at 56 d in the absence of *E. andrei*. At 56 d and in the presence of earthworms soil pH increased significantly ($p < 0.05$) from 6.83 ± 0.172 to 8.02 ± 0.214 for control and 289 mg Bi/kg dry soil, respectively, while the pH measured in the absence of earthworms varied between 5.98 ± 0.159 to 6.16 ± 0.110 .

Table 4.3 Responses of earthworm *Eisenia andrei* to Bi spiked natural soil.

Total Bi (mg/kg dry soil)	Adult survival (%, 28d)	Hatchability ^(a) (%, 56d)	Adult growth ^(b) (%, d 28)	pH		
				0 d	56 d without <i>E. andrei</i>	56 d with <i>E. andrei</i>
0 (control)	100 (0)	74.3 (11)	29.6 (6.2)	5.87 (0.138)	5.98 (0.159)	6.83 (0.172)
75	100 (0)	77.9 (8.2)	23.6 (9.6)	5.81 (0.140)	5.95 (0.154)	7.55 (0.127)*
116	100 (0)	52.6 (27)	34.2 (5.7)	5.89 (0.085)	6.04 (0.130)	7.77 (0.109)*
166	100 (0)	54.0 (22.7)	28.2 (9.4)	5.97 (0.077)	6.04 (0.129)	7.70 (0.293)*
212	100 (0)	46.8 (20)	31.1 (5.2)	5.99 (0.068)	6.10 (0.109)	7.91 (0.237)*
243	100 (0)	29.4 (21.8)	26.1 (6.4)	5.92 (0.014)	6.12 (0.114)	7.90 (0.370)*
289	100 (0)	18.0 (11.4)	22.8 (10.5)	5.74 (0.021)	6.16 (0.110)	8.02 (0.214)*

Data are expressed as mean \pm SD, $n=4$.^(a) Number of hatched/number of total cocoons. ^(b) Mean change in body weight during the experiment (average of initial minus final body weight). * Significantly different from the control ($p < 0.05$).

Figure 4.1 shows the effect of total Bi concentrations ranging from 75 to 289 mg/kg dry soil on earthworm reproductive parameters. The number of total cocoons, number of hatched cocoons and number of juveniles decreased significantly ($p < 0.05$) following the increasing of total Bi in soil. However, the number of juveniles and the number of hatched cocoons were more sensitive than the number of total cocoons according to IC_{25} and IC_{50} values shown in Table 4.4. The IC_{25} and IC_{50} values obtained using linear interpolation method were 81, 86, 126 and 123, 182, > 289 mg Bi/kg dry soil for number of juveniles, number of hatched cocoon and number of total cocoon, respectively.

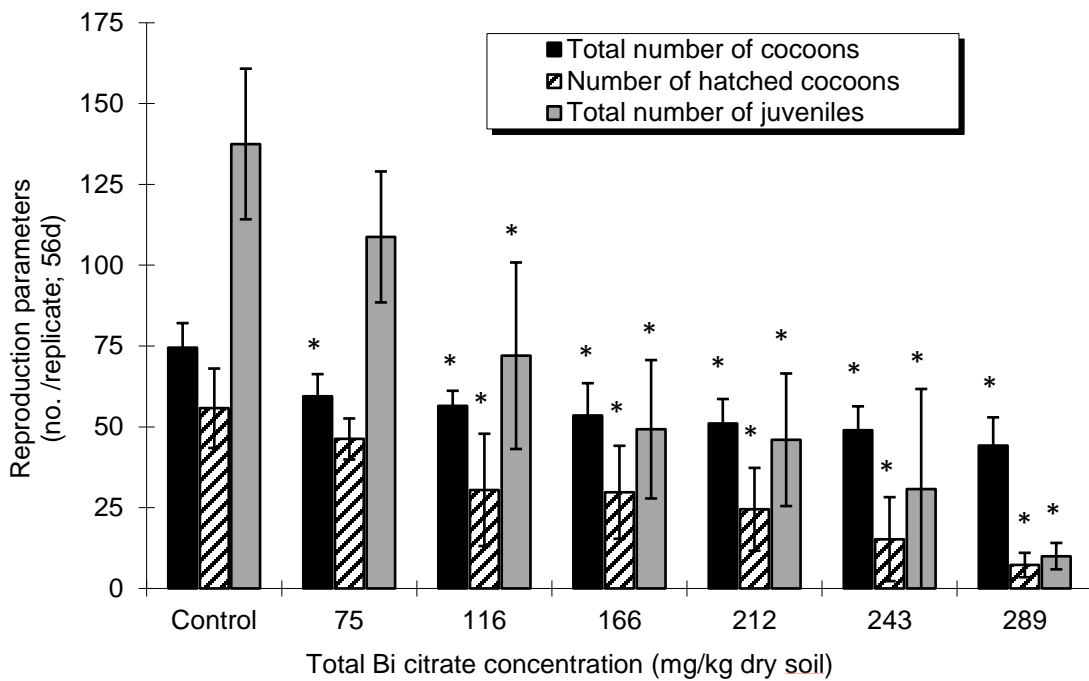


Figure 4.1 Effects of bismuth on various reproductive parameters using earthworm *Eisenia andrei* after 56 days of exposure. (error bar: \pm SD, n = 4). * significantly different from the control ($p < 0.05$).

Table 4.4 Reproductive toxicity endpoints using *Eisenia andrei* after 56 days of exposure in natural contaminated soil.

Reproduction parameters	NOEC ^a	LOEC ^b	IC ₂₅ (95% CI) ^c	IC ₅₀ (95% CI) ^d	CV ^e	R ²
Total number of juveniles	75	116	81 (33-110)	123 (85-193)	93	0.97
Total number of cocoons	< 75	75	126 (30-275)	> 289	<75	0.96
Number of hatched cocoons	75	116	86 (45-132)	182 (55-246)	93	0.92

NOEC, no observed effect concentration; LOEC, lowest observed effect concentration; IC₂₅, inhibiting concentration for a 25% of effect; IC₅₀, inhibiting concentration for a 50% of effect; CV, chronic value derived from the geometric mean of NOEC and LOEC values. R², regression coefficients for IC values. ^{a, b, c, d, e} concentrations of Bi mg/kg

4.4.3 Biomarkers responses

4.4.3.1 Viability and phagocytic activity of coelomocytes

Viability and phagocytic efficiency of coelomocytes extracted from earthworm after 28 d of exposure to various Bi concentrations are shown in Figure 4.2. Coelomocytes viability was not affected by Bi concentrations tested in this study. The percentage of coelomocytes viability was ≥ 89 % in all Bi concentrations. The phagocytosis efficiency response of coelomocytes showed a fluctuating pattern (Figure 4.2). At lower concentrations Bi was found to reduce phagocytic efficiency. Exposure of *E. andrei* to 116 mg Bi/kg dry soil, significantly ($p < 0.05$) reduced phagocytic efficiency of coelomocytes compared to the control. In contrast, at higher concentrations (i.e. 166, 212, 243 and 289 mg Bi/kg dry soil total content) phagocytic efficiency of *E. andrei* coelomocytes tend to increase but not significantly compared to control.

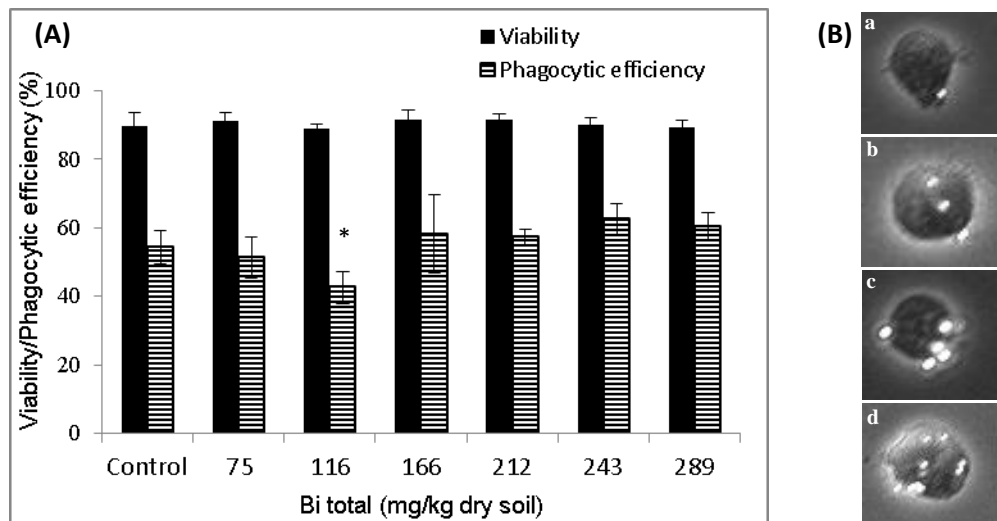


Figure 4.2 (A) Effect of various concentrations of Bi on the viability and phagocytic efficiency of coelomocytes in *E. andrei* exposed 28 days in spiked soil. (B) Confocal microscopy of *E. andrei* coelomocytes cells phagocytized fluorescent latex beads.

(error bar: \pm SD, n = 4). * significantly different from control (Dunnett's test, $p < 0.05$). (a) cell phagocytized 1 bead, (b) cell phagocytized 2 beads, (c) and (d) cell phagocytized more than 2 beads.

4.5 Discussion

There is little information available on the environmental effects of Bi-based compounds. The present study focused on the availability, uptake and chronic effects of Bi metal to the earthworm *E. andrei* in an artificially contaminated natural soil.

4.5.1 Soil and tissue Bi concentrations

Total Bi concentrations in soil tested in this study were close to or lower than total concentrations measured in soil samples collected at military training areas reported by Berthelot et al. (2008) and Johnson et al. (2005), i.e. 184.8 and 5140 mg Bi/kg, respectively. However, it is now recognized that total metal concentrations in soil is not a good indicator to evaluate risks associated with soil contamination. The potential toxicity of a metal in soil depends rather on its concentration in soil aqueous phase, the nature of its association with other soluble species, and on the ability of soil to release the metal from the solid phase (Krishnamurti and Naidu, 2002). The results of this study showed that for the same total Bi concentration, the fraction of bioaccessible Bi varied with time and with the presence or absence of earthworms in soil (Table 4.2). In soil without *E. andrei*, Bi bioaccessibility

decreased with time probably due to complexation of Bi with other soil constituents following the aging of Bi in soil. The effects of aging on metal availability in soil have been reported by many authors (Lock and Janssen, 2003; Schreck et al., 2011). In contrast, in soil with *E. andrei*, Bi bioaccessibility increased considerably with time. Bismuth was highly more bioaccessible in soil for all concentrations tested after 28 days of exposure compared to the values measured at the beginning of exposure. Furthermore, once adult earthworms were removed, the pattern of Bi availability at 56 d did not change drastically as indicated in Table 4.2. In the same trend, recent studies reported the importance to consider the factors influencing pore water availability of Hg and Pb in the assessment of soils toxicity (Kader et al., 2016; Mahbub et al., 2016). The increase in metal availability in soil due to the presence of earthworms is consistent with the findings of previous studies (Ma et al., 2002; Smith et al., 2010b). Ma et al. (2009) have postulated that activity of enzymes in the gastrointestinal fluid of earthworms (e.g. cellulase, amylase) can increase metal availability by releasing the metals sequestered in soil organic matter. The heavy-metal-chelating metallophores produced by earthworms could contribute to solubilisation of Bi as suggested for Cu by Wen et al. (2006). Other studies suggested that earthworms could stimulate the growth of soil microbial populations which are able to degrade soil organic matter and release the organically bound metals (Rada et al., 1996; Wen et al., 2004). In addition, it is well known that diverse physicochemical factors can influence metal soil partitioning e.g. pH, soil organic content, cation exchange capacity (CEC) and clay content. In this study the values of pH increased from 0.85 to 1.86 units. Similarly Wen et al. (2006) have reported that soil pH increased from 0.2 to 1.1 units due to earthworm *Eisenia fetida* activity. An increase in soil pH observed in the presence of earthworms (Table 3) is consistent with other studies (Berthelot et al., 2008; Ma et al., 2002; Udovic et al., 2007). The ability of earthworms to increase soil pH has been attributed to the granules of calcium carbonate produced by the calciferous glands located inside the earthworm esophagus (Lee, 1985), their alkaline urine (Salmon, 2001) and by cutaneous mucus secretion (Schrader, 1994). Thus, this noticeable increase in soil pH could influence the mobility and the bioavailability of metals such as Bi in soil. Many studies have reported that an increase in soil pH decrease the bioavailability of Cd, Ni and Zn (Kashem and Singh, 2001) and Zn (Waalewijn-Kool et al., 2014). At the opposite, high soil pH could stimulate bioavailability of metals such as Co and Mg (Adamczyk-Szabela et al., 2015). According to this study, the fraction of Bi bioaccessible in soil, and consequently the fraction of Bi bioavailable for uptake by soils organisms increased despite the pH rise induced by earthworm activity. The rise in soil pH might increase the mobility of metals including Bi, due to an increase in the number of pH-dependent cation-exchange sites on the soil surface as

suggested by Hou et al. (2006). The mobility and the bioavailability of Bi in soil remains little known. According to Jung et al. (2002) bioavailability and uptake of Bi by plant from soil could be influenced by several soil factors such as organic matter content and soil texture. Hou et al. (2005) reported that Bi seems to be retained in soil as function of matter organic content, surface area and aluminum concentration. Similarly Berthelot et al. (2009) found that total Bi concentration and clay content influenced positively Bi bioaccessibility in soil, whereas total organic carbon and amorphous aluminium oxide exert inverse effect. However, total carbon content seemed to be the most important soil parameter to influence soil Bi bioaccessibility (Berthelot et al., 2009).

