

**L'ASYMÉTRIE FLUCTUANTE : UN BIOMARQUEUR MORPHOMÉTRIQUE
POUR ÉVALUER LA QUALITÉ DE L'ENVIRONNEMENT**

par

Jean-Marc Bonzom

**thèse présentée au Département de Biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)**

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, Décembre 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-67093-7

Le mars 2000 , le jury suivant a accepté cette thèse dans sa version finale.
date

- Président-rapporteur: Mme Colette Anseau
Département de biologie _____
- Membre: M. Jean-Marie Bergeron
Département de biologie _____
- Membre: Mme Marie-Josée Fortin
Université de Montréal _____
- Membre: M. Gaétan Carrier
Université de Montréal _____
- Membre: M. Hugues Ménard
Département de chimie _____
- Membre externe Dr Éric Vindimian
INERIS _____

SOMMAIRE

Un des défis pour les scientifiques en environnement est de signaler, d'analyser, de prédire et d'évaluer les effets des activités humaines sur l'environnement. L'objectif de cette thèse était de démontrer la pertinence de l'asymétrie fluctuante des organismes comme biomarqueur morphométrique pour évaluer la qualité de l'environnement. L'asymétrie fluctuante d'un organisme est une petite déviation aléatoire à partir d'une symétrie bilatérale parfaite qui résulte d'un stress génétique et/ou environnemental durant le développement.

Pour atteindre cet objectif, l'impact de l'épandage sylvicole des boues d'épuration des eaux usées municipales sur la qualité de l'environnement a été évalué à l'aide de méthodes couramment utilisées (e.g. analyse chimique) pour détecter la présence de contaminants et à partir de l'estimation de l'asymétrie fluctuante de deux espèces animales (un micromammifère herbivore et un insecte prédateur). Les boues d'épuration municipale contiennent des éléments nutritifs qui peuvent améliorer la croissance des végétaux et entre autres celles des arbres. Cependant, la présence d'éléments traces métalliques, de composés organiques de synthèse et d'organismes pathogènes dans les boues sont une source de préoccupation.

Un an après l'épandage de boues d'épuration, une première série d'expériences a montré que les teneurs en cadmium, plomb, et mercure (trois métaux considérés comme très toxiques) mesurées dans les feuilles des arbres et dans les micromammifères pouvait être considérée comme sans effet biologique négatif. De plus, dès la première année, les boues ont amélioré la croissance en hauteur des chênes blancs (*Quercus alba* L.). Une deuxième série d'expériences a démontré que l'épandage des boues n'augmentait pas la charge en helminthes (parasites) dans la cavité générale et le tube digestif des campagnols des champs (*Microtus pennsylvanicus*) et des musaraignes (*Blarina brevicauda*). Ces premiers résultats - à court terme - suggèrent que l'application des boues, respectant la réglementation établie par le gouvernement québécois, permet de garantir une certaine qualité de l'environnement, tout en favorisant la croissance de certaines espèces d'arbres.

Ces résultats ont été confirmés en estimant l'asymétrie fluctuante des campagnols et d'un insecte prédateur (*Pterostichus melanarius*). L'asymétrie fluctuante des animaux prélevés sur les parcelles traitées par les boues d'épuration municipale n'était pas significativement différente de celle des animaux habitant des parcelles témoins. Le niveau d'asymétrie fluctuante d'un organisme est la conséquence de la qualité de l'environnement au cours de son ontogénèse et permet une évaluation globale de la qualité de l'environnement. Ainsi, à l'aide de ce biomarqueur

morphométrique il a été possible d'évaluer les effets synergiques et antagonistes des contaminants apportés par les boues chez des organismes vivants. Les méthodes de chimie analytique n'ont pas permis ce type d'évaluation et se sont avérées plus coûteuses que les mesures d'asymétrie fluctuante.

Une dernière expérience a été réalisée dans un écosystème aquatique pollué par un biocide (pentachlorophénol), et à l'aide d'épinoches (*Gasterosteus aculeatus*), pour comparer la sensibilité de l'asymétrie fluctuante par rapport à d'autres biomarqueurs (e.g. activité EROD) plus couramment utilisés par les toxicologues en environnement pour surveiller et évaluer la qualité de l'eau. Cette expérience a permis de démontrer la pertinence de l'asymétrie fluctuante pour détecter les polluants dans les écosystèmes aquatiques.

La principale conclusion de cette étude est que l'asymétrie fluctuante représente un indicateur de stress environnemental peu coûteux, rapidement applicable, sensible et complémentaire aux analyses chimiques ou aux biomarqueurs biochimiques pour évaluer la qualité de l'environnement. Cependant, d'autres travaux de recherches sont encore nécessaires pour s'assurer de la réelle valeur de ce biomarqueur dans diverses conditions de stress.

REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes ont contribué à la réalisation de cette thèse. Je suis heureux de pouvoir leur exprimer toute ma gratitude à travers ces quelques mots.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études. Je leur en serai à jamais reconnaissant.

Jean-Marie Bergeron a été mon directeur de recherche tout au long de cette thèse. Jean-Marie a toujours été très disponible et m'a laissé une totale liberté dans le choix de mes axes de recherches et dans la façon de mener mon parcours. Ses encouragements et son soutien ont été constants, surtout dans les moments les plus difficiles. Ses qualités humaines et ses critiques constructives sont pour beaucoup dans l'aboutissement de cette thèse. Qu'à travers ces mots, Jean-Marie soit assuré de toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier, très sincèrement, tous les membres de mon comité de thèse : les Professeures Colette Anseau et Marie-Josée Fortin, ainsi que le Professeur Hugues Ménard pour leur disponibilité et leur qualité humaine. Leur soutien et compréhension ont été sans faille jusqu'au dernier moment.

Le Professeur Gaétan Carrier a su m'initier avec pédagogie et passion à la toxicologie et à la toxicocinétique : je l'en remercie vivement.

J'adresse mes sincères remerciements et ma sympathie à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide : Rémi Duhamel qui n'a jamais hésité à m'aider sur le terrain ou au laboratoire, Denis Réale qui a bien voulu répondre patiemment à mes questions de statistiques, Céline Bérubé, François Granger, Alejandro Gonzalez, Katreen Ruckstuhl qui ont toujours été disponibles pour corriger mes textes en anglais, François Haguier pour ses talents d'infographiste, Caroline Cloutier qui a tenté de m'initier à SAS, Dominique Berteaux toujours prêt pour échanger et partager des idées de recherche. Merci également à Félix Boulanger, Pierre-Édouard Potié, Frank Sirieix, Geneviève Labrie, Benoît Vaillancourt, Laurence Réale, Muhaymina Sari, Pierrick Blanchard, Louis-Marie Thériault, Bertrand Mercier, Jean-Marc Lalonde, Madeleine Martel, Lucie Dionne, Olivier Laurent, Philippe Deruntz, Raphaël Chalmeau, Édith Duchatelle, et Fabienne Delfourt pour leur sourire, encouragement et/ou aide.

J'exprime ma profonde gratitude à Sophie Belleville qui m'a toujours soutenu et n'a jamais cessé de m'aider tout au long de cette thèse. Elle a toujours répondu présente pour passer des dimanches ou des nuits à piéger des micromammifères, à disséquer des campagnols, à mesurer

des os, à réaliser des analyses statistiques ou à jongler avec la mise en page de cette thèse. Son aide de tous les instants a été toujours très efficace et son dévouement sans limite.

J'adresse également mes remerciements et ma sympathie à tous les membres du laboratoire de toxicologie et d'écotoxicologie de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS - France) qui m'ont accueilli chaleureusement et qui m'ont permis, dans des conditions exceptionnelles, de réaliser plusieurs travaux de recherche.

Enfin je suis très honoré que Mesdames Colette Anseau, Marie-Josée Fortin, ainsi que Messieurs Jean-Marie Bergeron, Gaétan Carrier, Hugues Ménard et Éric Vindimian aient bien voulu lire cette thèse et la juger, je les en remercie vivement.

Que ceux que j'aurais pu oublier puissent m'en excuser !

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.	i
REMERCIEMENTS.	iii
TABLE DES MATIÈRES.	v
LISTE DES TABLEAUX.	viii
LISTE DES FIGURES.	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.	xv
INTRODUCTION.	1
1. L'écotoxicologie.	3
2. Les analyses chimiques en écotoxicologie.	3
3. Les organismes vivants pour évaluer la qualité de l'environnement.	4
3.1. Les indices de diversité et les indices biotiques.	4
3.2. Les biomarqueurs.	5
4. L'instabilité du développement.	6
4.1. L'asymétrie fluctuante.	7
4.2. Modèle et processus.	8
4.3. Le stress en tant que facteur influençant la stabilité du développement. ...	9
4.4. L'instabilité du développement pour évaluer les stress environnementaux. ...	10

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.	13
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.	14
CHAPITRE 1 - LA VALORISATION SYLVICOLE DES BOUES	15
Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration municipales au Québec : les risques pour la faune.	16
<i>Bonzom, J.-M., Cloutier, C., Belleville, S. et Bergeron, J.-M. Cahiers d'études et de recherche francophones/Agricultures (à soumettre).</i>	
CHAPITRE 2 - IMPACT DES BOUES SUR L'ENVIRONNEMENT.	31
Cadmium, lead, and mercury concentrations in leaves and growth response for two tree species following sewage sludge application.	33
<i>Bonzom, J.-M., Cloutier, C., and Bergeron, J.-M. J. Env. Qual. (soumis)</i>	
Cadmium, lead, and mercury accumulation in small mammals following sewage sludge application to forest land	50
<i>Bonzom, J.-M., and Bergeron, J.-M. J. Env. Qual. (soumis)</i>	
Détermination de certains parasites dans le sol et dans les micromammifères suite à l'épandage sylvicole de boues d'épuration	69
<i>Bonzom, J.-M., Duhamel, R., Belleville, S., et Bergeron, J.-M. Bioresource Technology (à soumettre)</i>	
CHAPITRE 3 - L'ASYMÉTRIE FLUCTUANTE COMME OUTIL COMPLÉMENTAIRE POUR ÉVALUER L'IMPACT DES BOUES.	84
Procedure with papain enzyme to clean bones of small mammals.	86
<i>Bonzom, J.-M., Siriex, F., Labrie, G., and Bergeron, J.-M. J. Mammal. (soumis)</i>	
Part I. Fluctuating asymmetry of voles (<i>Microtus pennsylvanicus</i>) as a biomonitor of sewage sludge application to forests.	93

Bonzom, J.-M., Belleville, S., and Bergeron, J.-M. J. Env. Qual. (soumis)

Part II. Fluctuating asymmetry of *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) as a biomonitor of sewage sludge application to forests. 111

Bonzom, J.-M., Belleville, S., and Bergeron, J.-M. J. Env. Qual. (soumis)

CHAPITRE 4 - L'ASYMETRIE FLUCTANTE COMPAREE A D'AUTRES BIOMARQUEURS. 123

Fluctuating asymmetry and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): two complementary biomarkers to monitor aquatic ecosystems. 124

Bonzom, J.-M., Ait-Aissa S., Brion F., Réale D., Poulsen V., Bergeron, J.-M., Porcher J.-M., and Thybaud, E. Aquatic Toxicology (à soumettre)

DISCUSSION GÉNÉRALE 149

CONCLUSION. 152

GLOSSAIRE. 154

BIBLIOGRAPHIE. 169

ANNEXE 177

LISTE DES TABLEAUX

Tableau tiré de l'introduction

1. Exemples de stress d'origine anthropique ayant entraîné une instabilité du développement chez diverses espèces végétales et animales. 11

CHAPITRE 2.

Tableaux tirés de : Bonzom *et al.* J. Env. Qual. (soumis)

1. Cadmium, lead and mercury concentrations (mg kg^{-1} dry weight) in sludge-exposed and control red pine (*Pinus resinosa*) and white oak (*Quercus alba*): before (1995) and one year after sludge application (1996). 39

Tableaux tirés de : Bonzom and Bergeron. J. Env. Qual. (soumis)

1. Cadmium, lead, and mercury concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$; dry weight) in livers and kidneys of shrews (*Blarina brevicauda*) living under sludge-exposed and control conditions: before the sludge application (from 3 to 10 September 1995) and after (in November 1995 and from 17 July to 14 October 1996). Sewage sludge was applied on 15 and 16 September 1995. . 58
2. Cadmium, lead, and mercury concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$; dry weight) in livers and kidneys of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living under sludge-exposed and control conditions, about one year after the sludge application (from 17 July to 14 October 1996). Sewage sludge was applied on 15 and 16 September 1995. 59

Tableaux tirés de : Bonzom *et al.* Bioresource technology (à soumettre)

1. Prévalence des kystes et des oeufs de différentes espèces de parasites retrouvées dans les échantillons de sol des parcelles témoins ($n = 24$) et traitées ($n = 24$), environ un an après l'épandage des boues d'épuration. 75
2. Prévalence des parasites dans les grandes musaraignes (*Blarina brevicauda*) vivant sur les

	parcelles traitées et témoins, en fonction des périodes d'échantillonnage. Les parasites ont été recherchés dans le tube digestif et la cavité interne des musaraignes. 10 musaraignes ont été échantillonnées par parcelle et par période de piégage.	76
3.	Prévalence des parasites dans le tube digestif et la cavité interne des campagnols des champs (<i>Microtus pennsylvanicus</i>) vivant sur les parcelles traitées (n = 32) et témoins (n = 30), environ un an après l'épandage des boues d'épuration.	77
4.	Comparaisons interspécifiques entre les prévalences des parasites de micromammifères dans les parcelles témoins et traitées, environ un an après l'épandage des boues.	77
5.	Comparaison temporelle entre les prévalences des parasites dans les musaraignes provenant des parcelles témoins (n = 10) et traitées (n = 10).	78

CHAPITRE 3.

Tableau tiré de : Bonzom *et al.* J. Mammal. (soumis)

1.	Material and methods published to prepare skeletons of small mammals with papain enzyme.	87
----	--	----

Tableaux tirés de : Bonzom *et al.* J. Env. Qual. (soumis)

1.	Results of two-way ANOVA (sides x individuals) to determine for all characters of each sample (control or treated), whether the between-side variation is significantly larger than the measurement error. Column F represents F-values with in parentheses the degree of freedom (df).	99
2.	Results of regression analyses of size-dependence of FA for all characters of each sample (control or treated). Absolute difference right-minus-left character values R - L was regressed against character size ((R + L) / 2). Column F represents F-values with in parentheses the degree of freedom (df).	101
3.	Results of F-test analyses comparing the level of fluctuating asymmetry (= FA10) for nine characters in meadow voles (<i>Microtus pennsylvanicus</i>) from control and treated sites (see text for more information). There are no significant differences (P > 0.05). Samples size	

are indicated in parentheses with the value of FA10 for each character and treatment. Column F-test represents F-values with in parentheses, at the left side, the degree of freedom (df) for FA10 control, and at the right side, the degree of freedom for FA10 treated. 104

Tableau tiré de : Bonzom *et al.* J. Env. Qual. (soumis)

1. Mean absolute fluctuating asymmetry $|R - L|$ values (\pm SE) and ANOVA results for tibia spines and antenna length of *P. melanarius* in three sites (T = sludge; C = control; C3 = control). Tukey-Kramer test was performed when ANOVA indicated significant differences. * indicates statistical significance at $P < 0.05$ 116

CHAPITRE 4

Tableaux tirés de : Bonzom *et al.* Aquatic Toxicology (à soumettre)

1. Nested ANOVAs and one-way ANOVAs (only level with * were considered) for FA measured on eye mass, EROD, CF, HSI, and SSI on PCP treatments (fixed level) and within and between treatments. 136
2. Partial correlations between indices in the stickleback treated with PCP in mesocosms. All the individuals from Control, Solvent control, PCP-low, and PCP-high were included in the analyses (n observations = 149). 137

LISTE DES FIGURES

Figures tirées de l'introduction

1. L'ampleur de l'asymétrie fluctuante reflète un compromis entre deux processus opposés : le bruit du développement et la stabilité du développement (d'après Palmer, 1994). 9
2. Les trois distributions de D - G communément rencontrées chez les organismes bilatéraux : a) asymétrie fluctuante (AF), b) asymétrie directionnelle (AD), c) antisymétrie (platykurtic ou bimodale). D = droit; G = gauche (d'après Palmer, 1994). 12

CHAPITRE 2

Figures tirées de : Bonzom *et al.* J. Env. Qual. (soumis)

1. Average concentrations (\pm SD) of cadmium, lead and mercury in leaves of sludge-exposed trees and controls: before the sludge application (1-14 September 1995) and one year after (15 August 1996). Sewage sludge was applied on 15 September 1995. Significant interactions (species x treatment x year) are indicated by * (* P < 0.05; *** P < 0.0001). Sample sizes are indicated in parentheses (1995-1996). 38
2. Red pine (*Pinus resinosa*) and white oak (*Quercus alba*) heights (mean \pm SD) living under sludge-exposed and control conditions: before the sludge application (1994 and 1995) and about one year after (15 August 1996). Sewage sludge was applied on 15 September 1995. Sample sizes are indicated in parentheses (1994-95-96). There is a significant interaction (species x treatment) in 1994 and 1996 (P < 0.05). In 1995, there is a significant difference between the species (P = 0.0001) (two-way ANOVA). See text for details. 41
3. Average growth rate (\pm SD) of trees. Height measurements were taken before (1-15 September, 1995 = H95) and one year after the sludge application (August 1996 = H96). In 1996, the height of the same 1994 trees was measured (= H94). The growth rate was calculated by the ratio: (H95 - H94) / H94 for 1995, and (H96 - H95) / H95 for 1996. Sample sizes are indicated in parentheses (1995-96). There is a significant difference

between species in 1995 ($P = 0.0001$) and 1996 ($P < 0.05$), and between control and treated trees for 1995 and 1996 ($P < 0.05$) (two-way ANOVA). See text for details. 42

Figure tirée de : Bonzom et Bergeron. *J. Env. Qual.* (soumis)

1. Cadmium, lead and mercury mean concentrations (\pm SD) in livers and kidneys of shrews living under sludge-exposed and control conditions: before the application of sludge (from 3 to 10 September 1995) and after (November 1995 and from 17 July to 14 October 1996). Sewage sludge was applied on 15 September 1995. Treatment, date and interaction followed by * indicate significant difference according to ANOVA (** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$). Samples sizes are indicated on bars in graphic c. 56

CHAPITRE 3

Figure tirée de : Bonzom *et al.* *J. Env. Qual.* (soumis)

1. The 22 measurements taken on vole mandibles (right and left). L1 - L5, five mandible lengths; h1 - h6, six mandible heights. 97

CHAPITRE 4

Figures tirées de : Bonzom *et al.* *Aquatic Toxicology* (à soumettre)

- 1.. Overview of the 12 outdoor artificial streams. 128
2. Water temperatures variations in channels. 133
3. pH variations in channels. 133
4. Dissolved oxygen concentration in channels. 134
5. Fluctuating asymmetry (A), hepatic EROD activities (B), condition factor (C), hepatosomatic index (D) and spleen-somatic index (E) in the control, and exposed populations of three-spined sticklebacks. C = control, E = ethanol, PCP-low = $10 \mu\text{g PCP L}^{-1}$, and PCP-high = $100 \mu\text{g PCP L}^{-1}$. Values are mean \pm SD. Histograms with different letters differ significantly. Sample sizes are indicated on bars in graphic A. See text for details. 135

Figures tirées du glossaire

1. Les trois distributions de D - G communément rencontrées chez les organismes bilatéraux : a) asymétrie fluctuante (AF), b) asymétrie directionnelle (AD), c) antisymétrie (platykurtic ou bimodale). D = droit; G = gauche (d'après Palmer, 1994). 154
2. Campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*). 157
3. Épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Environnement Canada, 1990). 160
4. L'ampleur de l'asymétrie fluctuante reflète un compromis entre deux processus opposés : le bruit du développement et la stabilité du développement (d'après Palmer, 1994). 162

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACFAS : Association canadienne-française pour l'avancement des sciences
AD : Asymétrie directionnelle
ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (France)
AF : Asymétrie fluctuante
AFNOR : Association française de normalisation
ANOVA : Analyse de variance
AS : Antisymétrie
CE50 : Concentration efficace à 50%
CEC : Capacité d'échange cationique
CF : Condition factor
CI : Confidence interval
CL50 : Concentration létale à 50%
CTQ : Centre de toxicologie du Québec
CUO : Communauté Urbaine de l'Outaouais
DL50 : Dose létale à 50%
EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase
GL-UDA : Gendron Lefebvre et Urgel Delisle et Associés (Québec)
HSI : Hepatosomatic index
INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques (France)
INRS : Institut national de la recherche scientifique (Québec - Canada)
ISO : International organization for standardization
LOAEL : Lower observed adverse effect level
LOEC : Lower observed effect concentration
MAPAQ : Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec
MEF : Ministère de l'environnement et de la faune (Québec)
MENVIQ : Ministère de l'environnement du Québec
MER : Ministère de l'énergie et des ressources du Québec
MFO : Ministère des forêts du Québec
MO : Matière organique.
MSSS : Ministère de la santé et des services sociaux du Québec
NAS. : National academy of sciences (États-Unis)

NF : Norme française
NOEC : No observed effect concentration
NRC : National research council (États-Unis)
OECD : Organisation for economic co-operation and development
PAEQ : Programme d'assainissement des eaux du Québec
RGS : Rapport gonado somatique
RHS : Rapport hépato somatique
SD : Standard deviation
SETAC : Society of environmental toxicology and chemistry
SSI : Spleen-somatic index
US-EPA : US - Environmental protection agency (États-Unis)
WHO : World health organization

Éléments et composés chimiques :

Al : Aluminium.

As : Arsenic

B : Bore

Ca : Calcium

Cd : Cadmium

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

Fe : Fer

Hg : Mercure

HNO₃ : Acide nitrique

K : potassium

N : Azote

NaCl : Chlorure de sodium

Ni : Nickel

P : Phosphore

Pb : Plomb

Se : sélénium

Zn : Zinc

BPC : Biphényles polychlorés

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

PAHs : Polyaromatic hydrocarbons

PCDDS : Polychlorinated dibenzo-p-dioxins

PCBs : Polychlorinated biphenyls

PCDFs : Polychlorinated dibenzofurans

PCP : Pentachlorophénol

INTRODUCTION

Dans de nombreux habitats, les stress abiotiques influencent la distribution, l'abondance des espèces et, d'une façon plus générale, la qualité de l'environnement. Les stress abiotiques d'origine humaine se sont amplifiés ces 50 dernières années, en relation avec l'accroissement des populations, de l'industrialisation et de l'agriculture moderne. Les stress abiotiques anthropiques sont variés (altération ou destruction de l'habitat, contamination chimique, changement climatique, etc.). Par exemple, dans le cas des produits chimiques, l'US Environmental Protection Agency (EPA) a inventorié 7 000 produits chimiques et a évalué que 2 000 nouveaux produits chimiques étaient fabriqués annuellement (Zeeman et Gilford, 1993). Seulement 10 % de ces produits avaient subi des tests d'écotoxicité (Zeeman et Gilford, 1993). Pourtant, un nombre important de ces produits sont dispersés dans l'environnement.

Un des défis pour les scientifiques en environnement est de signaler, d'analyser, de prédire et d'évaluer les effets des activités humaines sur l'environnement. Ce travail est capital car les gouvernements doivent pouvoir s'appuyer sur des résultats scientifiques pour élaborer leurs politiques environnementales et ainsi garantir une certaine qualité de l'environnement à la population humaine.

Deux raisons justifient amplement la nécessité de surveiller la qualité de l'environnement. Premièrement, la santé des populations humaines dépend étroitement de la qualité de leur environnement. Deuxièmement, les humains sont attachés, pour leur bien-être, à une certaine valeur esthétique de leur environnement. La préservation de la biodiversité et la protection des paysages sont d'ailleurs des préoccupations en plein essor (voir Amiard et al., 1998 pour une revue).

Dans quelques cas, les effets des activités humaines sur la qualité de l'environnement sont facilement observables, comme dans le cas d'un stress abiotique aigu. Par exemple, en 1989, quand un pétrolier déversa accidentellement 40 000 tonnes de pétrole dans le détroit de Valdez (Alaska, États Unis), plusieurs centaines de kilomètres de littoral furent contaminés et de nombreux oiseaux marins périrent mazoutés dans les heures qui suivirent l'accident. Dans le cas d'un stress abiotique aigu, l'impact sur l'écosystème est évident. Cependant, les stress abiotiques sont souvent présents dans l'environnement à des niveaux beaucoup plus bas. Bien qu'ils n'induisent pas de mortalité immédiate, ils peuvent avoir des impacts négatifs sur la valeur

adaptative des organismes (e.g. croissance, fécondité, succès reproducteur...). Ces types de stress abiotiques, qualifiés de stress chroniques sublétaux, sont les plus communs, mais également les plus difficiles à évaluer. En effet, ils sont présents continuellement ou périodiquement à de faibles concentrations, sur une longue période de temps et sur plusieurs générations.

De nombreuses méthodes sont employées pour surveiller la qualité de l'environnement. Il est possible de distinguer deux catégories : (1) les analyses chimiques pour détecter et quantifier les polluants présents dans les milieux abiotiques (air, eau et sol) ou biotiques (organismes vivants), (2) les méthodes plus appropriées, comme les biomarqueurs, pour évaluer les effets des stress abiotiques sur les organismes vivants, au niveau des individus, des populations et/ou des communautés (Amiard et al., 1998). Comme le soulignent Amiard et al. (1998), seule l'association de ces différentes approches peut permettre d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent.

Le but de cette thèse était d'évaluer la pertinence d'une méthode basée sur le concept de l'instabilité du développement des organismes pour évaluer la qualité de l'environnement. Cette méthode est encore peu connue de la plupart des scientifiques en environnement et par conséquent encore peu utilisée en évaluation de la qualité de l'environnement.

Dans cette thèse, la pertinence de l'instabilité du développement des organismes a été testée à travers l'évaluation de la qualité de l'environnement suite à l'épandage de boues d'épuration en milieu forestier. Une étude a également été réalisée en milieu aquatique dans des conditions semi-naturelles. Cette dernière étude avait pour objectif de comparer la sensibilité de l'instabilité du développement avec d'autres méthodes plus couramment utilisées par les toxicologues en environnement pour détecter les polluants chimiques dans les écosystèmes.

Les sections suivantes ont pour principal objectif d'éclairer le lecteur sur les motivations qui nous ont amenés à nous intéresser au concept d'instabilité du développement des organismes pour évaluer la qualité de l'environnement.

Dans un premier temps, l'écotoxicologie en tant que discipline scientifique pour évaluer la qualité de l'environnement sera définie brièvement. Par la suite, les méthodes classiquement utilisées dans les programmes de surveillance de la qualité de l'environnement seront brièvement décrites, afin que le lecteur puisse appréhender les limites et les avantages de chacune de ces méthodes. Finalement, le concept d'instabilité du développement sera abordé. Les objectifs précis seront alors présentés afin d'annoncer la structure de ce travail de recherche.

1. L'écotoxicologie

L'écotoxicologie est une discipline relativement récente, qui est apparue comme une extension de la toxicologie classique. La toxicologie étudie les contaminants à l'échelle de l'individu. Butler (1978) et Moriarty (1983) ont insisté sur la nécessité d'intégrer à la toxicologie les différents niveaux d'organisation biologique et les interactions avec l'environnement.

L'écotoxicologie est une approche scientifique qui intègre la chimie, la toxicologie et l'écologie pour évaluer les impacts des produits xénobiotiques sur l'écosystème (Koeman, 1983). Les recherches écotoxicologiques incluent donc la distribution et le comportement des contaminants dans l'environnement, l'impact d'un ou de plusieurs contaminants sur l'environnement, l'impact sur l'organisme et l'interrelation entre l'organisme et l'environnement. L'écotoxicologie a pour but de signaler, d'analyser et de prédire les problèmes environnementaux (Van Straalen et Verkleij, 1991).

2. Les analyses chimiques en écotoxicologie

L'étude de la pollution de l'environnement nécessite une connaissance de la distribution des polluants dans les écosystèmes et de leurs effets biocoénologiques.

À travers une étude de surveillance de la qualité de l'environnement, trois groupes de données sont principalement recherchés. Le taux de libération des polluants dans les milieux présumés contaminés, le degré et la variation de la contamination de l'environnement, les effets bioécologiques. Pour y parvenir, deux démarches existent : déterminer les niveaux de contamination des biotopes et évaluer les effets écotoxicologiques.

Les méthodes d'analyse chimique permettent généralement de détecter et de quantifier les concentrations en polluants dans les compartiments abiotiques (air, eau, sol et sédiment) et biotique (organismes vivants). Cependant, cette méthode a plusieurs inconvénients. Les analyses sont souvent coûteuses et applicables seulement pour une petite proportion de composés chimiques. Le nombre de composés chimiques anthropiques susceptibles de polluer l'environnement est considérable. En raison du coût élevé des analyses chimiques, seuls quelques composés sont pris en compte dans les programmes de surveillance de la qualité de l'environnement. Par exemple, l'US-EPA surveille 28 composés toxiques dans les eaux des

Grand Lacs (Canada, États-Unis) alors que la quantité de composés potentiellement toxiques a été estimée à 500 dans les poissons des Grand Lacs (Passino et Smith, 1987).

En plus du coût élevé des analyses chimiques, les techniques analytiques ne sont pas toujours assez sensibles pour détecter les polluants. Il est également possible que le composé chimique recherché soit fugace et/ou labile, passant ainsi inaperçu au moment de la mesure. Cette démarche de stricte chimie analytique ne nous renseigne en aucun cas sur les effets des contaminants sur le vivant et sur l'état de santé de l'écosystème. Il est nécessaire de se référer à des travaux de type dose-réponse pour tenter d'évaluer l'impact des concentrations mesurées sur la santé des organismes et des populations.

Par définition, les analyses chimiques ne sont d'aucune utilité pour détecter et quantifier tous les stress abiotiques autres que ceux de nature chimique (ex. : fragmentation de l'habitat, présence physique de déchets, piétinement de la végétation, perturbations des populations animales, etc.). D'autres méthodes basées sur les organismes vivants doivent être mises en oeuvre pour pallier les insuffisances des méthodes d'analyses chimiques.

3. Les organismes vivants pour évaluer la qualité de l'environnement

En complément des analyses chimiques traditionnelles pour détecter et quantifier la présence de polluants, très vite les organismes vivants ont été mis à contribution pour compléter la surveillance biologique de l'environnement. Deux approches complémentaires sont employées : les indices de diversité, les indices biotiques, et les biomarqueurs. Les indices de diversité et les indices biotiques, en se basant sur la présence ou l'absence d'espèces, doivent pouvoir apporter des informations sur la qualité des habitats. Par contre, les biomarqueurs font référence à des mesures de paramètres moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques ou morphométriques chez des individus. En quantifiant les changements de ces paramètres chez les organismes vivants, il est possible de détecter dans l'environnement un stress abiotique tel que la présence d'un polluant.

3.1. Les indices de diversité et les indices biotiques

Les mesures de la structure des communautés ont été traditionnellement utilisées pour évaluer et surveiller les effets des stress sur les écosystèmes (Rosenberg et Resh, 1993). Les indices de

diversité permettent de mesurer la structure de la communauté, mais ne tiennent pas compte de l'identité des espèces (Washington, 1984). À l'opposé, les indices biotiques incorporent des informations taxonomiques en pondérant chacun des taxons en fonction de sa sensibilité à la pollution (Metcalf, 1989). Les indices de diversité détectent des changements dans le nombre d'espèces présentes et dans leur abondance relative. Les indices biotiques, quant à eux, détectent les changements dans le nombre d'espèces ou de familles présentes dans une communauté. Des descripteurs mathématiques peuvent être appliqués pour comparer les communautés (e.g. Gauch, 1982 ; Clarke et Warwick, 1994; Manly, 1994).

De nombreux facteurs naturels et anthropogéniques influencent la structure des communautés. Si des différences dans la structure de la communauté sont détectées à cause d'un agent stressant, il est très difficile - voire impossible - de déterminer tous les processus qui ont conduit à ces changements. L'abondance des espèces peut être réduite à cause des effets directs (augmentation de la mortalité, diminution de la fécondité...) ou indirects (augmentation des compétiteurs et/ou prédateurs, diminution du nombre de proies...) des agents stressants (DeAngelis, 1996). Des réponses peuvent être apportées en déterminant (1) comment les agents stressants affectent l'organisme des individus, et (2) quelles sont les conséquences de ces effets au niveau des populations et des communautés.

Les mesures du stress au niveau des communautés, telles que les indices biotiques et de diversité ou les analyses multivariées, sont utiles et sensibles pour décrire la structure des communautés, mais sont insensibles si le niveau de stress est subléthal (Gray et al., 1990; Dawson-Shepherd et al., 1992). À des doses sublétales, il se peut que des espèces dominantes pollusensibles décroissent en abondance. En conséquence, les indices de diversité et d'équitabilité seront élevés. L'indice de diversité diminuera seulement après des effets plus toxiques sur les espèces de moins en moins pollusensibles. En conclusion, les changements de valeur des indices de diversité constituent seulement des descripteurs valables de l'état des communautés pendant des phases sévères de pollution (Ramade, 1992).

3.2. Les biomarqueurs

Depuis ces dix dernières années, les scientifiques en environnement s'intéressent de plus en plus à l'utilisation des biomarqueurs pour évaluer les dangers biologiques des produits chimiques toxiques et plus généralement la santé de l'environnement (Fossi et Leonzio, 1994).

Les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des stress chimiques (e.g. polluant) ou physiques (e.g. altération de l'habitat). Dans certains cas, il est

également possible d'évaluer les effets de ces stress sur les structures et les fonctions vitales de l'organisme (Hugget et al., 1992; Lagadic et al., 1997).

De nombreux biomarqueurs sont utilisés, tels que les mesures des activités enzymatiques impliquées dans les processus de détoxification des polluants, l'inhibition des cholinestérases par les pesticides, les altérations de l'ADN, les métallothionéines, les protéines de stress, etc. Pour une liste plus exhaustive, le lecteur pourra se référer à McCarthy et Shugart, 1990; Hugget et al., 1992; Fossi et Leonzio, 1994; Butterworth et al., 1995 et Lagadic et al., 1997.

Idéalement, un biomarqueur doit être sensible, spécifique, rapide, simple, peu coûteux et non destructif (Walker, 1996). À ce jour, aucun biomarqueur ne répond simultanément à l'ensemble de ces critères. Par ailleurs, afin d'évaluer l'état de santé des populations à partir des biomarqueurs, il est primordial de définir clairement la relation entre le biomarqueur et les composantes de la valeur adaptative des organismes (e.g. survie, croissance, reproduction). Malheureusement, pour de nombreux biomarqueurs, ce type de corrélation n'est pas encore clairement défini. De nombreux travaux de recherche doivent être entrepris pour déterminer précisément la signification biologique des biomarqueurs aux niveaux des populations et des communautés.

Actuellement, la plupart des biomarqueurs utilisés sont de nature biochimique, physiologique et cytologique. Les biomarqueurs morphométriques tels que l'instabilité du développement sont encore peu employés pour évaluer la qualité de l'environnement. Dans le paragraphe suivant, le lecteur pourra se rendre compte du potentiel de ce type de biomarqueur dans les programmes d'évaluation.

4. L'instabilité du développement

L'aptitude de maintenir un phénotype morphologique prédéterminé sous diverses conditions est une propriété des organismes en développement (Jones, 1987). La stabilité du développement est l'aptitude d'un génotype précis à produire invariablement un certain phénotype dans un environnement particulier. Plusieurs facteurs peuvent perturber la stabilité du développement et par conséquent être responsables d'une instabilité du développement chez un organisme. Ces facteurs peuvent être regroupés en deux catégories : les facteurs environnementaux (e.g. températures extrêmes, manque de nourriture, pollution, parasites, densité de population) et les facteurs génétiques (e.g. consanguinité, hybridation, aberrations chromosomiques, gènes

récessifs délétères, perturbation de l'équilibre génétique) (revue dans Palmer et Strobeck, 1986; Parsons, 1990; Møller et Swaddle, 1997).

4.1. L'asymétrie fluctuante

La mesure de l'instabilité du développement la plus communément utilisée est l'asymétrie fluctuante (Graham et al., 1993a). La croissance et le développement du côté droit et gauche des organismes présentant une symétrie bilatérale est sous le contrôle du même groupe de gènes. Ainsi, les deux côtés sont supposés se développer en parallèle. L'asymétrie fluctuante est une petite déviation aléatoire à partir d'une symétrie bilatérale parfaite qui résulte d'un stress génétique et/ou environnemental durant le développement (Van Valen, 1962; Palmer et Strobeck, 1986).

L'asymétrie d'un individu pour un caractère spécifique correspond à la valeur de la mesure du caractère sur le côté droit moins la valeur de la mesure du même caractère sur le côté gauche ($d = D - G$). Par contre, l'asymétrie fluctuante est estimée à partir d'un échantillon d'asymétries individuelles provenant d'une certaine population. Elle est caractérisée par une distribution normale de $D_i - G_i$ ayant une moyenne (μ_d) égale à zéro. La variance de $D_i - G_i$ représente la mesure de l'instabilité du développement. L'asymétrie fluctuante peut être estimée à partir de nombreux caractères d'un organisme, mais son amplitude varie grandement entre les individus et entre les caractères d'un même individu (Palmer et Strobeck, 1986; Møller et Pomiankowski, 1993; Watson et Thornhill, 1994).

L'asymétrie fluctuante existe à différentes échelles. C'est-à-dire que toute structure est asymétrique à une certaine échelle. Certaines asymétries sont évidentes, comme le corps des poissons plats et des escargots, les grandes pinces des homards et des crabes violonistes. Les premiers travaux s'attardèrent sur de tels organismes. Mais les autres asymétries, incluant l'asymétrie fluctuante, sont extrêmement subtiles, de l'ordre de 1% de la taille du caractère ou moins, et requièrent d'importantes précautions pour les détecter (Palmer, 1996).

Les mesures de l'instabilité du développement ont été élaborées pour des caractères montrant un certain degré d'invariance. En mathématique, un invariant est une quantité qui n'est sujette à aucune variation ou changement. La symétrie s'approprie ce concept (Weyl, 1952). Par exemple, un caractère bilatéral symétrique est invariant si seulement l'axe de symétrie est pris en considération. Cette invariance est conservée même si l'échelle change, comme c'est le cas

pendant la croissance. Ainsi, ces caractères peuvent être appelés des invariants "du développement".

Au cours de la vie des organismes, l'invariance du développement n'est jamais parfaite. Néanmoins, certains caractères présenteront une invariance statistique. Par exemple, pour un échantillon donné d'individus ($i = 1$ à n), la moyenne de la différence entre les côtés droit (D) et gauche (G), $x_d = (D_i - G_i) / n$, pour un caractère bilatéral symétrique, tend vers zéro quand n augmente. La variance de $D_i - G_i$ est une mesure de la déviation par rapport à cette moyenne.

Il est à noter qu'il existe d'autres mesures de la stabilité du développement. La plus connue et la plus utilisée est basée sur la fréquence des phénotypes déviants (Rasmuson, 1960; Møller et Swaddle, 1997). Un phénotype déviant fait référence à un caractère dont la valeur chez un individu s'écarte largement de l'étendue « normale » de ce caractère. Pour chaque caractère ainsi décrit, il est nécessaire de justifier et de définir précisément ce qui est considéré comme « normal » (Palmer, 1994). Graham et al. (1993 a; c) proposent aussi d'autres mesures potentielles basées sur le concept d'invariance du développement. Ces analyses font appel à d'autres formes de symétrie : la phyllotaxie chez les plantes, la spirale équi-angulaire chez les mollusques et les plantes, et la dimension fractale d'embranchement et de sutures chez les plantes et les animaux. Toutes ces mesures sont reliées à l'asymétrie fluctuante, en ce sens qu'elles peuvent présenter des déviations à partir d'une certaine forme de symétrie.

4.2. Modèle et processus

L'asymétrie fluctuante est un modèle de la variation entre les côtés droit et gauche au sein d'un échantillon d'individus. Il reflète un compromis du développement entre deux processus présumés indépendants mais opposés (Fig. 1; Palmer, 1994) :

- le bruit du développement (ou instabilité du développement) : suite de processus qui tendent à perturber la précision du développement, tels qu'une faible différence aléatoire dans la vitesse de division, de croissance et de changements de formes des cellules, des effets de bruit thermique sur les processus enzymatiques, des petites différences aléatoires dans la vitesse des processus physiologiques entre les cellules;
- la stabilité du développement : suite de processus qui tendent à combattre ou à temporiser la perturbation de la précision du développement, tel que les systèmes de rétrocontrôle négatif qui régulent l'activité enzymatique (concentration et vitesse catalytique) à l'intérieur et entre les cellules, la régulation nerveuse centrale ou hormonale des structures non contiguës. L'asymétrie

fluctuante peut résulter d'une augmentation du bruit du développement et/ou d'une diminution de la stabilité du développement (Mather, 1953; Van Valen, 1962; Palmer et Strobeck, 1992). Si la stabilité du développement était réellement une caractéristique de l'ontogenèse, alors les modifications dans la stabilité du développement apparaîtraient au niveau moléculaire d'un organisme, mais aussi dans son fonctionnement physiologique. Ainsi, plusieurs approches différentes sont envisageables pour caractériser l'homéostasie (Zakharov et Graham, 1992). L'instabilité du développement trouve son origine dans des perturbations non linéaires faibles et aléatoires des voies biosynthétiques et du développement (Emlen et al., 1993; Graham et al., 1993b).

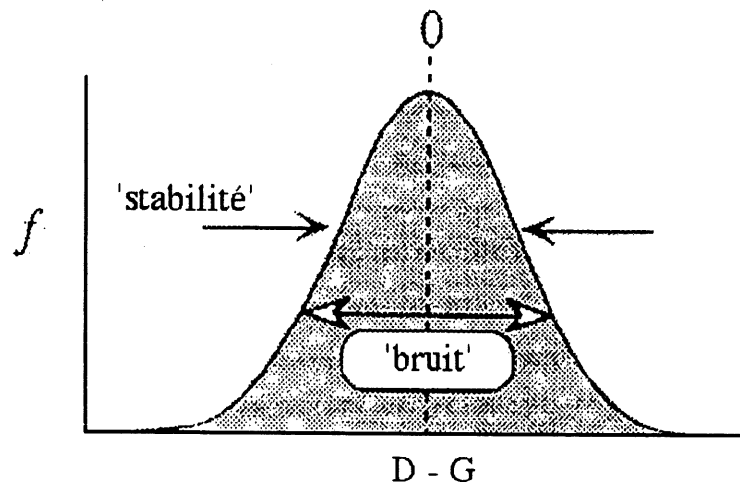


Fig. 1. L'ampleur de l'asymétrie fluctuante reflète un compromis entre deux processus opposés : le bruit du développement et la stabilité du développement (d'après Palmer, 1994).

Le mouvement brownien des molécules et des atomes pourrait être l'acteur principal du bruit du développement (Reeve, 1960; Soulé et Cuzin-Roudy, 1982).

4.3. Le stress en tant que facteur influençant la stabilité du développement

La réponse d'un organisme en développement, face à des perturbations mineures, est influencée par un stress soit génétique, soit environnemental. Le stress peut être défini comme : i) une influence négative sur la reproduction ou la survie, ii) une perturbation des processus physiologiques normaux, et iii) un épuisement de "l'énergie" d'un organisme. Le stress a des effets sur une communauté ou un écosystème seulement s'il affecte la valeur adaptative des individus. Néanmoins, les trois aspects sont étroitement liés. La perturbation des processus

physiologiques et une augmentation de la perte d'énergie doivent s'observer avant un déclin de la valeur adaptative. Ces trois mécanismes réduisent la stabilité du développement.

Freeman et al. (1993) et Graham et al. (1993b) suggèrent que dans un premier temps, le stress perturbe les liens des voies métaboliques. Par exemple, la mutation d'une enzyme peut perturber une voie tout entière. De même, en changeant la température, le pH ou la pression atmosphérique ou bien en introduisant une toxine dans les cellules, il est possible d'arriver au même résultat. Comme le développement dépend des interactions entre les cellules ainsi que des réponses cellulaires aux signaux moléculaires, le développement sera perturbé.

4.4. L'instabilité du développement pour évaluer les stress environnementaux

Dans les années 20, les généticiens ont commencé à utiliser les déviations aléatoires à partir de la symétrie bilatérale (asymétrie fluctuante) comme un indicateur de l'instabilité du développement (Summer et Huestis, 1921, Timofeef-Ressovsky, 1934). Dans les années 70, les généticiens réalisèrent que l'asymétrie fluctuante pourrait aussi être utilisée pour examiner l'impact du stress environnemental sur les organismes. Adams et Niswander (1967) suggéraient « qu'il est possible qu'un important stress environnemental (i.e. tératogène) puisse augmenter l'asymétrie ». En 1973, Valentine et al. ont testé l'asymétrie fluctuante comme mesure possible du stress environnemental. Ils ont montré que les poissons habitant les eaux polluées du sud de la Californie présentaient une augmentation de l'asymétrie entre les nageoires pectorales droites et gauches. Dans une étude du même ordre, Valentine et Soulé (1973) rapportent que l'asymétrie fluctuante des rayons des nageoires chez *Leuresthes tenuis* augmente avec la concentration en DDT. Depuis 1973, d'autres études réalisées sur des populations végétales ou animales ont mis en évidence une instabilité du développement causée par divers stress environnementaux abiotiques (voir Tracy et al., 1995; Møller et Swaddle, 1997; Tableau 1). Ces résultats contribuent à considérer l'instabilité du développement des organismes comme un outil pertinent pour évaluer la qualité de l'environnement. De plus, plusieurs travaux suggèrent que les composantes de la valeur adaptative peuvent être évaluées à partir des mesures d'instabilité du développement (pour une revue voir Sommer, 1996; Møller, 1997; Clarke, 1998). Plusieurs études ont montré que l'asymétrie fluctuante est inversement proportionnelle à la valeur adaptative (e.g. Thornhill et Sauer, 1992; Harvey et Walsh, 1993; Naugler et Leech, 1994; Ueno, 1994). Récemment, le travail de Møller (1999) semble confirmer que l'asymétrie fluctuante est une méthode efficace pour prédire la performance des paramètres de la valeur adaptative tels que la croissance, la fécondité et la longévité. Ainsi, la stabilité du développement

Tableau 1. Exemples de stress d'origine anthropique ayant entraîné une instabilité du développement chez diverses espèces végétales et animales.