Earthworms can tolerate and accumulate heavy metals in their bodies. They absorb the dissolved chemicals in the interstitial water through their moist body walls and also ingest contaminated soil particles passing the chemical from mouth to the gut. From the results of this study, it is clear that earthworm *E. andrei* can uptake and accumulate high concentrations of Bi within its body. After 28 days of exposure, Bi body burdens increased reaching a stationary state at 21.30 ± 4.19 mg Bi/Kg dry tissue. This result is consistent with the finding of Berthelot et al. (2008) who reported Bi body burden up to 22.8 ± 7.5 mg Bi/kg dry tissue in earthworms after 28 d of exposure to soil contaminated by a mixture of metal (Pb, Cd, Zn, Cu, Bi, Cr, Ni) and explosive (HMX). In earthworms, there are two major sites to accumulate heavy metals, the posterior alimentary canal (Morgan et al., 1989), and the chloragogenous tissue (Morgan and Morris, 1982). It is known that the pattern of metal accumulation in earthworms depends on time, species, type of soil, metal essentiality and concentration (Nahmani et al., 2009; Smith et al., 2010a; Spurgeon and Hopkin, 1999). Bi is a non-essential element for living organisms, thus Bi sequestration or accumulation might be considered as one of the potential routes of Bi detoxification. Our findings showed also that the fraction of bioaccessible Bi measured in soil at $t=0$ d were too low to explain the values of Bi accumulated in earthworm's tissues. The same finding have been reported by Berthelot et al. (2008), for example, an earthworm body concentration of 22.8 ± 7.5 mg Bi/kg dry tissue was recorded in soil where Bi bioaccessible at $t=0$ was below detection limit. In general, the increase in the use of Bi such as in manufacturing ammunition has been justified by the low solubility of Bi compounds which is considered as an important factor in limiting its bioavailability to biological receptors in the environment. However, this study revealed that the presence of *E. andrei* enhanced Bi bioavailability. A bioavailability study of bismuth containing shots reported that Bi was detected in blood and urine of the tested rats due in part to the bio-mobilisation of metal from the alloy (Urgast et al., 2012).

4.5.2 Effects of Bi on earthworm reproduction

The chronic effects of Bi on soil invertebrates such as earthworms have not been reported up to now. This study showed that total Bi concentrations ≥ 116 mg/kg dry soil decreased significantly ($p < 0.05$) several reproduction endpoints (e.g. number of juveniles and number of cocoons) in *E. andrei*. However, no significant effect of Bi recorded at total concentrations ≤ 289 mg/kg on the survival and the growth of *E. andrei*. Similarly, some studies reported that earthworm growth is a less sensitive parameter compared to reproduction (Van Gestel et al., 1993; Žaltauskaitė and Sodienė, 2010), and its reduction generally coincides with the first occurrence of mortality (Ma, 1984). The relationship between growth and reproduction of earthworms exposed to metals is still unclear. Burgos et al. (2005) reported a negative correlation between body growth and cocoons production on earthworms. Soil contaminants could affect earthworm reproduction via direct or indirect pathways. The indirect pathway could best be explained by the decrease of the energy available for reproduction due to its use to compensate the energy needed for the defense mechanisms (Savard et al., 2007). The growth and reproduction data of this study suggest that Bi has direct effects on *E. andrei* reproduction. The values of IC_{50} estimated of linear interpolation method were 123, 182 and > 289 mg Bi/kg dry soil for the number of juveniles, the number of hatched cocoons and total number of cocoons, respectively. Thus number of juveniles and number of hatched cocoons were more sensitive compared to the total number of cocoons. This could be explained by the fact that Bi affect more the fertility of cocoons than their production. On the other hand, after the cocoons are deposited into the contaminated soil, available Bi could affect the development of embryos and prevent hatching. This study showed that despite the low solubility and availability of Bi in soil at the beginning of exposure, all earthworm reproduction endpoints have been significantly reduced after 56 d. Bioaccessible Bi concentrations in soil at $t=0$ is of little relevance to explain its toxic effects on earthworms, because the presence of earthworms enhanced considerably the availability of Bi in soil. In addition and as we discussed above, there are two routes for the uptake of metals from soil in earthworms, the dermal and the ingestion uptake. This implies that the pathway by ingestion promotes the absorption of the non-soluble portion of the metal. Chelating agents excreted by earthworms or by microorganisms living in earthworms (i.e. gut, skin) and soil could also enhance availability and uptake of metals such as Bi by earthworms. Thus considering only the metals water solubility to predict metals toxicity on soil organisms is not sufficient.

In several industrial applications, Bi is widely promoted as non-toxic substitute to Pb, which caused an increase in Bi production and consumption. The IC₅₀ for total number of cocoon obtained in this study was > 289 mg Bi/kg. Savard et al. (2007) reported that Pb affected total number of cocoons at much higher concentration, i.e. the IC₅₀ value was 1068 mg Pb/kg. Whereas Berthelot (2007) reported a reproduction parameter at a much lower concentration, i.e. IC₅₀ was 81 mg Pb/kg. Literature results showed a large difference in IC₅₀ for total number of cocoons, probably due to the difference in availability or/and absorption of Pb in each study. Additionally, Bi has properties very similar to those of Pb (Rohr, 2002), thus similar behaviour in soil may be presumed. In field-soil samples contaminated by mixture of metal (e.g. Pb, Cd, Zn, Cu, Bi, Cr, Ni) a competition between Bi and Pb was assumed (Berthelot et al., 2008). These authors reported that despite higher Pb soil availability than Bi at t=0, Bi was found to be more available in soil and more accumulated in earthworm tissues at the end of exposure than Pb.

4.5.3 Viability and phagocytosis responses

The immune system parameters such as phagocytosis have been used as sensitive sub-lethal endpoints to assess toxicity of various metals to earthworms. Currently no data are available regarding the Bi effects on the phagocytosis activity of earthworm immune cells. Many studies showed that the exposure to mercury, cadmium, zinc affected coelomocytes phagocytosis (Fugère et al., 1996; Sauvé and Fournier, 2005; Sauvé et al., 2002). The present study indicates that Bi affected slightly coelomocytes phagocytic efficiency and no effect was observed on either the phagocytic activity or coelomocytes viability. The measurement of coelomocytes viability indicated that the phagocytic effect was not the result of a decrease in cell viability. However, coelomocytes phagocytic efficiency showed a fluctuated dose-response curve. Lower concentration of total Bi (75 and 116 mg/kg) tested decreased the phagocytic efficiency (ability of coelomocytes to phagocyte tree beads and more). Whereas, high concentration of Bi (≥ 166 mg/kg), seemed to slightly stimulate the phagocytic efficiency. Sauvé et al. (2002) and Fugère et al. (1996) reported that several metals (e.g. Hg, Cu, Cd, Ag) can induce a drastic inhibition of earthworms coelomocytes phagocytosis with increasing metal concentration. These authors also showed that metal immunotoxicity vary considerably with type of metals and among earthworm species. Thus the low immunotoxicity effect of Bi could be due to the fact that *E. andrei* phagocytic cells were less sensitive to Bi exposure. On the other hand metal compartmentalization in earthworm coelomocytes could explain the difference between metals toxicities. According to Fugère et al. (1996), Hg, Cd and Zn affected both

viability and phagocytosis of earthworms coelomocytes more than Pb, due to sequestration of Pb by chloragosome cell. Earthworm coelomocytes are classified in three major subpopulations: hyaline amoebocytes (consisting of neutrophils and basophils), granular amoebocytes (comprised of granulocytes, acidophils), and chloragocytes (also referred to as eleocytes) (Fuller-Espie, 2010; Stein et al., 1977). Several studies reported that only amoebocytes cells are capable of phagocytosis (Fuller-Espie, 2010; Stein et al., 1977), while the chloragocytes contain chloragosomes granules which are involved in metals sequestration. Indeed Ireland and Richards (1977) suggested that the metabolism of contaminated chloragocytes was directly involved in Pb sequestration. In the case of Bi, we presume that sequestration of Bi by chloragocytes cell could decrease the availability of this metal to amoebocytes cell hence explaining in part the low phagocytic responses. A recent study reported a bimodal dose response curve in coelomocytes exposed to different metals that was explained by the role and specific sensitivities of coelomocytes subpopulations (Irizar et al., 2015). However, the involvement of other defense mechanisms in earthworms as metal binding protein metallothioneins might explain the low immunotoxicity of Bi. Obviously, more investigations are needed to elucidate the exact mechanisms of Bi toxicity to earthworm reproduction and biomarker responses.

4.6 Conclusions

The present study demonstrated that Bi induced harmful effects to *E. andrei* reproduction. Bi inhibited all reproduction parameters investigated (number of juveniles, number of hatched cocoons and total number of cocoons) at total concentrations ≥ 116 mg/kg dry soil. However, total Bi concentrations ≤ 289 mg/kg dry soil, did not affect the survival and growth of earthworms and had little effect on phagocytic response of *E. andrei* coelomocytes. Our results revealed also that *E. andrei* enhanced soil pH and Bi bioaccessibility. Physical and biochemical response associated with earthworm activities in soil could explain in part the increase in Bi bioaccessibility and hence Bi uptake and toxicity. Furthermore, the Bi tissue concentrations data showed that *E. andrei* can absorb and accumulate relatively high concentration of Bi within their tissue, suggesting that *E. andrei* is a good candidate for environmental monitoring of Bi. The increase of Bi bioavailability in soil by earthworms could increase the risk of exposure for other soil organisms such as plant and other receptors *via* the trophic transfer. Although the present study provided some insights into the availability and toxicity of Bi in soil environment, further

investigations of the fate, biogeochemical interactions and toxicity mechanisms of Bi in earthworms and other organism are needed.

4.7 Funding sources

This work was partially supported by Defence Research and Development Canada–Valcartier (Canadian Ministry of National Defence) and the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier).

4.8 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Geoffrey Sunahara and Manon Sarrazin from the Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute – National Research Council of Canada for helpful guidance and technical assistance. We are also grateful to Drs Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from Defence Research and Development Canada – Valcartier (Canadian Ministry of National Defence) for their support of this project.

4.9 References

- Adamczyk-Szabela, D., et al., 2015. Heavy Metal Uptake by Herbs. IV. Influence of Soil pH on the Content of Heavy Metals in *Valeriana officinalis* L. *Water Air Soil Pollut.* 226, 106.
- Beaumelle, L., et al., 2016. A structural equation model of soil metal bioavailability to earthworms: confronting causal theory and observations using a laboratory exposure to field-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 569-570, 961-72.
- Belmeskine, H., et al., 2012. Toxic effects of PCDD/Fs mixtures on *Eisenia andrei* earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 54-59.
- Berthelot, Y., Évaluation de la biodisponibilité des métaux et des matériaux énergétiques dans des sols provenant de sites d'entraînement militaire. Vol. Doctorat. Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, 2007, pp. 234
- Berthelot, Y., et al., 2009. Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index. *Environ Int.* 35, 83-90.
- Berthelot, Y., et al., 2008. Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. *Chemosphere.* 74, 166-177.
- Bowen, H. J. M., 1979. *Environmental Chemistry of the Elements*. Academic Press, London, UK. 333.
- Brousseau, P., et al., 1997. Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* 29, 681-684.
- Brousseau, P., et al., 1999. *Manual of immunological methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- Burgos, M. G., et al., 2005. Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: multivariate statistical analysis of relationships between exposure, biomarkers, and ecologically relevant parameters. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1757-63.
- Cao, J., et al., 2015. Effects of earthworm on soil microbes and biological fertility: A review. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 26, 1579-1586.
- CEAEQ., Détermination des métaux dans les tissus animaux: méthode par spectrométrie d'émission au plasma d'argon après minéralisation acide. method MA 207-MetI.0. Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec, Québec, Canada., 2003.
- Dodard, S. G., et al., 2013. Ecotoxicological assessment of a high energetic and insensitive munitions compound: 2,4-dinitroanisole (DNAN). *J. Hazard. Mater.* 262, 143-50.
- Edwards, C., A., The Importance of Earthworms as Key Representatives of the Soil Fauna. *Earthworm Ecology.* CRC Press, 2004, pp. 3-11.
- Fahey, N. S., Tsuji, L. J., 2006. Is there a need to re-examine the approval of bismuth shotshell as a non-toxic alternative to lead based on the precautionary principle? *J. Environ. Monit.* 8, 1190-1194.
- Fugère, N., et al., 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology.* 109, 157-166.
- Fuller-Espie, S. L., 2010. Using flow cytometry to measure phagocytic uptake in earthworms. *J Microbiol Biol Educ.* 11, 144-51.
- Fuller-Espie, S. L., et al., 2011. Exposure of coelomocytes from the earthworm *Eisenia hortensis* to Cu, Cd, and dimethylbenz[a]anthracene: An in vitro study examining reactive oxygen species production and immune response inhibition. *Pedobiologia.* 54, S31-S36.
- Ghaffari, M. A., Motlagh, B., 2011. In vitro effect of lead, silver, tin, mercury, indium and bismuth on human sperm creatine kinase activity: a presumable mechanism for men infertility. *Iran. Biomed. J.* 15, 38-43.
- Hou, H., et al., 2005. Migration of silver, indium, tin, antimony, and bismuth and variations in their chemical fractions on addition to uncontaminated soils. *Soil Science.* 170, 624-639.
- Hou, H., et al., 2006. Concentrations of Ag, In, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 214-227.
- Ireland, M. P., Richards, K. S., 1977. The occurrence and localisation of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. *Histochemi.* 51, 153-66.
- Irizar, A., et al., 2015. Establishment of toxicity thresholds in subpopulations of coelomocytes (amoebocytes vs. eleocytes) of *Eisenia fetida* exposed in vitro to a variety of metals: implications for biomarker measurements. *Ecotoxicology.* 24, 1004-13.
- ISO, 2004. Soil Quality — Determination of pH. International Standard ISO 10390.
- ISO, 2008. Soil quality — Requirements and Guidance for the Selection and Application of Methods for the Assessment of Bioavailability of Contaminants in Soil and Soil Materials.
- Johnson, C. A., et al., 2005. Solubility of Antimony and Other Elements in Samples Taken from Shooting Ranges. *J. Environ. Qual.* 34, 248-254.
- Jung, M. C., et al., 2002. Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu-W mine in Korea. *Sci Total Environ.* 295, 81-9.
- Kader, M., et al., 2016. Predicting plant uptake and toxicity of lead (Pb) in long-term contaminated soils from derived transfer functions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 15460-70.
- Kashem, M. A., Singh, B. R., 2001. Metal availability in contaminated soils: I. Effects of flooding and organic matter on changes in Eh, pH and solubility of Cd, Ni and Zn. *Nutr. Cycl. Agroecosystems.* 61, 247-255.

- Krishnamurti, G. S. R., Naidu, R., 2002. Solid–Solution Speciation and Phytoavailability of Copper and Zinc in Soils. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2645–2651.
- Lanno, R., et al., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 39-47.
- Larsen, A., et al., 2005. In vivo distribution of bismuth in the mouse brain: influence of long-term survival and intracranial placement on the uptake and transport of bismuth in neuronal tissue. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97, 188-96.
- Le Roux, S., et al., 2016. Bioaccumulation of total mercury in the earthworm *Eisenia andrei*. *SpringerPlus.* 5, 681.
- Lee, K. E., 1985. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Academic Press, Sydney, Australia.
- Lemtiri, A., et al., 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18, 121-133.
- Lock, K., Janssen, C., 2003. Influence of aging on metal availability in soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 178, 1-21.
- Ma, W.-c., 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. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.* 33, 207-219.
- Ma, W. K., et al., 2009. Development of a simulated earthworm gut for determining bioaccessible arsenic, copper, and zinc from soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1439-46.
- Ma, Y., et al., 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biol. Fertil. Soils.* 36, 79–86.
- Mahbub, K. R., et al., 2016. Mercury Inhibits Soil Enzyme Activity in a Lower Concentration than the Guideline Value. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 76-82.
- Mahbub, K. R., et al., 2017a. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol. Indic.* 74, 451-462.
- Mahbub, K. R., et al., 2017b. Mercury toxicity to *Eisenia fetida* in three different soils. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 1261-1269.
- Mahbub, K. R., et al., 2017c. Mercury alters the bacterial community structure and diversity in soil even at concentrations lower than the guideline values. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2163-2175.
- Marois, A., et al., Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînement, Base des Forces canadiennes, Valcartier. Technical Report, 2004, pp. 78.
- Massicotte, R., et al., 2003. Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory. *J. Environ. Monit.* 5, 774-9.
- Morgan, A. J., Morris, B., 1982. The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochem.* 75, 269-285.
- Morgan, J. E., et al., 1989. A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol.* 92, 15-21.
- Nagata, T., 2015. Growth inhibition and IRT1 induction of *Arabidopsis thaliana* in response to bismuth. *Journal of Plant Biology.* 58, 311-317.
- Nahmani, J., et al., 2009. Uptake kinetics of metals by the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated soils. *Environ. Pollut.* 157, 2622-2628.
- OECD, 2004. Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Publishing.

- Omouri, Z., et al., Bioaccessibility and acute toxicity of bismuth to the earthworm *Eisenia andrei*. In: t. S. W. C. S. N. A. t. A. Meeting, (Ed.). 7th SETAC World Congress/SETAC North America 37th Annual Meeting, 2016.
- Peijnenburg, W. J., et al., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 163-72.
- Rada, A., et al., 1996. Bioavailability of cadmium and copper in two soils from the sewage farm of Marrakech city (Morocco): effect of earthworms. *Agricoltura Mediterr.* 126, 364-368.
- Rida, A. M. M., 1994. Les vers de terre et l'environnement. *La recherche.* 25, 260-267.
- Robidoux, P. Y., et al., 2004. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 300-13.
- Robidoux, P. Y., et al., 2000. Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ.Toxicol.Chem.* 19, 1764–1773.
- Rohr, O., 2002. Bismuth – the new ecologically green metal for modern lubricating engineering. *Ind. Lubr. Tribol.* 54, 153-164.
- Salmon, S., 2001. Earthworm excreta (mucus and urine) affect the distribution of springtails in forest soils. *Biol. Fertil. Soils.* 34, 304-310.
- Sano, Y., et al., 2005. Oral toxicity of bismuth in rat: single and 28-day repeated administration studies. *J Occup Health.* 47, 293-8.
- Sauvé, S., Fournier, M., 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 67-72.
- Sauvé, S., et al., 2002. Phagocytic Response of Terrestrial and Aquatic Invertebrates Following in Vitro Exposure to Trace Elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 21-29.
- Sauvé, S., et al., 1998. Soil Solution Speciation of Lead(II): Effects of Organic Matter and pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 618-621.
- Sauvé, S., et al., 1997. Speciation of Lead in Contaminated Soils. *Environ. Pollut.* 98, 149-155.
- Savard, K., et al., 2007. Effects of HMX-Lead Mixtures on Reproduction of the Earthworm *Eisenia Andrei*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 351-358.
- Schrader, S., 1994. Influence of earthworms on the pH conditions of their environment by cutaneous mucus secretion. *Zool. Anz.* . 233, 211–219.
- Schreck, E., et al., 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. *Chemosphere.* 85, 1555-62.
- Semple, K. T., et al., 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38, 228A-231A.
- Smith, B. A., et al., 2010a. Uptake and Elimination of Cadmium and Zinc by *Eisenia andrei* During Exposure to Low Concentrations in Artificial Soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 264-273.
- Smith, B. A., et al., 2010b. Comparison of biological and chemical measures of metal bioavailability in field soils: Test of a novel simulated earthworm gut extraction. *Chemosphere.* 81, 755–766.
- Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl. Soil Ecol.* 11, 227-243.
- Stein, E., et al., 1977. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J. Morphol.* 153, 467-77.
- Tillman, L. A., et al., 1996. Review article: safety of bismuth in the treatment of gastrointestinal diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10, 459-67.
- Udovic, M., et al., 2007. The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere.* 70, 126–134.

- Urgast, D. S., Ellingsen, D.G., et al., 2012. Multi-elemental bio-imaging of rat tissue from a study investigating the bioavailability of bismuth from shotgun pellets. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 89–99.
- Usmani, Z., Kumar, V., 2015. Earthworms: 'The Unheralded Soldiers' Standing Steadfast Against Metal Contamination. *Research Journal of Environmental Sciences.* 9, 48-65.
- Van Gestel, C. A. M., et al., 1993. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Sci. Total Environ.* 134, 585-597.
- Waalewijn-Kool, P. L., et al., 2014. Effect of soil organic matter content and pH on the toxicity of ZnO nanoparticles to *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 9-15.
- Wen, B., et al., 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biol. Fertil. Soils.* 40, 181-187.
- Wen, B., et al., 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere.* 63, 1179-1186.
- Yadav, J. S., et al., 2012. Bismuth(III) salts as synthetic tools in organic transformations. *Top. Curr. Chem.* 311, 229-69.
- Žaltauskaitė, J., Sodienė, I., 2010. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth, reproduction and survival of earthworm *Eisenia fetida*. *EKOLOGIJA.* 56, 10-16.

5 CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Depuis quelques années, l'utilisation et le développement de nouveaux composés à base de Bi ne cessent de croître. Ainsi, l'augmentation des niveaux actuels de Bi dans les écosystèmes terrestres et aquatiques est une réalité incontestable. En effet, la contamination des sols par le Bi a été mise en évidence par plusieurs études comme présentées dans la section 1.1.1. Le premier objectif de cette thèse était centré sur l'évaluation des effets aigus de Bi sur deux organismes clés du sol à savoir les vers de terre et les plantes. Pour cela, des concentrations de Bi représentatives des concentrations environnementales, tel que rapporté dans la littérature, ont été sélectionnées. En premier lieu, la phytotoxicité du citrate et du nitrate de Bi a été étudiée (Chapitre 2). Les résultats obtenus à partir des tests de contact sur papier filtre contaminé ont montré que les deux sels de Bi inhibent la germination et la croissance racinaire chez la plante *Lolium perenne*. Cependant, la sévérité de l'inhibition varie en fonction du type de sel de Bi utilisé. En effet, pour les mêmes teneurs en Bi total (6.5, 13.1, 26.1, 52.2, 104.4, 208.9 mg Bi/L), le nitrate de Bi est plus toxique que le citrate de Bi. Par exemple, les valeurs des concentrations inhibitrices de l'élongation racinaire CI_{25} et CI_{50} estimées par interpolation linéaire étaient de 23.79 et 60.34 mg/L pour le nitrate de Bi et de 45.22 et 139.5 mg/L pour le citrate de Bi, respectivement. Dans ces mêmes tests, des diminutions significatives du pH des solutions aqueuses de nitrate de Bi testées suivant l'augmentation des concentrations de nitrate de Bi ont été observées. Un effet similaire a été observé dans le cas du citrate de Bi, mais d'une manière moins drastique. La différence de toxicité causée par le nitrate de Bi comparée à celle du citrate de Bi pourrait s'expliquer d'une part, par la plus faible solubilité du citrate de Bi dans l'eau comparée à celle du nitrate de Bi. En effet, le nitrate de Bi est relativement plus soluble dans l'eau que le citrate de Bi (Briand *et al.*, 1999, Larrañaga *et al.*, 2016). Ainsi, la solubilité plus élevée du nitrate de Bi, entrainerait une fraction de Bi bioaccessible plus grande, par conséquent une toxicité plus élevée. D'autre part, l'exposition des graines de *Lolium perenne* à des milieux très acides ($pH \leq 3$) pourraient contribuer à l'inhibition de leur germination et de leur croissance racinaire. En effet, même si *Lolium perenne* peut tolérer une gamme de pH assez large, allant de 4.5 à 8.4 (Alberta Agriculture and Forestry, April 2004), des inhibitions significatives de la germination et de la croissance ont été observées chez *Lolium perenne* cultivée dans des sols à $pH \leq 3$ (Vicaş *et al.*, 2009).

L'article présenté au chapitre 2 inclut les résultats de l'étude effectuée avec des sols contaminés artificiellement au laboratoire. Les résultats de cette étude ont révélé que la phytotoxicité du même sel de Bi varie en fonction du type de substrat utilisé (sol artificiel ou sol

naturel). En sol naturel, le nitrate de Bi diminue significativement le poids des racines de la plante à des concentrations nominales totales ≥ 4.8 mg/kg sol sec. Tandis qu'en sol artificiel OCDE, une diminution significative du poids des racines est observée uniquement à la concentration de 485 mg de nitrate de Bi/kg sol sec. Dans le cas du sol contaminé avec du citrate de Bi, aucun effet significatif n'a été observé sur la croissance racinaire à des concentrations ≥ 398.1 mg/kg sol sec. Les concentrations inhibitrices CI_{25} et CI_{50} obtenues résument l'ensemble de ces effets. Pour le nitrate de Bi, les CI_{25} et CI_{50} obtenues pour le poids des racines étaient de 1,01 et 3,05 mg/kg en sol naturel et de 292,8 et > 485 mg/kg en sol artificiel OCDE, respectivement. Pour le citrate de Bi, les concentrations testées soit ≤ 398.1 mg/kg sol sec ne sont pas assez élevées pour estimer les valeurs de CI_{25} et CI_{50} par interpolation linéaire. De l'ensemble de ces résultats, il ressort l'influence des propriétés physicochimiques du substrat sur la phytotoxicité du sel de Bi. En effet, plusieurs études ont démontré l'influence des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques des sols sur la biodisponibilité des métaux pour les plantes. Dans notre étude, les différences au niveau des caractéristiques physicochimiques (texture, teneur en matière organique, pH) entre le sol artificiel et le sol naturel peuvent expliquer en partie les résultats de toxicité. En outre, nous supposons que la différence au niveau des propriétés biologiques entre le sol naturel et le sol artificiel OCDE pourrait contribuer à expliquer la différence de la toxicité en fonction du type de sol. Par exemple, il a été démontré que les microorganismes du sol augmentent la libération et la mobilisation du Bi dans le sol (Tsang *et al.*, 1994). Pour conclure, cette étude a montré que la biodisponibilité et la toxicité du Bi chez *Lolium perenne* dépend de la combinaison de plusieurs facteurs qui sont liés au composé de Bi testé et au type de substrat utilisé. Les résultats ont aussi montré que la croissance des racines est le paramètre le plus sensible aux sels de Bi. Ainsi, il serait important de vérifier les effets chroniques, et de comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse au stress causé par le Bi et les composés à base de Bi chez les plantes.