Stress environnemental	Espèces	Référence
Pollution aquatique (mer)	Algue : <i>Fucus furcatus latifrons</i>	Tracy et al. 1995
Pollution aquatique (eau douce)	Macrophytes : <i>Elodea canadensis</i> et <i>Ceratophyllum demersum</i>	Tracy et al. 1995
Ultra violet (UV-B)	Plante : <i>Dimorphotheca sinuata</i>	Midgley et al. 1998
Radioactivité (accident de Tchernobyl)	Plantes : <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Sorbus aucuparia</i> et <i>Matricaria perforata</i>	Møller 1998
Effluent chimique	Crustacé : <i>Palaemon elegans</i> Insecte : <i>Chironomus salinarius</i>	Clarke 1993
Métaux lourds (rivière)	Larve d'insecte : <i>Chironomus riparius</i>	Groenendijk et al. 1998
Avermectine (pesticide)	Mouche : <i>Musca vetustissima</i>	Clarke et Ridsdill-Smith 1990
Pentachlorophenol (biocide)	Poisson : <i>Gasterosteus aculeatus</i> (épineche)	Bonzom et al.; Chapitre 4 : publi 1
Température de l'eau élevée	Truite : <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Leary et al. 1992
Lacs acides	Perche : <i>Perca fluviatilis</i>	Ostbye et al. 1997
Effluent chimique(marais)	Grenouille : <i>Rana ribibunda</i>	Chubinishvili 1998
Pollution (mer Baltique)	Phoques : <i>Halichoerus grypus</i> et <i>Pusa hispida</i>	Zakharov et al. 1997
Parasite	Hirondelle : <i>Hirundo rustica</i>	Møller 1992a
Forêt fragmentée	Écureuil : <i>Sciurus vulgaris</i>	Wauters et al. 1996
Métaux lourds (sol)	Musaraigne : <i>Sorex araneus</i>	Pankakoski 1992; 1994
Habitat perturbé par les activités humaines	Gorille : <i>Gorilla gorilla</i>	Manning et Chamberlain 1994
Alcool	Humain : <i>Homo sapiens</i>	Keisser 1992

des individus pourrait servir de biomarqueur sensible *in situ* de la valeur adaptative des populations (Sommers, 1996).

Une critique hypothétique, concernant l'utilisation de l'asymétrie fluctuante pour évaluer la stabilité du développement, réside dans le fait que les écarts par rapport à la symétrie ne doivent pas avoir une base héréditaire (Palmer et Strobeck, 1992). En effet, si ces écarts sont héréditaires, alors les différences dans l'étendue de l'asymétrie, parmi les individus, ont une base génétique, et une autre non génétique. À moins que la composante génétique puisse être écartée, la différence entre D - G ne pourrait pas refléter la stabilité du développement. Le débat est également centré sur la fiabilité de l'asymétrie directionnelle (AD) et de l'antisymétrie (AS) pour mesurer la stabilité du développement. Aussi il est conseillé d'être prudent quand ces formes d'asymétrie (i.e. AD et AS) sont observées (Fig. 2) (Palmer et Strobeck, 1986; McKenzie et Clarke, 1988; Leary et Allendorf, 1989; Markow, 1992; Palmer et Strobeck, 1992; Graham et al., 1993b; McKenzie et O'Farell, 1993; Møller, 1994; Møller et Swaddle, 1997; Palmer et Strobeck, 1992).

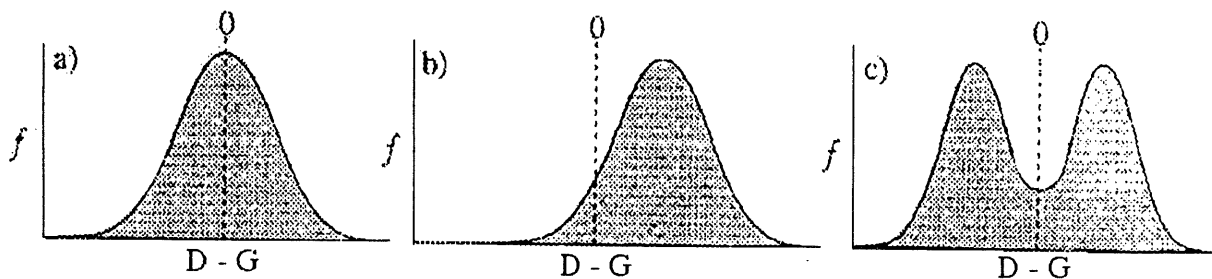


Fig. 2. Les trois distributions de D - G communément rencontrées chez les organismes bilatéraux : a) asymétrie fluctuante (AF), b) asymétrie directionnelle (AD), c) antisymétrie (platykurtic ou bimodale). D = droit ; G = gauche (d'après Palmer, 1994).

L'asymétrie fluctuante peut donc être utilisée comme outil pour estimer la santé, la qualité ou la stabilité du développement des organismes et par conséquent la santé d'un écosystème.

Cet outil apparemment simple attire l'attention, mais son application sans discernement a aussi engendré beaucoup de scepticisme. De nombreux questionnements subsistent quant à la puissance et à la fiabilité de cet outil. Il faut reconnaître que le signal biologique est extrêmement faible et que toutes les déviations par rapport à la symétrie ne fournissent pas un signal pertinent. Cependant, utilisée avec précaution, l'asymétrie fluctuante offre un outil unique pour des comparaisons quantitatives de la précision du développement à travers une grande variété d'organismes, de caractères et de stress (Palmer, 1994).

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Cette thèse est organisée en 4 chapitres.

L'objectif principal de cette thèse était de démontrer la pertinence de l'asymétrie fluctuante comme biomarqueur morphométrique pour évaluer la qualité de l'environnement.

Pour atteindre cet objectif, l'impact de l'épandage des boues d'épuration sur la qualité de l'environnement a été évalué à partir de mesures d'asymétrie fluctuante chez deux espèces animales (un micromammifère herbivore et un insecte prédateur) (Chapitre 3).

Des concentrations en contaminants (métaux lourds et parasites) ont été déterminées chez des espèces animales et végétales. La croissance des arbres a également été mesurée (Chapitre 2). Ainsi, il a été possible de valider en partie les résultats obtenus à partir de l'asymétrie fluctuante pour évaluer la qualité de l'environnement.

Les travaux présentés dans les chapitres 2 et 3 avaient aussi pour objectif final de contribuer à valider la réglementation établie par le Ministère de l'environnement du Québec concernant la valorisation sylvicole des boues d'épuration municipales.

Avant de présenter les chapitres 2 et 3, le lecteur peu familiarisé avec la problématique des boues d'épuration, trouvera dans le chapitre 1 un certain nombre de réponses à ces interrogations : Qu'est-ce que des boues d'épuration ? Pourquoi les épandre en milieu forestier ? Pourquoi évaluer l'impact des boues sur la qualité de l'environnement ? Quels sont les risques pour l'environnement et plus particulièrement pour la faune ?

Finalement, le dernier chapitre (Chapitre 4) avait pour principal objectif de comparer la sensibilité de l'asymétrie fluctuante par rapport à d'autres biomarqueurs plus couramment utilisés par les toxicologues en environnement pour surveiller et évaluer la qualité de l'environnement.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats et les discussions des travaux de recherche de cette thèse sont présentés sous forme de publications. Cette section comporte 4 chapitres. Chaque chapitre comporte une ou plusieurs publications. Les publications seront précédées d'une brève introduction pour guider le lecteur tout au long de cette section.

CHAPITRE 1

LA VALORISATION SYLVICOLE DES BOUES

Publication 1. Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration municipales au Québec : les risques pour la faune. *Cahiers d'étude et de recherche francophones/Agricultures (à soumettre)*

La valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des eaux usées en milieu forestier est encore au stade expérimental dans de nombreux pays. Cette publication présente la situation québécoise.

Ce chapitre présente les sujets suivants :

- les problèmes liés à la gestion des boues,
- les différentes solutions pour les gérer,
- leurs caractéristiques,
- leurs impacts potentiels sur l'environnement et en particulier sur la faune.

Des recherches sont encore nécessaires pour évaluer adéquatement les impacts des épandages de boues sur les écosystèmes forestiers. Ce chapitre permettra au lecteur de prendre conscience de l'importance des travaux de recherche menés au cours de cette thèse (Chapitres 2 et 3).

Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration municipales au Québec : les risques pour la faune

Jean-Marc Bonzom¹, Caroline Cloutier^{1 et 2}, Sophie Belleville¹, Jean-Marie Bergeron¹

*1 : Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec), J1K 2R1, Canada*

*2 : Groupe HBA experts-conseils, 150 rue Marchand, Bureau 600, Drummondville (Québec),
J2C 4N1, Canada*

Résumé

La valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales s'inscrit dans une approche de conservation des ressources (éléments nutritifs, matière organique) et de développement durable. Ce mode de gestion est complémentaire à la valorisation agricole, notamment dans le cas des municipalités où l'agriculture est peu ou pas présente. Les boues de stations d'épuration municipales contiennent des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes. Elles constituent un excellent engrais et amendement organique. Leur épandage en milieu forestier permet d'améliorer la croissance de nombreuses espèces d'arbres. Dès 1991, le Ministère de l'Environnement du Québec (MEF) a édité un Guide de Bonnes Pratiques pour réglementer la valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Cependant, la présence d'éléments traces métalliques, de composés organiques de synthèse et d'organismes pathogènes dans les boues est une source de préoccupation légitime pour le public et les représentants locaux (forestiers, chasseurs, randonneurs, riverains etc.), et cela même si la valorisation s'effectue selon des critères et des normes restrictives. Plus précisément, la présence de ces contaminants suscite des interrogations quant à leurs éventuels impacts sur la faune et sur la flore, et donc sur la santé humaine via la chaîne alimentaire. À ce jour, peu d'études de terrain ont été réalisées concernant l'impact des contaminants sur la faune, suite à la valorisation de boues de stations d'épuration. Ces études montrent que lorsque la qualité des boues et les taux d'application sont conformes à la réglementation en vigueur, l'épandage des boues ne semble pas avoir d'impact négatif sur la qualité des écosystèmes forestiers. Des travaux de recherche sont encore nécessaires pour étudier les impacts à long terme des épandages de boues sur les écosystèmes forestiers. Une meilleure connaissance des

impacts permettra de rassurer la population encore soucieuse d'une telle pratique et permettra ainsi de pérenniser cette filière qui semble être la voie la plus respectueuse pour l'environnement.

Mots clés : Boue d'épuration, Québec, Forêt, Contaminants, Faune, Risque.

Le rejet d'eaux usées non traitées dans les cours d'eau est une source importante de pollution domestique du milieu aquatique. Dans le but de diminuer la pollution du milieu aquatique par les eaux usées, le gouvernement québécois a élaboré en 1978 le Programme d'Assainissement des Eaux du Québec (PAEQ). Ce programme comprend trois volets : urbain, agricole et industriel.

Le volet urbain avait pour objectif principal l'installation d'équipement de traitement des eaux usées dans les municipalités pourvues de réseaux d'égouts. Ces mesures avaient pour but de réduire la pollution par la matière organique, les matières solides en suspension, les phosphates et les micro-organismes (MENVIQ¹, 1990; Vasseur *et al.*, 1994). A présent, les eaux usées de 85 % des québécois reçoivent au moins un traitement primaire (Couillard, 1989).

Cependant, si les stations d'épuration permettent de rejeter dans le milieu une eau de qualité acceptable pour l'environnement, il n'en est pas moins vrai qu'elles produisent des quantités considérables d'un résidu organique appelé boue d'épuration. En 1994, les eaux usées de 400 municipalités et communautés urbaines québécoises desservies par un réseau d'égout étaient traitées par un système d'épuration (Ministère des Affaires Municipales du Québec, 1995). Il est prévu qu'à la fin de l'année 1999, 877 municipalités ou communautés desservant 5 755 000 personnes, seront munies d'un système d'épuration des eaux usées. Ces systèmes produiront ainsi près de 200 000 tonnes de matières sèches de boues². L'identification de solutions pour la gestion de ces quantités croissantes de boues est donc une priorité et constitue la seconde phase du PAEQ (Vasseur *et al.*, 1994).

¹ MENVIQ : Ministère de l'Environnement du Québec

² L'estimation du volume ultime des boues est basée sur le volume de 1994 auquel sont ajoutés les volumes futurs que généreront les usines de La Pinière (Laval) et les 19 projets prioritaires des stations d'épuration identifiés par le ministère des Affaires municipales.

1. La gestion des boues résiduares municipales : la valorisation sylvicole

En 1994, les municipalités généraient 162 000 tonnes de matières sèches de boues³ dont seulement 11 000 tonnes (environ 7%) étaient valorisées en milieu agricole, en horticulture ou utilisées comme combustible (MEF, 1995). Près de 130 000 tonnes produites dans les régions de Montréal et de Québec étaient incinérées et 21 000 tonnes étaient envoyées à l'enfouissement sanitaire. Comme il a été mentionné en introduction, à la fin de l'année 1999, 200 000 tonnes (matières sèches) de boues par an devront être gérées. Actuellement, à l'échelle de la province du Québec, environ 80 % des boues sont incinérées, 13 % enfouies et 7 % valorisées comme fertilisant (Couillard et Grenier, 1990; MEF, 1995).

Depuis quelques années, les coûts associés à l'enfouissement sanitaire sont de l'ordre de 20 à 40 \$ Can / tonne⁴ humide (transport compris). Ils représentent une part importante des coûts de fonctionnement des stations d'épuration qui utilisent cette voie d'élimination de leurs boues. Les coûts associés à l'incinération sont encore plus élevés, atteignant près de 100 \$ Can / tonne humide en 1996 (adapté de Boileau et associés, 1989). L'incinération et l'enfouissement sont des solutions coûteuses et polluantes (Hamilton *et al.*, 1984; Couillard, 1989; MENVIQ et MAPAQ⁵, 1991; Beauchemin *et al.*, 1993). Elles nécessitent des installations (usines d'incinération, centres de stockage...) de moins en moins bien acceptées par des citoyens soucieux de la qualité de leur environnement. L'enfouissement sanitaire et l'incinération ne permettent pas de recycler les éléments fertilisants contenus dans les boues municipales. Grâce à leurs teneurs élevées en azote, phosphore, potassium et micronutriments, certaines boues d'épuration peuvent être utilisées comme fertilisant des terres agricoles et forestières. La valorisation des boues consiste à les utiliser comme fertilisant pour les plantes, en capitalisant leur contenu en éléments nutritifs et en se servant de la capacité du sol à les recycler (Hamilton *et al.*, 1984; Couillard, 1989; Grenier, 1989; MENVIQ *et al.*, 1991). Les boues agissent également comme amendement organique (Bontoux, 1999). Elles contribuent à maintenir la structure, la capacité d'échange cationique, le pouvoir de rétention de l'eau et des éléments nutritifs, et l'activité biologique du sol (OTV, 1997).

Actuellement, la valorisation agricole des boues semble constituer une solution intéressante pour les éliminer. D'ailleurs, plusieurs municipalités du Québec ont déjà réalisé un projet de valorisation agricole, ou pratiquent déjà ce mode de gestion des boues. Les villes de Jonquière,

³ Boue : tout au long de ce travail, le mot boue fait référence aux boues résiduares issues du traitement des eaux usées urbaines dans les stations d'épuration.

⁴ Tous les tarifs sont donnés en dollar canadien, soit environ 4 FF pour 1 \$ Can.

Victoriaville, Laval, Sherbrooke, la Communauté Urbaine de l'Outaouais (CUO) et plusieurs autres petites municipalités pratiquent la valorisation agricole (Granger *et al.*, 1993).

La valorisation agricole présente cependant quelques contraintes. Il existe en effet plusieurs régions au Québec dotées d'usines d'épuration où l'agriculture n'est pas ou peu présente (Grenier et Couillard, 1989). De plus, toutes les superficies agricoles ne peuvent pas recevoir annuellement des boues. Certaines restrictions d'épandage s'appliquent pour les cultures destinées à l'alimentation humaine. Plusieurs superficies agricoles sont aussi réservées à l'épandage des fumiers et des lisiers qui doivent être valorisés de façon prioritaire. Les politiques agricoles actuelles tendent aussi à diminuer les surfaces disponibles (augmentation du nombre de jachères, diminution du nombre d'exploitations). Par ailleurs, en raison du public de plus en plus soucieux de la qualité des produits de consommation, l'épandage en milieu agricole risque de devenir de plus en plus problématique. Dans ce contexte, la valorisation sylvicole des boues permettrait d'augmenter les superficies disponibles, de réduire les volumes enfouis ou incinérés et d'assurer un développement plus durable de la ressource en recyclant les éléments fertilisants des boues. Grenier et Couillard (1989) mentionnent que l'épandage de boues en forêt est une opération techniquement réalisable. Cette pratique peut être intégrée dans un plan d'aménagement forestier où cette forme particulière de fertilisation serait couplée à des opérations sylvicoles. Ces deux auteurs font état d'essais réalisés en milieu forestier au cours des vingt dernières années, essais qui ont démontré l'effet bénéfique de l'application de boues sur la croissance des arbres.

Bien que quelques projets soient en cours aux États-Unis depuis les années 1970 (Sopper et Kerr, 1977; US EPA⁶, 1983; Spencer et Machno, 1986), très peu de projets de valorisation sylvicole ont été réalisés au Québec. Dès 1991, pour réglementer cette pratique, les ministères québécois de l'Environnement, des Forêts et de la Santé et des Services Sociaux ont édité un Guide de Bonnes Pratiques intitulé : « valorisation sylvicole de boues de stations d'épuration municipales » (MENVIQ *et al.*, 1991). Ce guide répond à des objectifs d'élaboration de critères relatifs à l'environnement et à la santé sur lesquels repose la valorisation sylvicole des boues. Il vise également à sensibiliser les gestionnaires des stations d'épuration, les entreprises forestières, les ingénieurs forestiers, les biologistes, les environnementalistes et tous les individus désireux de valoriser les boues en milieu forestier, et à leur fournir l'information technique afin d'uniformiser la démarche à suivre dans un tel programme de valorisation. Les critères de bonnes pratiques de ce guide sont basés en grande partie sur le guide de bonnes

⁵ MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

⁶ US-EPA : Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis

pratiques / valorisation agricole de boues de stations d'épuration municipales (MENVIQ et MAPAQ, 1991) et sur les résultats de travaux de recherche réalisés dans d'autres pays et d'autres provinces (États-Unis, Grande-Bretagne, France, Ontario) (MENVIQ *et al.*, 1991). Il est aussi fondé sur les connaissances des écosystèmes forestiers québécois : sol, végétation, eau, climat, topographie, conditions écologiques, pédologiques et environnementales (MENVIQ *et al.*, 1991). Depuis, le guide évolue en fonction des nouvelles informations recueillies dans les programmes de valorisation qui ont eu lieu, de l'évolution technique de la valorisation et des résultats locaux et internationaux de la recherche dans ce domaine. Ainsi, en 1997, les exigences à respecter concernant les critères relatifs à la qualité des boues et aux caractéristiques du milieu récepteur sont devenues plus strictes (MEF, 1997). La réglementation est encore susceptible d'évoluer en fonction des études à venir.

2. Les contaminants présents dans les boues

Les boues contiennent des éléments nutritifs pour les plantes (azote, phosphore, potassium, etc.) mais aussi des contaminants tels que les éléments traces métalliques, les molécules organiques de synthèse et les organismes pathogènes. La concentration en contaminants dans les boues varie d'une station d'épuration à une autre, selon la part respective des apports domestiques, industriels, commerciaux ou de ruissellement urbain (Couillard, 1989) et selon le type de traitement employé (Vasseur *et al.*, 1994).

2.1. Les éléments traces métalliques

Les boues renferment des métaux lourds (Cd, Cu, Ni, Pb, Hg, Al, Cr, Zn, etc.), en teneur généralement inférieure à 1% du poids sec (Chang *et al.*, 1984). L'addition de coagulants et de floculants chimiques, lors du traitement physico-chimique des eaux usées, tels l'alun et le chlorure ferrique, entraîne la production de boues particulièrement riches en aluminium (Al) ou en fer (Fe) (MENVIQ et MAPAQ, 1991; Beauchemin et Laverdière, 1993).

2.2. Les composés organiques de synthèse

Des traces de certains composés organiques de synthèse sont susceptibles de se retrouver dans les boues; situation fort complexe, vu le grand nombre de composés organiques existants

(Couillard et Grenier, 1990; MENVIQ et MAPAQ, 1991; Couillard et Chouinard, 1993). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les biphényles polychlorés (BPC) et les phtalates sont les polluants les plus susceptibles de s'accumuler dans les boues lors du traitement des eaux usées (Couillard, 1989).

2.3. *Les organismes pathogènes*

En raison de leur origine fécale, les boues renferment des organismes pathogènes. Les plus connus sont les virus, les bactéries entériques, les protozoaires et les vers (Burge et Marsh, 1978, Pahren *et al.*, 1979).

3. Les préoccupations des citoyens face à l'épandage en milieu forestier

La présence potentielle de contaminants dans les boues est une source de préoccupation légitime pour le public et les représentants locaux (forestiers, chasseurs, randonneurs, résidents, etc.). Soucieuse de la qualité de l'environnement, la population s'interroge sur les impacts de l'épandage des boues sur la santé des écosystèmes forestiers. De nombreuses inquiétudes concernent les effets des contaminants sur la faune, la flore et sur la santé humaine. L'épandage des boues en milieu forestier est une source de préoccupations plus importante qu'en milieu agricole. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène : (1) en milieu agricole, il est possible de contrôler, en partie, l'exposition directe des grands mammifères aux boues valorisées en interdisant, à l'aide de clôtures, l'accès aux parcelles pendant une période déterminée. Par contre en milieu forestier, ce type d'intervention est impraticable, (2) la valorisation sylvicole des boues municipales est encore au stade expérimental au Québec et nos connaissances des impacts sur la faune locale sont restreintes.

4. Impacts sur la faune

En raison des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification, la chaîne alimentaire constituerait la principale voie d'exposition de la faune aux éléments traces métalliques et aux composés organiques de synthèse. La bioaccumulation consiste en l'absorption et au stockage des contaminants par les organismes vivants (Calow, 1993). La bioamplification résulte, quant à

elle, du transport des contaminants d'un niveau trophique à l'autre dans la chaîne alimentaire, provoquant une augmentation des concentrations observées à chaque niveau (Calow, 1993). Par conséquent, plus le niveau trophique est élevé (animaux carnivores, humains...), plus les organismes vivants sont susceptibles d'être exposés à une grande concentration de contaminants.

D'autres sources de contamination sont à considérer. Anderson *et al.* (1982) soulignent la possibilité que des boues soient ingérées directement par les animaux : par adhérence des boues aux végétaux consommés ou par le toilettage du pelage et des plumes souillées par des boues. D'autre part, plusieurs auteurs ont signalé que l'ingestion de sol, amendé, par les animaux brouteurs (Jones *et al.*, 1979; Chaney, 1980; Anderson *et al.*, 1982) ou les oiseaux qui picorent ou capturent les invertébrés du sol (Wade *et al.*, 1982) constitue également une voie de consommation accidentelle des boues et donc de contaminants.

Les poussières, les eaux de surface et souterraines sont aussi d'autres voies de contamination (Fitzgerald, 1980).

4.1. Les risques associés aux métaux

Plusieurs études ont montré qu'il existe un potentiel d'absorption et d'accumulation de métaux contenus dans les boues par la faune fréquentant des aires de valorisation (e.g. vers de terre : Helmke *et al.*, 1979; Woodyard, 1986; micro-mammifères : Hegstrom et West, 1989; Bonzom *et al.*, 1998; 1999; canards colverts : Goldberg et Yuill, 1990; cerfs de Virginie : Woodyard, 1986). Malgré tout, les concentrations mesurées ne semblent pas être toxiques pour les espèces étudiées. Cependant, en raison des conditions expérimentales différentes selon les études, il est difficile de dégager des tendances nettes (sites d'épandage, type de boues, concentrations en métaux, origine des boues, etc.).

La bioaccumulation des métaux dépend beaucoup de leur biodisponibilité dans le milieu (Chaney, 1980). La biodisponibilité d'un métal est fort complexe à comprendre et à analyser. Elle dépend de sa concentration dans le sol (Baker *et al.*, 1977; Bingham, 1979) et de sa forme chimique, qui varie elle-même selon des facteurs édaphiques (pH, capacité d'échange cationique, type de sol...) et climatiques (température, humidité...) (Linnman *et al.*, 1973; Chaney, 1980; Kuo et Baker, 1980; Harter, 1983; Jing et Logan, 1992; Mesquita *et al.*, 1994). Le Québec présente des facteurs édaphiques et climatiques diversifié et, qui lui sont bien spécifiques. Appliquer des critères de bonne pratique pour une région et une situation donnée (par exemple : un des écosystèmes forestiers québécois) en se basant sur des résultats obtenus

dans d'autres pays (climat) ou d'autres conditions (sol agricole) comporte donc des risques. Il est indispensable d'évaluer les risques, pour la faune sauvage, de bioaccumulation des métaux présents dans les boues épandues au sein des écosystèmes forestiers québécois. Une contamination de ces animaux peut représenter un risque pour leur propre santé, mais aussi pour la santé humaine par la voie de la chaîne alimentaire (consommation de gibier).

4.2. Les risques associés aux composés organiques

Plusieurs auteurs rapportent la présence de composés organiques de synthèse dans les plantes suite à leur exposition aux boues (pour une revue voir Couillard et Chouinard, 1993). Trois modes de transfert dans les végétaux sont possibles : l'adsorption par le système racinaire, l'absorption par les parties aériennes suite à la volatilisation de composés organiques présents sur le sol (Weber et Mrozek, 1979; Streck et Weber, 1982; Couillard et Grenier, 1990) ou encore l'adsorption par le feuillage lors de la pulvérisation des boues sur les plantes (Couillard et Chouinard, 1993). Ce dernier mode de contamination ne persiste que quelques semaines après l'épandage.

Les animaux peuvent être exposés aux contaminants organiques via la chaîne alimentaire, mais aussi par ingestion de boues et/ou de sol et par inhalation de composés volatils et de poussières contaminées (Couillard et Chouinard, 1993). Couillard et Chouinard (1993) présentent différentes études démontrant clairement que les organismes du sol peuvent atteindre des concentrations élevées en composés organiques.

En raison du caractère lipophile de la plupart de ces composés, ils ont un fort potentiel de bioaccumulation et sont donc susceptibles de se retrouver dans les graisses animales et dans les lipides du lait (Moore et Moore, 1976; Dacre, 1980; Couillard et Chouinard, 1993). Les composés halogénés seraient les plus susceptibles d'être bioaccumulés (Couillard et Chouinard, 1993).

Aucune étude de bioaccumulation des composés organiques de synthèse présents dans les boues, autre que celles citées par Couillard et Chouinard (1993), n'a été relevée dans cette revue de littérature. Couillard et Chouinard (1993) rapportent que les seuls cas d'accumulation de contaminants organiques ont eu lieu lorsque les animaux vertébrés étaient exposés à des boues très contaminées qui ne respectaient pas les normes québécoises. Le nombre d'études consultées par ces auteurs est cependant restreint et des conclusions générales sont donc difficiles à dresser.

L'information disponible pour les animaux, quant au risque associé à la présence de contaminants organiques dans les boues est très limitée et elle s'applique peu souvent aux écosystèmes forestiers et à la faune sauvage. Aucune étude ne rapporte de résultats sur l'accumulation de composés organiques par la faune et les animaux d'élevage suite à la valorisation de boues en milieu forestier. Contrairement aux métaux lourds, les effets toxiques des contaminants organiques sont très peu connus et très difficiles à cerner (Bontoux, 1999). La réglementation repose sur un nombre d'études scientifiques relativement limité (Bontoux, 1999).

4.3. Les risques associés aux organismes pathogènes

La transmission d'organismes pathogènes à la faune, par le biais des boues, pourrait avoir les impacts suivants : (1) une augmentation de l'occurrence des parasites et des autres organismes pathogènes chez la faune, (2) une diminution de la santé des individus et, par le fait même, une réduction de la résistance aux conditions du milieu, une diminution de la survie et une augmentation de la susceptibilité aux prédateurs, (3) en milieu agro-forestier, une transmission accrue d'organismes pathogènes au bétail car la faune devient un vecteur de contamination, (4) un plus grand risque de transmission de certains organismes pathogènes aux humains par le biais de la consommation de gibier infecté.

Actuellement, aucun traitement tertiaire des boues d'épuration ne permet de certifier que les boues sont suffisamment hygiéniques pour être sans danger (pour une revue voir Dumontet et al., 1999). Jusqu'à très récemment, seul le compostage des boues semblait certifier que les boues étaient hygiénisées. Cependant, Stenfiford (1986) souligne combien il est difficile d'atteindre et de maintenir le profil température/temps au cours du processus de compostage, pour aseptiser efficacement les boues résiduaires. En d'autres mots, pour une quantité donnée de compost, aucune technologie, même appliquée de la meilleure façon, ne peut garantir que le profil température/temps, nécessaire pour inactiver les organismes pathogènes, ait été atteint pour l'ensemble du compost.

De plus, il existe une certaine confusion concernant les concentrations seuils en organismes pathogènes qu'il ne faudrait pas dépasser dans les produits aseptisés, et les organismes bio-indicateurs à utiliser pour évaluer le degré d'aseptisation (Dumontet *et al.*, 1999).

Comme le mentionne Dumontet *et al.* (1999), les questions à se poser sont : « Quel est le niveau de risque acceptable qui peut être associé aux boues résiduaires aseptisées ? Quelles sont les valeurs seuils en organismes pathogènes qui ne devraient pas être dépassées dans le produit final

pour maintenir un équilibre entre la performance technique et économique des technologies et la protection de la santé humaine et animale ? »

À ce jour, en raison du manque d'études de terrain et épidémiologiques, il est impossible de donner des réponses satisfaisantes à ces questions (Dumontet *et al.*, 1999). Actuellement, une seule étude a mesuré la prévalence de certains parasites chez la faune suite à l'épandage sylvicole de boues liquides municipales (Bonzom *et al.*, 1999). Un an après l'épandage des boues, les musaraignes (*Blarina brevicauda*) et les campagnols (*Microtus pennsylvanicus*) vivant sur des parcelles traitées par des boues n'avaient pas plus d'helminthes dans la cavité générale et le tube digestif que les animaux provenant des sites témoins. D'autres travaux sont encore nécessaires pour confirmer les résultats pré-cités, et pour étudier d'autres parasites que les helminthes.

4.4. Effets d'attraction pour les animaux

L'épandage des boues peut être un facteur d'attraction pour les animaux herbivores. En effet, la valorisation des boues peut améliorer les habitats fauniques en augmentant la productivité et le couvert végétal (Woodyard, 1982). De plus, Campa *et al.* (1986) soulignent que les boues améliorent la quantité mais aussi la qualité nutritive des végétaux, ce qui a pour effet d'attirer la faune. Dans les milieux libres d'accès, comme en forêt, la faune sauvage est donc attirée par les sites d'épandage. Il est possible que le taux de broutage sur une parcelle traitée soit plus élevé que sur une parcelle non traitée, surtout si celle-ci est entourée par de nombreuses terres non traitées et plus pauvres en nutriments. La faune est alors susceptible de réagir favorablement à l'augmentation de la qualité nutritive de la végétation (Haufler et West, 1985) et ainsi de s'exposer à une plus grande absorption de contaminants, ce qui pourrait affecter sa santé. Ainsi, Mastrota *et al.* (1989) rapportent une diminution de la longévité chez des campagnols des champs nés dans des enclos ayant reçu des boues. Cette baisse de la survie est attribuée à une exposition aux contaminants des boues très tôt lors du développement des campagnols.

Les boues peuvent aussi avoir un effet positif sur les herbivores en améliorant la qualité nutritive de la végétation. Par exemple, dans le cas des cerfs, un plus grand taux de protéines dans la végétation serait à l'origine de densités accrues sur les sites fertilisés avec les boues (Anderson, 1985; Campa *et al.*, 1986; Haufler et West, 1985; Woodyard, 1986). Anderson (1983, 1985) a observé que les femelles de cerf muet (*Odocoileus hemionus columbianus*) vivant sur les sites de valorisation ont un plus grand succès reproducteur, qu'il attribue à un meilleur état nutritionnel. Ce genre d'étude n'a jamais été réalisé sur les écosystèmes forestiers québécois. Suite à des épandages de boues en milieu forestier, il serait pertinent d'évaluer les impacts à long terme des

changements de productivité et de dynamique végétale sur la survie et l'abondance des animaux, ainsi que sur les caractéristiques des communautés fauniques, comme la diversité. Ce type d'étude pourrait démontrer un effet positif des boues sur les animaux. Si parallèlement, il est possible de démontrer qu'il n'existe aucun effet négatif des boues sur la qualité de l'environnement existe, alors le public pourrait plus facilement accepter ce mode de gestion des boues et les décideurs politiques pourront encourager cette pratique et adapter la réglementation aux résultats des recherches effectuées.

5. Conclusion

Les risques de contamination de la faune sauvage associés à l'épandage de boues en milieu forestier sont réels. Il est donc légitime que le public et les élus soient préoccupés par les impacts possibles des épandages de boues sur la santé animale et humaine. De nombreux travaux de recherche sont encore nécessaires pour affiner l'évaluation des risques concernant l'impact de la valorisation sylvicole des boues sur les écosystèmes forestiers québécois.

Cette filière ne pourra être pleinement acceptée par les citoyens que si des recherches sont effectuées pour déterminer plus précisément les impacts potentiels de la valorisation sylvicole sur la faune. Il est primordial d'évaluer les risques associés à des épandages répétés de boues en milieu forestier et à leurs effets à long terme. Jusqu'à maintenant, la majorité des études ont été réalisées à court terme (1 ou 2 ans).

Le public, les représentants politiques et les personnes oeuvrant dans le domaine de la réglementation en environnement pourront alors s'appuyer sur des résultats plus concrets pour décider, rationnellement, de la politique à mener concernant l'épandage sylvicole des boues. Le manque d'études est une réelle barrière pour assurer la pérennité de cette filière qui semble réellement la voie la plus économique et certainement la plus respectueuse pour l'environnement. Mais il est indispensable de prendre des mesures pour y parvenir.

Remerciements

Nous souhaitons remercier François Granger et Alain Gadbois pour leurs commentaires pertinents tout au long de la rédaction de cet article.

Références

- Anderson DA. Influence of sewage sludge fertilization on food habits of deer in sewage-fertilized forest in western Washington. *J Wildl Manage* 1985 ; 47 : 243-247.
- Anderson DA. Reproductive success of Columbia black-tailed deer in sewage-fertilized forest in western Washington. *J Wildl Manage* 1983 ; 47 : 243-247.
- Anderson TJ, Barrett GW, Clark CS, Elia VJ, Majeti VA. Metal concentrations in tissues of meadow voles from sewage sludge-treated fields. *J Environ Qual* 1982 ; 11 : 272-277.
- Baker DE, Amacher MC, Doty WT. Monitoring sewage sludges, soils and crops for zinc and cadmium. In : Loehv RC, éd. *Land as a waste management alternative. Proc. of the 1976 Cornell Agricultural Waste Management Conference* 1977 ; 261-281.
- Beauchemin S, Laverdière MR. *Revue de littérature sur les métaux, l'azote et le phosphore dans les boues d'origine municipale, de pâtes et papiers et de désencrage en prévision de leur valorisation en milieux agricole et forestier*. Québec : Cogisol Inc, 1993 ; 110 p.
- Bingham FT. Bioavailability of Cd to food crops in relation to heavy metal content of sludge-amended soil. *Environ Health Perspect* 1979 ; 28 : 39-43.
- Boileau et Associés. *Étude des coûts d'immobilisation et d'exploitation concernant les techniques de traitement des boues et des modes d'élimination finale - volet I*. Montréal : Boileau et associés, 1989 ; 85 p.
- Bontoux, J. Les boues des stations d'épuration. *La houille blanche*, 1999 ; 3 : 142-143.
- Bonzom JM, Granger F, Gadbois A, Bergeron JM, Carrier G. *Valorisation sylvicole des boues d'origine municipale: impacts sur la faune*. Québec : Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, 1998 ; 93 p.
- Burge WD, Marsh PB. Infectious disease hazards of landspreading sewage wastes. *J Environ Qual* 1978 ; 7 : 1-9.
- Calow P. *Handbook of ecotoxicology, vol. 1*. London : Blackwell Scientific Publications, 1993 ; 478 p.
- Campa H, Woodyard DK, Haufler JB. Deer and elk use of forages treated with municipal sewage sludge. In : Cole DW, Henry CL, Nutter WL, éd. *The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes*. Washington : University of Washington Press, 1986 : 188-198.
- Chaney RL. Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. In : Bitton G, Damron BIL, Edel GT, Davidson JM, éd. *Sludge-health risks of land application*. Boca Raton : Ann. Arbor Science Publishers, 1980 : 59-83.

- Chang AC, Warneke JE, Page AL, Lund LJ. Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. *J Environ Qual* 1984 ; 13 : 87-91.
- Couillard D, Chouinard P. *Risques environnementaux associés à la présence de contaminants organiques de synthèse dans différentes boues résiduaires lors de leur valorisation en milieux agricole et forestier - Revue de littérature*. Sainte-Foy : INRS-Eau, 1993 ; 109 p.
- Couillard D, Grenier Y. Évaluation des risques environnementaux concernant la présence de composés synthétiques organiques toxiques dans les boues résiduaires municipales lors de leur valorisation (revue de littérature). *Water Pollution Research Journal of Canada* 1990 ; 25 : 109-130.
- Couillard D. Élimination des boues urbaines par la fertilisation sylvicole. *Can J Civil Engineering* 1989 ; 16 : 650-660.
- Dacre JC. Potential hazard of toxic organic residues in sludge. In : Bitton G, Damron DL, Edds GT, Davidson JM, éd. *Sludge-health risks of land application*, 1980 : 83-101.
- Dumontet S, Diné H, Baloda SB. Pathogen reduction in sewage sludge by composting and other biological treatments: a review. *Biological Agriculture and Horticulture* 1999 ; 16 : 409-430.
- Fitzgerald PR. Observations on the health of some animals exposed to anaerobically digested sludge originating in the Metropolitan Sanitary District of Greater Chicago system. In Bitton G, éd. *Sludge-health risks of land application*. Boca Raton : Ann Arbor Science Publishers, 1980 : 267-284.
- Goldberg DR, Yuill TM. Effects of sewage sludge on the immune defense of mallards. *Environ Res* 1990 ; 51 : 209-217.
- Granger F, Kodsí E, Cournoyer M. *Valorisation agricole des boues d'épuration, Ville de Sainte-Hyacinthe. Projet pilote - Urgel Delisle et Associés*. Sainte - Hyacinthe : Rapport présenté au Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, 1993 ; 108 p.
- Grenier Y, Couillard D. Avantages et faisabilité de l'épandage forestier des boues résiduaires. *The Forestry Chronicle* 1989 ; 9-15.
- Grenier Y. *La valorisation des boues d'usine des eaux pour la fertilisation des forêts*. Québec : Mémoire n°98 pour la direction de la recherche et développement au Ministère de l'Énergie et des Ressources (forêt) du Gouvernement du Québec, 1989 ; 190 p.
- Hamilton DL, Brockman RP, Knipfel JE. The agricultural use of municipal sewage. *Can J Physiology and Pharmacology* 1984 ; 62 : 1049-1055.
- Harter RD. Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc, and nickel. *Soil Science Society of America Journal* 1983 ; 47 : 47-51.

- Haufler JB, West SD. Wildlife response to forest application of sewage sludge. In : Cole DW, Henry CL, Nutter WL, éd. *Proceedings of the Forest Land Application Symposium*. Washington : University of Washington Press, 1985 : 110-116.
- Hegstrom LJ, West SD. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage sludge application to forests. *J Environ Qual* 1989 ; 18 : 345-349.
- Helmke PA., Robarge WP, Korotev RL, Schomberg PJ. Effects of soil-applied sewage sludge on concentrations of elements in earthworms. *J Environ Qual* 1979 ; 8 : 322-327.
- Jing J, Logan TJ. Effects of sewage sludge cadmium concentration on chemical extractability and plant uptake. *J Environ Qual* 1992 ; 21 : 73-81.
- Jones SG, Brown KW, Deuel LE, Donnelly KC. Influence of simulated rainfall on the retention of sludge heavy metals by the leaves of forage crops. *J Environ Qual* 1979 ; 8 : 69-72.
- Kuo S, Baker AS. Sorption of copper, zinc, and cadmium by some acid soils. *Soil Science Society of America Journal* 1980 ; 44 : 969-974.
- Linnman LA, Anderson KO, Nilsson B, Lind B, Kjelström T, Friberg L. Cadmium uptake by wheat from sewage sludge used as a plant nutrient source. *Arch Environ Health* 1973 ; 27 : 45-47.
- Mastrota FN, Yahner RH, Storm GL. Small mammals communities in a mixed-oak forest irrigated with wastewater. *American Midland Naturalist* 1989 ; 122 : 388-393.
- Mesquita ME, Vieira JM, Silva E, Domingues H. Copper adsorption by a schistic soil. Application of sewage sludge. *Environ. Tech.* 1994 ; 15 : 1089-1094.
- Ministère de l'Environnement du Québec (MENVIQ). *Rapport sur l'état de l'environnement 1989*. Québec : Direction de la promotion du développement durable du Ministère de l'Environnement du Québec, 1990 ; 42 p.
- Ministère de l'Environnement du Québec et Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MENVIQ et MAPAQ). *Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide de bonnes pratiques*. Québec, 1991 ; 60 p.
- Ministère de l'Environnement du Québec, Ministère des Forêts du Québec et Ministère de la Santé et des Services Sociaux (MENVIQ, MFO et MSSS). *Valorisation sylvicole des boues de stations d'épurations des eaux usées municipales - Guides des bonnes pratiques*. Québec, 1991 ; 83 p.
- Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEF). Pour une gestion durable et responsable de nos matières résiduelles. Document de consultation publique. Québec : Gouvernement du Québec, 1995, 52 p.

- Ministère des Affaires Municipales du Québec. *Programme d'assainissement des eaux du Québec, faits saillants : Fiche d'information*. Québec : Gouvernement du Québec, 1995, 5 p.
- Moore JW, Moore EA. *Environmental chemistry*. New York : Academic Press, 1976 ; 500 p.
- OTV. 1997. *Traiter et valoriser les boues*. OTV, Val de Marne, France.
- Pahren HR, Lucas JB, Ryan JA, Dotson GK. Health risks associated with land application of municipal sludge. *Journal Water Pollution Control Federation* 1979 ; 51 : 2588-2601.
- Sopper WE, Kerr SN. *Utilization of municipal sewage effluent and sludge on forest and disturbed land*. Washington : The Pennsylvania State University Press, 1977 ; 537 p.
- Spencer J, Machno PS. *Silvigrow : Metro's Forest Sludge application program. The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes*. Washington : University of Washington Press, 1986.
- Stentiford EI. Recent development in composting. In : De Bertoldi M., Ferranti MP, L'Hermite P, Zucconi F, éd. *Compost: production, quality and use*. London and New York : Elsevier Applied Science, 1986 : 52-60.
- Strek HJ, Weber JB. Behaviour of polychlorinated biphenyls (PCBs) in soils and plants. *Environ Pollut (Series A)* 1982 ; 28 : 291-312.
- US EPA. *Process design manual : land application of municipal sludge*. EPA 625/1-83-016. Ohio : Environmental Research Information Center, 1983 ; 32 p.
- Vasseur LP, de Conninck M, Séguin M, St-Germain J, Anseau C. *The STOPER model for ecosystem management at regional level; a case study on municipal sewage sludge. Cahier 2*. Sherbrooke : projet STOPER, Université de Sherbrooke, 1994 ; 27 p.
- Wade SE, Bache CA, Lisk DJ. Cadmium accumulation by earthworms inhabiting municipal sludge-amended soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 1982 ; 28 : 557-560.
- Weber JB, Mrozek E. Polychlorinated biphenyls: phytotoxicity, absorption and translocation by plants, and inactivation by activated carbon. *Bull Environ Contam Toxicol* 1979 ; 23 : 412-417.
- Woodyard DK. *Response of wildlife to land application of sewage sludges*. Thèse de Maîtrise, Michigan State University, 1982 ; 64 p.
- Woodyard DK. Risk evaluation for sludge-borne elements to wildlife food chains. Thèse de Doctorat, Michigan State University, 1986 ; 188 p.

CHAPITRE 2

IMPACT DES BOUES SUR L'ENVIRONNEMENT

Publication 1. Cadmium, lead, and mercury concentrations in leaves and growth response for two tree species following sewage sludge application. *Journal of Environmental Quality* (soumis).

Publication 2. Cadmium, lead, and mercury accumulation in small mammals following sewage sludge application to forest land. *Journal of Environmental Quality* (soumis).

Publication 3. Détermination de certains parasites dans le sol et dans les micromammifères suite à l'épandage sylvicole de boues d'épuration. *Bioresource Technology* (à soumettre).

L'objectif des épandages de boues en milieu forestier est d'améliorer la croissance des arbres, tout en permettant d'offrir une solution au problème de gestion des boues. Cependant, la présence de contaminants (métaux traces, molécules organiques de synthèse, organismes pathogènes) dans les boues est une source de préoccupation pour la population (voir Chapitre 1). Quel est l'impact de ces contaminants sur la qualité de l'environnement ? Les pratiques d'épandages sont règlementées au Québec. Malgré tout, l'épandage de boues peut-il avoir un impact négatif sur la qualité de l'environnement ? Dans ce chapitre, nous avons tenté d'apporter des réponses à ces questions en appliquant des méthodes couramment utilisées dans le domaine de l'évaluation de la qualité de l'environnement (e.g. analyses chimiques).

La bioaccumulation des métaux traces dépend largement de leur biodisponibilité. La biodisponibilité d'un métal dépend de nombreux facteurs (climat, type de sol, etc.). Les écosystèmes forestiers québécois ont leurs propres caractéristiques biotiques et abiotiques. Ces caractéristiques peuvent influencer la biodisponibilité des métaux traces. Or, la règlementation québécoise concernant l'épandage sylvicole des boues d'épuration est basée sur des études réalisées en milieu agricole et dans d'autres pays (voir Chapitre 1). Des études sont donc nécessaires pour tester les normes québécoises. Les études présentées dans les publications 1 et 2 apportent des éléments de réponses.

Publication 1. Suite à un épandage de boues en milieu forestier, la contamination en cadmium, plomb et mercure a été évaluée chez deux espèces d'arbres : le chêne blanc (*Quercus alba* L.) et le pin rouge (*Pinus resinosa* Ait). Dans ce même article, nous présentons également des résultats concernant l'impact des boues sur la croissance des arbres. Ce travail est important pour trois raisons principales : (1) il existe très peu d'études sur la contamination des arbres par les métaux suite à un épandage de boues, (2) le lien entre l'épandage des boues et la concentration en mercure dans les feuilles des arbres n'avait jamais été étudié, et (3) les résultats de ce travail contribuent à valider la réglementation québécoise.

Dans le même ordre d'idées, la bioaccumulation du cadmium, du plomb et du mercure a été mesurée chez deux espèces de micro-mammifères : la grande musaraigne (*Blarina brevicauda*) et le campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*) (Publication 2). Ces travaux sont importants pour les mêmes raisons énumérées ci-dessus.

Publication 4. Les boues contiennent des parasites. Ces parasites sont-ils susceptibles de contaminer la faune sauvage ? À ce jour, aucune étude n'avait été réalisée pour répondre à cette question. Cette publication permet de fournir des éléments de réponse (voir Chapitre 1).

En conclusion, les résultats de ces travaux ont permis d'établir un premier bilan de la qualité de l'environnement suite à l'épandage des boues.

Dans le chapitre suivant, le lecteur se rendra compte de la pertinence du concept d'instabilité du développement des organismes pour compléter cette évaluation. Il pourra aussi appréhender les limites de cette méthode.