Suite à ces premiers résultats, le citrate de Bi a été sélectionné pour la suite du projet. Ce choix nous a permis de tester des concentrations de Bi plus élevées en évitant les baisses du pH provoquées par le nitrate de Bi, d'une part. D'autre part, la très faible hydrosolubilité du citrate de Bi permettait de se rapprocher le plus de la réalité du terrain. En effet, il a été largement rapporté que le Bi et les composés à base de Bi sont très peu hydrosolubles. De ce fait, ce choix est une opportunité pour vérifier l'un des arguments les plus cités dans la littérature pour justifier la non toxicité du Bi et des composés à base de Bi qui est leur faible hydrosolubilité.

L'étude présentée au chapitre 3 démontre que le Bi sous la forme citrate provoque des effets létaux chez le ver de terre *Eisenia andrei*. Des taux de mortalité significatifs et des déformations sévères ont été observés chez les vers de terre exposés à des concentrations de Bi totales ≥ 399.5 mg/kg sol sec. Étant donné que le citrate de Bi a été ajouté au sol sous forme de poudre, ces résultats montrent clairement que dans un sol contaminé, la toxicité d'un composé métallique ne dépend pas seulement de sa solubilité dans l'eau. Chez les vers de terre, l'absorption des produits chimiques présents dans le sol est complexe en raison de l'existence de deux voies d'exposition (dermale et ingestion). Ainsi, les vers de terre sont capables d'absorber les produits chimiques présents dans l'eau interstitielle à travers leur peau et les produits chimiques séquestrés dans les particules du sol et/ou liés à la matière organique par ingestion.

De nos jours, il est largement reconnu que la concentration totale des contaminants dont les métaux n'est pas le paramètre le plus pertinent dans le processus d'évaluation des risques liés aux sols contaminés (Lanno *et al.*, 2004, Mahbub *et al.*, 2017, Ortega-Calvo *et al.*, 2015, Peijnenburg *et al.*, 1997). Au cours de ce chapitre, un intérêt particulier a été porté à l'étude de la biodisponibilité environnementale (connue sous le nom de la bioaccessibilité) du Bi dans le sol qui représente le premier maillon dans le processus de la biodisponibilité telle que considéré dans ce projet. Les résultats des analyses chimiques ont clairement montré, que pour les mêmes concentrations totales de Bi, la fraction du Bi bioaccessible varie considérablement en fonction du temps et de la présence ou de l'absence du ver *Eisenia andrei* dans le sol. La bioaccessibilité du Bi diminue après 14 jours dans le sol dépourvu de ver de terre, probablement due à la séquestration du métal dans des microsites du sol. En revanche, la fraction du Bi bioaccessible augmente significativement dans le sol après 14 jours en présence des vers de terre. L'impact des vers de terre sur la mobilité et la biodisponibilité des métaux et des métalloïdes dans le sol a été rapporté dans plusieurs études (W. K. Ma *et al.*, 2009, Sizmur *et al.*, 2011, Bei Wen *et al.*, 2004). Toutefois, les mécanismes impliqués chez les vers de terre pour augmenter la biodisponibilité des métaux dans les sols contaminés ne sont pas encore bien élucidés. Dans cette étude, l'amplification de la bioaccessibilité du Bi dans le sol en présence du ver *Eisenia andrei* pourrait s'expliquer par plusieurs phénomènes. Les vers de terre sécrètent des métallophores et d'autres biomolécules qui possiblement ont une grande affinité pour former des complexes avec le Bi. De plus, la dégradation de la matière organique par les vers de terre permettrait de libérer le Bi organiquement lié. Une autre étude a démontré que la libération de l'As, Pb, Zn et Cu dans le sol augmente suivant l'augmentation de la dégradation de la matière organique (Sizmur *et al.*, 2011). L'augmentation de la bioaccessibilité

du Bi dans le sol pourrait être attribuée en partie à l'activité enzymatique et à l'activité microbienne au niveau du système digestif des vers de terre.

Les taux élevés de mortalité observés chez les vers de terre et la décomposition rapide de leurs corps n'ont pas permis la mesure des concentrations de Bi accumulées dans leurs tissus. Toutefois, les résultats ont montré que la fraction de Bi bioaccessible mesurée dans le sol augmente à mesure que le taux de mortalité des vers augmente. Ainsi, on peut conclure que les vers de terre peuvent absorber et accumuler le Bi dans leurs tissus. Après, décomposition des vers, des concentrations relativement élevées de Bi bioaccessible retournent dans le sol ce qui pourrait expliquer la corrélation positive entre le taux de mortalité et la fraction du Bi bioaccessible dans le sol. Les données sur les concentrations corporelles de Bi chez les vers exposés au sol contaminé par le citrate de Bi sont présentées dans le chapitre 4 qui a comme objectif d'examiner la biodisponibilité et les effets chroniques du Bi.

L'étude des effets chroniques présentée au chapitre 4 démontre que le Bi diminue significativement les paramètres de reproduction (taux d'éclosion des cocons et le nombre de juvéniles) chez le ver *Eisenia andrei* à des concentrations totales mesurées ≥ 116 mg Bi/kg sol sec. Cependant, aucune mortalité et aucun effet négatif sur la croissance des vers n'ont été observés. Ces résultats démontrent que la reproduction est le paramètre le plus sensible à l'exposition au Bi. Chez *Eisenia fetida*, les paramètres de reproduction tels que la production de cocons et le taux d'éclosion seraient plus sensibles à la pollution métallique que la survie et le changement du poids (Nahmani *et al.*, 2007). Le gain de poids est le paramètre le moins sensible et sa diminution coïncide généralement avec la première apparition de la mortalité d'après W. C. Ma (1984). En effet, une perte de poids et une diminution de la taille considérable ont été observées chez les vers exposés aux concentrations létales de Bi ≥ 399.5 mg/kg de sol sec (toxicité aiguë /Chapitre 3). Ainsi les paramètres de reproduction sont les plus appropriés pour évaluer les effets sous-létaux du Bi sur les populations de vers de terre. Dans les sols contaminés, la reproduction des oligochètes peut être affectée par voie directe ou par voie indirecte. La voie indirecte implique une grande allocation des ressources énergétiques pour les mécanismes de défense, la maintenance et le métabolisme, et moins vers la reproduction et l'anabolisme (Givaudan, 2014, Savard *et al.*, 2007). Les données sur la variation du poids et la reproduction qui ont été obtenues dans cette étude (table 4.3) montrent que les effets sur la reproduction ne proviennent pas d'une baisse de la croissance des vers. Le Bi aurait un effet direct sur la reproduction chez *Eisenia andrei*. Les valeurs des Cl_{50} estimées par interpolation linéaire sont de 123, 182 et > 289 mg Bi/kg de sol sec pour le nombre de juvéniles, le nombre

de cocons éclos et nombre total de cocons, respectivement. Le nombre de juvéniles et le nombre de cocons éclos semblent être les paramètres les plus sensibles à l'exposition au Bi. D'une part, cela pourrait s'expliquer par le fait que le Bi affecte plus la fertilité des cocons que leur nombre. D'autre part, les cocons déposés dans le sol sont en contact direct avec le Bi bioaccessible qui pourrait affecter le développement des embryons et empêcher l'éclosion.

Une partie du chapitre 4 a été consacrée à l'évaluation des effets immunotoxiques du Bi. Les résultats des tests effectués en sol naturel contaminé artificiellement au laboratoire, ont montré que des concentrations totales ≤ 289 mg Bi/kg sol sec n'affectent pas la viabilité des coelomocytes et modulent légèrement l'efficacité phagocytaire des coelomocytes chez le ver *Eisenia andrei*. Les mesures de la viabilité confirment que l'effet sur l'efficacité phagocytaire n'est pas le résultat d'une diminution de la viabilité des coelomocytes. Cependant, l'effet sur l'efficacité phagocytaire montre une courbe dose réponse fluctuante. Les plus faibles concentrations testées (75 et 116 mg Bi/kg sol sec) ont tendance à diminuer l'efficacité phagocytaire des coelomocytes, mais de manière significative seulement à 116 mg/kg sol sec. Tandis que, les concentrations les plus élevées (\geq à 166 mg Bi/kg sol sec) semblent stimuler l'efficacité phagocytaire mais de manière non significative. La faible immunotoxicité du Bi pourrait être attribuée en partie à la faible sensibilité des cellules phagocytaires du ver *Eisenia andrei* au Bi. Il a été montré que la réponse phagocytaire chez le ver de terre est métal-spécifique, et qu'elle varie considérablement selon le type de métal (Fugère *et al.*, 1996). Les coelomocytes de ver de terre sont classées en trois sous populations : les amoebocytes petites et larges et les chloragocytes. Plusieurs études ont rapporté que seulement les amoebocytes sont capables de phagocytose, (Fuller-Espie, 2010, Stein *et al.*, 1977), alors que les chloragocytes contiennent des granules de chlorosomes qui sont impliquées dans la séquestration des métaux (Ireland *et al.*, 1977, J. E. Morgan *et al.*, 1989a). Le faible effet du Bi sur l'activité et l'efficacité phagocytaire observé au cours de cette étude est causé possiblement, en partie par la séquestration du Bi par les chloragocytes et la diminution de sa biodisponibilité pour les amoebocytes. Il a été suggéré que la séquestration du Zn dans les chloragocytes entraîne la détoxification du métal par immobilisation accumulative (J. E. Morgan *et al.*, 1989a). Récemment, il a été démontré que la sensibilité des chloragocytes et des amoebocytes vis à vis de l'exposition aux métaux (Cu, Ni, Pb et Cd) est nettement différente, et que les chloragocytes sont les plus sensibles (Irizar *et al.*, 2015). Ceci suggère qu'il serait intéressant de mettre en place des protocoles permettant l'étude d'une seule sous-population de coelomocytes à la fois, afin de mieux comprendre la toxicité métallique chez le ver de terre, mais aussi de développer de nouveaux outils d'investigation plus précis. De plus, l'implication

d'autres mécanismes de défense spécifiques au Bi chez le ver de terre pourrait expliquer la faible immunotoxicité du Bi. De toute évidence, plus d'investigation seront nécessaires pour élucider les mécanismes d'effets impliqués suite à une exposition au Bi chez les vers de terre.

L'étude du processus de la biodisponibilité du Bi a été poursuivie dans les conditions de concentrations sous-létales. Les résultats obtenus sur la bioaccessibilité du Bi dans le sol confirment ceux obtenus au chapitre 3 (étude sur la toxicité aiguë). La bioaccessibilité du Bi diminue avec le temps de séjour dans le sol, en l'absence des vers de terre. En revanche, en présence de vers de terre, la bioaccessibilité du Bi augmente considérablement avec le temps. Par exemple, les fractions du Bi bioaccessible mesurées en présence du ver *Eisenia andrei* sont de 32.59 à 17.75 fois supérieures à celles mesurées au début de l'expérience. De plus, une fois que les vers de terre ont été retirés du sol à 28 jours, les fractions de Bi bioaccessibles ne changent pas de façon drastique. Ce résultat montre clairement que l'augmentation de la bioaccessibilité du Bi dans le sol est liée à la présence du ver *Eisenia andrei*. Par conséquent, il faut prendre en considération que la biodisponibilité du Bi potentiellement toxique dans le sol puisse changer sous l'influence des vers de terre. En général, l'évaluation de la bioaccessibilité des composés toxiques dans le sol se fait sans se soucier de l'influence des organismes du sol. On présume généralement que la bioaccessibilité et la toxicité des métaux diminuent à mesure que les produits persistent dans le sol. Les résultats de cette étude démontrent une bioaccessibilité croissante du Bi attribuée à plusieurs phénomènes liés à l'activité des vers de terre (voir chapitre 3). Par conséquent, une toxicité croissante du Bi pour les autres organismes du sol dont les plantes et les microorganismes est fort possible. Dans un contexte d'évaluation réelle des risques liés aux sols contaminés, il serait important d'inclure l'influence des organismes du sol sur la biodisponibilité et la toxicité des métaux. Dans la même tendance, des études récentes ont montré l'importance de considérer les facteurs influençant la biodisponibilité du Hg et Pb dans l'eau interstitielle dans l'évaluation de la toxicité des sols (Kader *et al.*, 2016, Mahbub *et al.*, 2016). De plus, plusieurs facteurs physicochimiques du sol (pH, teneur en matière organique, teneur en argile) peuvent influencer la bioaccessibilité et l'absorption des métaux par les organismes du sol. Dans notre étude, une augmentation significative du pH a été observée dans les sols contaminés contenant les vers de terre en comparaison avec le pH des sols à 0 et à 56 jours en absence de vers de terre. Les résultats ont montré que les fractions du Bi bioaccessible dans le sol augmentent avec l'augmentation du pH induite par les activités du ver *Eisenia andrei*. L'augmentation du pH pourrait augmenter la mobilité du Bi, en raison d'une augmentation de nombre de sites d'échange de cations pH-dépendant dans le sol (Hou *et al.*, 2006). Cela permet de déduire que les concentrations du Bi

biodisponible pour absorption par les organismes du sol augmentent à leur tour. En effet, Li *et al.* (1993) avaient montré une augmentation des concentrations de Bi dans les pâturages de 0.01 mg/kg à 0.21 mg/kg lorsque le pH du sol passe de 5 à 8. Cependant, la mobilité et la biodisponibilité du Bi dans le sol restent peu connues. Le sol est une matrice très complexe, d'autres paramètres physico-chimiques (teneur en d'argile, teneur en carbone total) pourraient probablement influencer la bioaccessibilité et la toxicité du Bi.

Les analyses des résidus de Bi dans les tissus de vers exposés 28 jours en sol contaminé ont montré que le ver *Eisenia andrei* peut absorber et accumuler des concentrations relativement élevées de Bi, en dépit de la faible solubilité du citrate de Bi. Après 28 jours, la charge corporelle des vers en Bi atteint un maximum de $21,30 \pm 4,19$ mg Bi/kg de tissu sec. Ces résultats peuvent être attribués d'une part à l'augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité du Bi due à l'activité des vers de terre et des microorganismes du sol. D'autre part, l'existence de deux voies d'absorption de contaminants chez le ver de terre leur permet d'assimiler la partie du métal dissoute dans l'eau interstitielle à travers la paroi humide de leur corps, et la partie adsorbée/désorbée par les composantes du sol via leur tube digestif. La capacité des vers de terre à bioaccumuler divers contaminants tels : les métaux, les polluants organiques et les nanoparticules a été largement décrite. Chez les vers de terre, il existe deux sites majeurs pour accumuler les métaux lourds, le canal alimentaire postérieur (J. E. Morgan *et al.*, 1989b), et le tissu chloragogène (A. J. Morgan *et al.*, 1982). La détérioration et les déformations observées au niveau de la partie postérieure des vers (Figure 2, chapitre 3) seraient probablement dû à l'accumulation du Bi dans le tissu chloragogène entourant le tube digestif postérieur. De plus, l'ensemble des données obtenues sur l'accumulation du Bi dans les tissus de vers et sur la bioaccessibilité du Bi dans le sol pourraient expliquer les effets inhibiteurs sur la reproduction observés chez le ver de terre *Eisenia andrei*. Ces données mettent en lumière l'augmentation des risques d'exposition au Bi pour d'autres organismes via le transfert trophique.

En conclusion, ce projet a démontré que des concentrations de Bi égales et/ou inférieures à celles présentes dans l'environnement sont néfastes pour la germination et la croissance de la plante *Lolium perenne*, et pour la survie, la croissance et la reproduction du ver *Eisenia andrei*. Dans le cas du ver *Eisenia andrei*, des concentrations de Bi total dans le sol ≥ 116 mg/kg sol sec diminuaient significativement sa reproduction et des concentrations de Bi total ≥ 399.5 mg/kg sol sec étaient significativement létales. Cependant, pour une meilleure évaluation des risques écotoxicologiques liés aux sols contaminés par le Bi, d'autres études

impliquant d'autres espèces du sol seront nécessaires. En outre, plus d'études seront nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et biochimiques impliqués dans la toxicité de bismuth, et les potentielles biomolécules qui interagissent avec le Bi. Il serait aussi intéressant de poursuivre l'investigation à l'aide de mesures sous-létales afin de déterminer les biomarqueurs impliqués dans la réponse au stress causé par le Bi. Une approche multi-biomarqueurs serait très utile pour déterminer les effets de Bi à un stade précoce avant que les effets sur la survie, la germination, la croissance et la reproduction apparaissent chez les plantes et les vers de terre.

Il est fortement recommandé de manipuler les composés à base de Bi avec prudence et de mettre en place des directives que les industries et les municipalités devraient respecter afin de contrôler adéquatement les effluents contenant du Bi. Malheureusement, de nos jours il n'existe pas d'informations sur les quantités de Bi rejetées par les industries et il n'existe aucune législation qui pourrait encourager les industries à adopter de telles mesures (Amneklev *et al.*, 2015a). Une étude récente a rapportée qu'aucune norme de qualité environnementale est disponible au Japon concernant le Bi dans le sol (Nagata, 2015). Au Canada selon les données du CCME (Le Conseil canadien des ministres de l'environnement), il n'existe aucune recommandation concernant le Bi pour la qualité des sols agricoles, résidentiels et industriels.

REFERENCES

- Affar EB, Dufour M, Poirier GG & Nadeau D (1998) Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. *Mol Cell Biochem* 185(1-2):123-133.
- Al-Hossainy AF, Abd-Elmageed AAI & Ibrahim ATA (2015) Synthesis, structural and optical properties of gold nanoparticle-graphene-selenocysteine composite bismuth ultrathin film electrode and its application to Pb(II) and Cd(II) determination. *Arabian Journal of Chemistry*<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.020>.
- Alberta Agriculture and Forestry (April 2004) Perennial Ryegrass Seed Production in Western Canada.), p 15.
- Alexander M (2000) *Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants*.
- Ali H, Khan E & Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91(7):869-881.
- Alkim H, Koksal AR, Boga S, Sen I & Alkim C (2017) Role of Bismuth in the Eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Ther* 24(6):e751-e757.
- Allen HEHE & Société S (2002) *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems : importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants*. SETAC Press, Pensacola, Flor. xii, 158 p
- Amneklev J, Augustsson A, Sörme L & Bergbäck B (2016) Bismuth and Silver in Cosmetic Products: A Source of Environmental and Resource Concern? *Journal of Industrial Ecology* 20(1):99-106.
- Amneklev J, Sörme L, Augustsson A & Bergbäck B (2015a) The Increase in Bismuth Consumption as Reflected in Sewage Sludge. *Water, Air, & Soil Pollution* 226(4):92.
- Amneklev J, Sörme L, Augustsson A & Bergbäck B (2015b) The Increase in Bismuth Consumption as Reflected in Sewage Sludge. *Water, Air and Soil Pollution* 226(4):1-11.
- Antunes IM, Gomes ME, Neiva AM, Carvalho PC & Santos AC (2016) Potential risk assessment in stream sediments, soils and waters after remediation in an abandoned W>Sn mine (NE Portugal). *Ecotoxicol Environ Saf* 133:135-145.
- Asami T, Kubota M & Saito S (1992) Simultaneous determination of antimony and bismuth in soils by continuous hydride generation—atomic absorption spectrometry. *Water, Air, & Soil Pollution* 62(3):349-355.
- ASTM (1999) Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests. (E-1963-98, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.).
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L & Kizek R (2008) Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6(4):189-213.
- Badireddy AR & Chellam S (2011) Bismuth dimercaptopropanol (BisBAL) inhibits formation of multispecies wastewater flocs. *J Appl Microbiol* 110(6):1426-1437.
- Beaumelle L, Vile D, Lamy I, Vandenbulcke F, Gimbert F & Hedde M (2016) A structural equation model of soil metal bioavailability to earthworms: confronting causal theory and observations using a laboratory exposure to field-contaminated soils. *Sci Total Environ* 569-570:961-972.
- Belmeskine H, Brousseau P, Haddad S, Vandelac L & Fournier M (2011) Effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on phagocytic response of *Eisenia andrei* coelomocytes. *Journal of Xenobiotics* 1:29-34.
- Benhamou N & Rey P (2012) Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. : I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection* 92(1):1-23.

- Benzarti S, Mohri S & Ono Y (2008) Plant response to heavy metal toxicity: comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfalfa. *Environ Toxicol* 23(5):607-616.
- Berthelot Y (2008) *Évaluation de la biodisponibilité des métaux et des matériaux énergétiques dans des sols provenant de sites d'entraînement militaire*. Doctorat (Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada). 234 p
- Berthelot Y, Trottier B & Robidoux PY (2009) Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index. *Environ Int* 35(1):83-90.
- Berthelot Y, Valton E, Auroy A, Trottier B & Robidoux PY (2008) Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. *Chemosphere* 74(1):166-177.
- Bidar G, Garçon G, Pruvot C, Dewaele D, Cazier F, Douay F & Shirali P (2007) Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147(3):546-553.
- Bilej M, Cooper EL & Roch P (1993) *Immunology of Annelids*. Taylor & Francis. https://books.google.ca/books?id=dqWk_8DpctgC
- Binet F, Fayolle L, Pussard M, Crawford JJ, Traina SJ & Tuovinen OH (1998) Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 27(1):79-84.
- Bini C & Bech J (2014) *PHEs, Environment and Human Health: Potentially harmful elements in the environment and the impact on human health*. Springer Netherlands. <https://books.google.ca/books?id=sOglBAAAQBAJ>
- Bityutskii NP, Lapshina IN, Lukina EI, Solov'eva AN, Patsevich VG & Vygovskaya AA (2002) Role of earthworms in mineralization of organic nitrogen compounds in soil. *Eurasian Soil Science* 35:1100-1107.
- Blouin M, Hodson ME, Delgado EA, Baker G, Brussaard L, Butt KR, Dai J, Dendooven L, Peres G, Tondoh JE, Cluzeau D & Brun JJ (2013) A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* 64(2):161-182.
- Bourjaily P (2014) Hold Your Tungsten: Kill Turkeys at a Distance, and Give Old Guns New Life, with Two Affordable New Loads. *Field & Stream* 118(4):24-26.
- Bowen HJM (1979) *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press, London; New York
- Briand GG & Burford N (1999) Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chem Rev* 99(9):2601-2658.
- Brousseau P, Dunier M, Deschaux P, De Guise S, Krystyniak K & Fournier M (1997) Marqueurs immunologiques. *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux.*, L. Lagadic TC, J.C. Amiard, F. Ramade (Édit.) Elsevier Mason SAS., Issy-les-Moulineaux, FRA. p 171-184.
- Brown RD (2001) Bismuth, in *Metals and Minerals: US Geological Survey Minerals Yearbook.*
- Bulte JWM & Modo MMJ (2017) *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging*. Springer International Publishing. 469 p
- Cadevall M, Ros J & Merkoçi A (2016) Bismuth-Based Nanomaterials and Platforms for Sensing and Biosensing Applications. *Functional and Physical Properties of Polymer Nanocomposites*, John Wiley & Sons, Ltd, 10.1002/9781118542316.ch8. p 159-181.
- Cespedes CL, Lemus A, Salazar JR, Cabrera A & Sharma P (2003) Herbicidal, plant growth inhibitory, and cytotoxic activities of bismuthines containing aromatic heterocycles. *J Agric Food Chem* 51(10):2923-2929.
- Claudio CR & Chellam S (2015) Bismuth nanoparticles: Antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety. *Nanomedicine*, Seifalian A, De Mel, A., Kalaskar, D.M., Eds (Édit.)One Central Press: Manchester, UK. p 430–437.

- Conder JM & Lanno RP (2003) Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 15(3):151-151.
- Cristaldi A, Conti GO, Jho EH, Zuccarello P, Grasso A, Copat C & Ferrante M (2017) Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environmental Technology & Innovation* 8:309-326.
- Curry JP (1998) Factors affecting earthworm abundance in soils. *Earthworm Ecology*, Edwards CaE (Édit.) Lucie Press, Boca Raton, St. p 389.
- Cygal M, Lis U, Kruk J & Plytycz B (2007) Coelomocytes and fluorophores of the earthworm *Dendrobaena veneta* raised at different ambient temperatures *Acta Biologica Cracoviensia. Series Zoologia* 49:5-11.
- DalCorso G, Manara A & Furini A (2013) An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics* 5(9):1117-1132.
- Dhainaut A & Scaps P (2001) Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology* 79(2):233-253.
- Ding SN, Shan D, Xue HG & Cosnier S (2010) A promising biosensing-platform based on bismuth oxide polycrystalline-modified electrode: characterization and its application in development of amperometric glucose sensor. *Bioelectrochemistry* 79(2):218-222.
- Domínguez J, Velando A, Aira M & Monroy F (2003) Uniparental reproduction of *Eisenia fetida* and *E. andrei* (Oligochaeta: Lumbricidae): evidence of self-insemination: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia* 47(5):530-534.
- Edwards CA & Bohlen PJ (1992) The Effects of Toxic Chemicals on Earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, Ware GW (Édit.) Springer New York, New York, NY10.1007/978-1-4612-2890-5_2. p 23-99.
- Edwards CA & Bohlen PJ (1996) *Biology and Ecology of Earthworms*. Springer. https://books.google.ca/books?id=ad4rDwD_GhsC
- Ehlers LJ & Luthy RG (2003) Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environ Sci Technol* 37(15):295A-302A.
- Eijsackers H, Heimbach F & Donker MH (1993) *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Taylor & Francis. <https://books.google.ca/books?id=CwWsGhpTAWcC>
- Eisenhauer N, Milcu A, Nitschke N, Sabais ACW, Scherber C & Scheu S (2009) Earthworm and belowground competition effects on plant productivity in a plant diversity gradient. *Oecologia* 161(2):291-301.
- Elvira C, Domínguez J & Mato S (1997) The growth and reproduction of *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* in cow manure mixed cultures with *Eisenia andrei*. *Applied Soil Ecology* 5(1):97-103.
- Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F & Xie Y (2015) Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *The Scientific World Journal* 2015:18.
- Eriksson J (2001) *Concentrations of 61 Trace Elements in Sewage Sludge, Farmyard Manure, Mineral Fertiliser, Precipitation and in Oil and Crops*. Swedish Environmental Protection Agency. <https://books.google.ca/books?id=rUIHcgAACAAJ>
- Ernst G, Felten D, Vohland M & Emmerling C (2009) Impact of ecologically different earthworm species on soil water characteristics. *European Journal of Soil Biology* 45(3):207-213.
- Eyambe G, Goven AJ, Fitzpatrick LC, Venables B & Cooper EL (1991) Extrusion protocol for use in chronic immunotoxicity studies with earthworm *L. terrestris* coelomic leucocytes. *Lab. Animal* 25:61-67.
- Fahey NS & Tsuji LJ (2006) Is there a need to re-examine the approval of bismuth shotshell as a non-toxic alternative to lead based on the precautionary principle? *J Environ Monit* 8(12):1190-1194.