Cadmium, Lead, and Mercury Concentrations in Leaves and Growth Response for Two Tree Species Following Sewage Sludge Application

Jean-Marc Bonzom, Caroline Cloutier and Jean-Marie Bergeron

Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) J1K 2R1 Canada

ABSTRACT

Sewage sludge may prove to be an effective fertilizer and soil conditioner when applied to forest lands. However, sewage sludge may contain contaminants such as trace metals that are of environmental concern. It may be difficult to predict the influence of sewage sludge application on tree growth and metal uptake. This study evaluates the short-term effects of sludge application on foliar cadmium, lead and mercury concentrations and on the growth response of two tree species: white oak (*Quercus alba*) and red pine (*Pinus resinosa*) up to a year after the application. The results indicate that the sewage sludge application did not increase significantly the concentration of Cd and Hg in the leaves of the trees growing on treated plots compared to those growing on control plots. However, the pine needles from treated plots showed higher concentrations in Pb than pine needles from control plots ($P = 0.0001$). This was not the case for the leaves of white oak. All the maximum concentrations observed for Cd, Pb and Hg in the leaves of both tree species were considered largely below the threshold limits for phytotoxicity. After the first year, the sludge application which brought about 200 kg of available N ha⁻¹, increased the growth of oak growing on treated plots compared to those growing on control plots. However, the treatment did not appear to show any increase in growth for the red pine. The study concludes that, on a short-term basis, when reclamation is respected for sewage sludge application to forest land, no phytotoxic effect is observed for trees and beneficial effects of sludge may appear rapidly with some tree species while it may take longer for other species.

Key words: Sludge, cadmium, lead, mercury, tree, leaves, growth, Canada.

Municipal sludge can have a beneficial effect on plant growth and crop yields by improving the soil properties and fertility (Hall and Coker, 1983; Metzger and Yaron, 1987; Katterman and Day, 1989; Pierzynski, 1994). Municipal sludge have proven to be an effective fertilizer and soil conditioner for forest land (Bledsoe, 1981; Henry and Cole, 1983). Many studies have shown that sewage sludge may improve the growth of numerous tree species in diameter or in height (Smith and Evans, 1977; Berry, 1982; Zasoski *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1984).

However, sewage sludge may contain contaminants such as trace metals that are of environmental concern. Additions of metal elements to soil through sludge application usually increase metal concentration in crops (Logan and Chaney, 1983). High concentrations of trace metal in sludge may cause phytotoxicity (Davis and Carlton-Smith, 1984) or a yield decrease (Johnson *et al.*, 1983). Furthermore, they could represent a potential hazard to wildlife. Plant uptake is one of the major pathways by which land-applied sewage sludge contaminants enter the food chain (Chaney, 1990). Cadmium (Cd), lead (Pb) and mercury (Hg) are among the trace metals of major concern in sewage sludge application. These three metals have no biological functions known so far, and may be toxic at low concentrations (Chowdhury and Chandra, 1987). In particular, Cd is of major concern because some plant species tend to accumulate high concentrations of this metal without showing signs of phytotoxicity (Webber, 1979).

The study of Jing and Logan (1992) suggests that phytoavailability of a metal appears to be related to its concentration in the sewage sludge. However, plant uptake of nutrients and contaminants is a function of plant species, individual elements, soil and sludge characteristics (Kloke *et al.*, 1984; Page *et al.*, 1987a). Toxic and growth responses are also species dependent (Mitchell *et al.*, 1978; Kloke *et al.*, 1984). Hence, it may be difficult to predict the influence of sewage sludge application on tree growth and metal uptake.

At present, there is little specific research that has been done on the effect of sludge application concerning trace metal uptake by trees in natural forest ecosystems. Because very few studies have been conducted under natural conditions, it is difficult to predict the risks of sewage sludge application for the forest ecosystems in Québec (Canada). Moreover, the effect of sewage sludge on the growth of tree species growing in Québec are unknown for many of them. The objective of this study was to determine the short-term foliar Cd, Pb and Hg concentrations and growth response for two species of trees in natural conditions, white oak (*Quercus alba* L.) and red pine (*Pinus resinosa* Ait) following municipal sludge application to forest land.

MATERIALS AND METHODS

Description of the Study Area

This study was conducted in 1995 and 1996, on four experimental plots located within the tree plantations of the University of Sherbrooke, Québec, Canada (45°15'N, 72°00'E). The study was conducted on two types of forest stands in which the trees were seven years old in 1995. In the first stand, which consisted of red pines (*Pinus resinosa*) and white oak (*Quercus alba*), and two experimental plots of about 1 ha each were implemented (one treated with sludge = T1 and one control = C1). In the second stand, which consisted of red oak (*Quercus rubra*) and white oak (*Quercus alba*), the same design was applied and the treatment and control plots were named T2 and C2 respectively. Control (C1 and C2) and treatment stands (T1 and T2) were separated by a road and control and treatment plots were approximately 200 m apart. The location and slopes of the treated plots were chosen so that runoff from these plots would not affect the control plots.

Sewage Sludge Application

The sewage sludge used for the experiment came from the water treatment facility of the municipality of Richmond (Québec, Canada). This treatment facility consists of three aerated lagoons. The sludge was taken in the first lagoon in which no chemical dephosphatation is done. The average dry matter content of the sludge was about 11.2%. The concentrations (dry weight) means (\pm SD) in sewage sludge were 2.8 ± 0.2 mg kg⁻¹ for Cd, 144 ± 6 mg kg⁻¹ for Pb, and 3.7 ± 0.1 mg kg⁻¹ for Hg. These concentrations were lower than those presented in the 1991 guidelines for sewage application of the Québec government (MENVIQ et al., 1991). In order to maximize the exposure to the metals and nutrients from the sludge for the trees present on the plots, the application rate of the sludge corresponded to approximately 200 kg available N ha⁻¹ (about 39 to 44 t dry wt. ha⁻¹ of sludge), which was the maximal application rate per 10-year period suggested by the 1991 guidelines. This sludge treatment corresponded to an application of approximately 0.12 kg ha⁻¹ in Cd, 0.15 kg ha⁻¹ in Hg, and 12 kg ha⁻¹ in Pb. The sludge was applied on September 15 and 16, 1995, using commercial spreaders mounted on trucks with high floatation tires.

Growth Measurements

Twenty trees per plot were randomly chosen in both control and treatment (C1 and T1 = *Pinus resinosa*, and C2 and T2 = *Quercus alba*). Height measurements were taken before (between September 1 and 15, 1995 = H95) and one year after the sludge application

(August 1996 = H96). Tree growth before sewage application was measured by subtracting the height of trees at the end of 1995 from that of 1994 (= H94). The growth rate was calculated by the ratio: $(H95 - H94) / H94$ for the year 1995, and $(H96 - H95) / H95$, for the year 1996.

Cadmium, Lead and Mercury in the Leaves

The analysis of Cd, Pb, and Hg concentrations in the leaves of the selected trees was done in 1995 and 1996. The sampling method consisted of taking leaves from the same trees used for growth and height measurements. For each white oak tree, 10 leaves were taken to make a composite sample, while for the red pine, 20 fascicles per tree were collected. Twenty such samples were used each year. All chemical analyses were done by the Centre de Toxicologie du Québec (CTQ). For each tree, unwashed leaf or fascicle samples were chopped and homogenized in a standard household blender. The blender was rinsed with diluted acid before and between each sample preparation. The residual washing solution was analyzed to check for a possible contamination, especially for Cd. A portion of the tissues was oven-dried overnight at 105°C and the moisture content was then determined. Wet tissues were used for trace metal analysis since Hg could be lost in the drying process. Results were expressed on a dry weight basis. Tissues were weighted to 0.0001 g and transferred into 60 mL Teflon pressurized vessels. Five mL of concentrated nitric acid were added and the vessels were tightly capped. The vessels were then placed into an oven at 120°C for 12 to 16 hours. The digests were then diluted to 50 mL with distilled water. Pb and Cd were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (Perkin Elber Sciex Elan 5000) and Hg by cold vapor atomic spectrometry (Pharmacia). The standard reference materials that were used to verify the accuracy of the results were BCR-60-plant and BCR-279-plant, from the Community Bureau of Reference. The detection limits were (in mg kg⁻¹ dry weight basis) 0.01 for Cd; 0.1 for Pb; and 0.02 for Hg. For the sludge analysis, the same method was applied except that 200 mg were precisely weighted and transferred into 60 mL Teflon pressurized vessels and the standard materials that were used were MESS⁻¹-sediment and PACS⁻¹-sediment from the National Research Council of Canada. All concentrations were expressed on a dry weight basis.

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute, 1990). A three-way analysis of variance was done to test for differences between Cd, Pb and Hg concentrations with respect to three factors: plots (pine versus oak), treatment (control versus treated), and year

(before and after sludge application). All values below the detection limit were replaced by zeros in the statistical analysis.

The difference in height and growth between the tree species (pine and oak) and the type of plots (treated versus control) and the years (before: 1994 and 1995; and after: 1996 the sludge application) were tested with a three-way analysis of variance. All data was log transformed before the analysis to meet the assumption of normality required for the analysis of variance. Test results were considered significant when P values were lower than 0.05.

RESULTS

Cadmium, Lead and Mercury Concentrations in Leaves

The concentrations of Cd, Pb and Hg in the leaves of oak and pine trees are presented in Figure 1 and Table 1.

Cadmium

The three-way ANOVA (species, treatment and year) shows that there is no significant interaction between these three factors. There is no significant effect of the treatment: the sludge application did not increase significantly the concentration of Cd in the leaves of the trees. The ANOVA only indicates that the leaves from the treated plots before and after a sludge application had more Cd than the leaves from the control plots ($F_{1,142} = 19.51$; $P = 0.0001$) and that it is the oak that shows the highest concentrations ($F_{1,142} = 8.87$; $P = 0.0034$; Fig. 1a). There were no significant differences between the years ($F_{1,142} = 0.03$; $P = 0.87$).

Lead

ANOVA shows a significant interaction between the species, the treatment and the year ($F_{1,142} = 18.54$; $P = 0.0001$; Fig. 1b). A year after the sludge application, the Pb concentration in pine needles is significantly higher in the treated plots than in the control plots.

Mercury

A significant interaction between the three factors (species, treatment and year) indicates that the Hg concentration in the leaves of the control plots decreases with time, while it increases slightly for the treated oaks and remains the same for the treated pines ($F_{1,142} = 4.81$; $P = 0.0301$; Fig. 1c; Table 1). Moreover, in 1996, the oaks leaves from the control plot showed a steeper decrease in Hg concentration than the pine needles from the control plot.

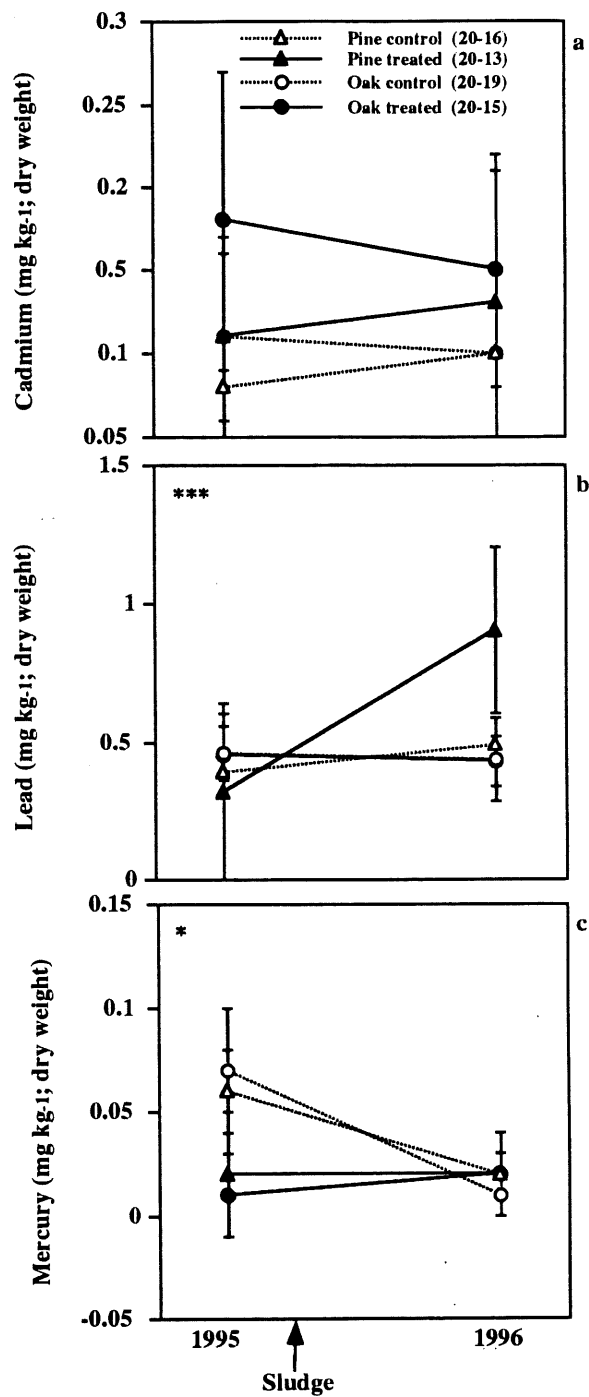


Fig. 1. Average concentrations (\pm SD) of cadmium, lead and mercury in leaves of sludge-exposed trees and controls: before the sludge application (1-14 September 1995) and one year after (15 August 1996). Sewage sludge was applied on 15 September 1995. Significant interactions (species x treatment x year) are indicated by * (* $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$). Sample sizes are indicated in parentheses (1995-1996).

Table 1. Cadmium, lead and mercury concentrations (mg kg⁻¹ dry weight) in sludge-exposed and control red pine (*Pinus resinosa*) and white oak (*Quercus alba*): before (1995) and one year after sludge application (1996).

Heavy metals	Red pine			White oak		
	Mean ± SD†	95 % CI	Range	Mean ± SD	95 % CI	Range
Control						
1995 (n = 20)						
Cd	0.08 ± 0.04	0.06 - 0.10	0.03 - 0.17	0.11 ± 0.05	0.09 - 0.13	0.02 - 0.20
Pb	0.39 ± 0.20	0.30 - 0.48	0.10 - 0.90	0.46 ± 0.10	0.42 - 0.50	0.30 - 0.60
Hg	0.06 ± 0.02	0.05 - 0.07	0.03 - 0.10	0.07 ± 0.03	0.06 - 0.08	0.04 - 0.13
	(n = 16)	1996			(n = 19)	
Cd	0.10 ± 0.06	0.07 - 0.13	0.04 - 0.24	0.10 ± 0.05	0.08 - 0.12	0.04 - 0.24
Pb	0.49 ± 0.32	0.33 - 0.65	0.00 - 1.30	0.44 ± 0.15	0.37 - 0.51	0.20 - 0.90
Hg	0.02 ± 0.01	0.01 - 0.03	0.00 - 0.03	0.01 ± 0.01	0.00 - 0.02	0.00 - 0.03
Sludge-exposed						
1995 (n = 20)						
Cd	0.11 ± 0.06	0.80 - 0.14	0.02 - 0.33	0.18 ± 0.09	0.14 - 0.22	0.04 - 0.43
Pb	0.32 ± 0.32	0.18 - 0.50	0.00 - 1.30	0.45 ± 0.15	0.38 - 0.52	0.20 - 0.70
Hg	0.02 ± 0.03	0.01 - 0.03	0.00 - 0.10	0.01 ± 0.02	0.00 - 0.02	0.00 - 0.06
	(n = 13)	1996			(n = 15)	
Cd	0.13 ± 0.08	0.09 - 0.17	0.07 - 0.37	0.15 ± 0.07	0.11 - 0.19	0.07 - 0.29
Pb	0.90 ± 0.30	0.74 - 1.09	0.40 - 1.50	0.43 ± 0.09	0.39 - 0.47	0.30 - 0.50
Hg	0.02 ± 0.02	0.01 - 0.03	0.00 - 0.05	0.02 ± 0.01	0.01 - 0.03	0.00 - 0.03

† SD = Standard deviation. 95 % CI = 95 % confidence interval. n = Number of trees sampled

Growth and Height of Oaks and Pines

Before Sludge Application

Before sludge application, oaks and pines had a similar height in 1994 ($F_{1,72} = 1.55$; $P = 0.218$), but the pines were taller in 1995 ($F_{1,79} = 23.33$; $P < 0.001$; Fig. 2). In 1994, the height of the trees on the control plot was significantly lower than that of the plots selected to receive the sludge ($F_{1,72} = 5.72$; $P < 0.05$). This difference was particularly important in oaks, and this has been confirmed by a significant interaction between the species and the plot ($F_{1,72} = 5.53$; $P < 0.05$). The difference between the treated and control plots tends to decrease in 1995 ($F_{1,79} = 3.17$; $P = 0.079$) and there is no interaction between the species and the plots ($F_{1,79} = 1.78$; $P = 0.187$). The growth rate of the trees before the sludge application shows the same tendencies than the preceding results on their height. The growth rate was higher for pines ($F_{1,72} = 115.70$; $P < 0.001$; Fig. 3). Moreover, this growth rate was slower on trees growing in plots used as treated stands compared to control plots ($F_{1,72} = 4.08$; $P < 0.05$).

After the Sludge Application

A year after the sludge application, the pines showed a greater height than oaks ($F_{1,71} = 18.56$; $P < 0.001$). The height of the trees in the treated plots is greater than in the control plot ($F_{1,71} = 5.40$; $P < 0.05$), especially for oaks ($F_{1,71} = 4.78$; $P < 0.05$). The interaction between species and treatment ($F_{1,71} = 2.96$; $P = 0.0898$) indicates that the sludge application increased the growth rate of oaks on the treated plots, compared to oaks of the control plots. However, in the case of pines, the growth rate was similar in both treated and control plots.

DISCUSSION

Metal Concentration in Leaves

Cadmium

Sludge application did not increase the concentration of Cd in the leaves of treated trees. Fiskell et al. (1990) found similar results in the case of plants fertilized with industrial sludge rich in chromium, nickel and cadmium. However, it is considered that cadmium can be readily absorbed by vegetation because there is no soil/plant barrier for this metal (Environment Canada, 1984; Kloke et al., 1984). Cadmium application rate, soil pH, plant species, and sludge Cd

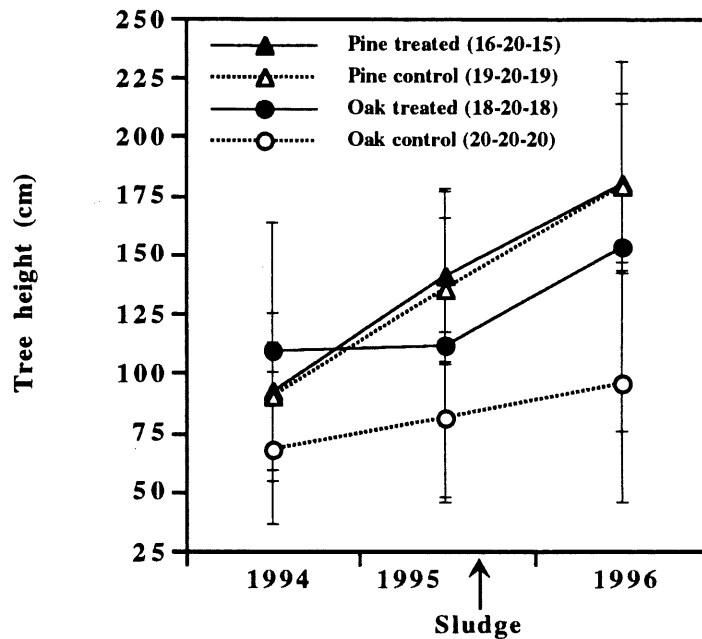


Fig. 2. Red pine (*Pinus resinosa*) and white oak (*Quercus alba*) heights (mean \pm SD) living under sludge-exposed and control conditions: before the sludge application (1994 and 1995) and about one year after (15 August 1996). Sewage sludge was applied on 15 September 1995. Sample sizes are indicated in parentheses (1994-95-96). There is a significant interaction (species \times treatment) in 1994 and 1996 ($P < 0.05$). In 1995, there is a significant difference between the species ($P = 0.0001$) (two-way ANOVA). See text for details.

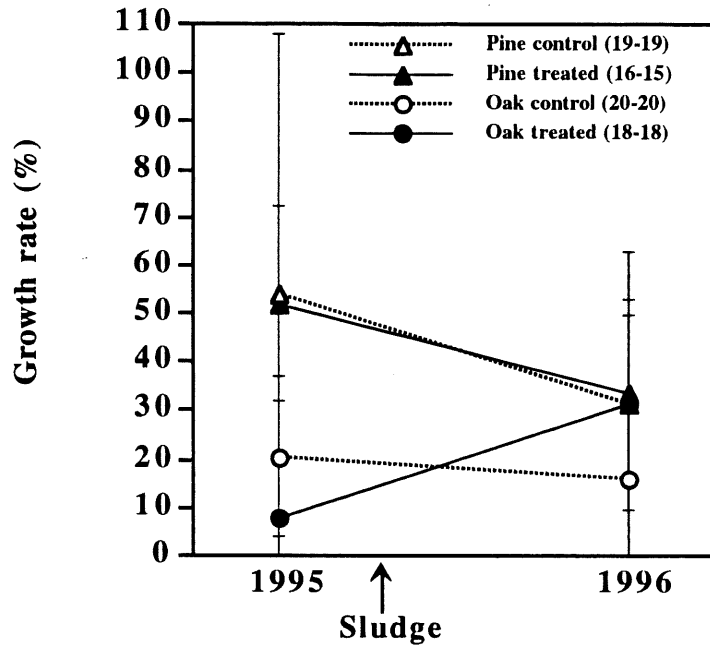


Fig. 3. Average growth rate (\pm SD) of trees. Height measurements were taken before (1-15 September, 1995 = H95) and one year after the sludge application (August 1996 = H96). In 1996, the height of the same 1994 trees was measured (= H94). The growth rate was calculated by the ratio: $(H95 - H94) / H94$ for 1995, and $(H96 - H95) / H95$ for 1996. Sample sizes are indicated in parentheses (1995-96). There is a significant difference between species in 1995 ($P = 0.0001$) and 1996 ($P < 0.05$), and between control and treated trees for 1995 and 1996 ($P < 0.05$) (two-way ANOVA). See text for details.

chemistry, all play an important role in affecting plant uptake of this trace element (Logan and Chaney, 1983; Jing and Logan, 1992).

Lead

A year after the sludge application, the pine needles from the treated plots had higher concentrations of Pb than the pine needles from control plots. This was not the case for oak leaves from both treated and control plots. However, the maximum concentration of Pb in the pine needles were much lower than that measured in the leaves of most plants growing on sites considered non contaminated (2 to 5 mg kg⁻¹) (ADEME, 1995). Pb has one of the lowest specific phytotoxicity for trace metals. According to Burton et al. (1983), it is necessary to reach a concentration of 35 mg Pb kg⁻¹ in the leaves to affect the growth of tree. Pb is also one of the trace metals which is not readily transferred from the root zone to the higher parts of the plant. Therefore, the concentration measured in plants growing on soils containing large quantities of total Pb, rarely exceeds 30 to 50 mg kg⁻¹ (ADEME, 1995). In the present study, immediately after the sludge application, part of the material was sticking to leaves of the oak and pine needles. A small quantity of Pb may have been immobilized in the vacuoles of the cells or retained on the foliar endoderm, as it has already been observed for the root cells (ADEME, 1995). Pine needles are persistent tissues, contrary to oak leaves. A year after the sludge application, a number of needles that were sampled must have been present in the preceeding year. Thus, the analyses may have reflected direct contamination rather than plant uptake. In the case of oak trees, the leaves sampled the year after treatment were all new over; this may explain why the pine needles from treated plots had higher concentrations in Pb compared to oak leaves of treated and control plots or pine needles from the control plot.

Mercury

In the case of Hg, it seems that there was a treatment effect. In fact, the Hg concentration in the leaves from control trees have decreased between 1995 and 1996, while they remained almost the same in treated plants. However, it is possible that the concentration measured in 1995 in the leaves from the control plots may have been due to an exogenous contamination. In 1995, the Hg concentration of the soils from the control plots was below the detection limit (< 0.05 mg kg⁻¹). The plants growing on soils in which the Hg concentration is considered normal (0.05 to 0.1 mg kg⁻¹) contained Hg concentrations that rarely exceed 0.05 mg kg⁻¹ (ADEME, 1995). For example, in the case of cereals, the Hg concentration ranges from 0.025 to 0.05 mg kg⁻¹ in the stems (ADEME, 1995). In the present study, the leaves from the control

plots presented maximal concentrations of Hg that were higher than these previous values (0.10 mg kg⁻¹ for the pine needles and 0.13 mg kg⁻¹ for the oak leaves). It is difficult to understand the decrease in Hg concentration in the leaves of the control plots in a given year, while the concentration in the soils remains almost unchanged (J.-M. Bonzom, unpublished data). From the results obtained, it is most likely that the sludge application did not cause a contamination of the leaves of the trees with Hg. Finally, all maximal concentrations of Hg measured in the leaves of trees from the treated plots were much lower than the threshold limit for phytotoxicity which ranges from 0.05 mg kg⁻¹ for rice to 3 mg kg⁻¹ for other species (ADEME, 1995).

Height and Growth Rate of the Trees

Growth rates measured before the sludge application were faster in pines than oak trees. Afterwards, the sludge has induced a better growth rate for oaks during the first year following sludge application. This result is similar to those reported by many studies on forest land application of sludge (Cole et al., 1986). However, in the case of pine, there were no such differences between the growth rates of trees before and after treatment. According to previous studies, fertilizers tend to accelerate mainly the growth in diameter of most tree species (Sopper, 1973; Gagnon, 1974; Vézina and Roberge, 1981). Pines may have then shown a beneficial effect of the sludge application if their diameter growth, something that we have not measured.

The trees growing on poor soils are more susceptible to present a positive growth response to fertilization (Roberge et al., 1980). The major factors to consider would be the difference between the pool of available nutrients in the soil and the nutrients applied with mineral and organic fertilizers (Grenier, 1989). Before the sludge application, the soil of the experimental pine plantations contained enough nutrients to support the growth of trees (Bonzom et al., 1998). The sludge application has not permitted to increase the growth and height of the pines for the first year, but it may be possible that a positive effect of the sludge on the growth rate would be observable in the coming years. It is anticipated that without fertilizer addition, the quantity of nutrients present in the soil could decrease with time. Therefore, the plots that received sludge would present a higher bank of nutrients and would sustain a better tree growth in the long-term (Michon et al., 1996). It has been shown that an increase in the productivity in red pine and white pine may be observed only after two growth seasons following the sludge application (Brockway, 1983).

SUMMARY AND CONCLUSION

The growth rate of oak increased in the first year following a sludge application at the rate of 200 kg of available N ha⁻¹. However, growth rate of pine did not increase with the same treatment. Impacts of sludge applications on forest systems may take up to 50 years to be assessed completely (Merkel et al., 1986). Consequently, additional long-term studies are required to determine the number of years the sludge application would have positive effects on the growth rate of oak and pines. In future studies, it would also be advisable to evaluate the diameter growth of the trees. The knowledge gained from these studies contribute to optimize the quantities and the frequencies of sludge application to forest lands.

Maximum concentrations of Cd, Pb and Hg found in the leaves of the trees were less than the threshold values at which growth depression of sensitive plant species start: 5 to 10 mg kg⁻¹ for Cd, 10 to 20 mg kg⁻¹ for Pb, and 0.5 to 1 mg kg⁻¹ for Hg (Sauerbeck, 1983) and less than the critical concentrations for farm animal feed: 0.5 to 1 mg kg⁻¹ for Cd, 10 to 30 mg kg⁻¹ for Pb, and 1 mg kg⁻¹ for Hg (Underwood, 1977; N.A.S., 1980). It is considered that plant availability of trace metals is greater during the first year after the sludge application (Sommers et al., 1991; Chang et al., 1997). This study shows that forest land application of sludge does not pose a threat to the trees, and in fact, may be beneficial to their growth when the guidelines of the Québec government are respected for sludge quality and rate of application. Most trace metals present in the soil can be mobilized by a decrease in the soil pH. Hence, acid rain may contribute to increase plant uptake where the soil pH is not controlled as on agricultural lands (Kloke et al., 1984). Trace metals phytoavailability is inversely related to soil pH for the majority of trace metals (Logan and Chaney, 1983; Narwal et al., 1983; N.R.C., 1996). For example, a one unit decrease in soil pH (5.9 to 4.9) would increase up to 100 % the Cd concentration in the grains of oat (Page et al., 1987b). Acid rain could then contribute to the bioaccumulation of Cd in plants in various Canadian regions, like in Québec (Crête et al., 1987; Glooschenkho et al., 1988; Craste and Burgat-Sarcaze, 1995). However, this possibility would depend on the various factors previously mentioned and would be of greater concern in regions already affected by atmospheric fall-outs from various industries.

ACKNOWLEDGMENTS

We thanks Félix Boulanger and Geneviève Labrie for field assistance, Alain Leblanc from Centre de Toxicologie du Québec for assistance in chemical analyses, and François Granger for helpful comments on earlier drafts of the manuscript. This study was funded by the Ministry of

Environment of Québec, the City of Richmond, the University of Sherbrooke and the Consortium GL-UDA (Gendron-Lefebvre inc. et Urgel Delisle & associés inc.).

REFERENCES

- ADEME, 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. *In* Guides et cahiers : techniques "Connaître pour agir". Collection "Valorisation agricole des boues de stations d'épuration".
- Berry, C.R. 1982. Dried sewage sludge improves growth of pines in the Tennessee Copper Basin. *Reclam. Reveg. Res.* 1:195-201.
- Bledsoe, C.S. 1981. Municipal sludge application to Pacific Northwest forest lands. Institute of Forest Resources Contribution 41, College of Forest Resources, University of Washington, Seattle.
- Bonzom J-M, F. Granger, A. Gadbois, J.-M. Bergeron, and G. Carrier. 1998. Valorisation sylvicole des boues d'origine municipale : impacts sur la faune. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, Québec, Canada. N° Réf. MEF 3335.22.9301.
- Brockway, D.G. 1983. Forest floor, soil and vegetation responses to sludge fertilization in red and white pine plantations. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 47:776-784.
- Burton, K.W., E. Morgan, and A. Roig. 1983. The influence of heavy metals upon the growth of sitka-spruce in south Wales forests. I. Upper critical and foliar concentrations. *Plant and Soil* 73:327-336.
- Chaney, R. L. 1990. Public health and sludge utilization. *Biocycle* 31:68-73.
- Chang, A.C., A.L. Page, H.-N. Huyn, and D.R. Parker. 1997. Plant absorption of cadmium and zinc from sewage sludge-treated soils: Plateau or time bomb ? *In* Isander et al. (ed.) *Extended Abstracts 4th Int. Conf. on the biogeochemistry of Trace Elements*. U.S. Army Cold Regions Res. and Eng. Lab., Hanover, NH.
- Chowdhury, B.A., and R.K. Chandra. 1987. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11:55-113.
- Cole, D.W., M.L. Rinehart, D.G. Briggs, C.L. Henry, and F. Mecifi. 1984. Response of Douglas-fir to sludge application: Volume growth and specific gravity. p. 77-84. *In* TAPPI Research and Development Conference, Appleton, Wisconsin. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Technology Park, Atlanta, Georgia, Appleton, Wisconsin.
- Cole, D.W., C.I. Henry, and W.L. Nutter. 1986. The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes. University of Washington Press, Seattle.

- Craste, L., and V. Burgat-Sarcaze. 1995. Les cervidés sauvages bioindicateurs de pollution par le cadmium. *Rev. Méd. Vét.* 146:583-592.
- Crête, M., F. Potvin, P. Walsh, J. Benedett, M.A. Lefebvre, J. Weber, G. Paillard, and J. Gagnon. 1987. Pattern of cadmium contamination in the liver and kidneys of moose and white-tailed deer in Québec. *Sci. Total Environ.* 66:45-53.
- Davis, R.D., and C.H. Carlton-Smith. 1984. An investigation into the phytotoxicity of zinc, copper, and nickel using sewage sludge of controlled metal content. *Environ. Pollut.* 8:163-185.
- Environment Canada, 1984. L'épandage des boues usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Environnement Canada, Service de la protection de l'environnement. Guide SPE6-EP-84-1.
- Fiskell, J.G.A., D.G. Neary, and N.B. Comerford. 1990. Slash pine and understory interception of micronutrients mineralized from sewage sludge applied to a sandy, acid forest soil. *For. Ecol. Manage.* 37:27-36.
- Gagnon, J.D. 1974. Results of fertilizer experiments in Québec. p. 83-91. *In Proc. of a workshop on forest fertilization in Canada.* Environnement Canada, Service des forêts, Sault-Sainte-Marie, Ontario.
- Glooschenko, V., C. Downes, R. Frank, H.E. Braun, E.M. Addison, and J. Hichle. 1988. Cadmium levels in Ontario moose and deer in relation to soil sensitivity to acid precipitation. *Sci. Total Environ.* 71:173-186.
- Grenier, Y. 1989. La valorisation des boues d'usine des eaux usées pour la fertilisation des forêts. Gouvernement du Québec. Ministère de l'Énergie et des Ressources (forêts), Direction de la Recherche et du Développement. no. 98. ISBN 2-550-20195-7.
- Hall, J.E., and E.G. Coker. 1983. Some effects of sewage sludge on soil physical conditions and plant growth. p. 43-60. *In G. Catroux et al. (ed.) The influence of sewage sludge application on physical and biological properties of soils.* D. Reidel Publishing, Boston.
- Henry, C.L., and D.W. Cole. 1983. Use of dewatered sludge as an amendment for forest growth. *In C.L. Henry and D.W. Cole (ed.) Institute of Forest Resources, University of Washington, Seattle.*
- Jing, J., and T.J. Logan. 1992. Effects of sewage sludge cadmium concentration on chemical extractability and plant uptake. *J. Environ. Qual.* 21:73-81.
- Johnston, N.B., P.H.T. Beckett, and C.J. Waters. 1983. Limits of zinc and copper toxicity from digested applied to agricultural land. p. 75-81. *In R.D. Davies et al. (ed.) Proc. on*

- Environmental effects of organic and inorganic contaminants in sewage sludge, Stevenage, 26-28 May 1982. D. Reidel, Dordrech, Holland.
- Katterman, F.R.H., and A.D. Day. 1989. Plant growth factors in sewage sludge. *Biocycle* 3:64-65.
- Kloke, A., D.R. Sauerbeck, and H. Vetter. 1984. The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. p. 113-141. *In* J.O. Nriagu (ed.) *Changing metal cycles and human health*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Logan, T.J., and R.L. Chaney. 1983. Utilization of municipal wastewater and sludge on land-metals. p. 235-295. *In* A.L. Page et al. (ed.) *Utilization of municipal wastewater and sludge on land*. University of California, Riverside, CA.
- Merkel, D.M., J.B. Jr. Hart, P.V. Nguyen, and C.W. Ramm. 1986. Municipal sludge fertilization on oak forests in Michigan: estimations of long-term growth responses. p.292-300. *In* D.W. Cole, C.L. Henry and W.L. Nutter (Ed.) *The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes*. University of Washington, Washington, Seattle.
- Metzger, L., and B. Yaron. 1987. Influence of sewage organic matter on soil physical properties. *Adv. Soil Sci.* 7:141-163.
- Michon, P.Y., A. Gadbois, F. Granger, E. Kodsi, et B. Côté. 1996. Evaluations sylvicole, environnementale et technico-économique de la valorisation de trois types de boues de stations d'épuration municipales dans la région des Basses-Laurentides. Consortium GL-UDA (Gendron Lefebvre - Urgel Delisle et Associés inc.). Collaborateurs Université Mc Gill. Rapport final présenté au ministère de l'Environnement de la Faune du Québec.
- Ministère de l'Environnement du Québec, Ministère des Forêts du Québec et Ministère de la Santé et des Services Sociaux. 1991. Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guides des bonnes pratiques, Québec. Envirodoq EN910413, QEN/QE/AE/56\1. ISBN 2-550-22516-3.
- Mitchell, G.A., F.T. Bingham, and A.L. Page. 1978. Yield and metal composition of lettuce and wheat grown on soils amended with sewage sludge enriched with cadmium, copper, nickel and zinc. *J. Environ. Qual.* 7:165-171.
- National Academy of Sciences. 1980. Mineral tolerance of domestic animals. NAS subcommittee on mineral toxicity in animals. National Academy Press, Washington, D.C.
- Narwal, R.P., B.R. Singh, and R.B. Panhwar. 1983. Plant availability of heavy metals in sludge-treated soils: I. Effect of sewage sludge and soil pH on yield and chemical composition of rape. *J. Environ. Qual.* 12:358-365.

- National Research Council. 1996. Use of reclaimed water and sludge in food crop production. National Academy Press, Washington, DC.
- Page, A.L., T.J. Logan, and J.A. Ryan. 1987a. Land application of sludge-food-chain implications. Lewis Publ., Chelsea, MI.
- Page, A.L., A. Chang, and M. El-Amamy. 1987b. Cadmium levels in soil in the United States. p. 119-145. *In* L. Hutchinson and K.M. Meema (ed.) Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment. Wiley, Chichester.
- Pierzynski, G.M. 1994. Plant nutrient aspects of sewage sludge. p. 21-25. *In* C. E. Clapp. et al. (ed.) Sewage sludge: Land application and the environment. SSSA Misc. Publ., SSSA, Madison, W.I.
- Roberge, M.R., J.D. Gagnon, and C.H. Ung. 1980. Essai d'un dosage d'azote dans trois sapinières de 60 ans au Québec : résultats de 10 ans. *Can. J. For. Res.* 10:470-475.
- SAS Institute. 1990. SAS/STAT user's guide, version 6, 4th ed. SAS Inst., Cary, NC.
- Sauerbeck, D. 1983. Welche schwermetallgehalte in pflanzen dürfen nicht überschritten werden, um wachstumbeeinträchtigungen zu vermeiden ? *Landwirt F* 39:108-129.
- Smith, W.H., and J.O. Evans. 1977. Special opportunities and problems in using forest soils for organic waste application. p. 429-454. *In* L.F. Elliott and F.J. Stevenson (ed.) Soils for management of organic waste waters. Am. Soc. Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Sommers, L.E., A.L. Page, T.J. Logan, and J.A. Ryan. 1991. Impact of sewage sludge on soils and barley: A regional study. *In* Western Regional Research. Publ. (ed.) W-1224: Optimum use of sewage sludge on agricultural land. Agric. Exp. Stn., Colorado State University, Fort Collins.
- Sopper, W.E. 1973. Crop selection and management alternatives-Perennials. p. 143-153. *In* D.R. Wright et al. (ed.) Recycling sewage sludge and waste effluents on land. Nat. Assoc. State Univ. and Land-Grant Colleges, Washington, D.C.
- Underwood, E.J. 1977. Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York.
- Vézina, P.-E., and M.R. Roberge. 1981. Comment aménager nos forêts. Les presses de Laval, Québec, Canada.
- Webber, M.D., 1979. Phosphate fertilizer and sewage sludge used on agricultural land - The potential for cadmium uptake by crops. Waste water technology center. Environmental protection service. Environment Canada. Report # EPS4-WP-79-2.
- Zasoski, R.J., D.W. Cole, and C.S Bledsoe. 1983. Municipal sewage sludge use in forests of the Pacific Northwest, U.S.A.: Growth responses. *Waste Manage. Res.* 1:103-114.

Cadmium, Lead, and Mercury Accumulation in Small Mammals Following Sewage Sludge Application to Forest Land

Jean-Marc Bonzom, and Jean-Marie Bergeron

Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) J1K 2R1 Canada

ABSTRACT

The use of sewage sludge to fertilize forests may prove to be an interesting alternative for municipalities where agricultural land is scarce. However, there is concern that the use of sewage sludge on forest land may cause wildlife contamination by trace metals. Cadmium (Cd), lead (Pb) and mercury (Hg) concentrations were analysed in livers and kidneys of insectivorous northern short-tail shrews (*Blarina brevicauda*) and herbivorous meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) from sludge treated and untreated forest sites at Sherbrooke's University (Québec, Canada). The animals from two sludge treated sites were compared with those captured on three control sites, before, two months and one year after the sludge application. The application of sewage sludge significantly increased Pb concentration in the liver and kidneys of voles and, Cd and Hg concentrations in those of shrews of treated sites compared to controls. The concentrations measured did not appear to be reaching a toxic level. The results of the study show that when sludge quality and rate of application from the guidelines of the Québec government are respected, sludge used on forest land has no detrimental effect on small mammals health and population up to one year after application. However, with time the concentration of Hg in the liver and kidneys of the shrews captured on treated sites showed a tendency to increase compared to the shrews captured on the control site. This observation suggests that long-term field studies would be necessary in order to evaluate adequately the fate of Hg in small mammals following sludge application.

Key words: Sewage sludge, cadmium, lead, mercury, *Microtus*, *Blarina*, forest, Québec.

The use of sewage sludge as a fertilizer and soil amendment can be advantageous on forest lands as well as on agricultural lands. This type of sludge management is compatible with sustainable and sound management of our natural resources. The use of sewage sludge offers many advantages such as low fertilizer costs, improvement of soil fertility and texture, improvement of growth, etc. (Kelling et al., 1977; Smith and Evans, 1977; Brockway, 1979). However, sewage sludge contains trace metals and in the case of forest land application, there is concern that wildlife may suffer from a contamination from these metals released in the ecosystem (Chaney, 1973). Moreover, a contamination of game animals could lead to a potential contamination of humans.

Many studies have shown that trace metals contained in sewage sludge may be accumulated by animals (earthworms: Andersen, 1979; Helmke et al., 1979; small mammals: Anderson et al., 1982; Woodyard, 1986; Hegstrom and West, 1989; birds: Gaffney and Ellerston, 1979; Goldberg and Yuill, 1990; black-tailed deer: Campa et al., 1986; Woodyard, 1986). However, field studies in forest ecosystems are limited (Campa et al., 1986; Woodyard, 1986; Woodyard et al., 1986; Hegstrom and West, 1989).

Small mammals have been used extensively in field studies to evaluate the risk of accumulation of potentially toxic compounds such as metals (see Talmage and Walton, 1991 for a review). Most of the small mammals species meet the criteria suggested by Beardsley et al. (1978) to be used effectively as biomonitors: they are abundant, easily caught, they do not migrate long distances, they have a widespread distribution and have generalized food habitats. Talmage and Walton (1991) mentioned that the relatively short life span (generally smaller than one year) and high reproductive rate of small mammals allows assessment of both: (i) immediate effects, in that each new generation reflects the present type and amount of contaminant in the environment, and (ii) long-term effects that may arise over several generations of exposure. Depending on their position in the food chain, the quantities of contaminants that may be absorbed by small mammals will differ from species to species. The herbivorous or granivorous species like voles and mice absorb and accumulate smaller quantities in their tissues than the insectivorous or carnivorous species like shrews (Goldsmith and Scanlon, 1977; Beyer et al., 1985; Hegstrom and West, 1989; Ma, 1989). Because of their high metabolic rate, shrews eat the equivalent of their weight on a daily basis (Hanski, 1984). Hence, they would be more at risk in the case of a contamination of their habitat. The shrew is considered a good indicator species for metal contamination because it tends to accumulate high concentrations of metals in its tissues (Pankakoski et al., 1994). Insectivorous small mammals have also been considered the best sentinel species to monitor all contaminants in an ecosystem

(Talmage and Walton, 1991). Small mammals have been used successfully to monitor for cadmium (Cd), fluoride (F), lead (Pb), and mercury (Hg) exposures (Talmage and Walton, 1991). Small mammals can hence be used to monitor the risk exposure of various contaminants following municipal sewage sludge application.

Bioaccumulation of metals depends largely, however, on their bioavailability (Chaney, 1980). The bioavailability of a metal depends on its concentration in the soil (Baker et al., 1979; Bingham et al., 1979), and on its chemical form, which in turn, depends on many soil factors (such as pH, CEC, soil type, etc.), and climatic factors (temperature, humidity, etc.) (Linnman et al., 1973; Chaney, 1980; Kuo and Baker, 1980; Harter, 1983; Jing and Logan, 1992; Mesquita et al., 1994). The forest ecosystems of Québec (Canada) have their own characteristics pertaining to climate, soils, hydrology, vegetation and wildlife. These characteristics may influence in a specific way the bioavailability of metals which would have been applied with sewage sludge. Québec's regulation concerning forest land application of sewage sludge is principally based on studies made in agriculture and from other countries. Studies are required to verify the criterion on which the regulation is based. Forest land application of sewage sludge is still in an experimental stage in Québec. The knowledge on the potential effects of this practice on wildlife is scarce, no studies in Québec have evaluated trace metals in wildlife following sewage sludge application to forest land. Of all the metals present in the sewage sludge, Cd, Pb and Hg are considered to have no biological function and to be potentially toxic for humans, animals and plants (West et al., 1981; Zamoski, 1981). Among all metals ranked to pose a hazard on the basis of their persistence in the environment, toxicity and bioaccumulation potential, Pb is considered the most hazardous, followed by organo-mercury, Cd and Hg (Shore and Douben, 1994). Hg accumulation in wildlife following sewage sludge application on forest land has never been studied.

The aim of this study was to evaluate the bioaccumulation potential of Cd, Pb and Hg in small mammals in their natural habitat following an application of liquid municipal sewage sludge on forest land when this application respects the guidelines issued by the Québec government (MEQ et al., 1991). More specifically, the objectives were (i) to measure the concentration of Cd, Pb and Hg in liver and kidneys of small mammals living on sludge treated sites compared to controls ; (ii) to evaluate through literature if the measured concentration could be considered potentially toxic ; and (iii) review the Québec government guidelines for forest land application of sewage sludge if relevant.

MATERIALS AND METHODS

Description of the Study Area

This study was conducted in 1995 and 1996, on five experimental plots located within the tree plantations of the University of Sherbrooke, Québec, Canada (45°15'N, 72°00'E). The study was conducted on two types of forest stands in which the trees were seven years old in 1995. In the first stand, which consisted of red pine (*Pinus resinosa*) and white oak (*Quercus alba*), two experimental plots of about 1 ha each were implemented (one treated with sludge = T1 and one control = C1). In the second stand, which consisted of red oak (*Quercus rubra*) and white oak (*Quercus alba*), the same design was applied and the treatment and control plots were named T2 and C2, respectively. In 1996, one other site was used as a control (= C3) because, in the previous year, no shrews or voles were found on the control areas used in 1995. Control (C1 and C2) and treatment plots (T1 and T2) were separated by a forest road and control and treatment were approximately 200 m apart. The control C3 was separated by about 900 m of a mature forest from the other sites. The location and slopes of the treated plots were chosen so that runoff from these plots would not affect the control plots.

Sewage Sludge Application

The sewage sludge used for the trials came from the water treatment facility of the municipality of Richmond (Québec, Canada). This treatment facility consists of three aerated lagoons. The sludge was taken in the first lagoon in which no chemical dephosphatation is done. The average dry matter content of the sludge was about 11.2%. The concentrations (dry weight) means (\pm SD) in sewage sludge were $2.8 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ for Cd, 144 ± 6 for Pb, and 3.7 ± 0.1 for Hg. These concentrations were lower than those presented in the 1991 guidelines of the Québec government (MENVIQ et al., 1991). In order to maximize the exposure to metals of the animals present on the plots, the application rate of the sludge corresponded to approximately 200 kg N ha^{-1} (about 39 to 44 t dry wt. ha^{-1} of sludge, which was the maximal application rate per 10-year period suggested by the 1991 guidelines of the Québec government for forest land). This sludge treatment corresponded to an application of approximately 0.12 kg ha^{-1} in Cd, 0.15 in Hg, and 0.12 in Pb. The sludge was applied on September 15 and 16, 1995, using commercial spreaders mounted on trucks with high floatation tires.