- Feldmann J, Krupp EM, Glindemann D, Hirner AV & Cullen WR (1999) Methylated bismuth in the environment. *Applied Organometallic Chemistry* 13(10):739-748.
- Ferrari CP, Hong S, Van de Velde K, Boutron CF, Rudniev SN, Bolshov M, Chisholm W & Rosman KJR (2000) Natural and anthropogenic bismuth in Central Greenland. *Atmospheric Environment* 34(6):941-948.
- Figuroa-Quintanilla D, Salazar-Lindo E, Sack RB, Leon-Barua R, Sarabia-Arce S, Campos-Sanchez M & Eyzaguirre-Maccan E (1993) A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *N Engl J Med* 328(23):1653-1658.
- Filella M (2010) How reliable are environmental data on 'orphan' elements? The case of bismuth concentrations in surface waters. *J Environ Monit* 12(1):90-109.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H & Brousseau P (2000) Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics1. *American Zoologist* 40(3):412-420.
- Frazer D, Stergar E, Cionea C & Hosemann P (2014) Liquid Metal as a Heat Transport Fluid for Thermal Solar Power Applications. *Energy Procedia* 49(Supplement C):627-636.
- Fugère N, Brousseau P, Krzystyniak K, Coderre D & Fournier M (1996) Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 109(2):157-166.
- Fuller-Espie SL (2010) Using flow cytometry to measure phagocytic uptake in earthworms. *J Microbiol Biol Educ* 11(2):144-151.
- Gaur A & Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86(4):528-534.
- Ghariani S, Trifi-Farah N, Marghali S & Marrakchi M (2004) Characterisation of genetic diversity of Tunisian *Lolium perenne* *Cahier Options Méditerranée* 62:73-76.
- Givaudan N (2014) *Adaptation strategies of soil biodiversity (earthworms) to pesticides : mechanisms in play and ecosystemic cost assessment*. (Université Rennes 1). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01127596> (Consulté le 2014-03-19)
- Govindaraju K (1994) 1994 COMPILATION OF WORKING VALUES AND SAMPLE DESCRIPTION FOR 383 GEOSTANDARDS. *Geostandards Newsletter* 18:1-158.
- Gupta S, Kushwah T & Yadav S (2014) Earthworm coelomocytes as nanoscavenger of ZnO NPs. *Nanoscale Research Letters* 9(1):259-259.
- Hamed SS, Kauschke E & Cooper EL (2002) Cytochemical properties of earthworm coelomocytes enriched by Percoll. *New Model for Analyzing Antimicrobial Peptides with Biomedical Applications*, Beschin A, Bilej, M., Cooper, E.L. (Eds.) (Édit.) IOS Press, Ohmsha p29-37.
- Harmsen J, Rulkens W & Eijsackers H (2005) Bioavailability: concept for understanding or tool for predicting? *Land Contamination & Reclamation*, 13(2):161-171.
- Hendawi M, Sauve S, Ashour M, Brousseau P & Fournier M (2004) A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf* 59(1):17-22.
- Hernandez-Delgado R, Velasco-Arias D, Diaz D, Arevalo-Nino K, Garza-Enriquez M, De la Garza-Ramos MA & Cabral-Romero C (2012) Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int J Nanomedicine* 7:2109-2113.
- Hester RE, Harrison RM & Chemistry RSo (1994) *Waste Incineration and the Environment*. Royal Society of Chemistry. <https://books.google.ca/books?id=QcE3W5OZBbAC>
- Hoffman L, DaCosta M, Ebdon JS & Zhao J (2012) Effects of drought preconditioning on freezing tolerance of perennial ryegrass. *Environmental and Experimental Botany* 79:11-20.
- Hopkin SP (1989) *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Springer. <https://books.google.ca/books?id=crlAAAIAAJ>

- Hou H, Takamatsu T, Koshikawa MK & Hosomi M (2005) MIGRATION OF SILVER, INDIUM, TIN, ANTIMONY, AND BISMUTH AND VARIATIONS IN THEIR CHEMICAL FRACTIONS ON ADDITION TO UNCONTAMINATED SOILS. *Soil Science* 170(8):624-639.
- Hou H, Takamatsu T, Koshikawa MK & Hosomi M (2006) Concentrations of Ag, In, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan. *Eur. J. Soil Sci.* 57(2):214-227.
- Hutson JC (2005) Effects of bismuth citrate on the viability and function of Leydig cells and testicular macrophages. *Journal of Applied Toxicology* 25(3):234-238.
- Ireland MP (1983) Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. *Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*, Satchell JE (Édit.) Springer Netherlands, Dordrecht 10.1007/978-94-009-5965-1_21. p 247-265.
- Ireland MP & Richards KS (1977) The occurrence and localisation of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. *Histochemi.* 51(2-3):153-166.
- Irizar A, Rivas C, Garcia-Velasco N, Goni de Cerio F, Etxebarria J, Marigomez I & Soto M (2015) Establishment of toxicity thresholds in subpopulations of coelomocytes (amoebocytes vs. eleocytes) of *Eisenia fetida* exposed in vitro to a variety of metals: implications for biomarker measurements. *Ecotoxicology* 24(5):1004-1013.
- ISO (2008) Soil quality — Requirements and Guidance for the Selection and Application of Methods for the Assessment of Bioavailability of Contaminants in Soil and Soil Materials.
- ISO (2012) Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms -- Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. in *ISO 11268-2:2012*).
- Jenkins JA (2015) *Viability of Bismuth as a Green Substitute for Lead in Jacketed .357 Magnum Revolver Bullets*. Master of Science in Mechanical Engineering (University of South Florida). 109 p
- Johnson CA, Moench H, Wersin P, Kugler P & Wenger C (2005) Solubility of antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. *J. Environ. Qual.* 34(1):248-254.
- Jung MC, Thornton I & Chon HT (2002) Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu-W mine in Korea. *Sci Total Environ* 295(1-3):81-89.
- Kabata-Pendias A (2010) *Trace Elements in Soils and Plants, Fourth Edition*. CRC Press. <https://books.google.ca/books?id=YQfMBQAAQBAJ>
- Kabata-Pendias A & Mukherjee AB (2007) *Trace Elements from Soil to Human*. Springer. <https://books.google.ca/books?id=JYAq9X9phnYC>
- Kabata-Pendias A & Pendias H (2001) *Trace elements in soils and plants*. London, New-York, Washington D.C.
- Kader M, Lamb DT, Mahbub KR, Megharaj M & Naidu R (2016) Predicting plant uptake and toxicity of lead (Pb) in long-term contaminated soils from derived transfer functions. *Environ Sci Pollut Res Int* 23(15):15460-15470.
- Kamari A, Pulford ID & Hargreaves JSJ (2012) METAL ACCUMULATION IN LOLIUM PERENNE AND BRASSICA NAPUS AS AFFECTED BY APPLICATION OF CHITOSANS. *International Journal of Phytoremediation* 14(9):894-907.
- Khangarot BS & Das S (2009) Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models. *Journal of Hazardous Materials* 172(2):641-649.
- Kraabel BJ, Miller MW, Getzy DM & Ringelman JK (1996) Effects of embedded tungsten-bismuth-tin shot and steel shot on mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Wildl Dis* 32(1):1-8.
- Kurek A & Plytycz B (2003) Annual changes in coelomocytes of four earthworm species: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia* 47(5):689-701.

- Kwadrans A, Litwa J, Woloszczakiewicz S, Ksiezarczyk E, Klimek M, Duchnowski M, Kruk J & Plytycz B (2008) Changes in coelomocytes of the earthworm, *Dendrobaena veneta*, exposed to cadmium, copper, lead or nickel-contaminated soil *Acta Biologica Cracoviensia. Series Zoologia* 49:57-62
- Lambert JR & Midolo P (1997) The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1:27-33.
- Lanno R, Wells J, Conder J, Bradham K & Basta N (2004) The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57(1):39-47.
- Larrañaga MD, Lewis RJ & Lewis RA (2016) *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. Wiley. <https://books.google.ca/books?id=KPrfCwAAQBAJ>
- Le Roux S, Baker P & Crouch A (2016) Bioaccumulation of total mercury in the earthworm *Eisenia andrei*. *Springerplus* 5(1):681.
- Lee KE (1985) *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press. <https://books.google.ca/books?id=C4bwAAAAAMAAJ>
- Lemtiri A, Colinet G, Alabi T, Cluzeau D, Zirbes L, Haubruge É & Francis F (2014) Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *BASE* 18(1):121-133.
- Leonard EM & Wood CM (2013) Acute toxicity, critical body residues, Michaelis-Menten analysis of bioaccumulation, and ionoregulatory disturbance in response to waterborne nickel in four invertebrates: *Chironomus riparius*, *Lymnaea stagnalis*, *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia pulex*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 158(1):10-21.
- Li X & Thornton I (1993) Arsenic, antimony and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. *Environ Geochem Health* 15(2-3):135-144.
- Lide DR (2005) *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th Edition*. CRC Press
- Lofs-Holmin A (1983) Influence of Agricultural Practices on Earthworms (Lumbricidae). *Acta Agriculturae Scandinavica* 33(3):225-234.
- Lone MI, He Z-l, Stoffella PJ & Yang X-e (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 9(3):210-220.
- Ma WC (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. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.* 33(3):207-219.
- Ma WK, Smith BA, Stephenson GL & Siciliano SD (2009) Development of a simulated earthworm gut for determining bioaccessible arsenic, copper, and zinc from soil. *Environmental toxicology and chemistry* 10.1897/08-366.1.
- Maeder T (2013) Review of Bi₂O₃-based glasses for electronics and related applications. *International Materials Reviews* 58(1):3-40.
- Mahbub KR, Krishnan K, Megharaj M & Naidu R (2016) Mercury Inhibits Soil Enzyme Activity in a Lower Concentration than the Guideline Value. *Bull Environ Contam Toxicol* 96(1):76-82.
- Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R & Megharaj M (2017) Mercury toxicity to *Eisenia fetida* in three different soils. *Environ Sci Pollut Res Int* 24(2):1261-1269.
- Manaka M (2006) Amount of amorphous materials in relationship to arsenic, antimony, and bismuth concentrations in a brown forest soil. *Geoderma* 136(1):75-86.
- Manara A (2012) Plant responses to heavy metal toxicity. *Plants and Heavy Metals*, Ed FA (Édit.). p 27-53.
- Mann M, Espinoza EO, Ralston RM, Stroud RK, Scanlan MD & Strauss SJ (1994) Shot Pellets:An Overview. *AFTE Journal* 26:223-241.
- Marzouk MA, Abo-Naf SM, Zayed HA & Hassan NS (2015) Integration Between Optical and Structural Behavior of Heavy Metal Oxide Glasses Doped with Multiple Glass Formers. *Silicon* 10.1007/s12633-015-9342-3.

- McCarty LS & Mackay D (1993) Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. Body Residues and Modes Of Toxic Action. *Environmental Science & Technology* 27(9):1718-1728.
- Mohan R (2010) Green bismuth. *Nat Chem* 2(4):336-336.
- Morgan AJ & Morris B (1982) The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochem.* 75(2):269-285.
- Morgan JE & Morgan AJ (1989a) Zinc sequestration by earthworm (Annelida: Oligochaeta) chloragocytes. An in vivo investigation using fully quantitative electron probe X-ray microanalysis. *Histochemistry* 90(5):405-411.
- Morgan JE & Morgan AJ (1990) The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissues of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated and four polluted soils. *Oecologia* 84(4):559-566.
- Morgan JE, Norey CG, Morgan AJ & Kay J (1989b) A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol.* 92(1):15-21.
- Nagata T (2015) Growth inhibition and IRT1 induction of *Arabidopsis thaliana* in response to bismuth. *Journal of Plant Biology* 58(5):311-317.
- Nahmani J, Hodson ME & Black S (2007) Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environ Pollut* 149(1):44-58.
- National Research Council (2003) *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*. The National Academies Press, Washington, DC. <https://www.nap.edu/catalog/10523/bioavailability-of-contaminants-in-soils-and-sediments-processes-tools-and>
- Nazari P, Dowlatabadi-Bazaz R, Mofid MR, Pourmand MR, Daryani NE, Faramarzi MA, Sepehrizadeh Z & Shahverdi AR (2014) The antimicrobial effects and metabolomic footprinting of carboxyl-capped bismuth nanoparticles against *Helicobacter pylori*. *Appl Biochem Biotechnol* 172(2):570-579.
- OECD (1984) Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. (OECD Publishing).
- OECD (2004) Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). *OECD Publishing*.
- Ortega-Calvo JJ, Harmsen J, Parsons JR, Semple KT, Aitken MD, Ajao C, Eadsforth C, Galay-Burgos M, Naidu R, Oliver R, Peijnenburg WJ, Rombke J, Streck G & Versonnen B (2015) From Bioavailability Science to Regulation of Organic Chemicals. *Environ Sci Technol* 49(17):10255-10264.
- Ovecka M & Takac T (2014) Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnol Adv* 32(1):73-86.
- Pan X, Song W & Zhang D (2010) Earthworms (*Eisenia foetida*, Savigny) mucus as complexing ligand for imidacloprid. *Biology and Fertility of Soils* 46(8):845-850.
- Parra LMM, Vazquez C, Macchi H LM, Urdaneta C, Amaya J, Cortez J & Matute S (2010) Use of earthworms (*Eisenia fetida*) and vermicompost in the processing and safe management of hazardous solid and liquid wastes with high metal contents. *International Journal of Global Environmental Issues* 10(3-4):214-224.
- Peijnenburg WJ, Posthuma L, Eijsackers HJ & Allen HE (1997) A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol Environ Saf* 37(2):163-172.
- Pelosi C, Bertrand M, Makowski D & Roger-Estrade J (2008) WORMDYN: A model of *Lumbricus terrestris* population dynamics in agricultural fields. *Ecological Modelling* 218(3):219-234.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasaur A & Forestier C (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32(4):539-548.

- Pretti C, Oliva M, Mennillo E, Barbaglia M, Funel M, Reddy Yasani B, Martinelli E & Galli G (2013) An ecotoxicological study on tin- and bismuth-catalysed PDMS based coatings containing a surface-active polymer. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98(Supplement C):250-256.
- Rabêlo FHS & Borgo L (2016) Changes caused by heavy metals in micronutrient content and antioxidant system of forage grasses used for phytoremediation: an overview. *Ciência Rural* 46:1368-1375.
- Raskin I, Smith RD & Salt DE (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8(2):221-226.
- Reichenberg F & Mayer P (2006) Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environ Toxicol Chem* 25(5):1239-1245.
- Rengel Z (1999) Heavy Metal Stress in Plants. *Heavy Metal Stress in Plants*, Prasad MNV & Hagemeyer J (Édit.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p 231-251.
- Ribera D, Narbonne JF, Arnaud C & Saint-Denis M (2001) Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry* 33(7):1123-1130.
- Rida AMM (1994) Les vers de terre et l'environnement. *La recherche* 25:260-267.
- Ringelman JK, Miller MW & Andelt WF (1993) Effects of Ingested Tungsten-Bismuth-Tin Shot on Captive Mallards. *The Journal of Wildlife Management* 10.2307/3809072.
- Robidoux PY, Svendsen C, Caumartin J, Hawari J, Ampleman G, Thiboutot S, Weeks JM & Sunahara GI (2000) Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ.Toxicol.Chem.* 19:1764–1773.
- Robinson PW, Mravic B & Tyler DE (1999) Lead-free shot formed by liquid phase bonding. (Google Patents).
- Roch P (1979) Protein analysis of earthworm coelomic fluid: 1) Polymorphic system of the natural hemolysin of *Eisenia fetida andrei*. *Developmental & Comparative Immunology* 3(Supplement C):599-608.
- Roscoe HE & Schorlemmer C (1890) *A TREATISE ON CHEMISTRY*. D. APPLETON AND COMPANY, New York
- Roubalová R, Procházková P, Dvořák J, Škanta F & Bilej M (2015) The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies. *ISJ* 12:203-213.
- Sampathkumar K & Yesudas S (2009) Hair dye poisoning and the developing world. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* 2(2):129-131.
- Sanderson GC (1997) *Acute toxicity of ingested bismuth alloy shot in game-farm mallards. Toxicity of ingested bismuth alloy shot in game-farm mallards : chronic health effects and effects on reproduction.* Illinois Natural History Survey, Champaign, IL :. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/105835>
- Sanderson GC, Anderson WL, Foley GL, Havera SP, Skowron LM, Brawn JW, Taylor GD & Seets JW (1998) Effects of lead, iron, and bismuth alloy shot embedded in the breast muscles of game-farm mallards. *J Wildl Dis* 34(4):688-697.
- Sanderson GC, Wood SC, Foley C & Brawn JD (1992) Toxicity of bismuth shot compared with lead and steel shot in game-farm mallards. *Transactions of the 57th North American Wildlife and Natural Resources Conference.* p 526-540.
- Sano Y, Satoh H, Chiba M, Shinohara A, Okamoto M, Serizawa K, Nakashima H & Omae K (2005) A 13-week toxicity study of bismuth in rats by intratracheal intermittent administration. *J Occup Health* 47(3):242-248.
- Sauvé S & Fournier M (2005) Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(1):67-72.
- Savard K, Berthelot Y, Auroy A, Spear PA, Trottier B & Robidoux PY (2007) Effects of HMX-Lead Mixtures on Reproduction of the Earthworm *Eisenia Andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(3):351-358.

- Schlich K, Terytze K & Hund-Rinke K (2012) Effect of TiO₂ nanoparticles in the earthworm reproduction test. *Environmental Sciences Europe* 24(1):5.
- Schützendübel A & Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53(372):1351-1365.
- Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A & Harms H (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol* 38(12):228A-231A.
- Sheik Mansoor S, Aswin K, Logaiya K & Sudhan SPN (2016) Bismuth nitrate as an efficient recyclable catalyst for the one-pot multi component synthesis of 1,4-dihydropyridine derivatives through unsymmetrical Hantzsch reaction. *Journal of Saudi Chemical Society* 20(Supplement 1):S100-S108.
- Shenker M, Fan TW & Crowley DE (2001) Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *J Environ Qual* 30(6):2091-2098.
- Sims RW & Gerard BM (1999) *Earthworms*. FSC Publications, London. 167 p
- Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP & Prasad SM (2015) Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science* 6:1143.
- Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP & Prasad SM (2016) Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science* 6(1143):1-36.
- Sivakumar S (2015) Effects of metals on earthworm life cycles: a review. *Environ Monit Assess* 187(8):530.
- Sizmur T, Tilston EL, Charnock J, Palumbo-Roe B, Watts MJ & Hodson ME (2011) Impacts of epigeic, anecic and endogeic earthworms on metal and metalloid mobility and availability. *J Environ Monit* 13(2):266-273.
- Slikkerveer A & de Wolff FA (1989) Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 4(5):303-323.
- Soltani T & Entezari MH (2013) Photolysis and photocatalysis of methylene blue by ferrite bismuth nanoparticles under sunlight irradiation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 377(Supplement C):197-203.
- Soto-Barajas MC, Gómez J, Vázquez de Aldana BR & Zabalgoceazcoa I (2013) Incidence and identification of endophytes *Epichloë/Neotyphodium* in wild populations of *Lolium perenne*. (Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e.V. Verlag, Braunschweig), p 33-38.
- Stein E, Avtalion RR & Cooper EL (1977) The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J Morphol* 153(3):467-477.
- Sterckeman T, Douay F, Baize D, Fourrier H, Proix N & Schwartz C (2004) Factors affecting trace element concentrations in soils developed on recent marine deposits from northern France. *Applied Geochemistry* 19(1):89-103.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H & Perdrix E (2002) Assessment of the Contamination of Cultivated Soils by Eighteen Trace Elements Around Smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 135(1):173-194.
- Stoltenberg M, Flyvbjerg A, Sondergaard LG & Rungby J (2002) Decreased serum testosterone levels in rats exposed intraperitoneally to bismuth subnitrate. *J Appl Toxicol* 22(2):111-115.
- Stoltenberg M, Hogenhuis J-A, Hauw J-J & Danscher G (2001) Autometallographic Tracing of Bismuth in Human Brain Autopsies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60(7):705-710.
- Stoltenberg M, Locht L, Larsen A, Jensen D & Danscher G (2003) In vivo cellular uptake of bismuth ions from shotgun pellets. *Histol Histopathol* 18(3):781-785.

- Supino-Viterbo V, Sicard C, Risvegliato M, Rancurel G & Buge A (1977) Toxic encephalopathy due to ingestion of bismuth salts: clinical and EEG studies of 45 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 40(8):748-752.
- Tangahu BV, Sheikh Abdullah SR, Basri H, Idris M, Anuar N & Mukhlisin M (2011) A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 2011:31.
- Thounaojam TC, Panda P, Mazumdar P, Kumar D, Sharma GD, Sahoo L & Sanjib P (2012) Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 53(Supplement C):33-39.
- Tsang KW, Dugan PR & Pfister RM (1994) Mobilization of Bi-ion, Cd-ion, Pb-ion, Th-ion, and U-ion from contaminated soil and the influence of bacteria on the process. *Emerging Technologies in Hazardous Waste Management IV*, ACS Symposium Series, Vol 554. p 78–93.
- Tyler G (2005) Changes in the concentrations of major, minor and rare-earth elements during leaf senescence and decomposition in a *Fagus sylvatica* forest. *Forest Ecology and Management* 206(1):167-177.
- U.S. Geological Survey (2007) Mineral Commodity Summaries 2007.
<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2016/mcs2016.pdf>.
- U.S. Geological Survey (2017) Mineral Commodity Summaries 2017.
<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2016/mcs2016.pdf>.
- Urgast DS, Ellingsen DG, Berlinger B, Eilertsen E, Friisk G, Skaug V, Thomassen Y, Beattie JH, Kwun IS & Feldmann J (2012) Multi-elemental bio-imaging of rat tissue from a study investigating the bioavailability of bismuth from shotgun pellets. *Anal Bioanal Chem* 404(1):89-99.
- US EPA (1982) Early Seedling Growth Toxicity Test. in *Number EG-13*. Office of Toxic Substances, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC).
- USDA-NRCS (2009) Earthworms. Soil quality indicator information sheet.
- van Gestel CAM, Koolhaas JE, Hamers T, van Hoppe M, van Roover M, Korsman C & Reinecke SA (2009) Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area: Linking biomarker, community and functional responses. *Environmental Pollution* 157(3):895-903.
- van Groenigen JW, Lubbers IM, Vos HMJ, Brown GG, De Deyn GB & van Groenigen KJ (2014) Earthworms increase plant production: a meta-analysis. 4:6365.
- Velki M & Hackenberger BK (2012) Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 156(2):104-112.
- Venter JM & Reinecke AJ (1988) The life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology* 23(3):161-165.
- Vicaș SI, Grosu E & Laslo V (2009) The effects of simulated acid rain on growth and biochemistry process in grass (*Lolium perenne*). *Universitatea de Stiinte Agricole Și Medicină Veterinară* 52(1):277-283.
- Vijver MG, Vink JPM, Miermans CJH & van Gestel CAM (2007) Metal accumulation in earthworms inhabiting floodplain soils. *Environmental Pollution* 148(1):132-140.
- Ville P, Roch P, Cooper EL, Masson P & Narbonne JF (1995) PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J Invertebr Pathol* 65(3):217-224.
- von Recklinghausen U, Hartmann LM, Rabieh S, Hippler J, Hirner AV, Rettenmeier AW & Dopp E (2008) Methylated bismuth, but not bismuth citrate or bismuth glutathione, induces cyto- and genotoxic effects in human cells in vitro. *Chem Res Toxicol* 21(6):1219-1228.

- Wallwork JA (1983) *Earthworm Biology*. London, Edward Arnold
- Wen B, Hu X-y, Liu Y, Wang W-s, Feng M-h & Shan X-q (2004) The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils* 10.1007/s00374-004-0761-3.
- Wen Y, Su L, Qin W, Zhao Y, Madden JC, Steinmetz FP & Cronin MTD (2015) Investigation of Critical Body Residues and Modes of Toxic Action Based on Injection and Aquatic Exposure in Fish. *Water, Air, & Soil Pollution* 226(6):174.
- Willcox RR (1948) The role of bismuth oxychloride in the treatment of syphilis. *Practitioner* 161(963):203.
- Wong MH & Bradshaw AD (1982) A Comparison of the Toxicity of Heavy Metals, Using Root Elongation of Rye Grass, *Lolium perenne*. *The New Phytologist* 91(2):255-261.
- Xiong QL, Zhao WJ, Guo XY, Shu TT, Chen FT, Zheng XX & Gong ZN (2015) Dustfall Heavy Metal Pollution During Winter in North China. *Bull Environ Contam Toxicol* 95(4):548-554.
- Yang N & Sun H (2011) *Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects*. 414-420 p
- Yang Y, Zhou S, Ouyang R, Yang Y, Tao H, Feng K, Zhang X, Xiong F, Guo N, Zong T, Cao P, Li Y & Miao Y (2016) *Improvement in the Anticancer Activity of 6-Mercaptopurine via Combination with Bismuth(III)*. 1539-1545 p
- Yasmin S, #39 & Souza D (2010) Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review. *Applied and Environmental Soil Science* 2010.
- Zengin FK & Munzuroglu O (2005) Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(2):157-164.
- Zhang Z, Yu K, Bai D & Zhu Z (2009) Synthesis and Electrochemical Sensing Toward Heavy Metals of Bunch-like Bismuth Nanostructures. *Nanoscale Res Lett* 5(2):398-402.
- Zhao L, Zhang F-S, Wang K & Zhu J (2008) Chemical properties of heavy metals in typical hospital waste incinerator ashes in China. *Waste Management* 29(3):1114-1121.

ANNEXES

ANNEXE A

Résultats des effets du nitrate de Bi et de citrate de Bi sur le poids humide et la longueur des feuilles de la plante *Lolium perenne*.

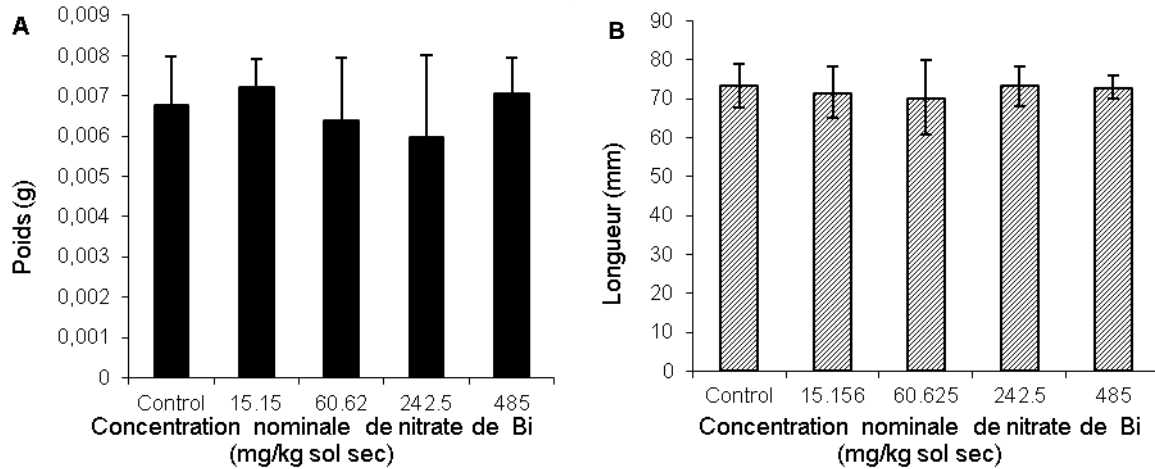


Figure A.1 Effets du nitrate de Bi sur le poids humide des feuilles (A) et la longueur des feuilles de *L. perenne* (B) après 7 jours d'exposition en sol artificiel OCDE. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD, N=4.