Vole and Shrew Sampling and Monitoring Program

In 1995, meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) and northern short-tail shrews (*Blarina brevicauda*) were sampled with Museum Special and Victor death traps baited with peanut butter

in both control and treatment study sites. This sampling method was reviewed and in 1996, voles and shrews were captured in Sherman live traps baited with rolled oats and peanut butter. The animals were captured, marked and released. Only animals trapped twice were sampled. This method was used to ensure that the animals trapped were residents of the experimental plots. The sampling was done on three periods that were: before sludge application (between September 3 and 10, 1995), about two months after the sludge application (between November 7 and 16, 1995), and about one year after the sludge application (between July 17 and October 14, 1996). Voles were captured only one year after the treatment on both control and treated plots. Due to the small sample size, all adult animals were used in the study without regard to sex. All captured specimens were frozen at -20°C in individual bags until dissected. Kidneys and livers were excised using stainless steel instruments that have been dipped during 12 hours in a solution of 10% HNO_3 of high purity for trace metal analysis. The instruments were then rinsed four times with distilled water. Organs were placed in separate detergent washed plastic tubes and frozen at -20°C until analyzed. These organs appeared to be considered the best tissues to be used to monitor accumulation of metals in small mammals compared to other body part analyses (see Talmage and Walton, 1991 for review). Experimental procedures were approved by the Québec Ministry of Environment and by the Canadian Council for Animal Welfare.

Analyses of Cd, Pb and Hg in Animal Tissues and Sludge

All tissue analyses were done by the CTQ (Centre de toxicologie du Québec, Canada). Organs were not homogenized because of their small size. A portion of the tissues was oven-dried overnight at 105°C and the moisture content was determined. Tissues were used, as received, for the trace metal analysis, since Hg could have been lost through the drying process. Results were expressed on a dry weight basis. Tissues were precisely weighed to 0.00001 g and transferred in 60 mL Teflon pressurized vessels. Five mL of concentrated nitric acid were added and the vessels were tightly capped. The vessels were then placed into an oven at 100°C for 12 to 16 hours. The digests were then diluted with 50 mL of distilled water. Pb and Cd were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (Perkin Elmer Sciex Elan 5000) and Hg was determined by cold vapor atomic spectrometry (Pharmacia). The standard reference materials that were used to verify the accuracy of the results were DOLT-2-liver, and a DORM-2-muscle, from the National Research Council of Canada. The detection limits were (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight basis) 0.01 for Cd, 0.1 for Pb, and 0.01 for Hg.

For the sludge analysis, the same method was applied, except that 200 mg were weighed to 0.00001 g and transferred into 60 mL Teflon pressurized vessels. For sludge, the standard reference materials that were used were MESS-1-sediment, and PACS-1-sediment from the National Research Council of Canada. All element concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) were reported on a dry weight basis.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute, 1990). All values below the detection limits were replaced by zeros in the statistical analyses. Mann-Whitney U-tests (two-tailed) were performed on each metal and organ combination to test for differences between voles trapped in 1996 from treated and control plots. The non-parametric test was used because the data were not normally distributed even after log transformation. Two-way analysis of variance (ANOVA) were performed on each metal and organ combination to test for differences between shrews trapped before, two months and one year after sludge application from treated and control plots. The data was log-transformed before analysis to meet the assumption of normality required for the ANOVA. In all statistical analyses, the level of significance was at least $P = 0.05$.

RESULTS

Heavy Metal Accumulation in Liver and Kidneys of Shrews

Cadmium

The concentrations of Cd in the liver of shrews trapped one year after the sludge application is significantly lower than that measured before and two months after the sludge application for both the treated and the control plots ($F_{2,70} = 11.24$; $P = 0.0001$; Fig. 1a). The ANOVA shows no significant effect of the treatment. However, the Cd content of the kidneys of shrews indicates a significant effect of the treatment ($F_{1,67} = 7.90$; $P = 0.0066$; Fig. 1d) and the application of sludge has caused a net increase in Cd content of the kidneys of shrews trapped on treated plots. Before sludge application, the mean (\pm SD) concentration of Cd in kidneys of shrews of control plots ($5.58 \pm 3.14 \mu\text{g g}^{-1}$) is similar to that of kidneys of shrews of treated plots ($5.58 \pm 3.30 \mu\text{g g}^{-1}$). Two months after the sludge application, the kidneys of the shrews of the control plots have a mean concentration of $5.57 \pm 1.15 \mu\text{g Cd g}^{-1}$, while the kidneys of the shrews from treated plots show a mean concentration of $10.39 \pm 7.22 \mu\text{g Cd g}^{-1}$. One year after the sludge application, the mean concentrations in the kidneys of shrews are 4.93 ± 1.99 and $6.78 \pm 3.58 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ for shrews from the control

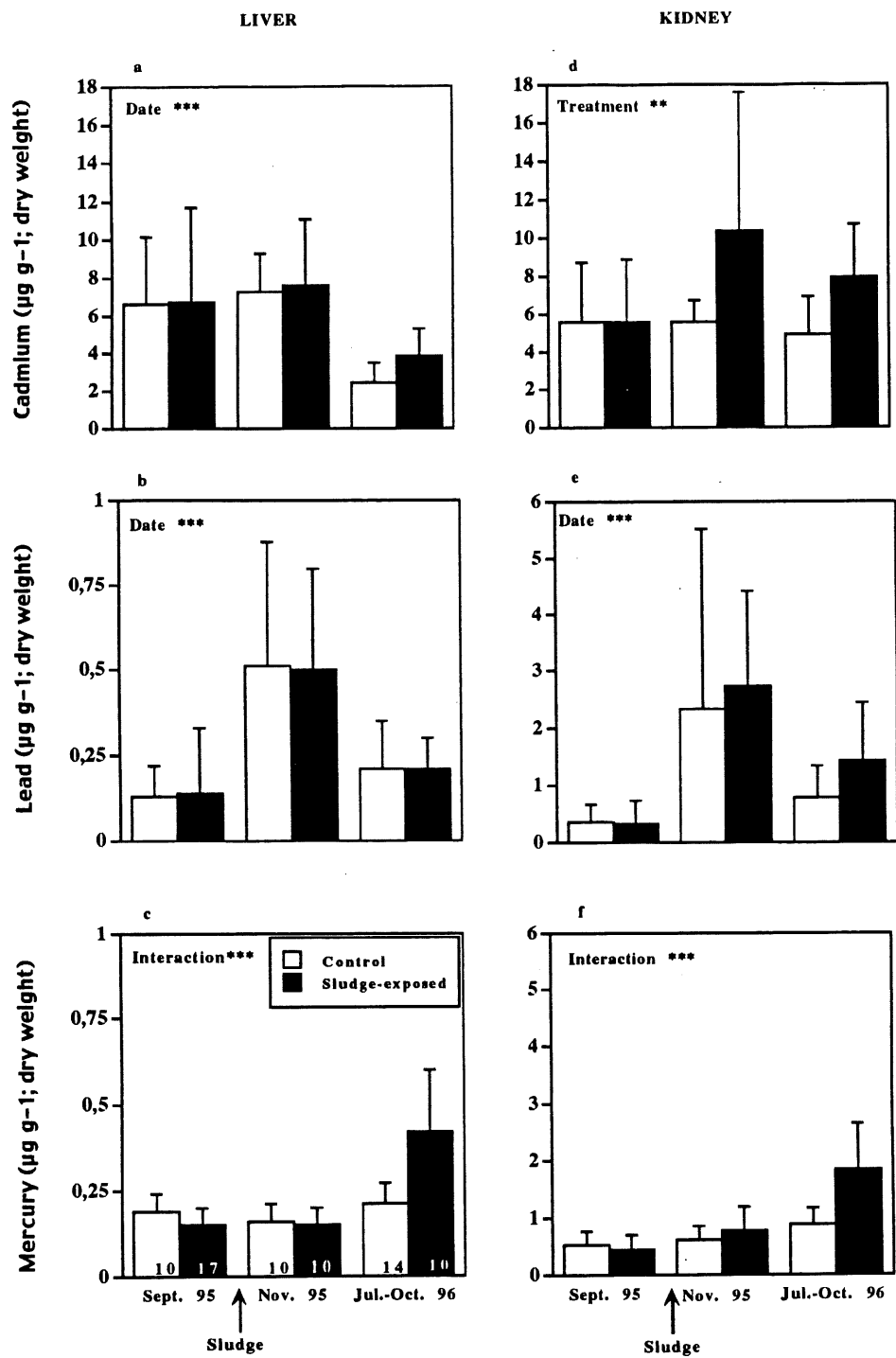


Fig. 1. Cadmium, lead and mercury mean concentrations (\pm SD) in livers and kidneys of shrews living under sludge-exposed and control conditions: before the application of sludge (from 3 to 10 September 1995) and after (November 1995 and from 17 July to 14 October 1996). Sewage sludge was applied on 15 September 1995. Treatment, date and interaction follow by * indicate significant difference according to ANOVA (** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$). Samples sizes are indicated on bars in graphic c.

and treatment plots, respectively. For the three sampling periods, the maximal concentrations of Cd in the kidneys of shrews were always observed in shrews from the treated plots (Table 1). Two months and one year after the sludge application, the maximal concentrations observed were 21.64 and 12.57 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ in the treated group, while the maximum concentrations observed were 7.84 and 7.10 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ in the control group.

Lead

In the case of Pb, the ANOVAs only indicated a significant difference between the periods of sampling (for liver: $F_{2,70} = 17.41$; $P = 0.0001$; for kidneys: $F_{2,67} = 13.69$; $P = 0.0001$; Fig. 1b and 1e). In fact, the maximum mean concentration of Pb in these organs was highest two months after the sludge application. However, for each of the three sampling periods, there was no significant difference between the control group and the treated group.

Mercury

The interaction terms were significant (treatment \times period) for liver ($F_{2,70} = 16.19$; $P = 0.0001$; Fig. 1c) and kidneys ($F_{2,67} = 10.54$; $P = 0.0001$; Fig. 1f). Before the sludge application, the liver of the shrews captured on the plots that would receive the sludge contained less Hg than the shrews captured on control plots ($0.14 \pm 0.19 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ and $0.18 \pm 0.05 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ respectively). Two months after the sludge application, there were practically no differences between the two groups (control: $0.16 \pm 0.04 \mu\text{g Hg g}^{-1}$; $0.15 \pm 0.05 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). One year after the sludge application, there was an increase in Hg content of the liver of the shrews captured on treated plots ($0.36 \pm 0.21 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) in comparison to those from the liver of shrews from control plot ($0.21 \pm 0.14 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) and to those observed in 1995. The same tendency is observed for the Hg content of kidneys (Fig. 1f), with the difference that after two months following the application of sludge, the concentrations were higher in shrews from treated plots than those from control plot ($0.78 \pm 0.41 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ and $0.62 \pm 0.24 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ respectively).

Metal Accumulation in Vole Tissues

One year after the sludge application, the mean concentration of Pb in the liver of voles captured on treated plots was 2.75 times more important than in the case of the liver from voles captured on control plots ($P = 0.0045$; Table 2). For kidneys, the Pb concentration was 3.5 times higher in voles from treated plots ($P = 0.0001$; Table 2). The maximum concentration of Pb measured in the liver of voles from treated plots ($0.4 \mu\text{g g}^{-1}$) is not too different of that of the

Table 1. Cadmium, lead, and mercury concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in livers and kidneys of shrews (*Blarina brevicauda*) living under sludge-exposed and control conditions: before the sludge application (from 3 to 10 September 1995) and after (in November 1995 and from 17 July to 14 October 1996). Sewage sludge was applied on 15 and 16 September 1995.

Heavy metals	Period	Control					Sludge-exposed				
		n†	Mean \pm SD	95% CI	Median	Range	n	Mean \pm SD	95% CI	Median	Range
Liver											
Cd	Before	10	6.62 \pm 3.57	2.21	5.44	2.48-14.96	17	6.73 \pm 4.97	2.36	3.93	1.78-17.95
	After two months	10	7.27 \pm 2.02	1.25	7.38	4.43-10.90	10	7.62 \pm 3.45	2.14	7.14	2.81-12.90
	After one year	14	2.44 \pm 1.06	0.55	2.65	0.41-3.95	10	3.34 \pm 1.79	1.11	3.03	0.41-6.14
Pb	Before	10	0.13 \pm 0.09	0.06	0.2	0-0.20	17	0.14 \pm 0.19	0.09	0.1	0-0.80
	After two months	10	0.51 \pm 0.37	0.23	0.45	0-1.40	10	0.50 \pm 0.30	0.19	0.55	0-1.10
	After one year	14	0.21 \pm 0.06	0.07	0.2	0-0.50	10	0.21 \pm 0.13	0.08	0.2	0-0.50
Hg	Before	10	0.18 \pm 0.05	0.03	0.17	0.10-0.29	17	0.14 \pm 0.04	0.02	0.14	0.07-0.24
	After two months	10	0.16 \pm 0.04	0.03	0.16	0-1.40	10	0.15 \pm 0.05	0.03	0.16	0.07-0.23
	After one year	14	0.21 \pm 0.06	0.03	0.22	0.11-0.29	10	0.36 \pm 0.21	0.13	0.33	0.03-0.70
Kidney											
Cd	Before	10	5.58 \pm 3.14	1.95	4.65	1.42-10.22	17	5.58 \pm 3.30	1.57	4.79	1.11-11.84
	After two months	10	5.57 \pm 1.15	0.8	5.26	4.33-7.84	10	10.39 \pm 7.22	4.48	8.91	1.85-21.64
	After one year	14	4.93 \pm 1.99	1.08	5.01	0.53-7.10	10	6.78 \pm 3.58	2.22	6.64	0.53-12.57
Pb	Before	10	0.36 \pm 0.30	0.19	0.35	0-1.00	17	0.33 \pm 0.40	0.19	0.2	0-1.20
	After two months	10	2.33 \pm 3.20	2.21	1.23	0.30-10.00	10	2.73 \pm 1.69	1.05	2.75	0.50-5.34
	After one year	14	0.78 \pm 0.56	0.3	0.6	0.10-2.20	10	1.29 \pm 1.03	0.64	0.8	0.10-3.90
Hg	Before	10	0.53 \pm 0.23	0.14	0.53	0.16-0.83	17	0.44 \pm 0.26	0.12	0.38	0.14-1.00
	After two months	10	0.62 \pm 0.24	0.17	0.56	0.26-1.05	10	0.78 \pm 0.41	0.26	0.77	0.27-1.39
	After one year	14	0.88 \pm 0.29	0.16	0.86	0.31-1.42	10	1.57 \pm 0.92	0.57	1.42	0.16-3.07

† n = Number of shrews sampled; SD = Standard deviation; 95% CI = 95% confidence interval.

Table 2. Cadmium, lead, and mercury concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$; dry weight) in livers and kidneys of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living under sludge-exposed and control conditions, about one year after the sludge application (from 17 July to 14 October 1996). Sewage sludge was applied on 15 and 16 September 1995.

Heavy metals	Control (n† = 32)				Sludge-exposed (n = 32)				Mann-Whitney U test
	Mean \pm SD	95% CI	Median	Range	Mean \pm SD	95% CI	Median	Range	
Liver									
Cd	0.18 \pm 0.02	0.037	0.16	0.05-0.6	0.18 \pm 0.09	0.030	0.17	0.03-0.36	U = 0.02 ; p = 0.8891
Pb	0.04 \pm 0.06	0.032	0	0-0.3	0.11 \pm 0.12	0.002	0.10	0-0.4	U = 8.71 ; p = 0.0045**
Hg	0.003 \pm 0.01	0.002	0	0-0.02	0.002 \pm 0.005	0.002	0	0-0.02	U = 0.05 ; p = 0.8168
Kidney									
Cd	0.89 \pm 0.25	0.250	0.58	0.13-3.5	0.91 \pm 0.97	0.337	0.50	0.1-3.83	U = 0.84 ; p = 0.3618
Pb	0.31 \pm 0.08	0.097	0.22	0-1.34	1.09 \pm 0.74	0.258	0.89	0.15-3.7	U = 54.48 ; p = 0.0001**
Hg	0.06 \pm 0.02	0.015	0.06	0.01-0.17	0.05 \pm 0.03	0.010	0.04	0-0.12	U = 0.51 ; p = 0.4781

† n = Number of voles sampled; SD = Standard deviation; 95% CI = 95% confidence interval.

control voles ($0.3 \mu\text{g g}^{-1}$). However, the maximum concentration of Pb observed in the kidneys from voles captured on treated plots is 2.75 times higher than that of the voles from control plots ($3.7 \mu\text{g g}^{-1}$ and $1.34 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively). In the case of Cd and Hg, there were no significant difference between the voles of control plots and those of the treated plots (Table 2).

DISCUSSION

The application of sewage sludge significantly increased the Pb concentration in voles and the Cd and Hg concentrations in shrews living on the treated plots compared to controls. The voles and the shrews have a different biology and they occupy a different level in the food chain. This would explain the differences in the type of metal that each species tend to accumulate in their tissues. Furthermore, all maximum liver and kidney concentrations observed for Cd, Pb and Hg (control and treated plots) were much lower than those measured in reference sites by other studies on voles and shrews (see Talmage and Walton, 1991 for review).

Liver and Kidneys of Shrews

Cadmium

The sewage sludge application has increased the concentration of Cd in the kidneys of shrews captured on treated plots two months and one year after the application. However, there were no significant effects on the concentration of Cd in the liver arising from sludge application. Differences in accumulation from both tissues may be attributed to the fact that at low contamination levels the kidneys have a tendency to accumulate more easily Cd than does the liver (Hammond and Beliles, 1980). The trace metal concentration in the preys of shrews (essentially invertebrates) has not been analyzed in this study. However, it could be possible that the increased levels observed in shrews from the treated plots indicate a biomagnification along the food chain. Hunter and Johnson (1982) have found such a biomagnification of Cd along the invertebrate/shrew food chain in studies concerning sites contaminated with trace metals. Van Hook and Yates (1975) and Skinner et al. (1978) found Cd biomagnification in terrestrial plant/invertebrate food chains. In the case of the present study, two months after the sludge application, the accumulation of Cd in kidneys may also be attributed, in part, by the direct ingestion of sludge from soil, insects, or grooming. It was observed that the concentrations found in the kidneys had a great variability.

The highest concentration in the kidney was $21.64 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ from a specimen captured two months after the sludge application on a treated plot. Hegstrom (1986) measured high concentrations of Cd in the kidneys of Trowbridge's shrews (*Sorex trowbridgii*) taken from

sludge-treated areas. The mean Cd concentration was $126 \mu\text{g g}^{-1}$, and the shrew did not show any renal damage. The lack of organ damage despite high Cd levels may be explained by the presence of other metal constituents of sewage sludge (Hegstrom, 1986). In particular, the protective action of Zn against organ damage from Cd is well-known (Webb, 1972). In the present study, the tissues were not examined to detect any damage or lesion. It is probable, however, that the concentration of Cd measured did not have any toxic effect on the kidneys (Hegstrom, 1986). However, some authors have found signs of nephrotoxicity in other species with Cd concentrations in kidneys that were lower than the maximum observed concentration in the present study. For example, Leffler and Nyholm (1996) found a proteinuria and an increase in urine production in bank voles (*Clethrionomys glareoleus*) that had Cd concentrations in kidneys as low as about $10 \mu\text{g g}^{-1}$. On their part, Chmielnicka et al. (1989) found in the laboratory rats that the lowest Cd level causing ultrastructural changes in the proximal tubules of kidneys was greater than $21 \mu\text{g g}^{-1}$. Hence, it is difficult to conclude on a possible nephrotoxicity for the species of shrews studied in the present project, for which the maximum mean concentration observed in the kidneys was highest after two months following the sludge application ($10.39 \pm 7.22 \mu\text{g g}^{-1}$), to reach afterwards lower levels around $6.78 \pm 3.58 \mu\text{g g}^{-1}$ one year after.

It also seems that the concentration of Cd in the kidneys had not effect on size population of shrews (Nickelson, 1993). Nickelson (1993) found that the species *Peromyscus sp.* and *Sorex sp.* captured on sites treated with biosolids had similar population levels than control sites. The range of Cd concentration in the kidneys of *Peromyscus sp.* was 0.4 to $11.8 \mu\text{g g}^{-1}$ and for *Sorex sp.* it was 0.4 to $125.0 \mu\text{g g}^{-1}$.

Mercury

An effect of the treatment was observed on Hg concentrations measured in the liver and kidneys of shrews. With time, the concentrations of Hg in the liver and kidneys of shrews captured on treated plots showed a tendency to increase compared with the same tissues of the shrews captured on control plots. One hypotheses could account for this result. This increase with time could be attributed to the chemical transformation of the Hg applied with the sewage sludge. Generally speaking, three chemical forms of Hg exist. These are inorganic, metallic and organic Hg. Each form has specific properties with respect to toxicocynetic and toxic effects. Along the digestive track, the inorganic Hg is practically not absorbed ($< 0.01\%$), metallic Hg is weakly absorbed ($< 0.05\%$), while the organic Hg (methylmercury) is almost totally absorbed (95%)

(Boisset, 1996). In the present study, the Hg present in the sewage sludge may have been essentially in an inorganic or metallic form (this has not been verified in the present study), hence, would have been weakly bioaccumulated by the shrews or their preys. However, with time, the inorganic Hg could have transformed into organic compounds such as methylmercury ($\text{CH}_3\text{-Hg}^+$). This compound is transported principally (90%) by erythrocytes, then it is demethylized in the liver, and then redistributed in the liver, the kidneys and the brain, mainly in an inorganic form (Farris and Dedrich, 1993). It would then be a possibility that the Hg applied initially with the sewage sludge may not have been completely transformed before the last sampling period (one year after the sludge application) and that the concentration of Hg in the kidneys and the liver of shrews captured on treated sites may have continued to increase. Future work will test this hypothesis.

Lead

The highest concentrations of Pb in the tissues of shrews from control and treated plots were measured in both cases two months after the sludge application. There were no significant differences between the two groups. The Pb concentration in the liver and kidneys of shrews captured on site considered non-contaminated is > 2 and $> 5 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively (Getz et al., 1977; Chmiel and Harrison, 1981; Hegstrom and West, 1989; Ma, 1996). In the present study, all maximum mean concentrations (mean + 95% confidence interval) for the control and treated groups before and after sludge application, were below these values. Moreover, all maximum concentrations measured were below the values for which a toxic effect of Pb was observed in mammals (liver: $< 5 \mu\text{g g}^{-1}$; kidneys: $< 10 \mu\text{g g}^{-1}$) (see Ma, 1996 for a review). These informations indicate that the application of sewage sludge is not likely to cause a Pb intoxication for the shrews.

Liver and Kidneys of Voles

The sludge application has increased the concentration of Pb in the kidneys and liver of voles one year after the application. However, for Cd and Hg, there were no significant effects observed. Pb, in both kidneys and liver, has a short half-life (3-4 weeks), thus concentrations measured in these organs reflect recent exposures (Scheuhammer, 1991). One year after the application, there is no more sludge adhering to the various plants or soil on the experimental plots. Hence, it is probable that the Pb measured in the organs of the voles captured on these plots, comes from the ingestion of soil or of plants contaminated by Pb uptake.

The normal Pb concentration in a healthy liver of mammal ranges from 0 to 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ and a concentration of 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ should be considered a sign of Pb intoxication (ADEME, 1995). The maximum concentration observed in the liver of the voles captured on the treated plots was 0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ and lies inside the normal range. In the case of kidneys, the maximum Pb concentration observed was 3.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ in one vole from a treated plot. This concentration does not indicate a Pb intoxication, because Pb poisoning is generally associated with liver concentration of 25 to 35 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ma, 1989) and kidney concentration of 70 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Scheuhammer, 1991) respectively. Intranuclear inclusions were found in the kidneys of rats with renal Pb concentrations of about 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Goyer et al., 1970). Ma (1989) suggested that 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ was an appropriate practical concentration that could be thought of analogous to a LOAEL.

In the present study, the maximum concentration of Cd and Pb observed in the liver and kidneys of voles captured on the treated plots were all below those measured by Anderson et al. (1982) in the same species (*Microtus pennsylvanicus*), following sludge application in semi-natural field conditions. Anderson et al. (1982) concluded that survivorship, longevity, percentage of breeding adults, and recruitment rates were not affected by sludge treatment. Given these results, it is unlikely that the Cd, Pb and Hg applied with the sewage sludge had an effect on the populations and health of the voles (*Microtus pennsylvanicus*) one year after the application.

Study Limitation and Conclusion

Because of the lack of laboratory data on *Microtus pennsylvanicus* and *Blarina brevicauda*, it is difficult to extrapolate the dose/response data from laboratory rodents in an attempt to evaluate the effects of trace metals on survival and reproduction of these two species. This is also true for numerous other wild animals (Shore and Douben, 1994). The accuracy of laboratory derived predictions of the effect of trace metal exposures on small mammals is unknown. This uncertainty may be attributed to inter species variations in sensitivity to trace metals (this would be true for most xenobiotics) and to the variations in toxicological effects and variation in exposure pattern between laboratory and wild animals that are largely unquantified (Shore and Douben, 1994). On the other hand, direct extrapolation of concentration/response data between laboratory and wild animals proves to be adequate to evaluate the effects of metals on specific organs (Shore and Douben, 1994). Much research has still to be done to determine the relationship between sub-lethal concentrations of trace metals measured in tissues of wild animals and their biological signification (toxicity, survival, reproduction, population dynamics,

etc.). This would allow a better level of precision concerning the potential effects of human activities, such as forest land interventions of sewage sludge, on wild animals.

The present study has shown that when the guidelines of the Ministry of Environment of Québec are respected for quality and rates of application, Pb, Cd and Hg applied to forest land through sludge application, present small risks for the health of small mammals (individuals and populations) up to one year after the application. The Hg results suggest that longer-term field studies are necessary in order to evaluate the impact of sludge application.

In the present study, the sludge application increased the background level of certain trace metals for two species of small mammals. Even if this increase is without risks on a relatively short-term basis for these small mammals, the sludge application contributed to increase the background level of the ecosystem in Cd, Pb and Hg. This increase may be considered without risk for the ecosystem with isolated inputs. However, if other sources of contamination are to be considered because of the characteristics of the region (atmospheric fall-outs, etc.), then all the inputs summed together may present a risk for a specific ecosystem through bioaccumulation or biomagnification.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was made possible by the funding from the Ministry of Environment of Québec, the City of Richmond, the University of Sherbrooke and from the Consortium GL-UDA (Gendron Lefebvre inc. and Urgel Delisle & associates inc.). We thank D. Berteaux, V. Bouffard, F. Boulanger and P-É Potié for trapping assistance, A. Leblanc from the Centre de Toxicologie du Québec for chemical analyses, C. Cloutier for her help with SAS analysis, F. Granger and D. Réale for helpful comments on earlier drafts of the manuscript.

REFERENCES

- ADEME, 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. *In* Guides et cahiers: techniques "Connaître pour agir". Collection "Valorisation agricole des boues de stations d'épuration".
- Andersen, C. 1979. Cadmium, lead and calcium content, number and biomass, in earthworms (Lumbricidae) from sewage sludge-treated soil. *Pedobiologia* 19:309-319.
- Anderson, T.J., G.W. Barret, C.S. Clark, V.J. Elia, and V.A. Majeti. 1982. Metal concentration in tissues of meadow voles from sewage sludge-treated fields. *Environ. Pollut.* (Series A) 33:153-162.

- Baker, D.E., M.C. Amacher, and R.M. Leach. 1979. Sewage sludge as a source of cadmium in soil-plant-animal systems. *Environ. Health Perspect.* 28:45-49.
- Beardsley, A., M.J. Vagg, P.H.T. Beckett, and B.F. Sansom. 1978. Use of field vole (*M. agrestis*) for monitoring potentially harmful elements in the environment. *Environ. Pollut.* 16:65-71.
- Beyer, W.N., O.H. Pattee, L. Siloe, D.J. Hoffman, and B.M. Mulhern. 1985. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environ. Pollut. (Series A)* 38:63-86.
- Bingham, F.T., A.L. Page, G.A. Mitchell, and J.E. Strong. 1979. Effects of liming and acid soil amended with sewage sludge enriched with Cd, Cu, Ni and Zn on yield and Cd content of wheat grain. *J. Environ. Qual.* 8:202-208.
- Boisset, M. 1996. Effets toxiques majeurs du mercure et du méthylmercure chez l'animal et chez l'homme. p. 171-176. *In* Ministère du travail et des affaires sociales, direction générale de la santé (ed.) Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Tec et doc, Paris, France.
- Brockway, D.G. 1979. Evaluation of northern pine plantation as disposal sites for municipal and industrial sludge. Ph. D. Thesis, Michigan State University.
- Campa, H., D.K. Woodyard, and J.B. Haufler. 1986. Deer and elk use of forages treated with municipal sewage sludge. p. 188-198. *In* D.W. Cole, C.L. Henry and W.L. Nutter (ed.) The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes. University of Washington Press, Washington, Seattle.
- Chaney, R.L. 1973. Crop and food chain effects of toxic elements in sludges and effluents. p. 129-140. *In* D.R. Wright, R. Kleis and C. Carlson (ed.) Recycling municipal sludges and effluents on land. USEPA/USDA Natl. assoc. of State Universities and land-grant colleges, Washington, D.C.
- Chaney, R.L. 1980. Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. p. 59-83. *In* G. Bitten, B.L. Damron, G.T. Edel and J.M. Davidson (ed.) Sludge-health risks of land application. Ann Arbor Science, Boca Raton, MI.
- Chmiel, K.M., and R.M. Harrison. 1981. Lead content of small mammals at a roadside site in relation to the pathways of exposure. *Sci. Total Environ.* 17:145-154.
- Chmielnicka, J., T. Halateck, and U. Jedlinska. 1989. Correlation of cadmium induced nephropathy and the metabolism of endogenous copper and zinc in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18:268-276.
- Farris, F.F., and R.L. Dedrick. 1993. Absorption of methylmercury from hair ingested by rats. *Life Sciences* 53:1023-1029.

- Gaffney, G. R., and R. Ellenson. 1979. Ion uptake of redwinged black-birds nesting on sludge-treated spoils. p. 507-515. *In* W. Sopper and S. Kerr (ed.) Utilization of municipal sewage effluent and sludge on forest and disturbed land. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Getz, L.L., L. Verner, and M. Prather. 1977. Lead concentrations in small mammals living near highways. *Environ. Pollut.* 13:151-157.
- Goldberg, D.R., and T.M. Yuill. 1990. Effects of sewage sludge on the immune defenses of mallards. *Environmental Research* 51:209-217.
- Goldsmith, C. D., Jr. and P.F. Scanlon. 1977. Lead levels in small mammals and selected invertebrates associated with highways of different traffic densities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17:311-316.
- Goyer, R.A., D.L. Leonard, J.F. Moore, B. Rhyne, and M.R. Krigman. 1970. Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body, an experimental study. *Arch. Environ. Health* 20:705-711.
- Hammond, P.B., and R.P. Beliles. 1980. Chapter 17: Metals. p. 409-468. *In* J. Doull et al. (ed.) Casarett and Doull's toxicology: the basis science of poisons. 2nd ed. Macmillan Publishing Co., New York.
- Hanski, I. 1984. Food consumption, assimilation and metabolic rate in six species of shrews in Finland (*Sorex and Neomys*). *Ann. Zool. Fennici* 21:157-165.
- Harter, R.D. 1983. Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc, and nickel. *Soil Sci. Soc. Am.* 47:47-51.
- Hegstrom, L.J. 1986. Heavy metal accumulation and toxicity in small mammals as a result of sewage sludge application to Douglas-fir forests. *In* S.D. West and R.J. Zasoski (ed.) Nutritional and toxic effects of sewage sludge in forest ecosystems. College of Forest Resources, University of Washington, Washington, Seattle.
- Hegstrom, L.J., and S.D. West. 1989. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage-sludge application to forests. *J. Environ. Qual.* 18:345-349.
- Helmke, P.A., W.P. Robarge, R.L. Korotev, and P.J. Schomberg. 1979. Effects of soil-applied sewage sludge on concentrations of elements in earthworms. *J. Environ. Qual.* 8:322-327.
- Hunter, B.A., and M.S. Johnson. 1982. Food chain relationships of copper and cadmium in contaminated grassland ecosystems. *Oikos* 38:108-117.
- Jing, J., and T.J. Logan. 1992. Effects of sewage sludge cadmium concentration on chemical extractibility and plant uptake. *J. Environ. Qual.* 21:73-81.

- Kelling, K.A., A.E. Peterson, L.M. Walsh, J.A. Ryan, and D.R. Keeney. 1977. A field study of the agricultural use of sewage sludge: I. Effect on crop yield and uptake of N and P. *J. Environ. Qual.* 6:339-345.
- Kuo, S., and A.S. Baker. 1980. Sorption of copper, zinc, and cadmium by some acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:969-974.
- Leffler, P.E., and E.I. Nyholm. 1996. Nephrotoxic effects in free-living bank voles in a heavy metal polluted environment. *Ambio* 25:417-420.
- Linnman, L., A. Anderson, K.O. Nilsson, B. Lind, T. Kjelström, and L. Friberg. 1973. Cadmium uptake by wheat from sewage sludge used as a plant nutrient source. *Arch. Environ. Health* 27:45-47.
- Ma, W.-C. 1989. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18:617-622.
- Ma, W.-C. 1996. Lead in mammals. p. 281-296. *In* W.N. Beyer, G.H. Heinz and A.W. Redmon-Norwood (ed.) *Environmental contaminants in wildlife*. Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London and Tokyo.
- Mesquita, M.E., J.M. Vieira, E Silva, and H. Domingues. 1994. Copper adsorption by a schistic soil. Application of sewage sludge. *Environmental Technology* 15:1089-1094.
- Ministère de l'Environnement du Québec, Ministère des Forêts du Québec, and Ministère de la Santé et des Services Sociaux. 1991. Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guides des bonnes pratiques. Québec. Envirodoq EN910413, QEN/QE/AE/56\1. ISBN 2-550-22516-3.
- Nickelson, S.A. 1993. Long-term responses of small mammals and their habitats to biosolids application on Douglas-fir forests. M.Sc. thesis, University of Washington, Washington, Seattle.
- Pankakoski, E., I. Koivisto, H. Hyvärinen, and J. Terhivuo. 1994. Shrews as indicators of heavy metal pollution. p. 137-149. *In* J.F. Merritt, G.L. Jr. Kirkland and R.K. Rose (ed.) *Advances in biology of shrews*. Carnegie museum of natural history special publication.
- SAS Institute Inc. 1990. SAS/STAT Guide for personal computers, version 6, 4th edition. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Scheuhammer, A.M. 1991. Effects of acidification on the availability of toxic metals and cadmium to wild birds and mammals. *Environ. Pollut.* 71:329-375.
- Shore, R.F., and P.E.T. Douben. 1994. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 134:51-89.

- Skinner, S.K., J.B. Gentry, and J.P. Jr. Giesy, 1978. Cadmium dynamics in terrestrial food webs of a coal ash basin. p. 658-672. *In* D.C. Adriano and I.L. Brisbin, Jr. (ed.) Environmental chemistry and cycling processes. DOE Symp. Series (CONF-760429). Tech. Inf. Ctr., U.S. Dep. of Energy, Oak Ridge, TN.
- Smith, W.H., and J.O. Evans. 1977. Special opportunities and problems in using forest soils for organic waste application. p. 429-454. *In* L.F. Elliott and F.J. Stevenson (ed.) Soils for management of organic waste waters. Am. Soc. Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Talmage, S.S., and B.T. Walton. 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 119:47-145.
- Van Hook, R.I., and A.J. Yates. 1975. Transient behavior of cadmium in a grassland arthropod food chain. *Environ. Res.* 9:76-83.
- Webb, M. 1972. Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 21:2767-2771.
- West, S.D., R.D. Taber, and D.A. Anderson. 1981. Wildlife in sludge-treated plantations. *In* C.S. Bledsoe (ed.) Municipal sludge application to Pacific Northwest forest lands. Contr. no. 41. Inst. of Forest Resource, University of Washington, Washington, Seattle.
- Woodyard, D.K. 1986. Risk evaluation for sludge-borne elements to wildlife food chains. Ph. D. Thesis, Michigan State University.
- Woodyard, D.K., H. Campa, and J.B. Haufler. 1986. The influence of forest application of sewage sludge on the concentration of metals in vegetation and small mammals. p. 199-205. *In* D.W. Cole, C.L. Henry, W.L. Nutter (ed.) The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes. University of Washington, Washington, Seattle.
- Zasoski, R. J. 1981. Heavy metal mobility in sludge amended soils. p. 67-72. *In* C.S. Bledsoe (ed.) Sludge application in Pacific Northwest Forest Lands. Coll. of Forest Resources, University of Washington, Washington, Seattle.

DÉTERMINATION DE CERTAINS PARASITES DANS LE SOL ET DANS LES MICROMAMMIFÈRES SUITE À L'ÉPANDAGE SYLVICOLE DE BOUES D'ÉPURATION

Jean-Marc Bonzom, Rémi Duhamel, Sophie Belleville, et Jean-Marie Bergeron
*Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) J1K 2R1 Canada*

Résumé

*L'épandage sylvicole des boues de station d'épuration des eaux usées municipales en milieu forestier permet d'améliorer la croissance de nombreuses espèces d'arbres. Cependant, les risques de contamination de la faune sauvage par les parasites contenus dans les boues sont une source de préoccupation. Un an après l'épandage de boues liquides d'épuration municipales, les parasites présents dans l'horizon A du sol ont été identifiés dans des parcelles traitées avec des boues et des parcelles témoins (Québec, Canada). En parallèle, les prévalences de certains parasites (helminthes) du tube digestif d'un herbivore, le campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*) et d'un insectivore, la grande musaraigne (*Blarina brevicauda*) ont été comparées entre les deux types de parcelles. Des comparaisons temporelles des prévalences ont été réalisées avant puis deux mois et un an après épandage. Des oeufs d'une espèce de nématode ont été retrouvés en grande quantité, uniquement dans les sols des parcelles traitées. Ces oeufs proviennent probablement des boues. Ces oeufs n'ont pas pu être identifiés. Quand aux micromammifères, l'épandage des boues n'a eu aucun impact sur leurs charges parasitaires internes (dans la cavité générale et le tube digestif). La détermination exacte de ces oeufs de ce type d'oeuf de nématode présents dans les sols traités pourrait permettre d'évaluer les risques environnementaux.*

*Mots clés : Boue d'épuration, parasite, helminthe, sol, *Blarina brevicauda*, *Microtus pennsylvanicus*.*

INTRODUCTION

Les boues de stations d'épuration municipales contiennent des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes (Pimentel *et al.*, 1983; MENVIQ *et al.*, 1991). Les boues constituent un engrais et un amendement organique excellents (Bledsoe, 1981; Henry and Cole, 1983). Leur épandage en milieu forestier permet d'améliorer la croissance de nombreuses espèces d'arbres (e.g. Smith and Evans, 1977; Berry, 1982; Zasoski *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1984; Bonzom *et al.*, 1999). Cependant, la présence de contaminants dans les boues tels que les éléments traces, les composés organiques de synthèse et les organismes pathogènes (bactéries, virus, parasites) soulève des questions quant à leur innocuité pour les écosystèmes forestiers et en particulier pour la faune sauvage. Actuellement, aucune étude n'a été réalisée pour estimer l'infection potentielle de la faune par des organismes pathogènes suite à la valorisation agricole ou sylvicole de boues résiduaires.

Les parasites présents dans les boues sont principalement des organismes d'origine fécale (Berron, 1984). Ils proviennent de fèces humaines, d'animaux domestiques ou d'espèces commensales. Les parasites les plus souvent retrouvés sont des protozoaires et des helminthes, la plupart étant sous forme de kystes ou d'oeufs, viables ou non (Wallis and Lehman, 1983). La présence et l'abondance des parasites dépendent des intrants des boues résiduaires, lesquels sont fonction du degré d'urbanisation, de la saison, du type de traitement des boues, des habitudes sanitaires de la population, et du degré de santé ou du taux de maladie de la population étudiée (Fradkin *et al.*, 1985). Quel que soit le traitement subi par les boues (physique, chimique et/ou biologique), les principaux parasites retrouvés dans les boues sont des nématodes *Ascaris sp.*, *Toxocara sp.*, *Trichuris sp.* (Gaspard *et al.*, 1995; Yanko, 1988); des oxyures (Berron, 1984); des cestodes *Hyemenolepis sp.*, *Taenia sp.* (Gaspard *et al.*, 1995; Yanko, 1988), *Echinococcus granulosus* (Pahren *et al.*, 1979); un trématode *Fasciola hepatica* (Berron, 1984); et des protozoaires *Toxoplasma gondii* (Pahren *et al.*, 1979), *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* (Berron, 1984).

Les oeufs de nématodes et de cestodes (helminthes) sont extrêmement résistants aux différents traitements de stabilisation et d'hygiénisation des boues (Gaspard *et al.*, 1995). Ils peuvent survivre très longtemps dans l'environnement (Strauch, 1998). Le temps de survie au sol des parasites dépend des conditions climatiques, écologiques et édaphiques (Storey et Phillips, 1985). Par exemple, les oeufs d'*Ascaris suum* peuvent survivre plus de 40 ans dans le sol, et d'autres oeufs de parasites entre plusieurs mois et 6 ans (Strauch, 1998). Par leur

biologie, ces parasites représentent un des plus grands risques de contamination de la faune et/ou de l'humain (Pahren *et al.*, 1979).

Jusqu'à présent, les seuls cas connus de contamination par des parasites chez l'humain et le bétail suite à une valorisation agricole, sont liés à l'épandage d'eaux usées ou de boues non-stabilisées (Gauss *et al.*, 1990). Cependant, les risques d'infection encourus par la faune suite à la valorisation agricole ou sylvicole des boues d'épuration n'ont jamais été étudiés. Pourtant, suite à un épandage de boues en milieu forestier, la faune est très exposée aux parasites. Durant les mois qui suivent l'épandage, la faune a encore une relation très étroite avec le milieu traité et se trouve directement en contact avec les boues, donc avec les parasites. La contamination potentielle de la faune va dépendre de la nature des parasites présents, susceptibles ou non d'infecter les espèces fauniques, et de leur persistance dans le milieu. Par contre, la capacité infectieuse du parasite est fonction de son abondance (Fradkin *et al.*, 1985). L'âge et l'état nutritionnel des individus hôtes influencent également leur résistance à l'infection (Nonaka *et al.*, 1994). La dose minimale infectante (DMI), c'est-à-dire la quantité minimale pour laquelle l'animal devrait être malade, est de 1 ou 10 unités/unité de mesure en ce qui concerne les vers et les protozoaires (Fradkin *et al.*, 1985).

Les genres *Ascaris*, *Toxocara* et *Toxascaris* présents dans les boues ont comme hôtes des espèces domestiques et fauniques (Prestwood, 1980). En ce qui concerne les protozoaires, il semblerait que *Giardia sp.* soit l'oocyste le plus susceptible de se développer chez les animaux sauvages (Prestwood, 1980). Le genre *Balliscaris* peut infecter les rats, les mouffettes, les lapins et les marmottes (Prestwood, 1980). Lors d'une étude sur les parasites présents sur les végétaux fertilisés par les boues, les protozoaires *Amoeba sp.*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni* et *Acanthamoeba polyphaga* ont été identifiés. Ce dernier a été reconnu comme virulent chez la souris (Ramirez *et al.*, 1992).

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude de terrain qui ait tenté d'évaluer la charge parasitaire de la faune suite à l'épandage de boues de stations d'épuration en milieu forestier.

L'objectif principal de cette étude fut alors de déterminer la charge parasitaire en helminthes de la faune dans son habitat naturel suite à l'épandage sylvicole de boues liquides de stations d'épuration municipales. L'épandage fut réalisé en respectant la réglementation et les normes du gouvernement québécois pour les sols forestiers (MENVIQ *et al.*, 1991). Plus spécifiquement, les objectifs étaient de comparer (1) les peuplements parasitaires des sols traités par les boues avec ceux des sols témoins, (2) les prévalences de différents helminthes internes chez deux espèces de micromammifères, le campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*) et la grande musaraigne (*Blarina brevicauda*) vivant sur les sites traités avec celles des micromammifères

vivant sur des parcelles témoins, (3) la charge parasitaire entre les campagnols (herbivores) et les musaraignes (insectivores) afin d'évaluer l'impact potentiel à deux niveaux trophiques différents.

Les campagnols et les musaraignes ont été choisis comme espèces bioindicatrices car ces animaux vivent en contact étroit avec les boues et le sol (ils peuvent donc ingérer directement de la boue ou du sol en creusant ou en se toilettant). Ils sont faciles à capturer, ils ont un petit domaine vital et leurs particularités biologiques différentes en font deux espèces bioindicatrices complémentaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Description de l'aire d'étude

L'étude a été réalisée en 1995 et 1996 sur les terrains de l'Université de Sherbrooke, Québec, Canada (45°22'N; 71°55'O). Les travaux ont été menés sur deux parcelles plantées de pins rouge (*Pinus resinosa*) : une parcelle traitée (= T1) et une parcelle témoin (= C1) et sur deux autres sites plantés de chênes rouges (*Quercus rubra*) et blancs (*Quercus alba*) : une parcelle traitée (= T2) et une parcelle témoin (= C2). Chaque parcelle a une superficie d'environ 1 ha. En 1996, la population de campagnols et de musaraignes sur les parcelles C1 et C2 étant très faible, une troisième parcelle de 2 ha a servi de témoin (= C3). Les parcelles témoins (C1 et C2) et traitées (T1 et T2) étaient séparées par un chemin forestier et distantes l'une de l'autre d'environ 200 m. La parcelle témoin C3 était située à environ 900 m des autres parcelles. Une forêt séparait la parcelle C3 des autres parcelles. L'emplacement des parcelles, ainsi que leur pente, rendait impossible toute contamination des parcelles témoins par le ruissellement ou le lixiviat suite à l'épandage des boues sur les sites traités.

Épandage des boues

Les boues provenaient de la station de traitement des eaux usées de la municipalité de Richmond (Québec, Canada). Le traitement des eaux usées y est réalisé dans trois étangs aérés. Les boues épandues provenaient du premier étang dans lequel aucune déphosphatation chimique a été réalisée. Les boues épandues contenaient en moyenne 11,2% de matière sèche. Le taux d'application des boues était approximativement de 200 kg N ha⁻¹ (soit environ 39 à 44 t ha⁻¹ de boue sur une base de matière sèche), ce qui représente le taux maximum d'application en forêt, par période de 10 ans, selon la réglementation de 1991 éditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ *et al.*, 1991). L'épandage a eu lieu les 15 et 16 septembre 1995.

Échantillonnage du sol

Des prélèvements de sol ont été réalisés en août 1996, soit 12 échantillons dans chacune des parcelles traitées T1 et T2 (= 24 échantillons traités) et 24 échantillons dans la parcelle témoin C3. L'échantillonnage a été effectué de façon aléatoire. Avant de prélever un échantillon de terre, la végétation a été coupée sur une surface d'environ 25 cm². Les 5 premiers cm de l'horizon A ont été récoltés et homogénéisés pour prévenir l'agrégation des oeufs de parasites. Les échantillons ont été conservés à 4°C avant analyse.

Extraction et observation des parasites

Pour chacun des échantillons, 5 g de terre ont été mélangés à 10 mL d'eau. Le mélange a été filtré sur une gaze et la solution résultante a été centrifugée à 1500 tours/min. pendant 15 min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été mélangé, dans le même tube, à une solution saturée en glucose. L'ensemble a été centrifugé à 1500 tours/min. pendant 15 min., une lamelle étant posée sur le ménisque formé en haut du tube. La lamelle a été ensuite déposée sur une lame et les parasites (œufs et kystes) ont été comptés et identifiés sous microscope (x10 ou x40). Le sol contient naturellement de nombreux nématodes (et donc leurs oeufs), mais peu d'entre eux sont des parasites. Puisque cette étude est focalisée sur les pathogènes potentiels pour la faune sauvage et les humains, seuls les oeufs qui ont déjà été identifiés dans la littérature comme provenant de parasites ont été pris en considération. Les oeufs ont été identifiés sur la base de critères morphologiques. Pour chaque espèce de parasite, un oeuf ou un kyste représentatif a été photographié.

Échantillonnage des campagnols et des musaraignes

Une première série de piégeages a été effectuée avant la date d'épandage, entre le 3 et le 10 septembre 1995. Après l'épandage, deux autres piégeages ont suivi : environ deux mois après l'épandage (du 7 au 16 novembre 1995) et un an après (du 17 juillet au 14 octobre 1996). Les stations de piégeage étaient espacées de 10 mètres à l'intérieur d'un plan quadrillé comptant 90 stations. Ce plan quadrillé tenait compte de l'effet de bordure pour s'assurer que les animaux faisaient réellement partie de la zone étudiée. Ainsi, un espace de 10 mètres a été respecté entre la limite de la parcelle et les premiers pièges.

Les campagnols et musaraignes adultes ont été capturés à l'aide de pièges à prise morte de type Victor et Museum Special (automne 1995). En 1996, les animaux ont été capturés à l'aide de pièges à prise vivante de type Sherman appâtés au beurre d'arachides. En été, nous suspectons que certains individus pouvaient se déplacer sur de grande distance. Pour être certain que les

animaux capturés étaient bien des résidents des parcelles étudiées, seuls les individus adultes (> 20 g) capturés deux fois consécutives ont été considérés comme résidents (Blair, 1951; Jons, 1990), les animaux étant identifiés en amputant la première phalange d'un ou plusieurs orteils (Pavone and Boonstra, 1984). Tous les animaux piégés ont été conservés dans un congélateur à - 20°C jusqu'à analyse. L'expérience a été approuvée par le Ministère de l'Environnement du Québec et par le Conseil canadien pour le bien être animal.

Prélèvement et identification des parasites des micromammifères

Les parasites ont été recherchés dans la cavité abdominale et dans le système digestif des individus. La dissection du tube digestif a permis l'étude des parasites intestinaux sous une loupe binoculaire au grossissement 16 x. Le tube a été coupé en 4 sections d'égales longueurs examinées séparément (Shimakuro *et al.*, 1995). Le poids et le sexe des individus ont été notés. Les parasites recueillis ont été fixés dans l'alcool à 70% bouillant, puis conservés dans l'alcool à 70%. L'identification a été effectuée d'après les travaux de classification de Zornowski (1960), Vaucher (1971), Vaucher et Durette-Desset (1973) et Genov (1984).

Analyses statistiques

Parasites du sol

Les données des prélèvements de sol ont été analysées en comparant la prévalence (nombre d'échantillons contenant des oeufs/nombre total d'échantillons) de chaque type d'oeufs et de kystes dans les parcelles traitées et les témoins. Des tests de Khi carré ont été utilisés pour ces comparaisons.

Parasites des micromammifères

Pour chacune des deux espèces de micromammifères et pour chaque période d'échantillonnage, des tests de Khi carré ou la méthode exacte de Fisher ont été appliqués pour comparer la prévalence (nombre d'individus parasités/nombre total d'animaux examinés) de tous les parasites trouvés dans les animaux de parcelles traitées et témoins. La méthode exacte de Fisher a été utilisée lorsque les effectifs des échantillons s'avéraient très faibles (l'effectif total n est inférieur à 20). Une comparaison a été aussi réalisée pour chaque espèce de parasite.

Un test de Khi carré a été utilisé pour comparer la prévalence des parasites entre les musaraignes et les campagnols dans les deux types de parcelles.

Le test exact de Fisher a été appliqué pour comparer les prévalences des parasites dans les micromammifères entre les différentes périodes d'échantillonnage des parcelles traitées et témoins.

RÉSULTATS

Sol

Dans les échantillons de sol, des kystes de coccidies et les oeufs de trois espèces de nématodes (*Capillaria sp.*, *Ascaris sp.* et un oeuf non identifié d'une taille de 60 X 50 μm) ont été trouvés. La larve contenue dans l'oeuf était animée de mouvement. Cet oeuf est en cours d'identification. Seule la prévalence dans le sol de ce nématode non déterminé diffère significativement entre les parcelles traitées et témoins ($\chi^2 = 21.09$, $p < 0.001$; Tableau 1). Il n'existe aucune différence significative entre les parcelles témoins et les traitées pour les autres espèces.

Musaraignes

Avant l'épandage des boues, puis deux mois et un an après, un total de 10 animaux par parcelle (T1, T2, C1 et C2) et par période de capture ont été piégés.

Avant l'épandage des boues, aucun parasite n'a été trouvé dans les musaraignes examinées (ni dans le site traité, ni dans le témoin). Environ deux mois après l'épandage des boues, aucune différence statistiquement significative entre les animaux traités et les témoins n'a été décelée (test exact de Fisher). Deux animaux témoins ($n = 10$) et deux traités ont été trouvés avec des *Taenia sp.* Pour les animaux capturés un an après l'épandage, aucune différence statistiquement significative entre les sites traités et les témoins n'a été découverte (test exact de Fisher). Les parasites retrouvés ont été des *Taenia sp.*, des *Ascaris sp.* et une douve (Tableau 2).

Tableau 1. Prévalence des kystes et des oeufs de différentes espèces de parasites retrouvés dans les échantillons de sol des parcelles témoins ($n = 24$) et traitées ($n = 24$), environ un an après l'épandage des boues d'épuration.

Parasite	Prévalence dans le sol		χ^2	p
	Parcelles traitées	Parcelles témoins		
Kystes de Coccidies	0/24	2/24	3,57	ns
Capillaria sp.	1/24	0/24	0,00	ns
Ascaris sp.	2/24	3/24	0,01	ns
Nématode (indéterminé)	16/24	0/24	21,09	$p \leq 0,001$

Tableau 2. Prévalence des parasites dans les grandes musaraignes (*Blarina brevicauda*) vivant sur les parcelles traitées et témoins, en fonction des périodes d'échantillonnage. Les parasites ont été recherchés dans le tube digestif et la cavité interne des musaraignes. 10 musaraignes ont été échantillonnées par parcelle et par période de piégeage.

Parasite	Parcelles traitées Parcelles témoins		Test exact de Fisher	p
	Période d'échantillonnage			
Aucun	Avant épandage des boues		1,00	ns
	0/10	0/10		
Taenia sp.	Deux mois après épandage		0,42	ns
	2/10	2/10		
Taenia sp.	Un an après épandage		0,32	ns
	5/10	4/10		
Ascaris sp.	2/10	2/10	0,42	ns
Douve	0/10	1/10	0,50	ns
Tous parasites confondus	6/10	7/10	0,33	ns

Campagnol

Deux mois après l'épandage des boues, le nombre de campagnols capturés sur les parcelles traitées et témoins était trop faible pour permettre une quelconque analyse statistique. Par contre, un an après l'épandage des boues, un total de 32 campagnols a été capturé sur les parcelles traitées (T1 et T2) et 30 autres sur la parcelle témoin (C3).

Deux espèces de parasites ont été identifiées. Une larve de cestode a été retrouvée chez deux individus témoins, et 3 cestodes chez un autre animal témoin (n = 32). Par contre, 14 animaux témoins (n = 32) et 14 animaux traités (n = 30) ont été infectés par une espèce de nématode, *Syphacia obevelata*. Il n'existe aucune différence statistiquement significative entre la prévalence des différents parasites des animaux témoins et traités (test du Khi carré; Tableau 3).

Tableau 3. Prévalence des parasites dans le tube digestif et la cavité interne des campagnols des champs (*Microtus pennsylvanicus*) vivant sur les parcelles traitées (n = 32) et témoins (n = 30), environ un an après l'épandage des boues d'épuration.

Parasite	Prévalence dans les campagnols		χ^2	p
	Parcelles traitées	Parcelles témoins		
Syphacia obevelata	14/30	14/32	0,00	ns
Cestode	0/30	3/32	1,27	ns
Tous parasites confondus	14/30	14/32	0,00	ns

Tableau 4. Comparaisons interspécifiques entre les prévalences des parasites de micromammifères dans les parcelles témoins et traitées, environ un an après l'épandage des boues.

	Campagnols	Musaraignes	χ^2	p
Parcelles traitées	14/30	6/10	0,13	ns
Parcelles témoins	14/32	7/10	1,18	ns

En ce qui concerne la comparaison des prévalences des parasites entre les musaraignes et les campagnols, il n'existe aucune différence significative, entre les animaux vivant dans les parcelles traitées et ceux vivant dans les parcelles témoins (Tableau 4).

Comparaison temporelle

La comparaison temporelle des prévalences de parasites dans les musaraignes provenant de parcelles témoins et traitées révèle trois différences statistiquement significatives (Tableau 5). Que ce soit sur les parcelles traitées ou témoins, la prévalence des parasites, un an après l'épandage, est supérieure à celle précédant l'épandage (traitées : Test exact de Fisher = 0,01; $p < 0,05$; témoins : Test exact de Fisher = 0 ; $p < 0,05$). Il existe pour les parcelles témoins une différence entre la prévalence des parasites deux mois (2/10) et un an (7/10) après l'épandage (Test exact de Fisher = 0,03, $p < 0,05$; Tableau 5).

Tableau 5. Comparaison temporelle entre les prévalences des parasites dans les musaraignes provenant des parcelles témoins (n = 10) et traitées (n = 10).

Périodes d'échantillonnage	Parcelles traitées			Parcelles témoins		
	Prévalence	Test exact de Fisher	p	Prévalence	Test exact de Fisher	p
Avant épandage des boues	0/10	0,24	ns	0/10	0,24	ns
Deux mois après épandage	2/10			2/10		
Avant épandage des boues	0/10	0,01	< 0,05	0/10	0	< 0,05
Un an après épandage	6/10			7/10		
Deux mois après épandage	2/10	0,08	ns	2/10	0,03	< 0,05
Un an après épandage	6/10			7/10		

DISCUSSION

Les oeufs de parasites retrouvés dans le sol correspondent à trois espèces de nématodes et à une espèce de protozoaire. Ceci s'explique, en partie, par la méthode utilisée pour extraire les oeufs ou kystes du sol. Effectivement, la méthode par flottation ne semble pas adaptée à l'extraction des oeufs de cestodes et de trématodes (Wallis *et al.*, 1984).

Au niveau du sol, seuls des oeufs d'une espèce de nématode ont une plus grande prévalence dans les parcelles traitées que dans les parcelles témoins (Tableau 1). Il est possible que ce parasite provienne des boues. En effet, ces oeufs ont déjà été trouvés dans des boues non-traitées provenant de la ville de New-York (Berk et Gunderson, 1993). Les oeufs de nématode sont très résistants à tous les types de traitement que peuvent subir les boues (Gaspard *et al.*, 1994). La présence de ces oeufs dans les boues épandues n'est donc pas surprenante. Il a été remarqué que les larves contenues dans les oeufs étaient animées de mouvement. Il serait cependant nécessaire de réaliser des tests de viabilité pour déterminer plus précisément la capacité d'infection de ces larves. De plus, il serait intéressant de connaître le type d'hôte qu'elles peuvent infecter pour évaluer les risques environnementaux associés à celles-ci. Jusqu'à présent, ces oeufs n'ont pas pu être identifiés.

L'identification des peuplements parasitaires des sols a été réalisée seulement un an après l'épandage. Entre l'épandage et la période d'échantillonnage du sol (un an après l'épandage), il est possible que des oeufs ou des kystes apportés par les boues aient disparu des parcelles traitées. En effet, les oeufs et les kystes ont une durée de survie qui dépendant des conditions

climatiques et notamment la température, l'humidité, la lumière. Des températures élevées, une forte exposition aux ultraviolets et un faible taux d'humidité diminuent le temps de survie des oeufs et kystes (Wallis et Lehman, 1983; Berron, 1984). De plus, les parasites peuvent être entraînés par les eaux de précipitation jusqu'à une profondeur de 20 cm (Hays, 1977; Storrey et Phillips, 1985). Cependant, la majorité des parasites sont dans les 5 premiers centimètres de l'horizon A du sol.

Le nématode d'espèce indéterminée n'a été retrouvé ni dans le tube digestif des campagnols, ni dans celui des musaraignes. Il se peut que ce parasite n'infecte aucune des espèces des micromammifères étudiés. Par contre, s'il est susceptible de les parasiter, il peut aussi se localiser dans une autre partie de l'organisme (foie, poumons, coeur, cerveau) que celle reliée au tube digestif explorée dans cette étude, et donc passer inaperçu dans nos résultats. Dans ce cas, seule l'identification et donc la connaissance du cycle de reproduction de ce parasite permettra de le localiser dans le corps de l'hôte.

Concernant les prévalences de parasites des micromammifères, les résultats suggèrent qu'il n'y a aucun impact additif des boues. Un apport de boues ne semble pas entraîner la présence de nouvelles espèces de parasites dans le tube digestif et la cavité générale de la grande musaraigne et du campagnol, et ne semble pas augmenter la charge parasitaire de ces micromammifères de façon significative (Tableaux 2 et 3). La charge parasitaire des musaraignes n'est pas supérieure à celle des campagnols, contrairement aux résultats obtenus par Soveri *et al.* (1994). Par une étude histopathologique, ces auteurs ont trouvé que les musaraignes communes (*Sorex araneus*) avaient plus de parasites que les campagnols (*Microtus agrestis*). Ceci s'expliquerait par le fait que le taux métabolique des musaraignes est nettement supérieur à celui des campagnols. Les musaraignes sont donc dépendantes d'un apport constant et élevé de nourriture pouvant être contaminée par les boues résiduaires (Hanski, 1984). Ainsi, les musaraignes auraient une plus grande probabilité d'ingérer des parasites que les campagnols. Mais il faut aussi tenir compte du fait que ces deux espèces de micromammifères ont deux niches écologiques et deux régimes alimentaires différents.

La comparaison temporelle des prévalences de parasites dans les musaraignes confirme que la fertilisation par les boues ne semble avoir aucun impact sur leur charge parasitaire (Tableau 5). Globalement, nous avons noté une charge et une diversité de parasites accrue un an après l'épandage (Tableau 2).

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'épandage de boues résiduaires ne semble pas avoir augmenté la charge en helminthes dans la cavité générale et le tube digestif des campagnols des champs et de la grande musaraigne. Par contre, suite à l'épandage des boues, le sol semble

avoir été contaminé par une espèce de nématode. Seule la détermination exacte de cet oeuf de nématode pourrait permettre d'évaluer les risques environnementaux associés aux boues. Actuellement, suite à un épandage de boues en milieu forestier, il n'existe pas d'autres études qui aient tenté d'évaluer l'impact des épandages de boues sur la charge parasitaire de la faune. D'autres travaux sont encore nécessaires pour compléter nos résultats, de façon à s'assurer que d'autres espèces de parasites, différentes des helminthes, ne viennent pas augmenter les risques de contamination des animaux et des humains fréquentant les sites valorisés.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. Alain Villeneuve de nous avoir accueilli dans son laboratoire de parasitologie de l'école vétérinaire de St-Jean-sur-Richelieu (Québec, Canada) et de nous avoir initié aux méthodes de recherche et de détermination des oeufs de parasites dans les sols. Cette recherche a pu être réalisée grâce aux subventions de recherche de Jean-Marie Bergeron, obtenues du Conseil canadien de la recherche en sciences naturelles et en ingénierie.

RÉFÉRENCES

- Bonzom J.-M. (1999) . L'asymétrie fluctuante : un biomarqueur morphométrique pour évaluer la qualité de l'environnement. Ph.D. thesis, Université de Sherbrooke, Canada.
- Berk, S. G. & Gunderson, J. H. (1993). *Wastewater Organisms. A Color Atlas*. Press CRC, Inc., Floride.
- Berron, P. (1984). Valorisation agricole des boues de stations d'épuration : aspects microbiologiques. T.S.M. (L'eau novembre), **11**, 549-556.
- Berry, C. R. (1982). Dried sewage sludge improves growth of pines in the Tennessee Copper Basin. *Reclam. Reveg. Res.*, **1**,195-201.
- Blair, W. F. (1951). Population structure, social behavior, and environmental relations in a natural population of the beach mouse (*Peromyscus polionotus leucephalus*). *Contributions from the laboratory of vertebrate Biology, University of Michigan*, **48**, 1-47.
- Bledsoe, C. S. (1981). Municipal sludge application to Pacific Northwest forest lands. *Institute of Forest Resources Contribution 41*, College of Forest Resources, University of Washington, Seattle.
- Cole, D. W., Rinehart, M. L., Briggs, D. G., Henry, C. L. & Mecifi, F. (1984). Response of douglas-fir to sludge application: volume growth and specific gravity. *Proceedings of TAPPI*

- Research and Development Conference. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Technology Park, Atlanta, Georgia, Appleton, Wisconsin, pp. 77-84.
- Fradkin, L., Lutkenhoff, S., Stara, J., Lomnitz, E. & Cornaby, B. (1985). Feasibility for performing a risk assessment on pathogens. *Journal WPCF*, **57**, 1183-1188.
- Gaspard, P. G., Wiart, J. & Schwartzbrod, J. (1995). Urban sludge reuse in agriculture: waste treatment and parasitological risk. *Bioresource Technology*, **52**, 37-40
- Gaspard, P. G., Wiart, J. & Shwartzbrod, J. (1994). Urban sludge reuse in agriculture: waste treatment and parasitological risk. *Bioresource Technology*, **52**, 37-40.
- Gaus, J., Brallier, S., Harrison, R. B., Coveny, S. & Dempsey, J. (1990). *Literature Review on Pathogen Survival and Transport in Sludge Amended Soil - Draft copy*. College of Forest Resources, University of Washington, Washington, Seattle.
- Genov, T. (1984). Helminths of insectivorous mammals and rodents in Bulgaria. House of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria.
- Hanski, I. (1984). Food consumption, assimilation and metabolic rate in six species of shrews (*Sorex* and *Neomys*). *Ann. Zool. Fenn.*, **21**, 157-165.
- Hays, B. D. (1977). Potential for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. *Water Research*, **2**, 583-595.
- Henry, C. L. & Cole, D. W. (1983). *Use of Dewatered Sludge as an Amendment for Forest Growth*. Institute of Forest Resources, University of Washington, Seattle.
- Jons, E. N. (1990). Effects of forage availability on home range and population density of *Microtus pennsylvanicus*. *J. Mamm.*, **71**, 381-89.
- Ministère de l'environnement du Québec, Ministère des forêts du Québec & Ministère de la santé et des services sociaux. (1991). *Valorisation Agricole des Boues des Stations d'Épuration des Eaux Usées Municipales - Guide des Bonnes Pratiques*, Québec (ISBN 2-550-26359-6).
- Nonaka, N., Iwaki, T., Okamoto, M., Ooi, H. K., Oku, Y., Ohbayashi, M. & Kamiya, M. (1994). Infectivities of four isolates of *Taenia taeniaeformis* to various rodents. *J. Vet. Med. Sci.*, **56**, 565-567.
- Pahren, H. R., Lucas, J. B., Ryan, J. A., & Dotson, G. K. (1979). Health risks associated with land application of municipal sludge. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. *Journal WPCF*, **81**, 2588-2601.
- Pavone, L. R. & Boonstra, R. (1984). The effect of toe clipping on the survival of meadow vole *Microtus pennsylvanicus*. *Can. J. Zool.*, **63**, 499-501
- Pimentel, D., Berardi, G. & Fast, S. (1983). Energy efficient of farming systems: organic and conventional agriculture. *Agric. Ecosys. Environ.*, **9**, 359-372.

- Prestwood, A. K. (1980). Disease transmission by wild animals from sludge-amended land. In *Sludge-Health Risks of Land Application*, ed. G. Bitton. Ann Arbor Science, Boca Raton, MI, pp. 210-212
- Ramirez, E., Warren, A., Rivera, F., Bonilla, P., Rodriguez, S., Calderon, A., Ortiz, R. & Gallegos, E. (1992). An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in an activated-sludge plant. *Water, Air and Soil Pollution*, **69**, 135-139.
- Shimabukuro, I., Hasegawa, H., Kobayashi, J., Hongvanthong, B. & Sato, Y. (1995). Redescription of *Strongyloides akbari* Mirza and Narayan, 1935 (Nematoda: Strongyloididae), an oviviparous parasite of *Suncus murinus* (Insectorova). *Jpn. J. Parasitol.*, **44**, 298-305.
- Smith, W. H. & Evans, J. O. (1977). Special opportunities and problems in using forest soils for organic waste application. In *Soils for Management of Organic Waste Waters*, ed. L.F. Elliott and F.J. Stevenson. Am. Soc. Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 429-454.
- Soveri, T., Rudbäck, E. & Henttonen, H. (1994). Histopathology of the common shrew *Sorex araneus* in Finland. *Special Publication Carnegie Museum of Natural History*, **1**, 151-153.
- Storey, G. W. & Phillips, R. A. (1985). The survival of parasite eggs throughout the soil profile. *Parasitology*, **91**, 585-590.
- Strauch, D. (1998). Pathogenic micro-organisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertiliser. *European Water Management*, **1**, 12-26.
- Vaucher, C. & Durette-Desset, M-C. (1971). Nématodes Heligmosomes parasites d'Insectivores Soricides de la région holarctique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **48**, 135-167.
- Vaucher, C. (1971). Les cestodes parasites des Soricidae d'Europe. Étude anatomique, révision taxonomique et biologie. *Rev. Suisse Zool.*, **78**, 1-113.
- Wallis, P. M. & Lehmann, D. L. (1983). *Biological Health Risks of Sludge Disposal to Land in Cold Climates*. University of Calgary Press, Calgary.
- Wallis, P. M., Lehmann, D. L., Mac Millan, D. A. & Buchanan-Mappin, J. M. (1984). Sludge application to land compared with a pasture and a hayfield: reduction of biological health hazard over time. *J. Environ. Qual.*, **13**, 645-650.
- Yanko, W. A. (1988). *Occurrence of Pathogens in Distribution and Marketing Municipal Sludges. A Project Summary*. Nat. tech. inf. serv. PB88-154 273/AS U.S.E.P.A. Springfield, Nevada.

- Zarnowski, E. (1960). Parasitic worms of forest micromammals (Rodentia and Insectivora) of the environment of Pulawy (district Lublin). II. Trematoda. *Acta Parasitol. Pol.*, **8**, 127-167.
- Zasoski, R. J., Cole, D. W. & Bledsoe, C. S. (1983). Municipal sewage sludge use in forests of the Pacific Northwest, U.S.A. : Growth responses. *Waste Manage. Res.*, **1**, 103-114.

CHAPITRE 3

L'ASYMÉTRIE FLUCTUANTE COMME OUTIL COMPLÉMENTAIRE POUR ÉVALUER L'IMPACT DES BOUES

Note 1. Procedure with papain enzyme to clean bones of small mammals. *Journal of Mammalogy* (soumis).

Publication 2. Part I. Fluctuating asymmetry of voles as a biomonitor of sewage sludge application to forests. *Journal of Environmental Quality* (soumis).

Publication 3. Part II. Fluctuating asymmetry of *Pterostichus melanarius* (coleoptera: carabidae) as a biomonitor of sewage sludge application to forests. *Journal of Environmental Quality* (soumis).

Dans le chapitre précédent, seul l'impact de certains contaminants sur la qualité de l'environnement a été évalué. Dans ce chapitre, le concept d'instabilité du développement a été utilisé comme méthode globale d'évaluation de la santé de l'écosystème forestier. L'instabilité du développement, plus précisément l'asymétrie fluctuante, a été mesurée chez deux espèces : un micro-mammifère herbivore, le campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*) et un insecte prédateur (*Pterostichus melanarius*). À travers la lecture des publications 2 et 3, le lecteur découvrira toute l'importance d'utiliser différentes espèces pour évaluer la qualité de l'environnement.

Le concept d'instabilité du développement n'avait jamais été utilisé dans le contexte des épandages de boues, pourtant elle offre de nombreux avantages (voir Publication 2 et 3 de ce chapitre). Ce travail devrait contribuer à valider et à promouvoir l'utilisation de l'instabilité du développement des organismes dans les programmes de surveillance de la santé des écosystèmes.

Au début de ce chapitre, nous présentons une note concernant la procédure utilisée pour préparer les os de campagnols sur lesquels les mesures d'asymétrie fluctuante ont été réalisées (Note 1).

Cette note devrait intéresser toutes les personnes qui doivent travailler à partir des os de micromammifères.

PROCEDURE WITH PAPAIN ENZYME TO CLEAN BONES OF SMALL MAMMALS

Jean-Marc Bonzom, Frank Sirieix, Geneviève Labrie, and Jean-Marie Bergeron

Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Qc), J1K 2R1, Canada

We report a complete and detailed procedure with papain enzyme to clean bones of small mammals. The procedure was applied on voles (*Microtus pennsylvanicus*) to measure the fluctuating asymmetry of bony structures. Bones did not break in the process but 40 % of epiphysis of the humerus and 28 % of femurs were separated from diaphyses in young animals because the cartilage was digested by papain. Similarly, 22 % of the skulls were disarticulated. Adequately used, the papain method rapidly yields good quality bones from a large number of small mammals for morphometric measures.

Key words: morphometry, fluctuating asymmetry, vole, *Microtus pennsylvanicus*, papain, maceration, bone.

Our project aimed to measure the fluctuating asymmetry (i.e. small random deviations from perfect bilateral symmetry) of voles (*Microtus pennsylvanicus*) to investigate the impact of municipal liquid sewage sludge application in young forests. The estimation of fluctuating asymmetry of small mammals, based on length of bones or on the number of foramina of some bones, can be a powerful biotest to assess environmental or genetic stresses (e.g., Leamy, 1984, 1997; Pankakoski *et al.*, 1992; Borisov *et al.*, 1997; Zakharov *et al.*, 1997; Zakharov and Sikorski, 1997).

Bone measurements of small mammals are still used in several fields of research. For example, morphometric bone measurements can help to draw a subspecific distinction within a species, e.g. *Monodelphis brevicauda* (Ventura *et al.*, 1998). Skeletal characters can help to distinguish species without laborious allozymic, karyotypic, or other molecular determinations, as done for example, for the genus *Geomys* (Mauk *et al.*, 1999).

Generally, great precision is needed for these studies, and therefore measures must be made on intact bones. For example, the fluctuating asymmetry is exceedingly subtle (generally <

TABLE 1.—Material and methods published to prepare skeletons of small mammals with papain enzyme. n.a. = not available.

	Luther (1949)	Searle (1954)	Hanski and Kuitunen (1986)	Pankakoski and Hanski (1989)	This study
Species	Mouse	Mouse	Shrew	Shrew	Vole
Body mass (g) (average \pm SD)	n.a.	17.90 \pm 0.2	n.a.	n.a.	35.9 \pm 14.39
Bones	Whole animal	Whole animal	Whole animal	Head	Whole animal
Animal preparation	Eviscerated and skinned	Eviscerated and skinned	Skinned	Eviscerated and skinned	Eviscerated and skinned
Time to boil carcasses	10 min.	5 min	5 min	5 min	30 min
Type of enzyme	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Non purified
Enzymatic concentration	About 100 cc of a freshly prepared 1 % solution of powdered papain in saline solution	Isotonic saline solution + a pinch of powdered papain	Searle's method (1954)	About 60 mg of papain in 150 ml of 0.9 % NaCl solution	60 mg of powdered papain in 150 ml of 0.9 % NaCl solution prepared with demineralized water
Temperature of incubation	37° C	38° C	38° C	38° C	38° C
Time of maceration	< 24 h	2 days	2-4 days	2-3 days	62 hours
Method to stop the enzymatic reaction	Boiled for a few minutes	n.a.	n.a.	n.a.	Wash in water and dry in oven at 80° C for 72 hours
Proportion of bones damaged	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Yes (see the text)

5 % and often < 1 % of trait size) (Palmer, 1994). Moreover, large sample sizes are necessary for conducting such studies, which implies the use of a rapid method of bone cleaning. Cleaning with chemicals, such as the proteolytic papain enzyme, is likely to be the most rapid and appropriate method to remove flesh from large samples of small mammals (Luther, 1949; Searle, 1954; Hanski and Kuitunen, 1986; Pankakoski and Hanski, 1989). However, to date, there are no publications precisely detailing the papain enzyme method (Table 1).

Based on our vole study, and on previous works (Luther, 1949; Searle, 1954; Pankakoski and Hanski, 1989) we report here a complete and detailed procedure of maceration with the papain enzyme which can be easily applicable for cleaning bones for large samples of small mammals.

MATERIALS AND METHODS

Sixty voles were captured in Sherman traps in sapling plantations on the campus grounds of the Université de Sherbrooke, Québec, Canada (45°15'N, 72°00'E) from 1 August to 10 September 1997. The average mass of captured animals (n = 60) was 35.9 g (\pm 14.39). Animals were euthanized and the carcasses were kept at - 20° C until analysis.

The animals were eviscerated, skinned, and marked with metallic rings around the abdomen. They were boiled together in water for 30 minutes, then individually introduced in glass jars containing a freshly prepared papain solution at 38° C (60 mg of papain in 150 mL of 0.9% NaCl solution prepared with demineralized water). Jars were carefully stirred once a day. We used non purified papain P-3375 (Sigma Chemical) that was ground before use. The state of tissue loss (bone cleaning) was checked every 12 hours. We removed carcasses after 62 hours because bones were clean of their tissues. This elapsed time of maceration compares well with maceration times reported by other studies, which vary between 2 and 3 days (Searle, 1954; Pankakoski and Hanski, 1989). After exposure to papain, bones were removed from the solution and washed in water. Next, bones of each individual were dried on blotting paper, then placed in a drying oven at 80°C for 72 hours to stop the enzymatic reaction. If this last stage is not properly carried out, bones are unsuitable for long-term preservation (Williams *et al.*, 1977). Boiling for a few minutes is usually required to neutralize the activity of papain, but this is not quite practical nor rapid when using a large sample of skeletons, because each animal must be boiled separately.

To assess the success rate of the method, we calculated the relative percentage of disarticulated bones and the relative percentage of broken bones. We define bone disarticulation

as the separation of the bone (skull, femur, humerus) into several pieces due to the digestion of cartilage by papain (example: the separation of the epiphyses from the diaphysis, for humerus or femur). In all other cases, if bones were not intact, they were considered as broken.

RESULTS AND DISCUSSION

After 62 hours of maceration, carcasses were thoroughly cleaned. The brain however was still encased in the skull, in all the case. No bone was broken, but 22 % of the skulls ($n = 60$), 40 % of the humerus and 28 % of the femurs were disarticulated ($n = 120$ for both sides). Small fragments of flesh were still present on some bones, but they could be removed easily by rinsing. The humerus and femur disarticulations were due to the separation of the epiphyses from the diaphyses. For young animals, epiphyses and diaphyses are linked together with cartilage, which was destroyed by papain (Luther, 1949). For the same reasons, even for adult voles, sutures between bones of the braincase opened, making metric measurements of the braincase impossible. Pankakoski and Hanski (1989) noted the same drawbacks with shrews cleaned with papain for more than 3 days. To keep skulls intact and usable for foramen counts, they recommended soaking the skulls for less than 72 hours in the enzyme solution, then cleaning the residual soft tissues in water under a microscope using a small brush with the hair cut short (Pankakoski and Hanski, 1989). From our results, 62 hours of maceration was sufficient to remove all flesh from the bones. A shorter period would permit a reduction in disarticulation, but would increase the amount of flesh attached to bones. Morphometric measures on bones to estimate fluctuating asymmetry can be realized from the diaphyses, so that disarticulation of bones does not cause any bias in measurements. The skulls that were disarticulated after 62 hours of digestion belonged to animals weighing less than 23 g. Therefore, the maceration period of 62 hours is appropriate for voles larger than 23 g. Skulls, however, should be digested for shorter periods even if this increases the time spent to manually clean muscular tissues afterwards.

Bones break when the maceration solutions falls below pH 7.0 because the acidity dissolves the bones (Güntert, pers. comm.). According to Troxler and Schneppat (pers. comm.) of the Natural History Museum of Berne (Switzerland), the pH can drop very quickly below 6.0 during the maceration period. We advise maintaining a pH between 8.0 and 9.0 with NaOH addition. A pH of 8.5 is optimal for the enzymatic activity. In our study, this procedure was not used because we aimed at reducing handling time with the papain method. The absence of broken bones suggests that the risk of damaging these structures from low pH is small.

However, the material used in the present study is different from that of the Natural History Museum of Berne. Their maceration solution is made of 1000 mL tap-water, 10g NaCl, 0.5g emulsify liquor: Remolgan PM, 0.5 g bactericid: Mollescal C, 5 g papain, bath temperature: 40°C, pH - buffering: with NaOH. This could explain why we did not encounter problems with the pH from our own procedures. We recommend checking for pH only in cases where broken bones are observed.

Bone preservation was also a parameter that we wanted to follow after neutralization from the papain enzyme. The long-term preservation of bones heated at 80° C (for interrupting the enzymatic activity of papain) was successful because bones are still intact after two years of storage in our laboratory.

In conclusion, cleaning vole carcasses with papain enzyme is a quick, practical, and inexpensive method (25 g of non purified papain costs about 17 U.S. \$ in 1999), and a small amount of the product (25 g) is sufficient to clean more than 400 voles carcasses. Bones are not altered so that large quantities of bony structures can be prepared for morphometric analyses. Its only drawback is the very unpleasant odor developed during heating even when the material is kept under a fumehood.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Boulanger and P-É. Potié for trapping assistance and Dr. Guentert, Mr. Meier, Troxler and Schnepat of the Natural History Museum of Berne (Switzerland) for information on their maceration technique with papain. We thank also C. Barrette, D. Berteaux, C. Bérubé, M. Festa-Bianchet and D. Réale for comments on earlier drafts of the manuscript. Financial support was provided to J.-M. Bergeron through a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada operating grant.

LITERATURE CITED

- BORISOV, V. I., A. S. BARANOV, A. V. VALETSKY, AND V. M. ZAKHAROV. 1997. Developmental stability of the mink *Mustela vison* under the impact of PCB. Pp. 17-26, *in* Developmental homeostasis in natural populations of mammals: phenetic approach (V. M. Zakharov, and A. V. Yablokov, eds). Acta Theriologica, Suppl. 4.
- HANSKI, I., AND J. KUITUNEN. 1986. Shrews on small islands: epigenetic variation elucidates population stability. *Holarctic Ecology*, 9:193-204.

- LEAMY, L. 1984. Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. V. Directional and fluctuating asymmetry. *American Naturalist*, 123: 579-593.
- , 1997. Genetic analysis of fluctuating asymmetry for skeletal characters in mice. *Journal of Heredity*, 88: 85-92.
- LUTHER, P.G. 1949. Enzymatic maceration of skeletons. *Proceedings. Linnean Society of London*, 161:146.
- MAUK, C.L., M.A., HOUK, AND R.D. BRADLEY. 1999. Morphometric analysis of seven species of pocket gophers (*Geomys*). *Journal of Mammalogy*, 80: 499-511.
- PALMER, A.R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. Pp. 335-364, in *Developmental instability: its origins and evolutionary implications* (T.A. Markow, ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- PANKAKOSKI, E., AND I. HANSKI. 1989. Metrical and non-metrical skull traits of the common shrew *Sorex araneus* and their use in population studies. *Annales Zoologici Fennici*, 26: 433-444.
- PANKAKOSKI, E., I. KOIVISTO, AND H. HYVARINEN. 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew *Sorex araneus*. *Acta Zoologica Fennica*, 191: 137-144.
- SEARLE, A.G. 1954. Genetical studies on the skeleton of the mouse. IX. Causes of skeletal variation within pure lines. *Journal of Genetics*, 52: 68-102.
- VAN VALEN, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, 16: 125-142.
- VENTURA, J., R. PÉREZ-HERNÁNDEZ, AND M.J. LÓPEZ-FUSTER. 1998. Morphometric assessment of the *Monodelphis breviceaudata* group (Didelphimorphia: Didelphidae) in Venezuela. *Journal of Mammalogy*, 79: 104-117.
- WILLIAMS, S.L., R. LAUBACH, AND H.H. GENOWAYS. 1977. A guide to the management of recent mammal collections. *Carnegie Museum of Natural History*, 4: 1-105.
- ZAKHAROV, V.M. 1992. Population phenogenetics: Analysis of developmental stability in natural populations. *Acta Zoologica Fennica*, 191: 7-30.
- ZAKHAROV, V. M., D. V. DEMIN, A. S. BARANOV, V. BORISOV, A. V. VALETSKY, AND B. I. SHEFTEL. 1997. Developmental stability and population dynamics of shrews *Sorex* in central Siberia. Pp. 41-48 in *Developmental homeostasis in natural populations of mammals: phenetic approach* (V. M. Zakharov, and A. V. Yablokov, eds). *Acta Theriologica*, Suppl. 4.
- ZAKHAROV, V. M., AND D. SIKORSKI. 1997. Inbreeding and developmental stability in a laboratory strain of bank vole *Clethrionomys glareolus*. Pp. 73-78 in *Developmental*

homeostasis in natural populations of mammals: phenetic approach (V. M. Zakharov, and A. V. Yablokov, eds). Acta Theriologica, Suppl. 4.

Part I. Fluctuating Asymmetry of Voles (*Microtus Pennsylvanicus*) as a Biomonitor of Sewage Sludge Application to Forests

Jean-Marc Bonzom, Sophie Belleville and Jean-Marie Bergeron

*Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) J1K 2R1 Canada*

ABSTRACT

Sewage sludge application has a dual consequence on forest ecosystems: (i) the improvement of forage quality and/or quantity which is generally assumed to be beneficial for animals, and (ii) the input of sludge substrate and of contaminants (notably heavy metals) in the environment assumed to be detrimental to animals. We used the herbivorous meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) as bioindicator and the fluctuating asymmetry (FA) of vole as morphometric biomarker to assess the global impact of municipal liquid sewage sludge on the health of animals from tree plantations. FA was estimated on the length of humerus, femur, pelvic girdle, tibia and eleven mandible measurements of voles sampled from sludge-treated and untreated forest sites at Sherbrooke's University (Québec, Canada). Animals from two sludge-treated sites were compared with those captured on one control site, about 1 year after the sludge application. There were no significant differences in the level of asymmetry between sites for all characters. These results suggest that sewage sludge application had no biological effects on the health of voles, and that the guidelines of the Québec government on the sewage sludge application on forest soils seem effective in protecting environmental quality, at least on the short term. However, additional short and long-term field studies on several other species (in particular carnivorous and detritivorous species), will be necessary to adequately evaluate the impact of sludge application on forest soils and on environmental health of these species.

Key words: sewage sludge, forestry, *Microtus pennsylvanicus*, fluctuating asymmetry.

As part of sustainable development, the amendment of forest soils with municipal sewage sludge is a common procedure: it is possible to improve tree growth while mitigating the problem of municipal waste disposal (Smith and Evans, 1977; Berry, 1982; Henry and Cole, 1983; Zasoski et al., 1983; Cole et al., 1984). However, sludge amendment alters the forest ecosystems. The perturbations can be quite varied. In fact, organic matter, nutrients and inert mineral matter contained in the sewage sludge can improve soil quality and can be beneficial to the development of plants. Therefore, sludge application to forest lands changes the composition, structure, or productivity of vegetation as well as the nutritional quality of forage (see Haufler and West, 1986 for a review). These changes are potentially beneficial to wildlife populations, which are favored by greater quantities of ground-level vegetation and by improved forage quality (Woodyard, 1982; Anderson, 1985; Dubé et al., 1994). On the other hand, the sewage sludge application with heavy trucks, the sludge layer added to soil, and the pathogenic micro-organisms, trace metals and synthetic organics in sludge represent potentially adverse effects on soil, plants or animals. The complex interactions between these many factors (i.e. improved forage quality, trace metals, parasites, etc.) may have either beneficial or detrimental effects on the structure and functioning of populations, communities, and ecosystems. The main difficulty is to develop approaches for assessing and predicting the various consequences of these combinations of factors on forest ecological systems.

Developmental stability of organisms can be used as a sensitive tool for monitoring environmental health under various anthropogenic impacts (see Leary and Allendorf, 1989; Graham et al., 1993; 1994; Tracy et al., 1995; Zakharov and Yablokof, 1997 for reviews). Developmental stability is the ability of a given genotype to consistently produce a given phenotype in a particular environment (Zakharov, 1989). The measure of developmental stability most commonly used is fluctuating asymmetry (FA) (Zakharov, 1981; Palmer and Strobeck, 1986). FA is defined as small random deviations from perfect bilateral symmetry that result from genetic and/or environmental stresses during development (Van Valen, 1962; Palmer, 1994). FA of morphological characters has been proposed as a powerful biotest to measure environmental quality (e.g. Leary and Allendorf, 1989; Parsons, 1992; Clarke, 1993; Graham et al., 1993; Sommer, 1996). Many studies have shown increased levels of fluctuating asymmetry among aquatic or land (in)vertebrate populations as a result of environmental disruptions (e.g. Valentine and Soulé, 1973; Pankakoski et al., 1992; Strong and James, 1992; Zakharov et al., 1997; Groenendijk et al., 1998; Drover et al., 1999; Imasheva et al., 1999; Lens et al., 1999). Most importantly, fitness components can be assessed by measuring developmental instability (see Sommer, 1996; Møller, 1997 for reviews). Several studies have shown that FA is inversely

proportional to fitness (e.g. Thornhill and Sauer, 1992; Harvey and Walsh, 1993; Naugler and Leech, 1994; Ueno, 1994). Recently, Møller's work (1999) seems to confirm that FA is a robust predictor of performance in fitness parameters such as growth, fecundity and survival. Developmental stability of individuals could provide a sensitive *in situ* marker of population fitness (Sommer, 1996). In estimating the condition of natural populations, FA can be a method for biomonitoring anthropogenic disruptions, such as those stemming from sewage sludge application in forest ecosystems.

In this study, we measured fluctuating asymmetry of voles to investigate the short term (one year) impact of municipal liquid sewage sludge application on environmental quality of tree plantations. Voles were chosen as the test organism because they live in contact with sludge and soil, (therefore may ingest sludge directly while digging and grooming), they are above all herbivorous, very sensitive to forage quality and/or quantity, they are easily caught, they have small home ranges, they show strict habitat selection, are therefore sensitive indicators of habitat change, and they were relatively plentiful at all study sites.

MATERIALS AND METHODS

Description of Study Areas

This study was conducted in 1995 and 1996, on five experimental plots located within the tree plantations of the University of Sherbrooke, Québec, Canada (45°15'N, 72°00'E). The study was conducted on two types of forest stands in which the trees were seven years old in 1995. In the first stand, which consisted of red pine (*Pinus resinosa*), two experimental plots of about 1 ha each were implemented (one treated with sludge = T1 and one control = C1). In the second stand, which consisted of red oak (*Quercus rubra*) and white oak (*Quercus alba*), the same design was applied and the treatment and control plots were named T2 and C2 respectively. In 1996, another site was used as a control (= C3) because, in the previous year, no voles were found on the control areas (C1 and C2) used in 1995. Control (C1 and C2) and treatment plots (T1 and T2) were separated by a forestry road and control and treatment were approximately 200 m apart. The control C3 was separated by about 900 m of a mature forest stand from the other sites. The location and slopes of the treated plots were chosen so that runoff from these plots would not affect the control plots.

Sewage Sludge Application

The sewage sludge used for the trials came from the water treatment facility of the municipality of Richmond (Québec, Canada). This treatment facility consists of three aerated

lagoons. The sludge was taken in the first lagoon in which no chemical dephosphatation is done. The average dry matter content of the sludge was about 11.2%. In order to maximize the exposure to contaminants of the animals present on the plots, the application rate of the sludge corresponded to approximately 200 kg N ha⁻¹ (about 39 to 44 t dry wt. ha⁻¹ of sludge, which was the maximal application rate per 10-year period suggested by the 1991 guidelines of the Québec government for forest land). The sludge was applied on September 15 and 16, 1995, using commercial spreaders mounted on trucks with high floatation tires.

Vole and Shrew Sampling and Monitoring Program

In 1995, meadow voles were sampled with Museum Special and Victor death traps baited with peanut butter in both control and treatment study sites. This sampling method was revised and in 1996, voles and shrews were captured in Sherman live traps baited with rolled oats and peanut butter. The animals were captured, marked and released. Only animals trapped twice were sampled. This method was used to ensure that the animals trapped were residents of the experimental plots. The sampling was done on three different periods that were: before sludge application (between September 3 and 10, 1995), about two months after the sludge application (between November 7 and 16, 1995), and about one year after the sludge application (between July 17 and October 14, 1996). Voles were captured only one year after the treatment on both control and treated plots (T1 and T2). Due to the small sample size, all adult animals were used in the study without regard to sex, and voles captured on treated plots (T1 and T2) are pooled for a more robust comparison between treatments (control and treated). All captured specimens were frozen at - 20°C in individual bags until preparation of bones.

Preparation of Bones

For removing soft tissues from skeletal material, the proteolytic enzyme papain has been used to rapidly prepare the large number of skeletons (Luther, 1949; Searle, 1954; Hanski and Kuitunen, 1986; Pankakoski and Hanski, 1989; Bonzom et al., 1999). The animals were eviscerated, skinned and marked with metallic rings around the abdomen. They were boiled together in water for 30 minutes, then individually introduced in glass jars containing a freshly prepared papain solution at 38° C (60 mg of papain in 150 mL of 0.9% NaCl solution). Jars were carefully stirred once a day. We used non purified papain P-3375 (Sigma Chemical) that was ground before use. The state of tissue loss (bone cleaning) was checked every 12 hours: 62 hours in papain solution was the best time to clean carcasses. After exposure to papain, dislocated skeletons were removed from the solution, thoroughly washed in water, dried on

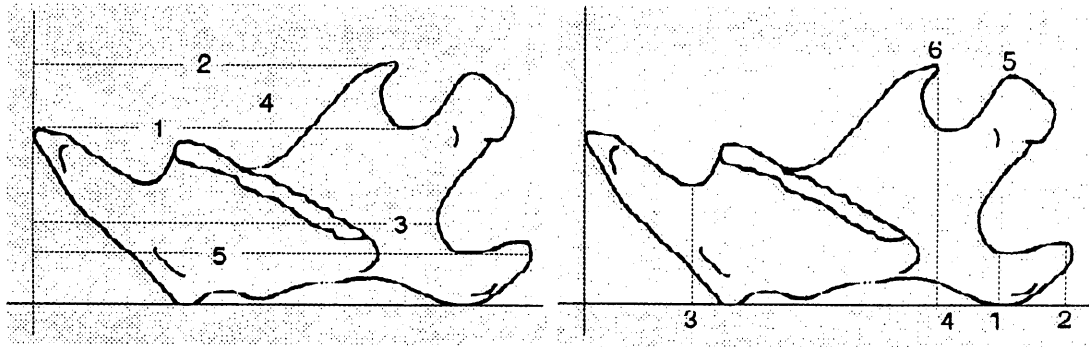


Fig. 1. The 22 measurements taken on vole mandibles (right and left). L1 - L5, five mandible lengths; h1 - h6, six mandible heights.

blotting paper, then placed in a drying oven at 80° C for 72 hours. This last step is important because it stops the enzymatic reaction on bones after tissues have been dissolved. If bones are not properly dried, they are unsuitable for long-term preservation (Williams et al., 1977). Boiling for a few minutes is usually required to neutralize the activity of papain, but this is not practical with a large sample including several bone categories. Moreover, this method seems more appropriate with long bones than with small fragile structures.