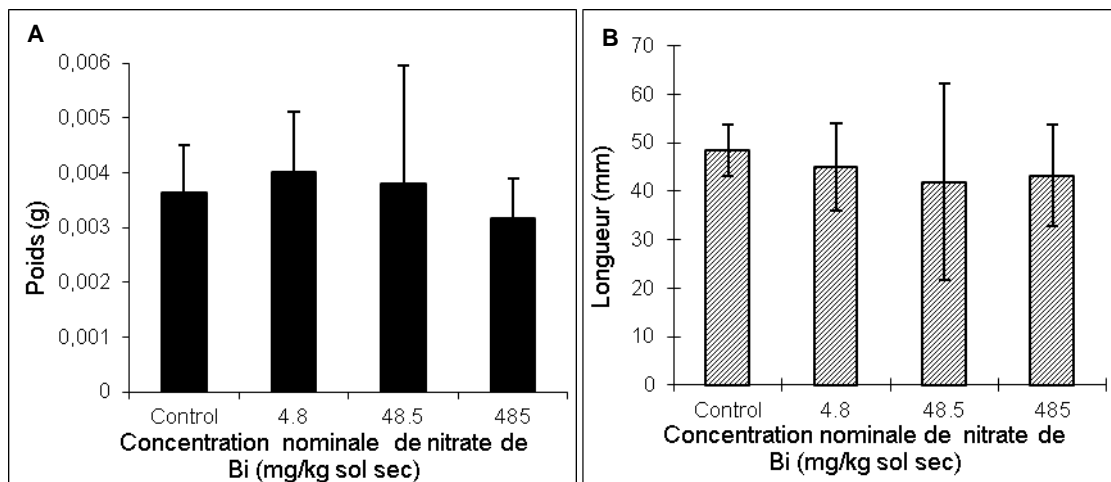


Figure A.2 Effets du nitrate de Bi sur le poids humide des feuilles de *L. perenne* (A) et la longueur des feuilles de *L. perenne* (B) après 7 jours d'exposition en sol naturel. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD, N=4.

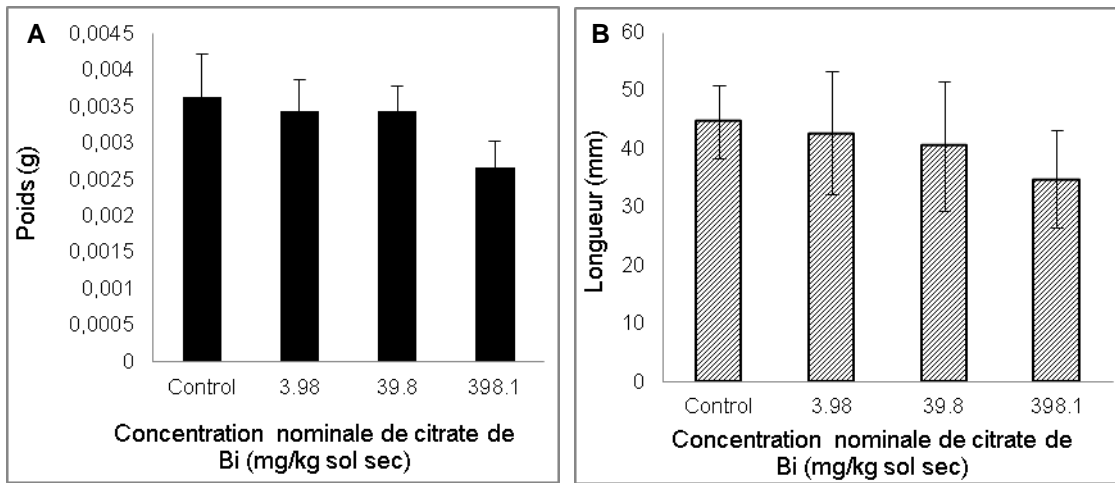


Figure A.3 Effets du citrate de Bi sur le poids des feuilles de *L. perenne* (A) et la longueur des feuilles de *L. perenne* (B) après 7 jours d'exposition en sol naturel. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD, N=4.

ANNEXE B

Résultats supplémentaires du test de létalité réalisé avec l'acide citrique.

Tableau B.1 Variation du pH dans les échantillons de sol naturel contaminé avec l'acide citrique en présence du ver *Eisenia andrei*.

Nominal citric acid concentration (mg/kg dry soil)	pH day	
	T 0	T 14
Control	5,76 (0.028)	6,69 (0.169)
200	5,89 (0.014)	6,9 (0.942)
500	5,73 (0.106)	6,75 (0.013)
900	5,3 (0.049)	6,79 (0.078)

Values are expressed as mean \pm SD, n=4.

ANNEXE C

Résultats supplémentaires des tests de reproduction.

Tableau C.1 Récapitulatif des résultats du test de reproduction effectué avec le citrate de Bi.

Reproduction parameter		Total Bi concentration (mg/kg dry soil)						
		Control	75	116	166	212	243	289
Adult survival (%; 28d)	Mean	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	Std dev.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Adult growth (%; 28d)	Mean	29.6	23.6	34.2	28.2	31.1	26.1	22.8
	Std dev.	6.2	9.6	5.7	9.4	5.2	6.4	10.5
Total number of cocoons (per replicate; 56d)	Mean	74.5	59.5	56.5	53.5	51.0	49.0	44.3
	Std dev.	7.6	6.8	4.7	10.0	7.6	7.3	8.7
Number of hatched cocoons (per replicate; 56d)	Mean	55.8	46.3	30.5	29.8	24.5	15.3	7.3
	Std dev.	12.3	6.3	17.4	164	12.8	13.0	3.8
Hatchability (hatched./total cocoon; 56d)	Mean	74.3	77.9	52.6	540	46.8	29.4	29.4
	Std dev.	11.0	8.2	27.0	20.7	20.0	21.8	21,8
Total number of juveniles (per replicate; 56d)	Mean	137.5	108.8	72.0	49.3	46.0	30.8	10.0
	Std dev.	23.3	20.3	28.9	21.4	20.5	31.0	4.1

Tableau C.2 Récapitulatif des résultats du test de reproduction effectué avec le toxique de référence (Carbendazyme).

		Nominal Carbendazym concentration (mg/kg dry soil)						
		Control	0,5	1.8	3.2	4.2	5.6	10.0
Reproduction parameter								
Adult survival (%; 28d)	Mean	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Std dev.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Adult growth (mg; 28d)	Mean	206,8	237,9	186,4	39,6	42,6	17,2	-76,8
	Std dev.	26,4	51,9	77,3	61,1	102,7	98,8	41,9
Adult growth (%; 28d)	Mean	52,0	55,8	43,3	9,7	11,3	4,3	-18,1
	Std dev.	11,3	14,3	18,5	14,7	27,4	24,3	8,7
Total number of cocoons (per replicate; 56d)	Mean	90,8	91,0	75,3	47,8	40,3	33,0	11,0
	Std dev.	11,9	15,7	18,7	23,2	18,2	18,5	2,9
Number of hatched cocoons (per replicate; 56d)	Mean	84,0	84,3	55,5	24,0	12,0	6,5	0,8
	Std dev.	13,9	18,9	22,6	30,2	11,3	7,7	1,0
Hatchability (hatched/total cocoon; 56d)	Mean	92,3	92,0	72,1	46,3	25,3	13,7	5,8
	Std dev.	5,1	6,6	20,8	23,0	17,8	16,7	6,9
Total number of juveniles (per replicate; 56d)	Mean	215,3	190,8	141,5	52,3	22,3	12,0	1,5
	Std dev.	30,2	89,1	75,3	44,5	18,9	14,0	1,7

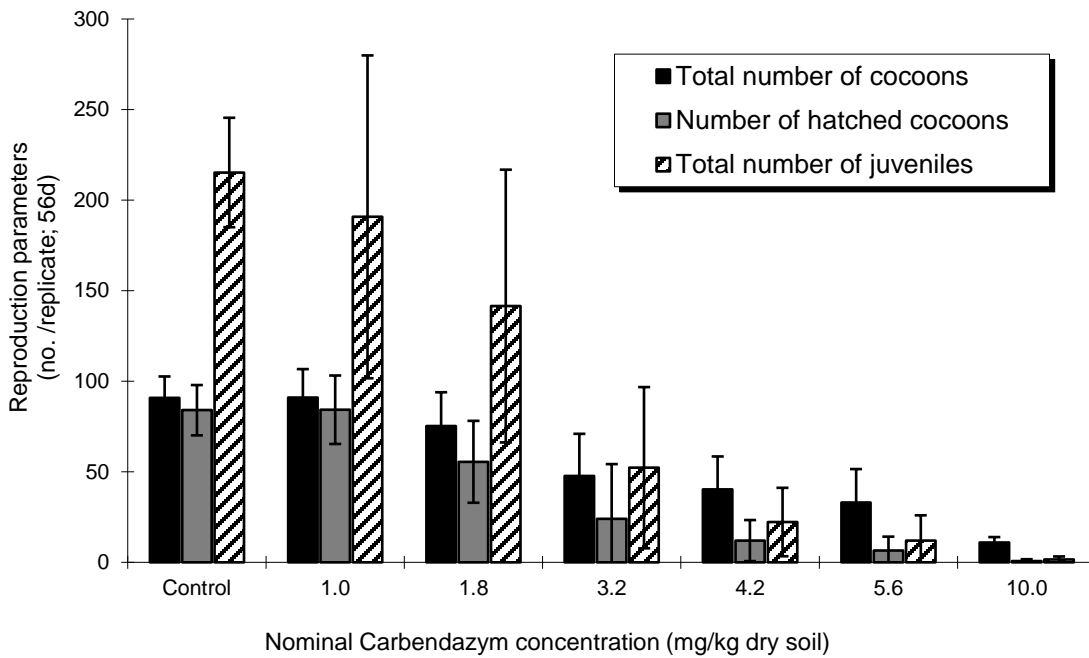


Figure C.1 Effets du carbendazym sur divers paramètres de reproduction chez le ver de terre *Eisenia andrei* après 56 jours d'exposition. (Barre d'erreur \pm SD, n = 4).

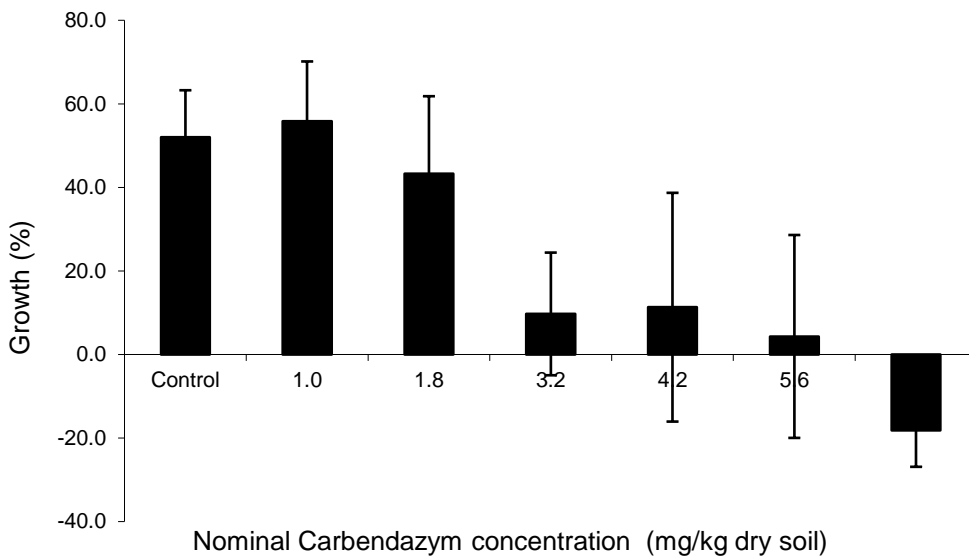


Figure C.2 Effet du carbendazyme sur la croissance du ver de terre *Eisenia andrei* après 28 jours d'exposition. (Barre d'erreur \pm SD, n = 4).

ANNEXE D : Lettre de l'éditeur du journal Chemosphere

Thank you for your submission to Chemosphere

eesserver@eesmail.elsevier.com

À :

M

zohra.omouri@hotmail.com; Omouri, Zohra

Dear Miss Omouri,

Thank you for sending your manuscript Phytotoxicity of bismuth nitrate and bismuth citrate on germination and growth of *Lolium perenne* exposed on filter paper and on artificially contaminated soil for consideration to Chemosphere. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Chemosphere to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can be viewed here:

http://journalinsights.elsevier.com/journals/0045-6535/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".

2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Chemosphere, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/CHEM>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: zohra.omouri@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com//CHEM/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu

3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Chemosphere.

Kind regards,

Jacob de Boer

Shane Snyder

Co-Editors in Chief