Characters Examined

Asymmetry was estimated on the length of humerus (Lh), femur (Lf), pelvic girdle (Lpg), tibia (Lt) and mandible measurements. Six height measures (h1, h2, h3, h4, h5, and h6) and five length (L1, L2, L3, L4 and L5) were realized on each mandible (see Fig. 1). Not all characters could be measured for all individual since some were damaged during trapping or cleaning. We used the Festing technique (1972) to realize all metric measurements. This technique consists in reducing a 1 mm graph paper (realized by computer) photographically to a quarter size. Two double-thickness glass microscope slides are then glued to the print at right angles to from the ordinate and abscissa of a graph. Bones were placed on this graph, touching the glass slides always in a standard way. Measurements were done under a dissecting binocular microscope to a nearest 0.125 mm.

To obtain a totally unbiased estimate of measurement error, all measurements were conducted by the same individual and were conducted using a blind technique (i.e. without reference to earlier measurements). To estimate measurement error, all characters were measured three times.

The second replicate measurements were conducted in reverse order of the first and, the third was done in random order. The time between replicate measurements was equal to the total elapsed time spanned by one complete set of measurements of all treatment groups (Palmer, 1994).

Preliminary Analyses

Analyses of variance were conducted in SuperAnova 1.11 (Abacus concepts, 1989), and other statistics were made with SPSS 6.1 (SPSS Inc., 1994). Fluctuating asymmetry calculation worksheets (Palmer, 1994b) were based on formulae and analyses made by Palmer and Strobeck (1986) and Palmer (1994a).

Because differences in values of bilateral characters are usually small, generally $< 5\%$ and often $< 1\%$ of character size (Palmer, 1994a), it is necessary to test if the between-side variation is significantly larger than the measurement error. If it is not the case, then FA tests are not justified. To evaluate measurement error relative to between-side variation for the metric characters, we used the method described by Palmer and Strobeck (1986). We conducted a two-way ANOVA (sides \times individuals) for each character. From ANOVA results, we used a F-test between the interaction mean square (MS sj) and error mean square (MS m) with degrees of freedom $(S - 1)(J - 1)$ and $SJ(M - 1)$, where S = number of sides, J = number of individuals, and M = number of replicates. The Sequential Bonferroni test was applied (Rice, 1989). For all characters of each sample, the between-side variation is significantly larger than the measurement error (Table 1).

Three sorts of asymmetry exist: directional asymmetry (DA), antisymmetry (AS), and fluctuating asymmetry (FA) (Van Valen, 1962). Because DA and AS may have a genetic basis, only FA reflects with certitude an environmental stress that occurs during the organism's ontogenesis. Thus, it's important to test the presence of directional asymmetry and antisymmetry before analyzing FA (Palmer, 1994a). To detect directional asymmetry, we calculate for each sample and each character the ratio between mean (R - L) and standard error (R - L) and the significance test is an one-sample t-test (Palmer, 1994a). The Sequential Bonferroni test is also applied (Rice, 1989). No significant directional asymmetry was found in any of the samples for all characters ($p > 0.05$). To test for departure from normality, skewness (g_1), and kurtosis (g_2), as well as standard error for s_{g_1} and for s_{g_2} respectively, and for signed (R - L) values of each character were calculated. The significance test is a one-sample t-test which compares $t_s = g_1 / s_{g_1}$ and $t_s = g_2 / s_{g_2}$ versus values of t for an infinite degree of freedom (Palmer, 1994a). The Sequential Bonferroni test was applied to the data (Rice, 1989). Two measurements presented a

Table 1. Results of two-way ANOVA (sides x individuals) to determine for all characters of each sample (control or treated), whether the between-side variation is significantly larger than the measurement error. Column F represents F-values with in parentheses the degree of freedom (df).

Characters from control animals			Characters from treated animals		
	F (df†)	P		F(df)	P
Lh	12.96 (31, 128)	< 0.001	Lh	7.51 (30, 124)	< 0.001
Lf	13.2 (29, 120)	< 0.001	Lf	9.20 (31, 128)	< 0.001
Lcg	12.20 (27, 112)	< 0.001	Lpg	26.39 (26, 108)	< 0.001
Lt	16.56 (24, 100)	< 0.001	Lt	4.22 (29, 120)	< 0.001
h1	3.55 (30, 124)	< 0.001	h1	4.86 (30, 124)	< 0.001
h2	5.67 (30, 124)	< 0.001	h2	5.39 (29, 120)	< 0.001
h3	3.03 (31, 128)	< 0.001	h3	2.50 (31, 128)	< 0.001
h4	4.18 (31, 128)	< 0.001	h4	3.75 (31, 128)	< 0.001
h5	4.88 (31, 128)	< 0.001	h5	2.95 (31, 128)	< 0.001
h6	4.01 (31, 128)	< 0.001	h6	4.19 (31, 128)	< 0.001
L1	3.58 (31, 128)	< 0.001	L1	5.74 (31, 128)	< 0.001
L2	10.33 (31, 128)	< 0.001	L2	7.04 (31, 128)	< 0.001
L3	4.17 (31, 128)	< 0.001	L3	3.1 (30, 124)	< 0.001
L4	10.43 (31, 128)	< 0.001	L4	2.27 (31, 128)	< 0.001
L5	6.88 (30, 124)	< 0.001	L5	2.63 (29, 120)	< 0.001

† df = degree of freedom, Lh = length of humerus, Lf = length of femur, Lpg = length of pelvic girdle, Lt = length of tibia, h1-6 = six heights measures on mandible, L1-5 = five lengths measures on mandible.

distribution skew at right side (control: Lt: $g_1 = 2.012$, $P < 0.001$; L4: $g_1 = 1.396$, $P < 0.001$), and two toward the left side (treated: L1: $g_1 = -1.363$, $P < 0.01$; h1: $g_1 = -1.363$, $P < 0.01$). Five other measurements presented a leptokurtic distribution (control: h4: $g_2 = 3.559$, $P < 0.001$; Lt: $g_2 = 3.619$, $P < 0.001$; L4: $g_2 = 2.858$, $P < 0.001$. Treated: L1: $g_2 = 3.940$, $P < 0.001$; L4: $g_2 = 3.431$, $P < 0.001$). On the other hand, no significant departure from normality was found for others measurements ($p > 0.05$).

An association between character size and the degree of asymmetry can distort conclusions concerning analyses of asymmetry (see Palmer and Strobeck, 1986 for explanation). In order to detect size dependence in all characters, absolute difference ($R - L$) was regressed against character size $((R + L) / 2)$. No size dependence was detected, so that, no size scaling was necessary for all characters, except for L4 control and Lgc treated (Table 2). Interpretation of FA population differences in these last two characters should be treated with caution.

Fluctuating Asymmetry Index

Because characters presenting a skewed or leptokurtic distribution may have a genetic basis (Palmer and Strobeck, 1992), Lt, h1, h4, L1, and L4 measurements have been excluded from FA analyses.

To assess difference in FA for all characters among the two sites (control and treated), we used the Palmer's index FA10 (Palmer, 1994a), which represents the magnitude of FA after the measurement error has been removed: [FA10 = (interaction mean square minus error measurement mean square) divided by the number of replicates].

Mean squares came from the two way ANOVAs (sides x individuals) used to measure the error relative of the between-side variation (see above). The difference in FA between treated and control sites was calculated by F-tests using the FA10 index. Approximate degrees of freedom for FA10 have been calculated according to Palmer's formulae (Palmer, 1994a; 1994b).

RESULTS AND DISCUSSION

FA10 values for all characters analyzed and F-test results are presented in table 3. There were no significant differences in the level of asymmetry between sites for all characters.

Developmental stability was established as one of the most general ontogenic characteristics useful for biomonitoring the health condition of natural populations (Zakharov et al., 1997). The increased fluctuating asymmetry of various morphologic characters has been found in natural animal populations exposed to a range of anthropogenic environmental stresses (see Møller and Swaddle, 1997 for a review). Therefore, the lack of differences in the level of asymmetry

Table 2. Results of regression analyses of size-dependence of FA for all characters of each sample (control or treated). Absolute difference right-minus-left character values $|R - L|$ was regressed against character size $((R + L) / 2)$. Column F represents F-values with in parentheses the degree of freedom (df).

Characters of control animals				Characters of treated animals			
	r	F (df)	P		r	F (df)	P
Lh	0.223	1.569 (1, 31)	0.220	Lh	0.130	0.496 (1, 30)	0.487
Lf	0.249	1.848 (1, 29)	0.185	Lf	0.159	0.777 (1, 31)	0.385
Lcg	0.217	1.286 (1, 27)	0.267	Lcg	0.393	4.558 (1, 26)	0.043
Lt	0.003	0.0003 (1, 24)	0.986	Lt	0.068	0.129 (1, 29)	0.722
h1	0.170	0.860 (1, 30)	0.361	h1	0.336	3.678 (1, 30)	0.065
h2	0.188	1.061 (1, 30)	0.311	h2	0.110	0.344 (1, 29)	0.562
h3	0.112	0.382 (1, 31)	0.541	h3	0.143	0.628 (1, 31)	0.434
h4	0.007	0.001 (1, 31)	0.969	h4	0.160	0.786 (1, 31)	0.382
h5	0.210	1.390 (1, 31)	0.248	h5	0.174	0.941 (1, 31)	0.340
h6	0.024	0.017 (1, 31)	0.896	h6	0.074	0.166 (1, 31)	0.687
L1	0.255	2.092 (1, 31)	0.158	L1	0.206	1.327 (1, 31)	0.258
L2	0.020	0.011 (1, 31)	0.916	L2	0.239	1.819 (1, 31)	0.187
L3	0.144	0.635 (1, 31)	0.432	L3	0.260	2.108 (1, 30)	0.157

Table 2. (concluded)

Characters of control animals	r	F (df†)	P	Characters of treated animals	r	F (df)	P
L4	0.360	4.460 (1, 31)	0.043*	L4	0.116	0.412 (1, 31)	0.526
L5	0.186	1.038 (1, 30)	0.317	L5	0.064	0.117 (1, 29)	0.735

† df = degree of freedom, Lh = length of humerus, Lf = length of femur, Lpg = length of pelvic girdle, Lt = length of tibia, h1-6 = six height measures on mandible, L1-5 = five length measures on mandible.

between treated and control populations suggests that one year after the sewage sludge application, there was no impact on vole's development, i.e. on the environmental health of voles. FA in voles is a consequence of the environmental quality experienced by mothers and fetuses during pregnancy or lactation (Siegel and Doyle, 1975), and also by young voles during post-weaning growth. Because voles have a relatively short live span (< 1 year), voles that were collected from August to October 1996 had realized all their ontogenesis on treated sites.

Therefore, the sewage sludge was present throughout the development of the characters chosen as indicators.

As several studies have already shown on FA (see Sommer, 1996 for review), our results suggest that the contaminant concentrations present in the sewage applied represented no risk for the health of voles. In an earlier study, cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg) concentrations have been detected in livers and kidneys of the same voles (Bonzom *et al.*, 1998; 1999). The application of sewage sludge significantly increases Pb concentrations in voles, but these concentrations were not high enough to be toxic for animals. In another investigation (Bonzom *et al.*, 1999), internal helminth parasites in these voles have been listed. Sludge does not contaminate voles with any specific parasites, and does not increase the voles' parasitic load in a significant way. The results of FA presented here are in accordance with the results on heavy metal concentrations analyses and the parasitic load in voles. Sewage sludge application has no biological effects on the health of voles. FA has enabled us to assess the synergetic effects, or interaction, of several contaminants present in sewage sludge (i.e. pathogenic microorganisms, trace metals and synthetic organic), which are impossible to study by other means (Pankakoski *et al.*, 1992).

Because sludge application improves forage quality and/or quantity (Woodyard, 1982; Anderson, 1985; Dubé et al., 1994), some animal populations increase in number, e.g. earthworms (Dindal et al., 1979; Hamilton, 1983), Columbia black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) (Anderson, 1983), meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) (Anderson and Barrett, 1982), deer mice (*Peromyscus spp.*) (Thomas, 1983; Seon, 1984). In this study, following the sludge application, an important increase in vertical and horizontal cover in herbaceous vegetation has been observed (J.-M. Bonzom, unpublished data). Moreover, sludge application in previous studies has most likely improved forage quality through increased protein and phosphorus concentrations in leaves (Campa, 1982; Anderson, 1983; Seon, 1984). From the results of FA analyses, there is no significant difference in the level of developmental stability between the treated and control populations. This suggests that the changes in vegetation have not led to an increase in the developmental stability of voles, in other words, have not improved the condition of the organisms. Even so, it is possible that the improved forage quality and/or quantity produced a positive impact on the health of voles by offsetting some negative impacts of sewage sludge, such as the transfer of trace metals in the food-chain.

FA of voles could be a useful method for biomonitoring sewage sludge application on forest soils because the level of FA of treated voles simultaneously reflects the dual nature of sludge application: (i) the improvement of forage quality and/or quantity which is generally assumed beneficial for animals, and (ii) the input of sludge material on the ground and the related contaminants (notably heavy metals) in the environment assumed to be detrimental for animals.

In the present study, the fitness components of voles for each site (control and treated) are unknown, but high asymmetry has been associated with reductions in fitness components ranging from growth, fecundity, survival and mating success in a wide variety of animals and plants (Møller, 1997; Møller and Swaddle, 1997). As there were no significant differences in the levels of asymmetry between sites, it is very likely that sewage sludge had no consequence on fitness components a few months after the sludge application.

FA is most likely to be detected and correctly interpreted than other bioindicators of environmental stress because developmental instability is a much more sensitive indicator of stress than mortality for example (Campbell and Emlen, 1996). Sludge application is in general strongly regulated by governments (as in Canada), so that, the concentrations in contaminants (specially in trace metals) can be considered relatively safe for the environment. Therefore, in the present short-term study, it is unlikely that sludge application has resulted in selective removal of less fit individuals, i.e. the most asymmetric ones. The effect of sludge on the development of voles has certainly not been underestimated in the present study.

Table 3. Results of F-test analyses comparing the level of fluctuating asymmetry (= FA10) for nine characters in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) from control and treated sites (see text for more information). There are no significant differences ($P > 0.05$). Samples size are indicated in parentheses with the value of FA10 for each character and treatment. Column F-test represents F-values with in parentheses, at the left side, the degree of freedom (df) for FA10 control, and at the right side, the degree of freedom for FA10 treated.

Characters	FA10†		F-test
	Control (n)	Treated (n)	F (df)
Lh	0.004547 (32)	0.004560 (31)	1.00 (22.45, 26.36)
Lf	0.006017 (30)	0.003773 (32)	1.59 (24.74, 24.56)
h2	0.004703 (31)	0.005837 (30)	1.24 (28.95, 19.08)
h3	0.002417 (32)	0.002197 (32)	1.10 (13.53, 10.75)
h5	0.003790 (32)	0.003487 (32)	1.09 (19.40, 13.17)
h6	0.003507 (32)	0.004217 (32)	1.20 (17.74, 17.19)
L2	0.012410 (32)	0.010487 (32)	1.18 (25.23, 22.71)
L3	0.004127 (32)	0.002323 (31)	1.78 (17.66, 13.79)
L5	0.007697 (31)	0.002933 (32)	2.62 (21.80, 10.75)

† FA = fluctuating asymmetry, n = number of voles sampled, df = degree of freedom, Lh = length of humerus, Lf = length of femur, h2, 3, 5 and 6 = four height measures on mandible, L2, 3, and 5 = three length measures on mandible.

In conclusion, one year after the sewage sludge application, it seem that no apparent biological stresses were at work according to the FA measures made on *M. pennsylvanicus*. These results suggest that the guidelines of the Québec government for the sewage sludge application on forest soils seem effective in protecting environmental quality on a short term basis (MENVIQ et al., 1991). However, additional longer term field studies, using several animals species should be made in order to adequately evaluate the impact of sludge on environmental health of animals.

Developmental instability is not necessarily measurable in all species living in stressed habitats (review in Tracy et al., 1995). Because of the transfer of contaminants in food-chains, and the biomagnification of toxics (notably heavy metals and synthetic organics), insectivorous

and carnivorous animals, as well as detritivorous and predaceous soil macrofauna could accumulate much higher concentrations of contaminants than herbivores such as voles (Beyer et al., 1985; Hegstrom and West, 1989). Future studies should assess the fluctuating asymmetry of animals of this trophic group in order to biomonitor more accurately the impact of sewage sludge on environmental health. In the present study, we did not use small insectivorous mammals, such as shrews, as biomonitors due to the small sample size collected during trapping. Shrews generally show lower densities than voles, and in the case of small study areas, as in the present study, it is difficult to collect a sufficient number of shrews for sample analysis. On the other hand, certain insects, such as many species of carabidae, are often abundant and live on the ground or in the leaf litter, and are predators and/or detritivores. These attributes make them particularly suitable as biomonitors, and would be a favorable complement to vertebrate species such as voles. The combined use of FA on carabidae and voles may provide a sensitive biomonitoring system for assessing more accurately the effects of sewage sludge application to forests.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Félix Boulanger, Geneviève Labrie, Pierre-Édouard Potié and Frank Sirieux for trapping assistance. We thank also Dr. Katreen Ruckstuhl and Dr. Denis Réale for comments on statistical analyses, and François Haguier for the mandible' drawings. The research was supported by operating grants to J.-M. Bergeron from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche of Québec.

REFERENCES

- Abacus Concepts. 1989. Super ANOVA. Version 1.11. Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA.
- Anderson, D.A. 1983. Reproductive success of Columbian black-tailed deer in a sewage-fertilized forest in western Washington. *J. Wildl. Manage.* 47:243-247.
- Anderson, D.A. 1985. Influence of sewage sludge fertilization on food habits of deer in western Washington. *J. Wildl. Manage.* 49:91-95.
- Anderson, T.J., and G.W. Barret. 1982. Effects of dried sewage sludge on meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) populations in two grassland communities. *J. Appl. Ecol.* 19:759-772.
- Berry, C.R. 1982. Dried sewage sludge improves growth of pines in the Tennessee Copper Basin. *Reclam. Reveg. Res.* 1:195-201.

- Beyer, W.N., O.H. Pattee, L. Siloe, D.J. Hoffman, and B.M. Mulhern. 1985. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environ. Pollut. (Series A)* 38:63-86.
- Bonzom J.-M., F. Granger, A. Gadbois, J.-M. Bergeron, and G. Carrier. 1998. Valorisation sylvicole des boues d'origine municipale: impacts sur la faune. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, Québec, Canada. N° Réf. MEF 3335.22.9301.
- Bonzom J.-M., 1999. L'asymétrie fluctuante : un biomarqueur morphométrique pour évaluer la qualité de l'environnement. Ph.D. thesis, Université de Sherbrooke, Canada.
- Campa, H. 1982. Nutritional responses of wildlife forages to municipal sludge application. M.Sc. thesis, Michigan State University, East Lansing.
- Campbel W.B., and J.M. Emlen. 1996. Developmental instability analysis of BDK-infected spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, prior to seawater exposure. *Oikos* 77:540-548.
- Clarke, G.M. 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environ. Pollut.* 82:207-211.
- Cole, D.W., M.L. Rinehart, D.G. Briggs, C.L. Henry, and F. Mecifi. 1984. Response of douglas-fir to sludge application: Volume growth and specific gravity. p. 77-84. *In* TAPPI Research and Development Conference. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Technology Park, Atlanta, Georgia, Appleton, Wisconsin.
- Dindal, D.L., L.T. Newell, and J.P. Moreau. 1979. Municipal wastewater irrigation: effects on community ecology of soil invertebrates. p. 197-205. *In* W. Sopper and S. Kerr (ed.) Utilisation of municipal sludge on forest and disturbed land. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Drover, S., B. Leung, M.R. Forbes, M.L. Mallory, and D.K. McNicol. 1999. Lake pH and aluminum concentration: consequences for developmental stability of the water strider *Rheumatobates rileyi* (Hemiptera: Gerridae). *Can. J. Zool.* 77:157-161.
- Dubé, M., S. Delisle, F. Delisle, and P.M. Marotte. 1994. Effets des fertilisants minéraux sur les écosystèmes forestiers et la santé humaine. Gouvernement du Québec, Ministère des Ressources naturelles, Direction de l'environnement forestier, Service du suivi environnemental, Québec, Canada.
- Festing, M. 1972. Mouse strain identification. *Nature* 238:351-352.
- Graham, J.H., D.C. Freeman, and J.M. Emlen. 1993. Developmental stability: a sensitive indicator of population under stress. p. 136-158. *In* W.G. Landis, J.S. Hughes and M.A. Lewis (ed.) Environmental toxicology and risk assessment. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

- Graham, J.H., D.C. Freeman, and J.M. Emlen. 1994. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. p. 123-140. *In* T.A. Markow (ed.) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Groenendijk, D., L.W.M. Zeinstra, and J.F. Postma. 1998. Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a metal-contaminated river. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:1999-2005.
- Hamilton, W.E. 1983. Impact of landspread sewage sludge on soil organisms and soil structure. M.Sc. thesis, Michigan State University, East Lansing.
- Hanski, I., and J. Kuitunen. 1986. Shrews on small islands: epigenetic variation elucidates population stability. *Holarctic Ecology* 9:193-204.
- Harvey, I.F., and K.J. Walsh. 1993. Fluctuating asymmetry and lifetime mating success are correlated in males of the damselfly *Coenagrion-puella* (Odonata, coenagrionidae). *Ecol. Entomol.* 18:198-202.
- Haufler, J., and S. West. 1986. Wildlife responses to forest application of sewage sludge. p. 110-116. *In* D.W. Cole, C.L. Henry and W.L. Nutter (ed.) *The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes*. University of Washington Press, Seattle and London.
- Hegstrom, L.J., and S.D. West. 1989. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage-sludge application to forests. *J. Environ. Qual.* 18:345-349.
- Henry, C.L., and D.W. Cole (ed.). 1983. Use of dewatered sludge as an amendment for forest growth. Vol. 4. Institute of Forest Resources, University of Washington, Washington, Seattle.
- Imasheva, A.G., D.V. Bosenko., and O.A. Bubli. 1999. Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* 82:187-192.
- Leary, R.F., and F.W. Allendorf. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 4:214-217.
- Lens, L., S. Van Dongen, C.M. Wilder, T.M. Brooks, and E. Matthysen. 1999. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. *Pro. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266:1241-1246.
- Luther, P.G. 1949. Enzymatic maceration of skeletons. *Proceedings of the Linnean Society of London* 161:146.
- Ministère de l'environnement du Québec, Ministère des forêts du Québec et Ministère de la santé et des services sociaux. 1991. Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des

- eaux usées municipales. Guides des bonnes pratiques. Québec. Envirodoq EN910413, QEN/QE/AE/56\1. ISBN 2-550-22516-3.
- Møller, A.P. 1997. Developmental stability and fitness - a review. *Am. Nat.* 149:916-932.
- Møller, A.P. 1999. Asymmetry as a predictor of growth, fecundity and survival. *Ecology Letters* 2:149-156.
- Møller, A.P., and J.P. Swaddle. 1997. *Asymmetry, developmental stability and evolution.* Oxford University Press, Oxford.
- Naugler, C.T., and S.M. Leech. 1994. Fluctuating asymmetry and survival ability in the forest tent caterpillar moth *Malacosoma misstria* - Implications for pest management. *Entomol. Exp. Appl.* 70:295-298.
- Palmer, A.R. 1994a. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. p. 335-364. *In* T.A Markow (ed.) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Palmer, A.R. 1994b. FA spreadsheet on Excel Spreadsheet. ftp://www.biology.ualberta.ca/pub/palmer.ftp/software/FA_Calc.sea.hqx.
- Palmer, A.R., and C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annal Review of Ecological Systematics* 17:391-421.
- Palmer, A.R., and C. Strobeck. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zool. Fenn.* 191:57-72.
- Pankakoski, E., and I. Hanski. 1989. Metrical and non-metrical skull traits of the common shrew *Sorex araneus* and their use in population studies. *Ann. Zool. Fennici* 26: 433-444.
- Pankakoski, E., I. Koivisto, and H. Hyvärinen. 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew *Sorex araneus*. *Acta Zool. Fenn.* 191:137-144.
- Parsons, P.A. 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68:361-364.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing table of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Searle, A.G. 1954. Genetical studies on the skeleton of the mouse. IX. Causes of skeletal variation within pure lines. *Journal of Genetics* 52: 68-102.
- Seon, E.M. 1984. Nutritional, wildlife, and vegetation community response to municipal sludge application of a jack pine/red pine forest. M.Sc. thesis, Michigan State University, East Lansing.

- Siegel, M.I., and W.J. Doyle. 1975. Stress and fluctuating limb asymmetry in various species of rodents. *Growth* 39:363-369.
- Smith, W.H., and J.O. Evans. 1977. Special opportunities and problems in using forest soils for organic waste application. p. 429-454. *In* L.F. Elliott and F.J. Stevenson (ed.) *Soils for management of organic waste waters*. Am. Soc. Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Sommer, C. 1996. Ecotoxicology and developmental stability as an *in situ* monitor of adaptation. *Ambio* 25:374-376.
- SPSS. Inc. 1994. *SPSS 6.1 Base System User's Guide*. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Strong, L., and S. James. 1992. Some effects of rearing the yellow dung fly *Scatophaga stercoraria* in cattle dung containing ivermectin. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 63:39-45.
- Thomas, A.H. 1983. First-year responses to wildlife and wildlife habitat to sewage sludge application in a northern hardwood forest. M.Sc. thesis, Michigan State University, East Lansing.
- Thornhill, R., and P. Sauer. 1992. Genetic side effects on the fighting ability of sons and daughters and mating success of sons in a scorpionfly. *Anim. Behav.* 43:225-264.
- Tracy, M., D.C. Freeman, J.M. Emlen, J.H. Graham, and R.A. Hough. 1995. Developmental instability as a biomonitor of environmental stress. p. 313-337. *In* Butterworth et al. (ed.) *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Plenum Press, New York.
- Ueno, H. 1994. Fluctuating asymmetry in relation to two fitness components, adult longevity and male mating success in a ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecol. Entomol.* 18:87-88.
- Valentine, D.W., and M.E. Soulé. 1973. Effects of p, p'-DDT on developmental stability of pectoral fin rays in the grunion, *Leuresthes tenuis*. *Fish. Bull.* 71:921-926.
- Van Valen, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16:125-142.
- Williams, S.L., R. Laubach, and H.H. Genoways. 1977. A guide to the management of recent mammal collections. *Carnegie Museum of Natural History*, 4: 1-105.
- Woodyard, D.K. 1982. Response of wildlife to land application of sewage sludge. M.Sc. thesis, Michigan State University, East Lansing.
- Zakharov, V.M. 1981. Fluctuating asymmetry as an index of developmental homeostasis. *Genetika (Beograd)* 13:241-256.
- Zakharov, V.M. 1989. Future prospects for population phenogenetics. *Soviet Sci. Rev. F. Physiol. Gen. Biol.* 4:1-79.

- Zakharov, V.M., A.V. Valetsky, and A.V. Yablokov. 1997. Dynamics of developmental stability of seals and pollution in the Baltic sea. *Acta Theriologica (Suppl.4)*:9-16.
- Zakharov, V.M., and A.V. Yablokov (ed.). 1997. Developmental homeostasis in natural populations of mammals: phenetic approach. *Acta theriologica (Suppl.4)*.
- Zasoski, R.J., D.W. Cole, and C.S. Bledsoe. 1983. Municipal sewage sludge use in forests of the Pacific Northwest, U.S.A.: Growth responses. *Waste Manage. Res.* 1:103-114.

Part II. Fluctuating Asymmetry of *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) as a Biomonitor of Sewage Sludge Application to Forests

Jean-Marc Bonzom, Sophie Belleville, and Jean-Marie Bergeron

*Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) J1K 2R1 Canada*

ABSTRACT

Fluctuating asymmetry (FA) of organisms can be used as a sensitive tool for monitoring environmental health under various anthropogenic impacts. We estimated the fluctuating asymmetry of a predator ground beetle (*Pterostichus melanarius*) as morphometric biomarker to assess the global impact of municipal liquid sewage sludge on the environmental quality. Fluctuating asymmetry was estimated on the length of the antenna's second segment and the number of spines on the tibia of the second pair legs of *P. melanarius* sampled from sludge-treated (= T) and two untreated (= C and C3) forest sites at Sherbrooke's University (Québec, Canada). The control C and treatment stands T were approximately 200 m apart. The control C3 was separated by about 900 m of a mature forest from the other sites. The antennae FA values were not significantly different between the 3 sites. On the other hand, the spine FA levels of the control site C3 were greater than those from the control site C and treated T plot. According to these values, there was a higher developmental stability of *P. melanarius* on the treated site T and on the control site C than on the second control site C3. Our results suggest that municipal sewage sludge applications have no short-term impact (2 years) on the *P. melanarius* development, i.e., on the environmental quality of their habitat. These results agree with the conclusions of a previous study where we had shown that FA on meadow voles from treated sites was not significantly different from that of control sites. These results suggest that the guidelines of the Québec government on the sewage sludge application on forest soils seem effective in protecting environmental quality on the short term basis (MENVIQ et al. 1991).

Key words: sewage sludge, forestry, ground beetle, fluctuating asymmetry.

Developmental stability represents the stable development of a phenotype under given environmental conditions (Møller and Swaddle, 1997). A range of environmental (e.g. food deficiency, heavy metals, pesticides, radiations, toxic chemicals, woodland fragments) and genetic factors (e.g. inbreeding, hybridization, novel mutants) is known to affect the ability of a wide variety of organisms to develop stable phenotypes (review in Clarke and McKenzie, 1987, 1992; Parsons, 1992; Freeman et al., 1993; Graham et al., 1993; Tracy et al., 1995; Zakharov and Yablokov, 1997; Møller and Swaddle, 1997). Fluctuating asymmetry (FA) is the most often used measure of developmental stability (Zakharov, 1981, Palmer and Strobeck, 1986). FA can provide a sensitive morphometric biomarker to detect and assess the effects of environmental stresses on a variety of organisms (e.g. plants: Tracy et al., 1995; Møller, 1998; Roy and Stanton, 1999; invertebrates: Clarke and McKenzie, 1992; Strong and James, 1992; Groenendijk et al., 1998; small mammals: Pankakoski et al., 1992; 1994; fishes: Sánchez-Galán et al., 1998; Bonzom et al., 1999; sea mammals: Zakharov et al., 1997; birds: Lens et al., 1999).

In the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus*, it has been shown that following municipal sewage sludge application on forest land, the level of FA on bone structures did not increase which suggests that one year after the municipal sewage sludge application, according to the guidelines issued by Québec government (MENVIQ et al., 1991), no biological stress was indicated according to the FA technique applied on voles (Bonzom et al., 1999). Municipal sludge is a fertilizer containing nutrients, organic matter but also contaminants such as pathogens, trace metals and synthetic organics. However, developmental instability is not necessarily measurable in all species living in a stressed habitat (review in Tracy et al., 1995). Moreover, because of the transfer of contaminants in the food-chain, and of biomagnification of toxics, notably heavy metals and synthetic organics, carnivorous and detritivorous animals could accumulate much higher concentrations of contaminants than herbivores, such as voles (Beyer et al., 1985; Hegstrom and West, 1989). Therefore, following a sludge application, environmental stresses could particularly affect the species at the top of the food chain compared to species of lower trophic levels.

Since FA analyses did not vary between herbivorous voles living on treated and control sites, we then focused on FA analyses from a predator insect. This was done by comparing the levels of FA of ground beetles, *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae), living under sludge-exposed conditions to those of beetles living in control sites. The hypothesis is that morphometric and meristic parameters will vary significantly between animals living on treated and control stands.

MATERIALS AND METHODS

Description of Study Area and Sludge Application

Characteristics of the study area and principles of the sewage sludge application have been presented in details in Bonzom et al. (1999). The study was conducted in 1997 on five experimental plots located within the tree plantations of the University of Sherbrooke, Québec, Canada (45°15'N, 72°00'E). Trapping occurred on two treatment sites (= T1 and T2) and on three control sites (= C1, C2, C3). Control (C1 and C2) and treatment plots (T1 and T2) were separated by a forest road and the control and treatment stands were approximately 200 m apart. The control C3 was separated by about 900 m of a mature forest from the other sites. The location and slopes of the treated plots were chosen so that runoff from these plots would not affect the control plots.

The sewage sludge used for the trials came from the water treatment facility of the municipality of Richmond (Québec, Canada). The average dry matter content of the sludge was about 11.2%. The application rate of the sludge corresponded to approximately 200 kg N ha⁻¹ which represented the maximum permissible rate by the Québec guidelines at that time (MENVIQ et al., 1991). The sludge was applied on September 15 and 16, 1995.

Ground Beetle Sampling

Nearly two years after the sludge application (between July 17 and August 25, 1997), adult *P. melanarius* were collected using pitfall traps on both control and treated plots. All captured specimens were stored in ethyl acetate until examined. Because C1 and C2 (control) plots are very near to each other, 50 adult insects by plot were randomly selected and pooled afterwards to form a single control sample (= C). The same procedure was applied for the treated plots T1 and T2 (= T).

Species and Characters Examined

Like most of the carabidae, *P. melanarius* adults live commonly on the ground and in the litter. Adult ground beetles are commonly found under stones, logs, leaves, bark, debris, or running about on the ground. When disturbed, they run rapidly, but seldom fly (Borrer et al., 1989). The adults feed on a wide variety of animals, including snails, worms, and adults or immature insects of many kinds. The rate of food intake can be as high as three times their body weight per day (Thiele, 1977). The larvae are slender with strong mouthparts, well-developed legs, and a pair of terminal urogomphi (cercus-like organs). They are predaceous, feeding on

other insects. They are usually found in the soil or under ground cover, where they hunt for their prey (Ross et al., 1991).

P. melanarius is a fall breeder. The females begin to lay their eggs at the end of spring until early fall. The larvae are found from summer to spring of the following year, but mainly, the new generation appears mainly next summer (Bousquet, 1986). The adults of the new generation are able to reproduce the same year they emerge under certain climatic conditions (Luff, 1973; Jørum, 1980). Hibernation occurs in the larval and adult stages. The adult population usually has one activity cycle per year.

Fluctuating asymmetry was estimated on the length of the antenna's second segment and between the number of spines on the tibia of the second pair legs. Antennas were removed from both sides of each individual using fine forceps and were mounted in Hoyer's medium (Martin, 1977) on glass microscope slides. Second segment of antenna were measured with an ocular micrometer at 40 magnification. Spines were scored under a binocular dissecting microscope at 40 magnification.

FA from antenna and spines were calculated as the absolute value of the right (R) minus left (L) difference $|R - L|$.

To obtain a totally unbiased estimate of measurement error, all measurements were conducted by the same individual and were conducted according to a blind technique (i.e. without reference to earlier measurements).

Since sample size was large (100 individuals by site) the measurement error was made three times on a subsample of 30 individuals. For the site C3, all individuals ($n = 20$) were measured three times. Measurements followed the procedure recommended by Palmer (1994a).

Statistical Analyses

Analyses of variance were conducted in SuperAnova 1.11 (Abascus Concepts, 1989), and other statistics were made with SPSS (SPSS Inc., 1994), using fluctuating asymmetry calculation worksheet (Palmer, 1994b) based on formulae and analyses presented by Palmer and Strobeck (1986) and Palmer (1994a).

Before doing these however, it is necessary to test if the between-side variation is significantly larger than the measurement error. If it is not the case, then FA tests are not justified (Palmer, 1994a). To evaluate measurement error for the metric trait, we used the method described by Palmer and Strobeck (1986). We used a two-way ANOVA (sides x individuals). From ANOVA results, we used a F-test between the interaction mean square (MS_{sj}) and error mean square (MS_m), with degrees of freedom equal to (S - 1) (J - 1) and SJ(M -

1), where S = number of sides, J = number of individuals, and M = number of replicates. For all samples, the between-side variation is significantly larger than the measurement error (site T: $F_{29, 120} = 59.40$, $P < 0.001$; site C: $F_{29, 120} = 64.60$, $P < 0.001$; site C3: $F_{19, 80} = 22.71$, $P < 0.001$). The meristic trait was counted without any measurement error because all replicates were equal.

Characters that demonstrate fluctuating asymmetry are distinguished from those having directional asymmetry or anti-symmetry when the normal signed left-minus-right character values have a mean not deviating significantly from zero (Møller and Swaddle, 1997). To detect directional asymmetry we calculate for each sample and each trait the mean ratio $(R - L) / \text{error standard } (R - L)$ and the significance test used is a one-sample t-test (Palmer, 1994a). The Sequential Bonferroni test is applied (Rice, 1989). No significant directional asymmetry was found in any of the samples tested ($p > 0.05$). To test for departure from normality, skewness (g_1), and kurtosis (g_2), as well as standard error of (s_{g_1}) and (s_{g_2}) respectively, and for the signed $(R - L)$ values of each trait, we used a one-sample t-test to compare $t_s = g_1 / s_{g_1}$ and $t_s = g_2 / s_{g_2}$ versus values of t for an infinite degree of freedom (Palmer, 1994a). The Sequential Bonferroni test was applied (Rice, 1989). No significant departure from normality was found in any of the samples tested ($p > 0.05$).

An association between trait size and the degree of asymmetry can distort the results of FA analyses (Palmer and Strobeck, 1986). In order to detect size dependence in spine and antenna length, absolute difference $(R - L)$ in trait was regressed against trait size $((R + L) / 2)$. No size dependence was detected, so, no size scaling was necessary to correct the raw data of antenna length (site T: $r = 0.091$, $F_{1, 99} = 0.816$, $P = 0.36$; site C: $r = 0.059$, $F_{1, 99} = 0.348$, $P = 0.56$; site C3: $r = 0.038$, $F_{1, 19} = 0.027$, $P = 0.87$), and spine (site T: $r = 0.018$, $F_{1, 99} = 0.030$, $P = 0.86$; site C: $r = 0.031$, $F_{1, 99} = 0.095$, $P = 0.76$; site C3: $r = 0.084$, $F_{1, 19} = 1.652$, $P = 0.21$).

Differences in FA of spine and antenna measurements among the three sites (T, C, and C3) were tested with a one way ANOVA for each trait on $|R - L|$ calculated separately for each individual, and pairwise Tukey-Kramer tests were made to evaluate which group means were significantly different.

RESULTS AND DISCUSSION

Mean absolute FA values (\pm SE) for tibia spines and the length of the antenna's second segment as well as ANOVA results are presented in Table 1.

Table 1. Mean absolute fluctuating asymmetry $|R - L|$ values (\pm SE) and ANOVA results for tibia spines and antenna length of *P. melanarius* in three sites (T = sludge; C = control; C3 = control). Tukey-Kramer test was performed when ANOVA indicated significant differences. * indicates statistical significance at $P < 0.05$.

	Site			ANOVA		
	T † (n = 100)	C (n = 100)	C3 (n = 20)	$F_{2,218}$	P	Tukey-Kramer
Antenna	0.01115 \pm 0.00999	0.00960 \pm 0.00914	0.0088 \pm 0.00817	0.939	0.392	
Spine	0.67333 \pm 0.74155	0.66000 \pm 0.69628	1.200 \pm 0.95145	4.934	0.008	T vs C3* C vs C3*

† T = Treated. C and C3 = Control. n = Numbers of ground beetles

The antennae FA values were not significantly different between the 3 sites. On the other hand, the spine FA levels of the control site C3 were greater than those from the control site C and treated T plot. According to these values, there was a higher developmental stability of *P. melanarius* on the treated site T and on the control site C than on the second control site C3. Our results suggest that municipal sewage sludge applications have no short-term impact (2 years) on the *P. melanarius* development, i.e. on the environmental quality of their habitat. These results agree with the conclusions of a previous study where we had shown that FA on meadow voles from treated sites was not significantly different from that of control sites (Bonzom et al., 1999).

High levels of asymmetry have already been associated with reductions in fitness components such as growth, fecundity, survival and mating success in a wide variety of plants and animals (Møller, 1997; Møller and Swaddle, 1997). In the present study, fitness components of *P. melanarius* for each site (control and treated) are unknown. As FA of *P. melanarius* from treated sites was not significantly different from that of the control site C, and significantly lower than that of control site C3, it is very likely that sewage sludge did not decrease the fitness of *P. melanarius* after two years of sludge application.

Many studies present evidence that environmental stresses increase insect's FA: e.g. temperature in the Diptera *Lucilia cuprina* (Clarke and McKenzie, 1992) and in the *Drosophila melanogaster* (Parsons, 1962); climatic extreme conditions in the Lepidoptera *Coenonympha tullia* (Soule and Baker, 1968); fertilizer factory effluents in the Diptera *Chironomus salinarius*

(Clarke, 1993a) and in the Neuroptera *Chrysopa perla* (Clarke, 1993b); ivermectin in the Diptera *Musca vetuatissima* (Clarke and Ridsdill-Smith, 1990); benzene and lead in the Diptera *D. melanogaster* (Graham et al., 1993); carbaryl in the Odonata *Xanthocnemis zealandica* (Handersen and Wratten, 1998). In the present study, FA values even suggest that the current environmental conditions of the control site C3 were not as good as those present on the treated site and the control site C for *P. melanarius*. Environmental quality is then not different between the treated and control site C. The high capture levels of *P. melanarius* on both plots is indirect evidence that reproduction and survival of larvae were equally high compared to C3 stand where capture levels were much lower.

Municipal sewage sludge represents a valuable source of plant nutrients containing high levels of nitrogen, phosphorus, and potassium (Pimentel et al., 1983). Indeed, after the first year of sludge application, we registered a rapid growth of white oak (*Quercus alba*) (Bonzom et al., 1999), as well as, an important increase in herbaceous vegetation (J.-M. Bonzom, pers. obs.). Previous studies have shown that such nutrient enrichments stimulate increases in ground beetle abundance and biomass in short grass prairies (Lavigne and Campion, 1978). Larsen et al. (1996) found that carabid abundance and diversity were still significantly higher after 11 years following sewage sludge application compared with control plots. The authors thought that the carabid response was an indirect result of the increased plant biomass caused by the nutrient enrichment (Sedlacek et al., 1988), which could support a higher diversity and increased densities of the arthropod fauna (Hurd and Wolf, 1974; Kirchner, 1977; Pimentel and Warneke, 1989). Increased plant growth means more food to herbivores which can support larger populations of predators such as ground beetles. We showed elsewhere that sludge application (1 year after application) seemed to promote insect herbivory on the leaves of white oaks (J.-M. Bonzom, unpublished data). This is suggesting that fitness components of *P. melanarius* inhabiting the treated site could be higher than that of animals inhabiting the control sites. However, our results of FA suggest that fitness components were similar for animals of the treated and control plots but lower for these living on the second control stand. Several studies have showed a negative relationship between developmental instability and fitness components (see Møller, 1997 for review).

Developmental stability is understood and used as a non-specific stress indicator (Tracy et al., 1995; Zakharov and Yablokov, 1997; Møller and Schaddle, 1997 for reviews). FA permits to visualize simultaneously the synergetic, antagonistic or additive effects of sewage sludge on forest ecosystems, which would be impossible to study otherwise (Pankakoski et al., 1992). We used FA on voles as a biomarker to biomonitor sewage sludge application to forest soils

(Bonzom et al., 1999), FA data of treated *P. melanarius* give an integrated response of environmental health after sludge application, that is the improvement of forage quality and/or quantity which is generally assumed beneficial for animals, and the input of contaminants (i.e. pathogenic micro-organisms, trace metals and synthetic organics) in the environment assumed to be detrimental for animals. FA provides a scientific basis for managerial decisions concerning the rapid assessment of environmental impact in relation to cost/benefit estimations.

Previous studies at the sites of the present study have focused on cadmium, lead and mercury concentrations in small mammals, tree leaves, tree growth, parasite contamination of voles and FA analyses of specific voles traits (Bonzom et al., 1999). If sewage sludge is applied to forest soils according to the guidelines of the Québec's government (MENVIQ et al., 1991), our results suggest that it did not impact negatively the health of young trees and small mammals on a short-term basis. In the present study, we could not find any biological stress based of FA analyses that could influence *P. melanarius* population health. This is suggesting that the guidelines of the Québec government on the sewage sludge application on forest soils seem effective in protecting environmental quality on the short term basis (MENVIQ et al. 1991). Longer term studies should be made to evaluate the cumulative impact of sludge components through time.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Geneviève Labrie and Frank Siriex for assistance in collecting the insects and Benoit Vaillancourt for his help in the identification of the ground beetle samples. We thank also Céline Bérubé for comments on earlier drafts of the manuscript. The research was supported by operating grants to J.-M. Bergeron from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche of Québec.

REFERENCES

- Abacus Concepts. 1989. Super ANOVA. Version 1.11. Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA.
- Beyer, W.N., O.H. Pattee, L. Siloe, D.J. Hoffman, and B.M. Mulhern. 1985. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. Environ. Pollut. (Series A) 38:63-86.
- Bonzom J.-M., 1999. L'asymétrie fluctuante : un biomarqueur morphométrique pour évaluer la qualité de l'environnement. Ph.D. thesis, Université de Sherbrooke, Canada.
- Borror, D.J., D.M. DeLong, and C.A. Triplehorn. 1989. An introduction to the study of insects. Saunders College Publishing, Philadelphia.

- Bousquet, Y. 1986. Observations on the life cycle of some species of *Pterostichus* (Coleoptera: Carabidae) occurring in northeastern North America. *Le Naturaliste Canadien*. 113:295-307.
- Clarke, G.M. 1993a. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environ. Pollut.* 82:207-211.
- Clarke, G.M., 1993b. Patterns of developmental stability of *Chrysopa-Perla L* (Neuroptera, Chrysopidae) in response to environmental pollution. *Environ. Entomol.* 22:1362-1366.
- Clarke, G.M., and J.A McKenzie. 1987. Developmental stability of insecticide resistant phenotypes in blowfly: a result of canalizing natural selection. *Nature* 325:345-346.
- Clarke, G.M., and J.A. McKenzie. 1992. Coadaptation, developmental stability and fitness of insecticide resistance genotypes in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: a review. *Acta Zool. Fenn.* 191:107-110.
- Clarke, G.M., and T.J. Ridsdill-Smith. 1990. The effect of Avermectin B1 on developmental stability in the bush fly, *Musca vetuatiissima*. *Entomol. Exp. Appl.* 54:265-269.
- Clarke, J.M., and L.J. McKenzie. 1992. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. *J. Econ. Entomol.* 85:2045-2050.
- Freeman, D.C., J.H. Graham, and J.M. Emlen. 1993. Developmental stability in plants - symmetries, stress and epigenesis. *Genetica* 89:97-119.
- Graham, J.H., K.E. Roe, and T.B. West. 1993. Effects of lead on the developmental stability of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology* 2:185-195.
- Groenendijk, D., L.W.M. Zeinstra, and J.F. Postma. 1998. Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a metal-contaminated river. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:1999-2005.
- Handersen, S., and S.D. Wratten. 1998. The effects of carbaryl exposure of the penultimate larval instars of *Xathocnemis zealandica* on emergence and fluctuating asymmetry. *Ecotoxicology* 7:297-304.
- Hegstrom, L.J., and S.D. West. 1989. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage-sludge application to forests. *J. Environ. Qual.* 18:345-349.
- Hurd, L.C., and L.L Wolf. 1974. Stability in relation to nutrient enrichment in arthropod consumers of old-field successional ecosystems. *Ecol. Monogr.* 44:465-482.
- Jørum, P. 1980. Life cycles and annual activity patterns of *Pterostichus melanarius* (Illig.) and *P. niger* (Schall.) (Coleoptera: Carabidae) in a Danish beech wood. *Ent. Meddr.* 48:19-25.
- Kirchner, T.B. 1977. The effects of resource enrichment on the diversity of plants and arthropods in a shortgrass prairie. *Ecology* 58:1334-1344.

- Larsen, K.J., F.F. Purrington, S.R. Brewer, and D.H. Taylor. 1996. Influence of sewage sludge and fertilizer on the ground beetle (Coleoptera, Carabidae) fauna of an old-field community. *Environ. Entomol.* 25:452-459.
- Lavigne, R.J., and M.K. Champion. 1978. The effect of ecosystem stress on the abundance and biomass of Carabidae (Coleoptera) on the shortgrass prairie. *Environ. Entomol.* 7:88-92.
- Lens, L., S. Van Dongen, C.M. Wilder, T.M. Brooks, and E. Matthysen. 1999. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266:1241-1246.
- Luff, M.L., 1973. The annual activity pattern and life cycle of *Pterostichus madidus* (F.) (Col., Carabidae). *Ent. Scand.* 4:259-273.
- Martin, J.E.H. 1977. The insects and arachnids of Canada. Part 1. Collecting, preparing and preserving insects, mites, and spiders. Biosystematics Research Institute, Ottawa, Canada.
- Ministère de l'environnement du Québec, Ministère des forêts du Québec, and Ministère de la santé et des services sociaux. 1991. Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guides des bonnes pratiques. Québec.
- Møller, A.P. 1997. Developmental stability and fitness - a review. *Am. Nat.* 149:916-932.
- Møller, A.P. 1998. Developmental instability of plants and radiation from Chernobyl. *Oikos* 81:444-448.
- Møller, A.P., and J.P. Swaddle. 1997. Asymmetry, developmental stability and evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Palmer, A.R. 1994a. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. p. 335-364. In T.A Markow (ed.) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Palmer, A.R. 1994b. FA spreadsheet on Excel Spreadsheet. ftp://www.biology.ualberta.ca/pub/palmer.ftp/software/FA_Calc.sea.hqx.
- Palmer, A.R., and C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annal Review of Ecological Systematics* 17:391-421.
- Pankakoski, E., I. Koivisto, and H. Hyvärinen. 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew, *Sorex araneus*. *Acta Zool. Fennica* 191:137-144.
- Pankakoski, E., I. Koivisto, H. Hyvärinen, and J. Terhivuo. 1994. Shrews as indicators of heavy metal pollution. In J.F. Merritt, G.L.J. Kirkland, and R.K. Rose (ed.) *Advances in biology of shrews*. Carnegie museum of natural history special publication, pp. 137-149.
- Parsons, P.A., 1962. Maternal age and developmental variability. *J. Exp. Biol.* 39:251-260.

- Parsons, P.A., 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68:361-364.
- Pimentel, D., and A. Warneke. 1989. Ecological effects of manure, sewage sludge and other organic wastes on arthropod populations. *Agric. Zool. Rev.* 3:1-30.
- Pimentel, D., G. Berardi, and S. Fast. 1983. Energy efficiency of farming systems: organic and conventional agriculture. *Agric. Ecosys. Environ.* 9:359-372.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing table of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Ross, H.H., C.A. Ross, and R.P. Ross. 1991. A textbook of entomology, 4th edition. Krieger publishing company, Malabar, Florida.
- Roy, B.A., and M.L. Stanton. 1999. Asymmetry in wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. *J. Evol. Biol.* 12: 440-449.
- Sánchez-Galán, S., A.R. Linde, J.I. Izquierdo, and E. Garcíavazquez. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*) - complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 412:219-225.
- Sedlacek, J.D., G.W. Barrett, and D.R. Shaw. 1988. Effects of nutrient enrichment on the *Auchenorrhyncha* (Homoptera) in contrasting grassland communities. *J. Appl. Ecol.* 25:537-550.
- Soulé, M.E., and B. Baker. 1968. Phenetics of natural populations. IV. The population asymmetry parameter in the butterfly, *Coenonympha tullia*. *Heredity* 23:611-614.
- SPSS. Inc. 1994. SPSS 6.1 Base System User's Guide. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Strong, L., and S. James. 1992. Some effects of rearing the yellow dung fly *Scatophaga stercoraria* in cattle dung containing ivermectin. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 63:39-45.
- Thiele, H.U., 1977. Carabid beetles in their environments. Springer-Verlag, Berlin.
- Tracy, M., D.C. Freeman, J.M. Emlen, J.H. Graham, and R.A. Hough. 1995. Developmental instability as a biomonitor of environmental stress. p. 313-337. *In* Butterworth et al. (ed.) *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Plenum Press, New York.
- Zakharov, V.M. 1981. Fluctuating asymmetry as an index of developmental homeostasis. *Genetika (Beograd)* 13:241-256.
- Zakharov, V.M., A.V. Valetsky, and A.V. Yablokov. 1997. Dynamics of developmental stability of seals and pollution in the Baltic sea. *Acta Theriologica (suppl.4)*:9-16.

Zakharov, V.M., and A.V. Yablokov (ed.). 1997. Developmental homeostasis in natural populations of mammals: phenetic approach. Acta theriologica (Suppl.4).

CHAPITRE 4

L'ASYMÉTRIE FLUCTANTE COMPARÉE À D'AUTRES BIOMARQUEURS

Publication 1. Fluctuating asymmetry and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): two complementary biomarkers to monitor aquatic ecosystems. *Aquatic Toxicology* (à soumettre).

Le chapitre précédent a contribué à démontrer la pertinence de l'instabilité du développement des organismes pour évaluer la qualité de l'environnement. Ces études ont été réalisées dans le contexte des épandages des boues d'épuration en milieu forestier.

Dans ce chapitre, nous démontrons que le concept d'instabilité du développement peut être également appliqué dans tout autre programme de surveillance, comme par exemple celui de la qualité des eaux (Publication 1).

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la sensibilité de l'asymétrie fluctuante par rapport à d'autres biomarqueurs plus couramment utilisés dans les programmes de surveillance de la qualité des eaux. L'objectif recherché était de montrer que l'asymétrie fluctuante chez les poissons représente une méthode complémentaire intéressante pour évaluer la santé des écosystèmes aquatiques.

Fluctuating asymmetry and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): two complementary biomarkers to monitor aquatic ecosystems.

Jean-Marc Bonzom^{a,b}, Sélim Ait-Aissa^b, François Brion^b, Denis Réale^c, Véronique Poulsen^b,
Jean-Marie Bergeron^a, Jean-Marc Porcher^b, and Éric Thybaud^b

^a Groupe de Recherche en Écologie, Nutrition et Énergétique, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada, ^b Laboratoire d'Écotoxicologie et de Toxicologie, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Parc Technologique ALATA Verneuil en Halatte, France, ^c Biology Department, McGill University, Montréal, Canada

Abstract

Several studies have indicated that fluctuating asymmetry (FA) of organisms may be a sensitive, simple and inexpensive tool for monitoring environmental quality under various anthropogenic impacts. In this study, we evaluated the FA sensitivity compared with ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activities in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to the biocide pentachlorophenol (PCP) in lotic aquatic mesocosms. Two channels were continuously contaminated with PCP at 100 µg L⁻¹ (= PCP-high), two channels had PCP at 10 µg L⁻¹ (= PCP-low) while two others received the solvent ethanol at 25 mg L⁻¹ (which is the same ethanol concentration as in the PCP channels) and the last two channels were used as control. Sub-adult fishes born in these channels were captured about one year after the start of the chronic contamination experiment, and FA was estimated on both number of pectoral fin rays and fresh mass of both eyes. Number of pectoral fin rays did not differ between treatments. On the other hand, the differences in FA of eye mass between treatments were significant. In PCP-high channels, fishes were less symmetric than fishes from control channels (P = 0.034), and from PCP-low channels (P = 0.046). Moreover, fishes from PCP-high channels tended to be less symmetric than fishes from solvent channel (P = 0.08). All other differences between treatments were not significant. Hepatic EROD activity was not significantly different between PCP-high and PCP-low animals (P = 0.52), but was significantly higher in PCP-high animals over control (P = 0.0007) and solvent-reared individuals (P = 0.0001). EROD was significantly higher in PCP-low fishes compared to control (P = 0.0002) and solvent-reared animals (P =

0.0001). EROD was significantly lower in solvent treated individuals compared to control animals ($P = 0.011$). Our results showed the usefulness of FA measurements in organisms to detect pollutants in water ecosystems. FA measurements in fishes is an easy, rapid and inexpensive way to assess environmental quality in both laboratory and field studies. FA measurements based on a higher number of traits, coupled with other biomarkers such as EROD, hepatosomatic index (HSI) and spleen somatic index (SSI) may allow the detection of bioavailable pollutants at low toxic concentrations.

Key words: Fluctuating asymmetry, EROD, fish, pentachlorophenol, hepatosomatic, gonadosomatic, condition factor, spleen-somatic, mesocosm

1. Introduction

Interest in sustainable development and public concern about environmental threats have stimulated governments to develop their capacity to monitor and assess the state of the environment (OECD, 1994). The assessment of sublethal and combined effects of human activities on the health of aquatic ecosystems represents an important challenge for environmental scientists. The biomonitoring of the aquatic environment quality needs simple and inexpensive methods that can be used routinely. Moreover, these methods must be sensitive, i.e. capable of detecting stress levels well before certain components of aquatic communities (e.g. invertebrates, plants, fishes) are affected or disappear.

Several studies have indicated that developmental stability indices may be such a monitoring tool for environmental quality under various anthropogenic impacts (e.g. see Leary and Allendorf, 1989; Clarke, 1993; Graham et al., 1993, 1994; Tracy et al., 1995; Møller and Swaddle, 1997; Zakharov and Yablokov, 1997 for reviews). The developmental stability of organisms can be viewed through the stable development of phenotypes under a given environmental condition (Møller and Swaddle, 1997). The most commonly used measurement of developmental stability is fluctuating asymmetry (Zakharov, 1981; Palmer and Strobeck, 1986). FA is defined as small random deviations from perfect bilateral symmetry that result from genetic and/or environmental stresses during development (Van Valen, 1962; Palmer, 1994). Many studies have shown increases in fluctuating asymmetry of traits among aquatic (in)vertebrates populations as a result of environmental disruptions. For example, populations living in polluted habitats have higher FA levels with regards to certain phenotypes than those

living in non polluted habitats (invertebrates: Clarke, 1993; Groenendijk et al., 1998; amphibians: Chubinishvili, 1998; fishes: Ostbye et al., 1997; Sánchez-Galán et al., 1998; marine mammals: Zakharov et al., 1997). Moreover, laboratory experiments have shown an increase in FA for individuals grown under polluted conditions (e.g. fishes: Valentine and Soulé, 1973; insects: Hardersen and Wratten, 1998).

Most of all, FA is able to detect chronic sublethal stresses in the environment, well before the decrease of population fitness (Clarke and McKenzie, 1992; Graham et al., 1993; Clarke, 1995; Møller and Swaddle, 1997). This fact is of particular importance for biomonitoring purposes. However, further field and laboratory studies using various sublethal stresses and animal species are still necessary to validate FA on phenotypes as an early warning morphometric biomarker. In that respect there is a need to compare FA sensitivity with other commonly used biochemical, physiological or histological biomarkers which are commonly used by environmental scientists for detecting xenobiotic chemicals in ecosystems (see Huggett et al., 1992; Fossi and Leonzi, 1994 for reviews). To date, a single study made such a comparison between FA measures and biomarker data. Sánchez-Galán et al. (1998) measured micronuclei number in kidney erythrocytes (an index of cytogenic damage) and FA in wild populations of brown trout (*Salmo trutta*) living under polluted environments. Brown trouts from highly polluted rivers showed significantly higher micronuclei numbers and FA values than brown trouts from less polluted rivers.

Among biochemical markers, fish hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), a cytochrome P450 1A monooxygenase, has certainly been the most often used biochemical marker to detect certain organic pollutants in marine and continental aquatic ecosystems (e.g. Payne, 1976; Vindimian and Garric, 1989; Fenet et al., 1996; Arinc and Sen, 1999). Many studies in field and laboratory conditions have demonstrated an increase in EROD activities in fish from areas contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs), polyaromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), or polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) (see Stegeman and Hahn, 1994 for a review).

The aim of the present study was to assess the relationship between FA and EROD activities in fishes exposed to a chemical pollutant, in order to validate FA measurements as complementary morphometric biomarkers for biomonitoring the quality of freshwater ecosystems. This was carried out by measuring FA and hepatic EROD activity in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to the biocide pentachlorophenol (PCP) in an outdoor mesocosm. Moreover, body condition, hepatosomatic index, spleen-somatic index and gonadosomatic index were calculated to assess fish condition and reproductive status. Mass of

the spleen provides a general overview of the adequacy of the structural parts of the immune system (Weeks et al., 1992). Mesocosms attempt to mimic natural conditions and are logistically and experimentally manageable (see SETAC, 1992 for a review). PCP was chosen as a reference compound because its chemistry, toxicology and fate in the environment have been widely studied (WHO, 1987) and it has been used as a reference compound by various groups concerned with the standardization of laboratory methods in aquatic toxicology (Davis and Hoos, 1975; Adema and Vink, 1981). *G. aculeatus* was chosen as test fish because of its well known biology and natural history (Wooton, 1976; Coad, 1981; Allen and Wooton, 1982; Bell and Foster, 1994). Three-spined sticklebacks are widely present in shallow sea water, freshwater, and in estuaries through temperate and subarctic areas of the northern hemisphere. The species is also easy to catch and to acclimatize to semi natural field and laboratory conditions. As a predator, it can accumulate and magnify high quantities of contaminants. It is able to reproduce after one year and reproduce well in mesocosms. They already have been used to test the toxicity of chemicals and waste waters (Van den Dikkenberg et al., 1989; Environnement Canada, 1990; Holm et al., 1994).

2. Materials and methods

2.1. Mesocosms design

This study was conducted at the Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France). The station has 12 outdoor experimental channels, each 20 meters long x 1 m wide x 1 m deep (see Fig. 1). Each channel consists of two parts: the upstream zone (10 m long and 30 cm deep), and the downstream zone (10 m long and 70 cm deep). A pool in the upstream portion of the channel allows the mixing of contaminants with water. Ground water from a borehole is continuously flowing in this system. The flow in each channel is about $1 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ which corresponds to the following speeds: 0.1 cm s^{-1} in the upstream part and 0.05 cm s^{-1} in the downstream part. The residence time of a chemical in the channels is about 8 hours.

In the downstream zone of the channels, a 10 cm deep sediment layer is made of 2 parts of a mixture of clay and 2 mm-diameter sand, and 1 part natural sediments. In the upstream part, a very thin layer (a few millimeters) of natural sediment was introduced and 20 cm-diameter grey stones were placed on it.

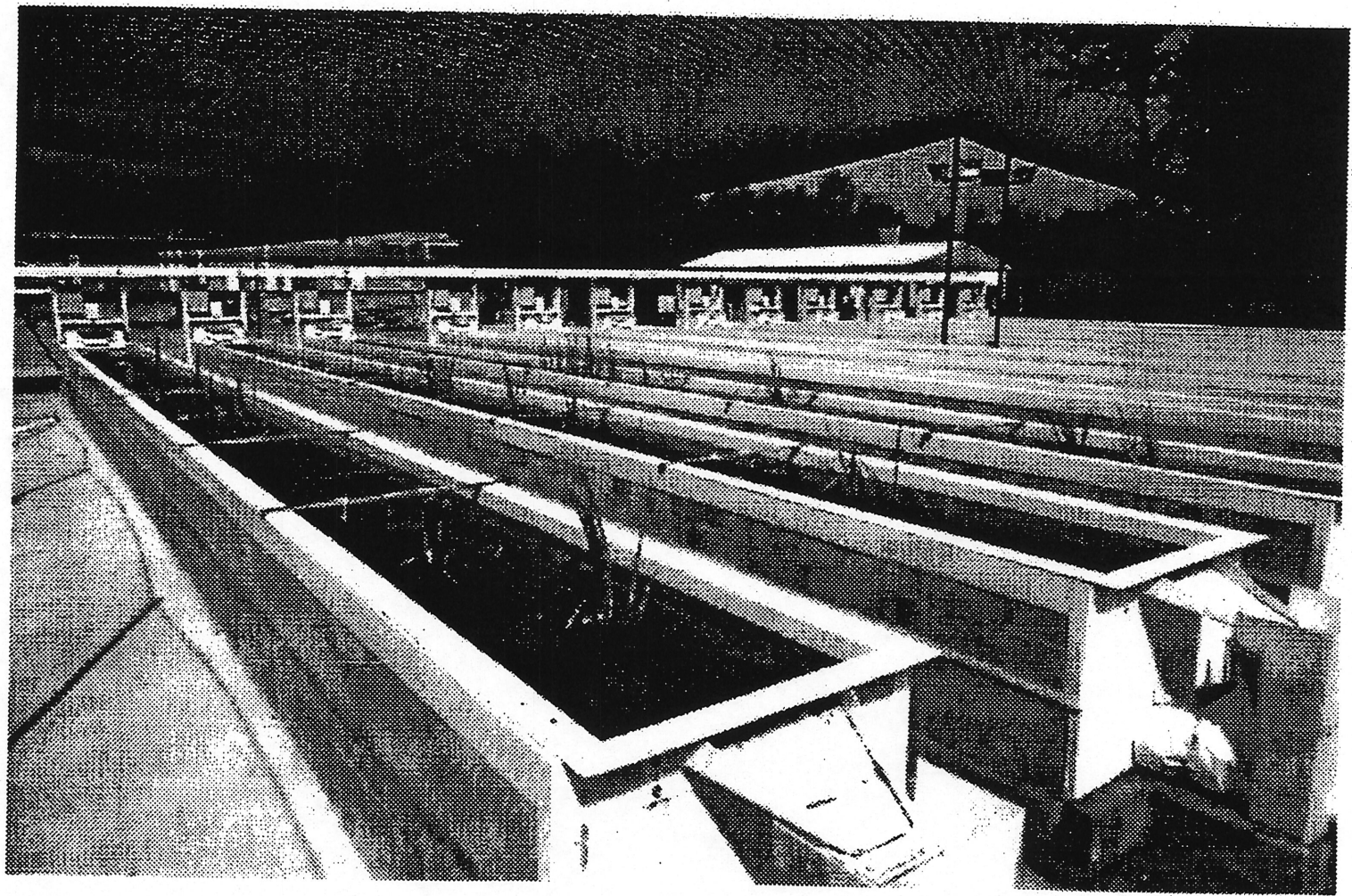


Fig. 1. Overview of the 12 outdoor artificial streams.

2.2. Biocenosis

The vegetation in each channel is composed of *Iris pseudacorus* and *Sparganium sp.* in the deep part, and *Callitriche sp.* and *Myosotis palustris* in the upstream part. Free populations of invertebrates were introduced in the channels. These are *gammaridae*, *asellidae*, *ephemeroptera*, *diptera* (with a majority of *chironomiidae*), *trichoptera*, *coleoptera* and *lymnaeidae*.

In May 1998, five adult three-spined sticklebacks, two males and three females, were introduced in each channel. All the fauna and flora introduced in the mesocosms was collected in an unpolluted river located 20 km from the laboratory.

2.3. Mode of contamination

Two channels were continuously contaminated with pentachlorophenol (PCP) to an instream concentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (PCP-high), two other channels with $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCP (PCP-low). Two control (C) and two solvent control (E) were also used. Concentrations in the channels were controlled weekly. Stock solutions of 2 and 0.2 g L^{-1} of PCP were prepared each week and were used to contaminate the channels. Because of the low water solubility of PCP (14 mg L^{-1} at 20°C) (WHO, 1987), ethanol was used as a solvent to prepare the stock solutions. Ethanol represents 50% of the stock solutions and its concentration in the channels was estimated at 25 mg L^{-1} . Control and contaminated solutions were randomly assigned to the channels at the start of experiment.

2.4. Physical and chemical water characteristics

In 1998, temperature, pH, dissolved oxygen, conductivity and turbidity were recorded every 15 min. at 20 cm depth using one line sensors protected from direct sun light. In the present study, we present these data as complementary information.

2.5. Fish sampling

Between March 13 and April 6 1999, about one year after the introduction of sticklebacks, 20 sub-adult three-spined sticklebacks were randomly sampled in each channel with fish traps. We did not find any sticklebacks in one of the PCP-high channels, and only 12 animals were

captured in the second PCP-high channel. After being captured, individuals were immediately sacrificed, weighed (g), measured (cm), and dissected for further study.

2.6. Fluctuating asymmetry

FA was estimated by counting the number of pectoral fin rays and weighing the fresh mass of eyes. Both left and right pectoral fin rays were scored using a binocular dissecting microscope. Both right and left eyes were weighted to 0.0001 g precision using a precision laboratory balance. Asymmetry was estimated as the signed difference between the right and left side (R - L) for both characters (Palmer, 1994).

2.7. EROD assay

Liver EROD activities were determined immediately after dissection. Fresh livers were rinsed in cold KCl 0.5 M, and were manually homogenized on ice with a Teflon™ Potter in 0.2 mL of a 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.8) containing 0.2 mM phenylmethylsulfonide fluoride (PMSF). To ensure equal homogenization of all samples, liver homogenates were sonicated on ice for 3 to 10s. In preliminary experiments, we made sure that the sonication step did not significantly affect the EROD activity. The samples were centrifugated for 10 min. at 9000 g, 4°C, and the resulting supernatants (S9) were used for the assay.

EROD activity was assessed in a microplate format as described by Flammarion and Garric (1997). Briefly, 10 µl of S9 were mixed in 200µl of phosphate buffer containing 0.2 mM PMSF and 2 µM 7-ethoxyresorufin in a black 96-wells microplate and the reaction was started by adding 10 µl of NAPDPH (final concentration of 250 µM). Kinetics of resorufin formation (wavelengths excitation/emission: 530 nm/585 nm) was measured with a multiwell fluorimeter (Victor, Wallac™) using a resorufin standard from Sigma. The assay was conducted at room temperature.

Total protein content in S9 was determined by the method of Bradford (1976) adapted on an automated Cobas Fara (Roche, France). Bovine serum albumin was used as standard.

2.8. *Physiological indices*

The body condition factor (CF) was first calculated from the total weight and length according to the formula: $100 \times (\text{weight}/\text{length}^3)$. However, the condition factor was still

significantly correlated to length ($r^2 = 0.26$; $F_{1,166} = 57.330$, $P = 0.0001$). Therefore, to obtain an index of condition factor orthogonal to length, we had to estimate the condition factors as the residuals in the regression between the body weight (log10 transformed) as an independent variable and the length (log10 transformed) as a dependent variable. This regression was highly significant ($r^2 = 0.967$, $F_{3,166} = 4861.366$, $P = 0.0001$). For a given length, individuals with negative residuals are in poorer conditions, and individuals with positive residuals are in better conditions than the mean population condition.

Liver, spleen, and gonads were removed and weighed. Hepatosomatic index (HSI), spleen somatic index (SSI), and gonadosomatic index (GSI) were calculated for each organ as the ratio between the organ weight and total body weight.

2.9. Statistical analyses

Three kinds of asymmetry exist: directional asymmetry (DA), antisymmetry (AS), and fluctuating asymmetry (FA) (Van Valen, 1962). Because DA and AS may have a genetic basis, it is important to test the presence of both types of asymmetry before analyzing FA (Palmer, 1994). Fluctuating asymmetry is characterized by a normal distribution with a mean not significantly different from zero (Van Valen, 1962). We therefore tested the normality of FA for eye mass in each channel to check for a significant deviance of the means from zero. Fin ray numbers did not vary between body sides for each fish and among fish, and therefore have not been used (see below). Shapiro-Wilk tests indicated that FA data sets were normally distributed in all the cases ($P > 0.05$), and none of the mean values of FA were significantly different from zero (Student's *t* test; $P > 0.1$). An association between trait size and the degree of asymmetry can distort conclusions concerning analyses of asymmetry (Palmer and Strobeck, 1986). In order to detect size dependence in eye mass, absolute difference $|R - L|$ was regressed against the length of individuals. FA indices were not related with length of individuals in each channel ($r < 0.34$ in all the cases, $P > 0.1$).

Data were transformed for normality before analyses. Both hepatosomatic index (HSI), spleen somatic index (SSI), which are proportions, were arcsine transformed, and EROD was log transformed (Sokal and Rohlf, 1997). We investigated the effect of treatment on the different parameters using mixed-model nested ANOVAs (Sokal and Rohlf, 1997). In these analyses, treatment was considered as a fixed effect, and channels (nested within treatment), as a random effect. This allows to investigate if some part of the total variance is due to variance among channels, and specific differences among channels per se is of no concern in that case. When

channels had no significant effects on the expression of the index, we performed a one-way ANOVA with treatment as a fixed effect (Sokal and Rohlf, 1997). We then performed Scheffé's post-hoc tests to compare differences among treatments.

Many studies have shown that EROD activity in different fish species is related with age, sex or reproductive status (e.g. Goksøyr and Förlin, 1992; Sleiderink et al., 1995; Flammarion and Garric, 1999; Kirby et al., 1999; Lundstrom et al., 1999). We thus performed a multiple stepwise backward regression between EROD and both length (a rough indicator of age in stickleback), sex, GSI (an index of sexual maturity), and channels (categorical variable). We also performed a multiple stepwise backward regression of FA in function of length, sex and sexual maturity. We finally compared the different indices (i.e. FA, EROD, HSI and SSI) with partial correlations.

Mixed-model ANOVAs were performed using JUMP (SAS Institute Inc., 1989), and other tests were performed using Statview 4.02 (Abacus Concepts Inc., 1992).

3. Results

3.1 Water characteristics

Water temperature (Fig. 2), conductivity and turbidity had similar fluctuation patterns in all channels. The increase in pH (Fig. 3) in the control channels is probably due to an important filamentous algae development. Dissolved oxygen concentration differed among channels (Fig. 4). In the 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ PCP contaminated channels, dissolved oxygen concentration decreased because of macrophytes and algae death due to the PCP inhibition action on plants photosynthetic activity (Senger and Rühl, 1980; Tissut et al., 1987). In these channels, oxygen production was reduced, its consumption increased.

3.2. Effect of the treatment on fluctuating asymmetry

Ten pectoral fin rays were found on the right and the left side of each fish in all channels. Few exceptions existed: one control fish had 11 rays at the right side (R) and 10 rays at the left (L), one solvent fish (R = 12; L = 10), one PCP-low fish (R = 11; L = 10), and one PCP-high fish (R = 8; L = 10) had also such differences. The number of pectoral finrays, therefore, did not seem to differ among treatments and are not statistically meaningful.

There was no significant effect within treatment (channels) in eye mass (Table 1 and Fig. 5A). However, the differences in FA of eye mass between treatments were significant (Fig. 5A).

Temperature (°C)

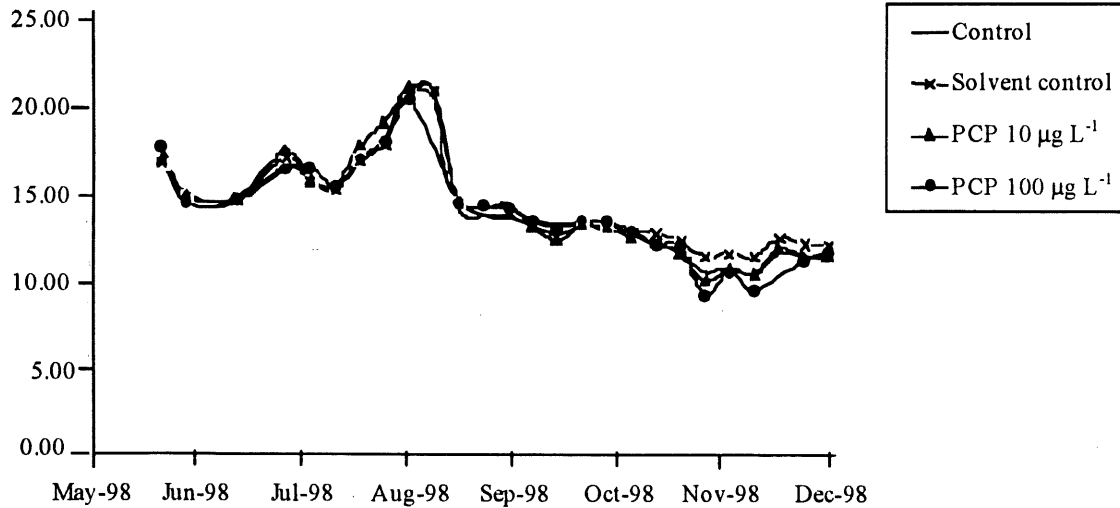


Fig. 2. Water temperatures variations in channels.

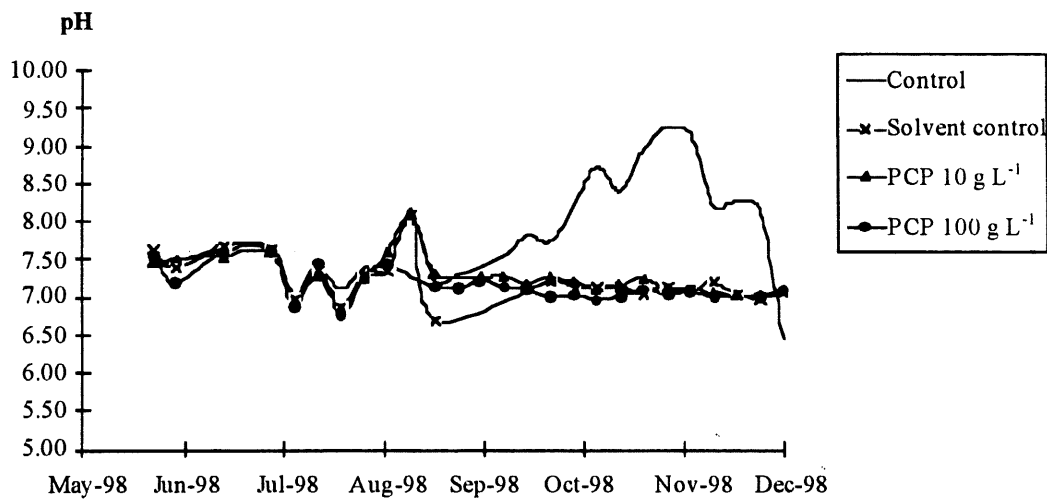


Fig. 3. pH variations in channels.

In PCP high channels, fishes were less symmetric than fishes in control channels (Scheffé: $P = 0.034$), and PCP-low channels ($P = 0.046$). Moreover, fishes from PCP-high channels tended

to be less symmetric than fishes from solvent-control channels ($p = 0.08$). All other differences between treatments were not significant.

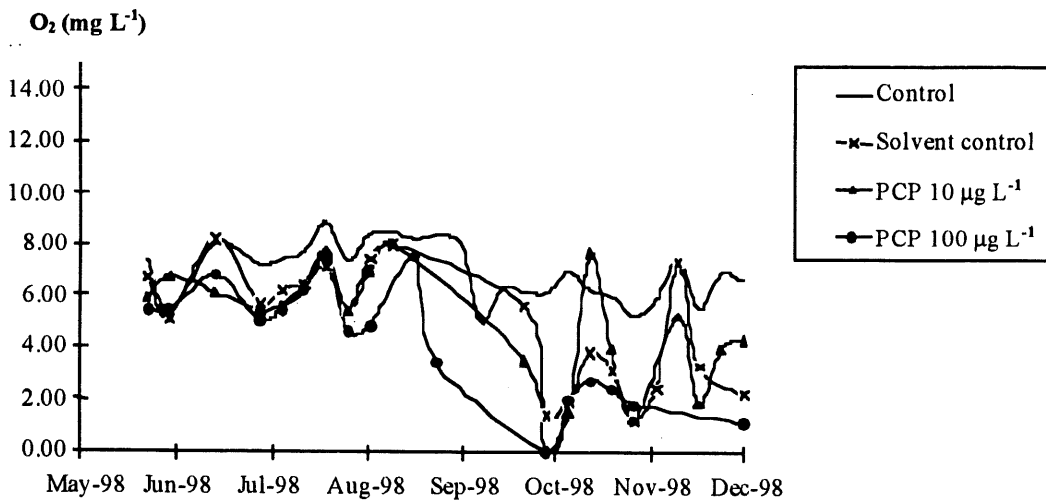


Fig. 4. Dissolved oxygen concentration in channels.

3.3. Effect of the treatment on EROD

EROD significantly differed in treated animals (Table 1 and Fig. 5B). EROD was not significantly different between fishes caught in PCP-high and PCP-low channels ($P = 0.52$), but was higher in PCP-high animals compared to control ($P = 0.0007$) and solvent-control fishes ($P = 0.0001$). EROD also was significantly higher in PCP-low animals compared to control ($P = 0.0002$) and solvent-control animals ($P = 0.0001$). EROD was significantly lower in solvent-control reared fishes compared to control animals ($P = 0.011$).

3.4. Effect of the treatment on body condition

Mean body condition of sticklebacks varied significantly within treatments, but did not differ significantly between treatments (Table 1 and Fig. 5C).

3.5. Effect of the treatment on hepatosomatic index

HSI differed significantly among treatments but not within each treatment (Table 1 and Fig. 5D). HSI did not vary significantly between solvent-reared fishes and PCP-low animals. HSI data differed significantly at a 0.01 level (Scheffé's post-hoc test) between all other types of

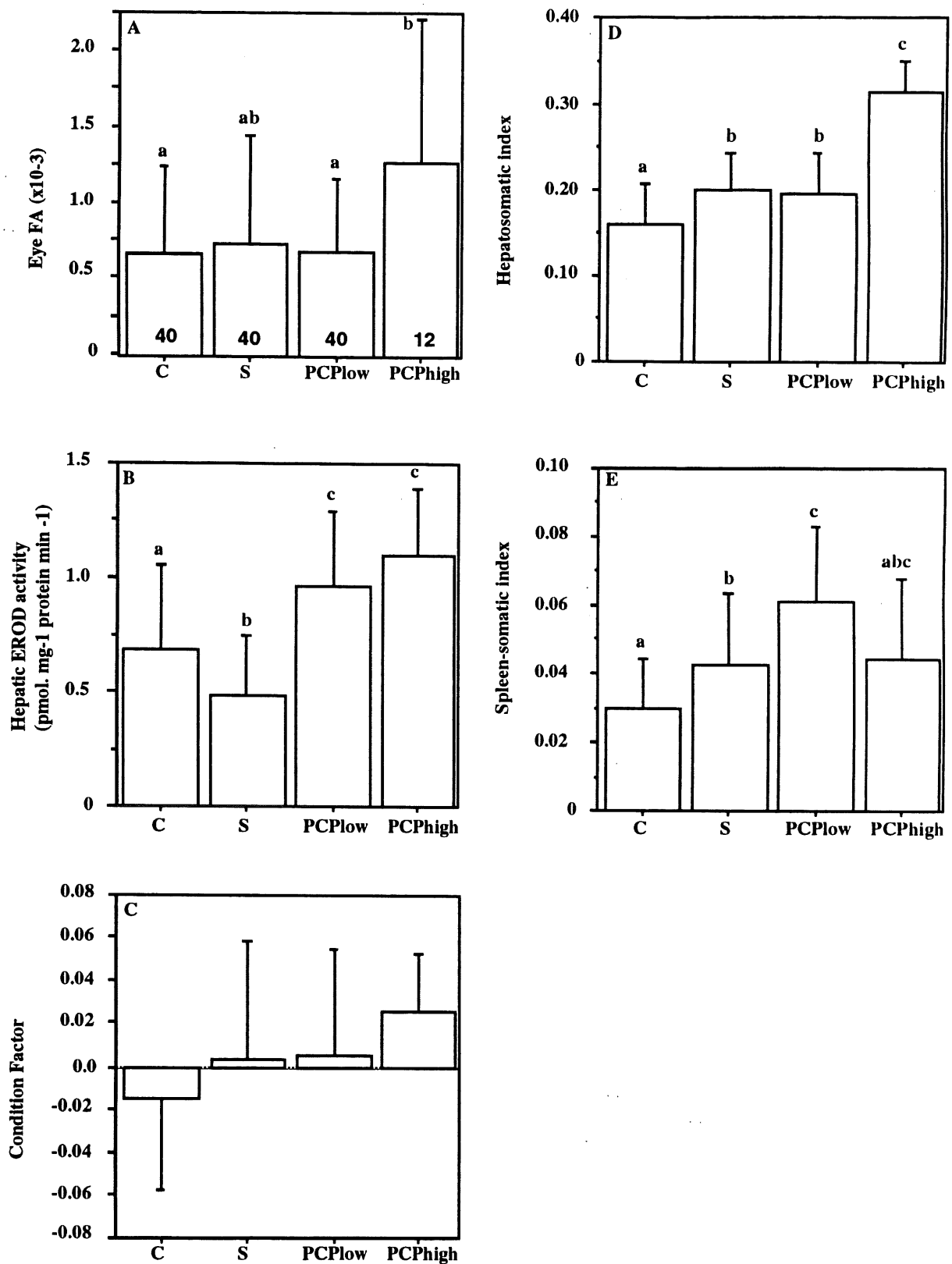


Fig. 5. Fluctuating asymmetry (A), hepatic EROD activities (B), condition factor (C), hepatosomatic index (D) and spleen-somatic index (E) in the control, and exposed populations of three-spined sticklebacks. C = control, S = solvent control, PCPlow = 10 µg PCP L⁻¹, and PCPhigh = 100 µg PCP L⁻¹. Values are mean ± SD. Histograms with different letters differ significantly. Sample sizes are indicated on bars in graphic A. See text for details.

treatments. The highest HSI value was observed in a PCP-high-reared fish and the lowest, in control-reared fish (Fig. 5D).

3.6. Effect of the treatment on spleen somatic index

SSI data differed significantly between treatments but not within treatments (Table 1 and Fig. 5E). SSI data were significantly higher in individuals of the PCP-low compared to control and solvent-control reared individuals (Scheffé: $P = 0.0001$). The indices also tended to be higher than those related to PCP-high individuals ($P = 0.08$). Control animals had significantly lower SSI values than solvent-control reared individuals ($P = 0.048$).

Table 1

Nested ANOVAs and one-way ANOVAs (only level with * were considered) for FA measured on eye mass, EROD, CF, HSI, and SSI on PCP treatments (fixed level) and within and between treatments.

Biomarker	Level	df	MS	F	P
FA	Between treatment	3,154*	0.000001	3.1611	0.026
	Within treatment	3,151	0.000000	1.0961	0.353
EROD (log)	Between treatment	3,3	2.68719	7.1937	0.061
	Within treatment	3,158	0.42816	4.5742	0.004
CF	Between treatment	3,3	0.00783	0.9474	0.510
	Within treatment	3,161	0.00947	4.2826	0.006
HSI (arcsine)	Between treatment	3,162*	0.07968	35.3072	<0.001
	Within treatment	3,159	0.00467	2.1872	0.092
SSI (arcsine)	Between treatment	3,149*	0.00079	20.2658	<0.001
	Within treatment	3,146	0.00046	1.1780	0.320

df = Degree of freedom, MS = Mean square, FA = Fluctuating asymmetry, CF = condition factor, HSI = Hepatosomatic index, SSI = Spleen somatic index.

3.7. Relationships between body length, sex and reproductive status, and biomarkers (EROD and FA)

Multiple stepwise backward regression of EROD on length, sex, reproductive status and treatment types was significant (general model: $R^2 = 0.45$; $F_{8,147} = 14.911$, $P = 0.0001$). GSI was rejected from the final model ($F_{1,145} = 0.126$, $P = 0.72$). Body length was positively correlated with EROD ($b = 0.09 \pm 0.06$, $F_{1,147} = 5.825$, $P = 0.017$). Males had higher EROD levels than females ($b = 0.12 \pm 0.05$, $F_{1,147} = 5.635$, $P = 0.02$). As previously shown, treatment was significantly related with EROD ($F_{6,147} = 18.026$, $P = 0.0001$).

All variables except treatment types were rejected from the regression model of FA (length: $F_{1,139} = 0.032$, $P = 0.86$; GSI: $F_{1,139} = 0.763$, $P = 0.38$; sex: $F_{1,139} = 0.352$, $P = 0.55$).

3.8. Correlation between FA, EROD, HSI, and SSI

HSI was positively and significantly correlated with both EROD and FA. FA and EROD activity were not correlated (Table 2).

Table 2

Partial correlations between indices in the stickleback treated with PCP in mesocosms. All the individuals from Control, Solvent controls, PCP-low, and PCP-high were included in the analyses (n observations = 149).

	HSI	SSI	EROD
FA	0.18*	0.02	-0.08
HSI		0.02	0.21**
SSI			0.15

* significant at 5%; **significant at 1%.

FA = Fluctuating asymmetry, HSI = Hepatosomatic index, SSI = Spleen-somatic index

4. Discussion

4.1. Fluctuating asymmetry

Low ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) and high ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) concentrations of PCP did not affect the symmetry of pelvic fin rays. On the other hand, high concentrations of PCP increased FA in eye mass (Fig.

5A). This study is the first to report FA data on eye mass. These results suggest that a particular stress can affect the development of a specific organ or set of organs, but not necessarily the whole organism (e.g. Campbell and Emlen, 1996; Roy and Stanton, 1999). For example, Roy and Stanton (1999) have shown that the type of organ affected depends on the physiological stress in wild mustard, *Sinapis arvensis* (*Brassicaceae*). Petal asymmetry was higher in the high salt treatment, whereas fruit asymmetry was higher in the low light treatment. Therefore, FA measurements from different characters are needed to detect environmental stresses (Leary and Allendorf, 1989; Palmer and Strobeck, 1992).

Our results indicate that FA of eye mass is robust enough to differentiate sticklebacks living in $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCP. This result is consistent with many studies that have shown increasing levels of fluctuating asymmetry as a result of environmental disruptions in aquatic or terrestrial invertebrate and vertebrate populations (e.g. Valentine and Soulé, 1973; Strong and James, 1993; Pankakoski et al., 1992; Zakharov et al., 1997; Groenendijk et al., 1998; Drover et al., 1999; Imasheva et al., 1999; Lens et al., 1999). However, FA did not allow to detect any effect in fishes living in PCP-low channels compared to control and solvent-control populations. FA of eye mass was therefore not efficient to detect low concentrations of PCP in freshwater ecosystems after one year of chronic contamination. Alternatively, $10 \mu\text{g PCP L}^{-1}$ in water may not be sufficiently stressful during embryonic development of eyes to cause increased asymmetry in fishes. Another explanation is that individual sticklebacks with higher developmental instability may be more sensitive to low PCP concentrations than symmetric ones and therefore had a higher chance to die before the end of the experiment. This could have led to the under-representation of asymmetric individuals at low PCP concentrations. Selection often acts against individuals with developmentally unstable phenotypes (Møller, 1998; Møller and Swaddle, 1997), symmetric phenotypes generally having higher survival than asymmetric ones (review in Møller, 1997). At high PCP concentration, individuals were less able to cope with stress, whatever their intrinsic (or genetic) ability to maintain a stable development. Likewise, FA values measured at high PCP concentrations likely underestimate the real effect of PCP.

High asymmetry is generally associated with a decrease in fitness components (i.e. growth, fecundity, mating success, and survival) in a wide variety of animals and plants (Møller, 1997; Møller and Swaddle, 1997). In the present study, the fitness components of sticklebacks for each treatment (control, solvent-control, PCP-low and PCP-high) have not been measured, but the lower number of fishes present at high PCP concentrations (e.g. no fish in one PCP-high channel and 12 in the other) compared to others treatments (about 70 fishes per channel) suggests that the high PCP concentrations affect both fecundity and/or survival.

FA is a general stress response that does not identify neither the specific stressor nor its mechanism of action (Tracy et al., 1995). FA is a nonspecific biomarker of effect. In the present study, FA values reflect the direct PCP toxicity on fishes, but also the indirect adverse impact of PCP on habitat of fishes because PCP, as a result of its biocidal properties, affects also large aquatic species at relatively low concentrations and consequently the physico-chemical parameters of water such as the increase of dissolved oxygen (review in WHO, 1987).

Our results have shown that FA of eye mass was not modulated by length, sex or reproductive status. FA in sticklebacks is a consequence of environmental quality experienced by fishes during their developmental time. FA of eye mass provides a reliable environmental biomarker.

4.2. *EROD*

Our study shows that sticklebacks living in both PCP-low and PCP-high channels had a higher EROD activity than control-reared sticklebacks while sticklebacks in channels with solvent (ethanol) had the lowest EROD values. Bebetts et al. (1980) have shown an increase in EROD and glucuronyl transferase activity in female rats fed during 5 weeks on a diet with 99 % pure PCP. Our results show once more that EROD is a useful biochemical biomarker for in situ monitoring of pollutant effects in freshwater ecosystems. However, the EROD values did not allowed to differentiate between the PCP-low and PCP-high effects. An inhibition phenomenon may occur at high concentrations and had been recorded in the past in fish caught at highly polluted sites (Vindimian et al., 1991). Moreover, the presence of ethanol in the environment is likely to inhibit EROD activity on the long term. Consequently, EROD values in PCP-low and PCP-high fishes may be under-estimated. A high variation in EROD activity among channels suggests that other factors are at work which may limit the EROD potential as a biomarker in field research. Part of the within-channel variation in EROD may be caused by the relationship between the length of fishes, their sex, or reproductive status (= GSI) (this study; Andersson and Förlin, 1992). The female hormone oestradiol-17b is known to depress monooxygenases activities (O'Hare et al., 1995).

4.3. *Condition factor*

One commonly used index of fish health is the condition factor (CF) (Everhart and Youngs, 1981). A decline in CF is usually associated with a depletion of energy reserves such as stored

liver glycogen or body fat, and may reflect a change in feeding patterns or an increase in metabolic rate (Dennis and Bulger, 1995). Our results suggested that body condition was not affected by PCP. As far as we know, no other study has tested PCP on the condition factor of this fish species.

4.4. Hepatosomatic index

Sticklebacks in PCP-low and PCP-high channels had significantly higher HSI than those in control channels. These results indicate the possible deterioration of hepatic cells in sticklebacks exposed to PCP (Sloof et al., 1983), and are consistent with previous observations reported by previous studies (see WHO, 1987 for review). Exposure to purified PCP or technical formulations of PCP increases the mass of liver of several species (e.g. Jekat et al., 1994; Umemura et al., 1996; Blakley et al., 1998). HSI thus seems to be a useful indicator of exposure to PCP. Moreover, sticklebacks from channels with solvent (25 mg L⁻¹ of ethanol) showed higher HSI than those from control channels. This result together with those on EROD (see above) indicate that, even low concentrations of ethanol in the water should have long-term biological effects on *G. aculeatus*. This raises the question of the apparent neutrality of auxiliary agents, like ethanol, that are commonly used in ecotoxicological tests to measure the effects of the substance above the solubility limit or even to prepare the test solutions of the product to be tested. Further studies are needed to assess long-term effects of ethanol on aquatic ecosystems.

4.5. Spleen-somatic index

PCP at low concentration and its solvent used in channels increased SSI of fishes compared to PCP-high and control-reared fishes. This suggests that low PCP concentrations and ethanol enhance the immune activity. The response of the immune system is often used to assess the toxic effects of chemicals (see Weeks et al., 1992 for review). The spleen is supplied by splanchnic (autonomic) innervation which stimulates its contractions during stress, such as hypoxia (Fänge and Mattisson, 1985).

4.6. Correlation between FA, EROD, HSI, and SSI

An important issue of this research was to assess the relationship between FA, EROD activities, HSI and SSI in fishes. HSI was positively and significantly correlated with both

EROD and FA. HSI is generally considered a good indicator of health (Huggett et al., 1992), and therefore FA and EROD activity may be reliable tools to assess health status at the population level.

FA and EROD activity were not correlated, but both biomarkers give complementary informations of health status of individuals and populations. FA indicates stress conditions during the embryonic development (Parsons, 1992), and EROD values present data on recent stresses (see Stegeman et al., 1992 for review). EROD tests are useful to biomonitor recent events related to chemical pollution whereas the FA tests are helpful to biomonitor old or/and sporadic events of pollution. Moreover EROD belongs to the phase I Cytochrome P450 1A1 dependent activities which are well known to be mainly induced by planar aromatic hydrocarbons such as PCBs, PAHs, dioxins and furans. It had been shown to be the most potent biomarker in field situations where persistent chlorinated pollutants were present (Van der Oost et al., 1997). However, its significance at the population level remains unclear. Thus, EROD may be considered as a good biomarker of exposure to bioavailable persistent pollutants. On the other hand, FA cannot be linked to a specific type of pollution or even stress but is known to be relevant of embryogenic effects. FA is a biomarker of effects and should be included in multibiomarkers studies in order to add to the information on exposure to toxicants a useful information on effects. However, more research is still needed to assess the sensitivity of FA to chronic pollution and its correlation to other biomarkers.

5. Conclusion

This study highlights several new aspects of biomonitoring environmental health. First, it shows the usefulness of FA measurements in organisms to detect the impact of pollutants in water ecosystems. FA measurements in fish is an easy, rapid and inexpensive way to assess environmental quality in both laboratory and field conditions. Further studies are needed to assess the reliability of FA on eye mass or other biometric characters in several stress conditions and for other fish species. FA measurements based on a higher number of traits, coupled with other biomarkers such as EROD, HSI or SSI, may allow to detect the effect of pollutants at different sublethal concentrations. Finally, this study shows the usefulness of mesocosms in ecotoxicological research. They allow to go a step further in the impact assessment of pollutants in semi-natural conditions. They should also detect subtle long-term effects of solvents providing such biomarkers are recorded within mesocosms studies.

Acknowledgments

This manuscript greatly benefited from constructive comments by Dr. Éric Vindimian and Dr. Hélène Magaud. Our research was funded by the Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement (France) within the PNETOX program (N   97-028). Financial support was provided to J.-M. Bonzom by the Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France) and through operating grants to J.-M. Bergeron from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche of Québec.

References

- Abacus Concepts Inc. 1992. Statview 4.02. Berkeley, California.
- Adema, D.M.M., Vink, G.J., 1981. A comparison study of the toxicity of 1,1,2-trichloroethane, dieldrin, pentachlorophenol and 3,4-dichloroaniline for marine and fresh water organisms. *Chemosphere* 10, 533-554.
- Allen, J.R.M., Wootton, R.J., 1982. The effect of ration and temperature on the growth of the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Fish Biol.* 20, 402-422.
- Andersson, T., Förlin, L., 1992. Regulation of the cytochrome P-450 dependent enzymatic activities, a chemical pollution indicator. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, 287-312.
- Arinc, E., Sen, A., 1999. Hepatic cytochrome P450 1A and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase induction in mullet and common sole as an indicator of toxic organic pollution in Izmir Bay, Turkey. *Marine Environ. Res.* 48, 147-160.
- Bebets, F.M.H., Strick, J.J.T.W.A., Olie, K., 1980. Effects of pentachlorophenol on rat liver changes induced by hexachlorobenzene with special reference to porphyria and alterations in mixed-function oxygenases. *Toxicology* 15, 181-195.
- Bell, M.A., Foster, S.A. (Eds.), 1994. *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*. Oxford University Press, Oxford.
- Blakley, B.R., Yole, M.J., Brousseau, P., Boermans, H., Fournier, M., 1998. Effect of pentachlorophenol on immune function. *Toxicology* 125, 141-148.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-251.

- Campbell, W.B., Emlen, J.M., 1996. Developmental instability analysis of bdk-infected spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, prior to seawater exposure. *Oikos* 77, 540-548.
- Chubinishvili, A.T., 1998. Developmental homeostasis in populations of the marsh frog (*rana ridibunda pall.*) living under the conditions of chemical pollution in the middle volga region. *Russian Journal of Ecology* 29, 63-65.
- Clarke, G.M., 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environ. Pollut.* 82, 207-211.
- Clarke, G.M., 1995. Relationships between developmental stability and fitness: application for conservation biology. *Conservation Biology* 9, 18-24.
- Clarke, G.M., Mc Kenzie, L.J., 1992. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing process. *J. Econ. Entomol.* 85, 2040-2050.
- Coad, B.W., 1981. A bibliography of the Sticklebacks (*Gasterosteides: Osteichthyes*). Collection Syllogeus, n°35, Musées nationaux du Canada, Ottawa.
- Davis, J.C., Hoos, R., 1975. Use of sodium pentachlorophenate and dehydroabiotic acid as reference toxicants for salmonid bioassays. *J. Fish Res. Board Can.* 32, 411-416.
- Dennis, T.E., Bulger, A.J., 1995. Condition factor and whole-body sodium concentrations in a freshwater fish - evidence for acidification stress and possible ionoregulatory over-compensation. *Water, Air and Soil Pollution* 85, 377-382.
- Drover, S., Leung, B., Forbes, M.R., Mallory, M.L., McNicol, D.K., 1999. Lake pH and aluminum concentration: consequences for developmental stability of the water strider *Rheumatobates rileyi* (Hemiptera Gerridae). *Can. J. Zool.* 77, 157-161.
- Environement Canada. 1990. Biological test method, acute lethality test using threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Environment Canada. NTIS, SPE 1/RM/10.
- Everhart, W.H., Youngs, W.D., 1981. *Principles of Fishery Sciences*, 2nd edition. Ithaca, New York.
- Fänge, R., Mattisson, A., 1985. The fish spleen: structure and fonction. *Experientia* 41, 152-158.
- Fenet, H., Casellas, C., Bontoux, J., 1996. Hepatic enzymatic activities of the european eel *Anguilla anguilla* as a tool for biomonitoring freshwater streams - laboratory and field caging studies. *Water Science and Technology* 33, 321-329.
- Flammarion, P., Garric, J., 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers - a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker. *Chemosphere* 35, 2375-2388.

- Flammarion, P., Garric, J., 1999. A statistical approach for classifying the extent of EROD induction of fish sampled in clean and contaminated waters. *Water Research* 33, 2683-2689.
- Fossi, M.C., Leonzi, C.E., 1994. *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo.
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22, 287-312.
- Graham, J.H., Freeman, D.C., Emlen, J.M., 1993. Developmental stability: a sensitive indicator of population under stress. In: Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 136-158.
- Graham, J.H., Freeman, D.C., Emlen, J.M., 1994. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. In: Markow, T.A. (Eds.), *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 123-140.
- Groenendijk, D., Zeinstra, L.W.M., Postma, J.F., 1998. Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a metal-contaminated river. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1999-2005.
- Hardersen, S., Wratten, S.D., 1998. The effects of carbaryl exposure of the penultimate larval instars of *Xathocnemis zealandica* on emergence and fluctuating asymmetry. *Ecotoxicology* 7, 297-304.
- Holm, G., Lundstrom, J., Andersson, T., Norrgren, L., 1994. Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the 3-spined stickleback, *Gasterosteus Aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 29, 241-256.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, J., P.M., Bergman, H.L.E., 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological makers of anthropogenic stress. Ward, C.H. Walton, B.T., Lapoint, T.W. (Eds.), SETAC Special Publications Series. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Imasheva, A.G., Bosenko, D.V., Bubli, O.A., 1999. Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* 82 (Part 2), 187-192.
- Jekat, F.W., Meisel, M.L., Eckard, R., Winterhoff, H., 1994. Effects of pentachlorophenol (PCP) on the pituitary and thyroidal hormone regulation in the rat. *Toxicology Letters* 71, 9-25.

- Kirby, M.F., Matthiessen, P., Neall, P., Tylor, T., Allchin, C.R., Kelly, C.A., Maxwell, D.L., Thain, J.E., 1999. Hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) as an indicator of contaminant exposure in English estuaries. *Marine Pollut. Bull.* 38, 676-686.
- Leary, R. F., Allendorf, F. W., 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 4, 214-217.
- Lens, L., Van Dongen, S., Wilder, C.M., Brooks, T.M., Matthysen, E., 1999. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. *Pro. R. S. Lond. B. Biol. Sci.* 266, 1241-1246.
- Lundstrom, J., Carney, B., Amcoff, P., Pettersson, A., Borjeson, H., Forlin, L., Norrgren, L., 1999. Antioxidative systems, detoxifying enzymes and thiamine levels in Baltic salmon (*Salmo salar*) that develop M74. *Ambio* 28, 24-29.
- Møller, A. P., 1997. Developmental stability and fitness - a review. *American Naturalist* 149, 916-932.
- Møller, A.P., 1998. Developmental instability of plants and radiation from Chernobyl. *Oikos* 81, 444-448.
- Møller, A.P., Swaddle, J.P., 1997. *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- O'Hare, D.B., Siddall, R., Robotham, P.W.J., Gill, R.A., 1995. Influence of oestradiol on induction of EROD activity in roach (*Rutilus rutilus L.*). *Chemosphere* 30, 1423-1428.
- OECD, 1994. *Environmental indicators*. Organisation for economic co-operation and development, Report No. 47518.
- Ostbye, K., Oxnevad, S.A., Vollestad, L.A., 1997. Developmental stability in perch (*Perca fluviatilis*) in acidic aluminium-rich lakes. *Can. J. Zool.* 75, 919-928.
- Palmer, A.R., 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow, T. (Ed.), *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrech, Netherlands, pp. 335-364.
- Palmer, A.R., Strobeck, C., 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annal Review of Ecological Systematics* 17, 391-421.
- Palmer, A.R., Strobeck, C., 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zool. Fenn.* 191, 57-72.
- Pankakoski, E., Koivisto, I., Hyvärinen, H., 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew, *Sorex araneus*. *Acta Zool. Fennica* 191, 137-144.

- Parsons, P.A., 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68, 361-364.
- Payne, J.F., 1976. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science* 191, 945-946.
- Roy, B.A., Stanton, M.L., 1999. Asymmetry in wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. *J. Evol. Biol.* 12, 440-449.
- Sánchez-Galán, S., Linde, A.R., Izquierdo, J.I., Garcíavazquez, E., 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*) - complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 412, 219-225.
- SAS Institute Inc. 1989. JMP 3.02, statistical software for Macintosh. Cary, North Carolina.
- Senger H., Rühl D., 1980. The influence of pentachlorophenol on the biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and chlorophyll. *Int. J. Biochem.* 12, 1045-1048.
- SETAC, 1992. Symposium on aquatic mesocosms in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (Special issue). 140 p.
- Sleiderink, H.M., Oostingh, I., Goksoyr, A., Boon, J.P., 1995. Sensitivity of cytochrome P450 1A induction in dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the southern north sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 423-430.
- Sloof, W., Van Kreijl, C.F., Baars, A.J., 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology* 4, 1-14.
- Sokal, R.R., Rohlf F.J., 1981. *Biometry: the principles and practices of statistics in biological research*. 2 ed. W.H. Freeman and Company, San Fransisco, California.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, J.P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp. 235-335.
- Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular,*

- Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, Chelsea, United States, pp. 235-335.
- Strong, L., James, S., 1993. Some effects of ivermectin on the yellow dung fly, *Scatophaga stercoraria*. *Veterinary Parasitology* 48, 181-191.
- Tissut M., Taillandier G., Ravanel P., Benoit-Guyod J.L., 1987. Effects of chlorophenols on isolated class A chloroplasts and thylakoids: a QSAR study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 13, 32-42.
- Tracy, M., Freeman, D.C., Emlen, J.M., Graham, J.H., Hough, R.A., 1995. Developmental instability as a biomonitor of environmental stress: an illustration using aquatic plants and macroalgae. In: Butterworth, F.M., Corkum, L.D., Gusmán-Rincón, J. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A Handbook*. Plenum Press, New York, pp. 313-337.
- Umemura, T., Saikato, K., Takagi, A., Hasegawa, R., Kurokawa, Y., 1996. Oxidative DNA damage and cell proliferation in the livers of B6c3f1 mice exposed to pentachlorophenol in their diet. *Fundamental and Applied Toxicology* 30, 285-289.
- Valentine, D. W., Soulé, M., 1973. Effect of p,p' - DDT on developmental stability of pectoral fin rays in the grunion, *Leuresthes tenuis*. *Fish. Bull.* 71 (4), 921-926.
- Van den Dikkenberg, R.P., Canton H.H., Mathijssen-Spiekman L.A.M., Roghair C.J., 1989. The Usefulness of *Gasterosteus aculeatus* - The Threespine Stickleback - as a Test Organism in Routine Toxicity Test. Denmark, National Institute of Public Health and Environmental Protection. NTIS, 718625003.
- Van der Oost R., Vindimian E., Van den Brink P.J., Satumalay K., Heida H., Vermeulen N., 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): III Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic toxicology* 39, 45-75.
- Van Valen, L., 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16, 125-142.
- Vindimian, E., Garric, J., 1989. Freshwater fish cytochrome P450 dependent enzymatic activities, a chemical pollution indicator. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18, 277-285.
- Vindimian E., Namour P., Migeon B., Garric J., 1991. In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: *Barbus barbus*, *Leuciscus cephalus* and *Chondrostoma nasus*. *Aquatic Toxicology* 21, 255-266.
- Weeks, B.A., Anderson, D.P., Dufour, A.P., Fairbrother, A., Goven, A.J., Lahvis, G.P., Peters, G., 1992. Immunological biomarkers to assess environmental stress. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, J.P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers*. Biochemical,

- Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp. 211-234.
- WHO, 1987. Pentachlorophenol. World Health Organization, Geneva, Suisse.
- Wootton, R. J., 1976. The biology of the Sticklebacks. Academic Press, Londres.
- Zakharov, V.M., 1981. Fluctuating asymmetry as an index of developmental homeostasis. *Genetika (Beograd)* 13, 241-256.
- Zakharov, V.M., Yablokov, A.V., 1997. Developmental homeostasis in natural populations of mammals: phenetic approach. *Acta theriologica (Supplement 4)*. 90 p.
- Zakharov, V.M., Valetsky, A.V., Yablokov, A.V., 1997. Dynamics of developmental stability of seals and pollution in the Baltic sea. *Acta Theriologica (Suppl 4)*, 9-16.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Un an après l'épandage de boues d'épuration, une première série d'expériences a montré que les teneurs en cadmium (Cd), plomb (Pb) et mercure (Hg) mesurées dans les feuilles des arbres et dans les micromammifères, peuvent être considérées comme non toxiques. Par ailleurs, dès la première année, les boues ont amélioré la croissance en hauteur des chênes blancs (*Quercus alba*). Une deuxième série d'expériences a démontré que l'épandage des boues n'augmentait pas la charge en helminthes dans la cavité générale et le tube digestif des campagnols des champs et des grandes musaraignes.

Ces premiers résultats - à court terme - suggèrent que l'application de boues, respectant la réglementation établie par le gouvernement du Québec (Canada), permet de garantir une certaine qualité de l'environnement, tout en favorisant la croissance de certaines espèces d'arbres. Cependant, parmi tous les contaminants présents dans les boues (métaux traces, molécules organiques de synthèse, organismes pathogènes), seule une infime partie a été étudiée. Le suivi de tous les contaminants exigerait des moyens financiers considérables et ferait appel à de nombreux experts (parasitologues, toxicologues, écotoxicologues, chimistes, etc.). Ce type d'étude demanderait énormément de temps. De plus, il est très difficile - voire impossible - d'identifier et de détecter tous les contaminants dans un écosystème. Par exemple, dans ce travail de thèse, un oeuf de parasite n'a pas pu être identifié malgré la collaboration de plusieurs spécialistes (voir Chapitre 2 : publi. 3).

Par ailleurs, les organismes vivants sont exposés simultanément à plusieurs contaminants. Des effets antagonistes et synergiques peuvent exister entre les contaminants au sein d'un organisme. Certains effets synergiques ou antagonistes sont connus. Par exemple, il a été montré que des rats recevant un régime contenant 50 mg kg^{-1} de Cd et 200 mg kg^{-1} de Pb, accumulent moins de Pb dans les reins et ont moins d'inclusions intranucléaires que les rats qui reçoivent uniquement du Pb à dose équivalente (Mahaffey et al., 1981). L'explication de cet effet modérateur réside dans l'induction hépatique et rénale de métallothionéines par le Cd qui réduit la biodisponibilité des ions Pb^{2+} . À l'opposé, il a été montré des effets synergiques entre le Pb et le Hg. L'exposition simultanée au Pb et au Hg (sous forme inorganique ou méthylée) conduit à une exacerbation de la néphrotoxicité (Mahaffey et al., 1981; Schubert et al., 1978). Pour de nombreuses combinaisons de contaminants (e.g. parasites, métaux lourds, molécules organiques de synthèse), il est impossible de prédire et de quantifier les effets sur la santé des organismes. Il est nécessaire de disposer de méthodes qui permettent d'évaluer simultanément

les effets biologiques directs (toxicité) et indirects (e.g. modification de l'habitat) de plusieurs contaminants. Par ailleurs, les effets des activités anthropogéniques sur la qualité de l'environnement sont souvent difficiles à évaluer. Par exemple, dans le cas des épandages de boues en milieu forestier, les boues ont plusieurs impacts sur l'écosystème forestier. Les boues apportent des contaminants dans le milieu mais améliorent également la quantité et la qualité nutritive de la végétation (e.g. Chapitre 1). Quels sont les effets simultanés de ces impacts diamétralement opposés sur la santé des populations ? Comment les mesurer ?

Pour résoudre ces difficultés, l'asymétrie fluctuante des organismes a été utilisée comme outil pour évaluer la qualité de l'environnement (Chapitre 3 : publi. 2 et 3). Les valeurs d'asymétrie fluctuante d'un organisme sont le reflet de la qualité de l'environnement pendant l'ontogénèse de cet organisme. Par ailleurs, une asymétrie élevée a été associée à des réductions de la valeur adaptative de plusieurs animaux et plantes (Møller, 1997; Møller et Swaddle, 1997; Clarke, 1998). Il a donc été possible d'évaluer l'impact global des boues d'épuration sur la santé des populations, à partir de l'asymétrie fluctuante. Des mesures d'asymétrie ont été réalisées sur deux espèces animales terrestres : le campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*) et un carabe (*Pterostichus melanarius*). Les résultats de ces deux études suggèrent que les boues n'ont pas eu d'impact biologique négatif sur la qualité de l'environnement (Chapitre 3 : publi. 2 et 3). Cette conclusion est en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre 2.

Par rapport au campagnol, les insectes offrent de nombreux avantages. Ils sont abondants, leur capture nécessite des moyens très simples, et les mesures d'asymétrie fluctuante peuvent être réalisées très rapidement. Ces attributs font des insectes des bio-indicateurs pertinents (pour une revue voir Clarke, 1993).

Traditionnellement, l'instabilité du développement est mesurée à partir d'espèces animales, mais de récents travaux ont démontré que l'instabilité du développement des végétaux pouvait être également un excellent indicateur de stress environnementaux (Freeman et al., 1993; Tracy et al., 1995; Midgley et al., 1998; Møller, 1998; Siikamaki et Lammi, 1998; Roy et Stanton, 1999). Les végétaux offrent de nombreux avantages : ils sont souvent abondants et faciles à échantillonner. De plus, pour la plupart des végétaux fixés à un support, l'instabilité du développement reflète réellement les conditions environnementales de leur lieu de croissance. Il serait intéressant de mesurer l'asymétrie fluctuante à partir d'espèces végétales et de comparer les résultats avec ceux obtenus sur des espèces animales. Des résultats similaires entre ces deux règnes signifieraient que la qualité de l'environnement pourrait être évaluée seulement à partir d'espèces végétales. D'un point de vue éthique, une telle approche serait préférable.

Pour valider l'instabilité du développement comme biomarqueur morphométrique, il est nécessaire de comparer la sensibilité de l'instabilité du développement des organismes avec d'autres biomarqueurs (biochimique, physiologique ou histologique). Le dernier travail de recherche présenté dans cette thèse avait pour objectif de contribuer à cette validation (Chapitre 4 : publi. 1). Le but de cette étude était d'évaluer la relation entre l'asymétrie fluctuante et l'activité EROD des épinoches (*Gasterosteus aculeatus*) exposées à un polluant chimique : le pentachlorophénol. Les résultats suggèrent que les mesures d'asymétrie sur des poissons sont faciles, rapides et peu coûteuses. Actuellement, seule une autre étude a tenté d'évaluer la relation entre l'asymétrie fluctuante et un autre biomarqueur (micro-noyaux) suite à une contamination chimique d'un écosystème (Sánchez-Galán et al., 1998). Des travaux supplémentaires devront être effectués pour confirmer ces résultats.

CONCLUSION

Le travail présenté dans cette thèse a contribué à valider la pertinence du concept d'instabilité du développement comme outil de surveillance de la qualité de l'environnement.

L'impact des boues sur la qualité de l'écosystème forestier a été évalué à l'aide de méthodes traditionnelles, ainsi qu'à l'aide du concept d'instabilité du développement des organismes. Les résultats obtenus par les deux méthodes concordent. L'asymétrie fluctuante semble donc être une méthode valable pour évaluer la qualité de l'environnement.

L'application de boues d'épuration en milieu forestier, respectant la réglementation québécoise en vigueur, ne semble pas avoir d'effet négatif à court terme sur la qualité de l'écosystème. Cependant, d'autres études à court et à long terme sont nécessaires pour confirmer la validité des normes québécoises concernant l'épandage sylvicole des boues d'épuration municipales.

Le dernier travail de recherche effectué dans cette thèse a permis de démontrer que l'asymétrie fluctuante pouvait être un biomarqueur morphométrique pertinent qui pourrait être intégré dans les programmes de surveillance de la qualité des écosystèmes.

Nos résultats, ainsi que les résultats d'autres travaux, laissent penser que l'instabilité du développement représente un indicateur du stress environnemental peu coûteux, sensible et facile à mettre en oeuvre. Par conséquent, cet indicateur pourrait être utilisé comme signal d'alarme précoce ou bien comme outil de contrôle régulier des impacts anthropogéniques sur les espèces animales ou végétales.

Dans les pays en voie de développement, les méthodes traditionnelles pour détecter les pollutions, telles que le dosage chimique et l'utilisation de biomarqueurs biochimiques sont irréalisables faute de moyens financiers et techniques. Une alternative possible à ces méthodes repose sur l'utilisation du concept de stabilité du développement pour évaluer la qualité de l'environnement.

L'instabilité du développement résulte d'une perturbation de l'homéostasie fondamentale et il est donc raisonnable de penser que celle-ci est inversement proportionnelle à la valeur adaptative, ou à des caractéristiques importantes impliquées dans le bien-être d'un organisme (la capacité à se reproduire, la longévité, etc.). Plusieurs travaux vont dans ce sens (Sommers, 1996; Møller,

1997). Cependant, d'autres études doivent être entreprises pour confirmer ces résultats avec plusieurs types de stress environnementaux et diverses espèces.

La stabilité du développement des individus serait donc un outil sensible *in situ* de la valeur adaptative d'une population. Cependant, la stabilité du développement est un outil non spécifique. C'est-à-dire que des tests plus spécifiques peuvent être nécessaires (1) pour déterminer exactement l'agent responsable de l'instabilité ou (2) pour déterminer si l'augmentation de la stabilité du développement est causée par une exposition moindre, ou par une adaptation. Ce dernier point doit encore être étudié.

Seules de récentes expériences laissent penser qu'une corrélation entre la stabilité du développement et la valeur adaptative permettrait aux écotoxicologues de disposer d'un outil pour évaluer l'état d'une population à partir des seuls individus de cette population. Il est cependant nécessaire d'entreprendre des études supplémentaires pour s'assurer de la réelle valeur de ce biomarqueur.

GLOSSAIRE

Remarque : Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux termes utilisés dans la présente thèse; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes. Les termes anglais sont présentés entre parenthèse.

A

Absorption (absorption) : ensemble des phénomènes accompagnant la pénétration des substances venant de l'extérieur à l'intérieur d'un organisme vivant.

Adsorption (adsorption) : fixation, à la surface des substances solides (ex. l'argile, particules d'humus, etc.) d'ions ou de composés dissous (Environnement Canada, 1985).

Aérosol (aerosol) : suspension de particules liquides ultra-microscopiques dans un gaz; la taille des particules varie de 0,01 à 50 micromètres (Environnement Canada, 1985).

Amendement organique (organic improvement) : matières fertilisantes composées principalement de combinaisons carbonées d'origine végétale, fermentées ou putrescibles, destinées à l'entretien ou à la reconstitution du stock de la matière organique d'un sol (NF U 44-041).

Anthropique (anthropogenic) : relatif à l'homme, résultant des interventions humaines.

Antisymétrie (antisymmetry) : modèle de variation bilatérale au sein d'un échantillon d'individus, où statistiquement il existe une différence significative entre les deux côtés, mais où le côté le plus grand varie aléatoirement entre les individus (Fig. 1c) (Palmer, 1994).

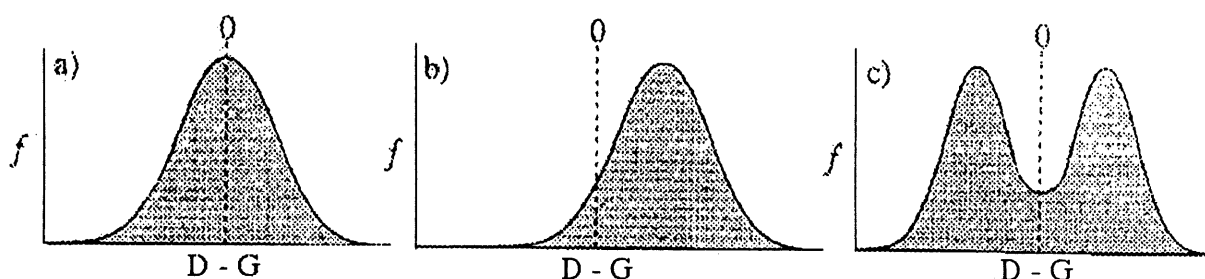


Fig. 1. Les trois distributions de D - G communément rencontrées chez les organismes bilatéraux : a) asymétrie fluctuante (AF), b) asymétrie directionnelle (AD), c) antisymétrie (platykurtic ou bimodale). D = droit; G = gauche (d'après Palmer, 1994).

Asymétrie absolue (absolute asymmetry) : valeur absolue de la différence entre les côtés droit (D) et gauche (G) chez un individu, $|D - G|$ (Palmer, 1994).

Asymétrie directionnelle (AD) (directional asymmetry) : modèle de variation bilatérale à l'intérieur d'un échantillon d'individus, où une différence significative existe entre les côtés, mais où le côté le plus grand est généralement le même (Fig. 1b) (Palmer, 1994).

Asymétrie droite ou gauche (skewed asymmetry) : modèle de variation bilatérale dans un échantillon d'individus où la distribution des fréquences de la différence droite moins gauche (D - G) s'écarte significativement de la normalité dans la direction droite ou gauche (Palmer, 1994).

Asymétrie fluctuante (AF) (fluctuating asymmetry) : modèle de la variation bilatérale dans un échantillon d'individus où la moyenne droite (D) moins gauche (G) est zéro et où la variation est normalement distribuée autour de cette moyenne (Fig. 1a).

Asymétrie non directionnelle (non-directional asymmetry) : terme général qui renvoie à toutes les variations bilatérales exceptées l'asymétrie directionnelle (i.e. asymétrie fluctuante, antisymétrie) (Palmer, 1994). (voir asymétrie fluctuante et antisymétrie).

B

Bio-indicateur (bioindicator) : terme synonyme d'indicateur biologique, désignant une espèce animale ou végétale qui est connue pour être particulièrement sensible ou tolérante à la pollution. Basée sur la connaissance du comportement d'un organisme face à un type particulier ou une intensité de pollution, la présence de cet organisme peut être alors utilisée comme outil pour indiquer les conditions de pollution (Cunningham et al., 1994).

Bio-surveillance (biomonitoring) : activité de recherche et/ou de contrôle dont l'objet est de surveiller la qualité de l'environnement. Les méthodes utilisées pour y parvenir sont réparties en deux catégories distinctes :

- la détection des polluants et éventuellement leur quantification, dans les milieux physiques et biologiques,
- l'évaluation des effets des pollutions sur les organismes vivants, soit au niveau de des individus, soit au niveau des populations et/ou des communautés.

C'est l'association des deux différentes approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent (Lagadic et al., 1998).

Bioaccumulation (bioaccumulation) : terme général désignant un processus au cours duquel les substances chimiques sont ingérées et accumulées par les organismes, soit par absorption directe de composés présents dans le milieu (air ou eau), soit par la consommation d'aliments contenant ces composés (Pierce et al., 1998). La bioaccumulation décrit l'accumulation des contaminants dans les tissus des organismes.

Bioamplification (biomagnification) : phénomène par lequel une substance naturelle ou un contaminant présent dans un biotope connaît un accroissement de sa concentration au fur et à mesure qu'il circule vers les maillons supérieurs d'un réseau trophique (Ramade, 1998).

Bioconcentration (bioconcentration) : phénomène par lequel des êtres vivants absorbent des substances naturellement présentes dans leur biotope ou polluantes et les accumulent dans leur organisme à des concentrations supérieures à celles auxquelles elles se rencontrent dans le milieu naturel. Il diffère en ce sens de la bioaccumulation dans laquelle le contaminant ou autre substance absorbée sera l'objet d'un simple transfert par l'organisme considéré, conduisant au mieux à une concentration égale à celle à laquelle il se rencontre dans le biotope concerné (Ramade, 1998). (voir bioaccumulation).

Biodisponible (bioavailable) : espèce chimique (ion ou molécule électriquement neutre) présente dans l'environnement, qui peut être transférée dans un organisme vivant ou alors espèce minérale (cation ou anion) qui peut être absorbée par un végétal.

Bioessai (bioassay) : procédures effectuées en laboratoire dont l'objectif est de déterminer à l'aide d'expérimentations sur divers types d'êtres vivants les activités biocides et/ou les particularités toxicologiques de tel ou tel type de substance chimique. Les bioessais peuvent être divisés en trois grandes catégories : test de létalité, test sublétaux et test de létalité à long terme (Ramade, 1998). (voir tests de toxicité, tests à long terme, tests létaux, tests sublétaux).

Biomarqueurs (biomarkers) : changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, morphométrique, ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

Boue (sludge) : matières solides accumulées, après leur séparation, par des procédés naturels ou artificiels, des divers types d'eau qui les contiennent (ISO 6107-1/1986) (AFNOR, 1994).

Boue d'épuration (sewage sludge) : sédiments résiduels des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines (NF U 44-041).

Boue liquide (slurry) : boue qui s'écoule sous l'influence de la gravité (NF U 44-041).

Boue sèche (dry sludge) : boue solide ayant une teneur minimale de 90% de matière sèche (NF U 44-041).

Boue solide (solid sludge) : boue qui mise en tas de 1 m de hauteur environ, forme un talus naturel stable qui fait avec le sol un angle supérieur à 45° (NF U 44-041).

Boue stabilisée (stabilized sludge) : boue d'épuration dont le pouvoir fermentescible a été réduit par un traitement approprié (NF U 44-041).

Boue activée (activated sludge) : boue floculée ou en voie de floculation produite par aération prolongée des eaux d'égout; par les micro-organismes qu'elle contient, ces boues peuvent transformer les matières organiques en matériaux stables (Environnement Canada, 1985).

Boue hygiénisée (hygienized sludge) : boue ayant subi un traitement (compostage, chaulage, lagunage, etc.) dans le but de diminuer leur teneur en micro-organismes pathogènes (virus, bactéries, parasites...).

Bruit de fond (background level) : concentration d'une substance dans l'environnement qui est présente naturellement (i.e. qui ne résulte pas de l'activité humaine) (EPA, 1999).

Bruit du développement (developmental noise) : voir instabilité du développement.

C

Canalisation (canalization) : capacité d'une structure à développer, d'un bout à l'autre, une trajectoire du développement idéale sous une variété de conditions environnementales différentes (Waddington, 1940). C'est un phénomène distinct de la stabilité du développement, qui fait référence à la même capacité mais sous une condition environnementale particulière (Zakharov, 1992). Un caractère qui est très canalisé montrera peu de plasticité phénotypique en réponse à différents milieux de croissance, même s'il peut tout de même montrer des niveaux normaux de bruit du développement. (voir bruit du développement, plasticité phénotypique, stabilité du développement).

Campagnol des champs (meadow vole) : *Microtus pennsylvanicus*. Taille : de 8 à 12 cm. Poids : de 28 à 70 g. Espèce vivant préférentiellement dans les prairies. Le campagnol des champs est actif le jour et la nuit. Il construit des nids à la surface du sol et sous la litière du sol. Il se nourrit essentiellement de végétaux, de graines et d'écorce. Il peut également consommer des invertébrés. Son domaine vital est de l'ordre de 0,04 - 0,4 ha et la densité de population fluctue grandement dans un intervalle de 2 ou 3 ans. La durée de gestation est de 21 jours. (Fig. 2).



Fig. 2. Campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*).

Capacité d'échange cationique (CEC) (cation exchange capacity) : quantité totale de cations échangeables que le sol peut adsorber (Environnement Canada, 1985).

Coagulation chimique (chemical coagulation) : procédé qui consiste à ajouter un produit chimique, appelé « coagulant », destiné à agréger, sous forme de floccs, des particules colloïdales en suspension dans l'eau.

Compost (compost) : mélange de déchets organiques plus ou moins décomposés obtenu par compostage. Le compost est employé comme amendement et engrais (Parent, 1990). (voir compostage).

Compostage (composting) : procédé biologique qui consiste à provoquer la fermentation de déchets organiques divers afin d'obtenir un mélange riche en minéraux et matières organiques, le compost (Parent, 1990). (voir compost).

Concentration efficace 50% = CE 50% (medium efficace concentration) : concentration d'un polluant provoquant 50% d'un effet autre que la mortalité (diminution de la fertilité, de l'activité...) au bout d'un temps donné d'exposition dans un échantillon de population d'une espèce donnée, sur une espèce donnée.

Concentration létale 50% = CL 50 (median lethal concentration) : concentration d'une substance qui, dans un essai écotoxicologique, est responsable de la mortalité de 50% des organismes mis en jeu pendant une période déterminée.

Concentration sans effet observé (No Observed Effect Concentration) (NOEC) : concentration maximale pour laquelle aucun effet significatif n'a été observé.

Contaminant (contaminant) : substance étrangère à un système naturel ou présente à des concentrations anormalement élevées (Pierce et al., 1998).

Contamination et pollution (contamination and pollution) : deux expressions couramment employées pour désigner l'accumulation anormale, généralement due à une activité humaine, d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée. Le terme **contamination** sera utilisé pour désigner une augmentation des teneurs totales, suite à des apports anthropiques, sans préjuger d'une évolution négative de la qualité. En revanche, la **pollution** désigne l'accumulation d'un composé en quantité telle qu'il peut induire un danger pour les organismes vivants ou compromettre l'usage qui est habituellement fait du milieu récepteur. (voir pathogène).

D

Développement durable (sustainable development) : développement qui garantit que l'utilisation présente de ressources et de l'environnement ne nuit pas aux perspectives de leur utilisation par les générations futures (Pierce et al., 1998).

Dose de référence (Reference Dose) (RfD) : dose à laquelle un individu (incluant des sujets hypersensibles) pourrait être exposé sur une base quotidienne, durant toute sa vie, sans que ne surviennent des effets délétères ou néfastes à la santé. Cette dose de référence est dérivée du NOAEL « No Observed Adverse Effect Level » à partir d'expériences animales auxquelles on applique un facteur d'incertitude qui tient compte notamment de la durée de l'expérience et des variations intra et inter-espèces. (voir No Observed Adverse Effect Level).

Dose létale 50% (medium lethal dose) (DL 50) : dose d'un toxique provoquant la mort de 50 % dans une population d'une espèce déterminée après un temps donné.

E

Eau résiduaire (waste water) : eau rejetée après son utilisation dans un procédé industriel, ou après sa production au cours de ce procédé, et qui n'a aucune valeur immédiate en ce qui concerne ce procédé (ISO 6107-1/1986) (AFNOR, 1994). A présent, le terme d'eau résiduaire est également utilisé pour désigner les eaux usées d'origine municipale.

Eau usée urbaine (sewage) : eau provenant des rejets d'une collectivité (ISO 6107-1/1986) (AFNOR, 1994).

Écosystème (ecosystem) : système dans lequel il existe des échanges cycliques de matières et d'énergie dus aux interactions entre les différents organismes présents et leur environnement.

Écotoxicologie (ecotoxicology) : discipline dont l'objet est l'étude des effets des polluants sur les écosystèmes. L'écotoxicologie consiste en l'analyse de la circulation des polluants entre les biotopes et les communautés vivantes et consiste à comprendre les conséquences écologiques de l'action des polluants sur la structure et le fonctionnement des systèmes écologiques naturels (Ramade, 1998). (voir écosystème).

Effet léthal (lethal effect) : qui entraîne la mort de l'organisme.

Effet sublétal (sublethal effect) : effet susceptible de provoquer des perturbations physiologiques non létales chez un organisme.

Élément trace (trace element) : métal (Cd, Cu, Pb, Zn, etc.) ou métalloïde (Se, As, B, etc.) présent à de très faible concentration dans les milieux naturels, en particulier dans les sédiments et les eaux (Ramade, 1998). Les éléments traces ne peuvent pas être définis très

précisément mais sont fréquemment retrouvés dans l'environnement à des concentrations de l'ordre du partie par million (ppm) (Cunningham et al., 1994).

Engrais (fertilizer) : matières fertilisantes dont la fonction principale est d'apporter aux plantes des éléments directement utiles à leur nutrition (éléments fertilisants majeurs, éléments secondaires et oligo-éléments) (NF U 44-041).

Épinoche à trois épines (three spine stickleback) : *Gasterosteus aculeatus*. Taille : de 6 et 12 cm. Poids : de 3 à 10 g. Espèce anadrome et d'eau douce commune, qui tolère les eaux marines, estuariennes et douces et vit principalement dans les eaux peu profondes. Ses habitats côtiers sont presque circumpolaires, mais elle préfère les zones tempérées et subarctiques de l'hémisphère nord (Environnement Canada, 1990). La période de reproduction se situe entre les mois d'avril et de juin (Fig. 3.).

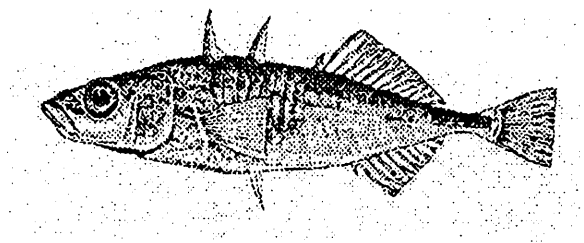


Fig. 3. Épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Environnement Canada, 1990).

EROD : voir EthoxyRésorufine-O-Dééthylase.

Espèce bioaccumulatrice : espèce présentant, de par leur mode de vie et/ou leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques, la capacité de bioaccumuler certains contaminants directement à partir du milieu ambiant ou d'autres voies (nourriture par exemple) jusqu'à des niveaux nettement supérieurs au niveau de contamination du milieu physique (eau, sédiments, atmosphère, etc.) (Lagadic et al., 1998).

Espèce indicatrice (indicator species) : organisme qui peut servir à indiquer la présence ou l'absence d'un facteur particulier, comme les métaux lourds (Pierce et al., 1998).

Espèce sentinelle : type particulier d'organismes indicateurs. Il s'agit de toute espèce vivante susceptible d'être utilisée en tant qu'indicateur de la présence et de la toxicité d'au moins un contaminant, et qui permet d'évaluer les effets potentiels de ce contaminant sur la santé humaine et/ou celle de l'environnement. Les espèces sentinelles vivent sur le site à étudier, soit qu'elles y soient présentes spontanément, soit qu'elles y soient introduites à dessein (e.g. encagement). Ces espèces présentent pour l'essentiel les mêmes intérêts que les espèces bioaccumulatrices. Il est par ailleurs nécessaire de posséder une connaissance détaillée de leur

physiologie, afin de pouvoir interpréter les variations des biomarqueurs mesurés (Lagadic et al., 1998). (voir organisme bio indicateur, espèce bioaccumulatrice, biomarqueur).

Essai biologique (bioassay) : technique d'évaluation de l'effet biologique qualitatif ou quantitatif de différentes substances contenues dans un milieu (eau, air ou sol) par l'observation des modifications d'une activité biologique définie (ISO 6107-2/1989) (AFNOR, 1994). (voir bioessai).

Essai de toxicité (toxicity test) : essai au cours duquel une substance est mise en contact à une concentration donnée avec des organismes déterminés dans le but d'évaluer les effets toxiques de la substance sur eux (Norme T90-503) (AFNOR, 1994). Par exemple, un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer soit le nombre d'organismes affectés par l'exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats..., soit l'intensité des effets observés.

Essai de toxicité avec renouvellement continu (flow-through toxicity test) : essai de toxicité avec renouvellement constant et continu de la solution d'essai (Norme T90-503) (AFNOR, 1994).

EthoxyRésorufine-O-Dééthylase (ethoxyresorufin-O-deethylase) EROD : suite à une contamination du milieu aquatique, les polluants peuvent pénétrer à l'intérieur des poissons et y être distribués avant de s'accumuler dans des tissus et/ou exercer leur toxicité sur des organes cibles. Cependant, des systèmes biochimiques peuvent transformer ces polluants en produits qui pourront être éliminés plus facilement dans l'urine et la bile. Lors de la première phase de biotransformation des xénobiotiques, les enzymes monooxygénases à cytochrome P 450 (EROD) interviennent en augmentant la solubilité des xénobiotiques afin qu'ils puissent être excrétés. L'induction de cytochrome P 450 désigne la synthèse *de novo* de nouvelles protéines P 450 par l'organisme, entraînant une activité enzymatique accrue. L'activité enzymatique EROD permet de quantifier l'induction du cytochrome P 450 1A (Flammarion, 1997).

Évaluation de l'impact (impact assessment) : identification des problèmes environnementaux spécifiques à un projet et la prise en compte de ces questions dans la planification du projet.

Évaluation des risques (risk assessment) : méthode d'estimation de l'importance et de la probabilité des effets délétères des substances anthropiques sur l'environnement (Volmer et al., 1988).

F

Fertilité du sol (soil fertility) : réponse à la facilité avec laquelle la racine peut, en quantités suffisantes, bénéficier dans ce sol des différents facteurs de la croissance végétale : chaleur, eau, ensemble des différents éléments chimiques nécessaires à la plante, substances organiques de croissance.

Floculation (flocculation) : formation de grosses particules, par agglomération de petites particules ; le mode de formation est généralement accéléré grâce à des moyens mécaniques, physiques, chimiques ou biologiques.

H-L

Homéostasie (homeostasis) : "flux stabilisé" d'une trajectoire du développement (Waddington, 1957; Zakharov, 1992). Ce terme fait référence à la capacité d'une structure à développer d'un bout à l'autre une trajectoire du développement idéale dans des conditions environnementales particulières. C'est un phénomène distinct de la canalisation. (voir canalisation).

Instabilité du développement ou bruit du développement (developmental instability) : est l'incapacité d'un organisme de temporiser ou de corriger les perturbations aléatoires au cours de son développement. L'instabilité du développement est due à une suite de processus qui tendent à perturber la précision du développement d'un organisme, tel qu'une faible différence aléatoire dans la vitesse de division, de croissance et de changement de forme des cellules, des effets de bruit thermique sur les processus enzymatiques, des petites différences aléatoires dans la vitesse des processus physiologiques entre les cellules (Palmer, 1994) (Fig. 4).

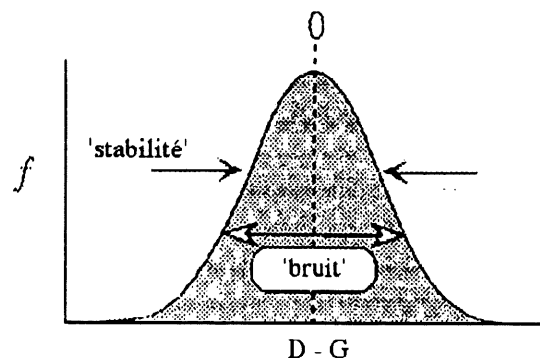


Fig. 4. L'ampleur de l'asymétrie fluctuante reflète un compromis entre deux processus opposés : le bruit du développement et la stabilité du développement (d'après Palmer, 1994).

Kyste (kyst) : structure protectrice d'un organisme à paroi distincte ; dans des conditions environnementales néfastes, beaucoup de micro-organismes s'enkystent ; les kystes peuvent contenir l'oeuf ou l'organisme arrivé ou non à maturité. Certains pathogènes sont transmis surtout sous forme de kystes ingérés par le nouvel hôte (Environnement Canada, 1985). (voir pathogène).

Lotique (écosystèmes) (lotic) : ensemble des cours d'eau continentaux (fleuves, rivières, torrents et ruisseaux), écosystèmes caractérisés par un renouvellement rapide de leur eau. À l'opposé, on définit les écosystèmes lenticques (lacs, étangs et marais). (voir écosystème).

Low Observed Adverse Effect Level (LOAEL) : dose minimale d'un polluant induisant un effet nocif observé.

Lower Observed Effect Concentration (LOEC) : concentration minimale pour laquelle un effet significatif a été observé.

M

Macrophytes (macrophytes) : grandes plantes aquatiques ou terrestres.

Matière organique dans les sols (Organic mater in soils) : les fonctions des matières organiques (MO) participent de façon générale à l'aptitude des sols à la production végétale. Les MO assurent la cohésion des autres constituants du sol entre eux et contribuent à la structuration du sol et à la stabilité de la structure. Ceci est dû au grand nombre de liaisons électrostatiques et surtout de liaisons faibles que les MO peuvent assurer, combiné avec le caractère macromoléculaire et la conformation souple des molécules. Les MO augmentent de façon générale la réserve en eau des sols. Les MO contribuent classiquement à la fertilité chimique : elles sont une réserve d'éléments nutritifs, la principale pour l'azote, une des principales pour le phosphore et le soufre. Les MO ont aussi une forte capacité d'échange qui, dans certains milieux comme les sols sableux, est la principale réserve des bases disponibles (K et Ca). Les MO sont le substrat énergétique des organismes hétérotrophes du sol. Les MO du sol contiennent et libèrent des molécules de petite taille, directement actives sur les métabolismes végétaux et microbiens. De manière générale, les réserves organiques donnent à l'agro- ou à l'écosystème une capacité de résistance à différentes fluctuations, accidents ou agressions tels que des pertes ou des exportations d'éléments, des pollutions, ou l'action érosive des pluies.

Matières fertilisantes : les matières fertilisantes comprennent les engrais, les amendements et, d'une manière générale, tous les produits dont l'emploi est destiné à assurer ou à améliorer la nutrition des végétaux, ainsi que les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (NF U 44-041).

Méristique (meristic) : terme utilisé pour désigner un caractère qui peut être dénombré. (Ex. : nombre de poils abdominaux de vertébrés, etc.).

Mésocosmes (mesocosms) : dispositifs expérimentaux clos d'un volume inférieur à 15 m³ ou d'une longueur supérieure à 15 cm, situés en plein air, simulant étroitement le milieu naturel. Les mésocosmes sont destinés à l'étude des effets des polluants sur les écosystèmes. Les mésocosmes présentent un intérêt expérimental car ils se situent à une échelle beaucoup plus réaliste et représentative des conditions écologiques réelles que les microcosmes utilisés dans des expérimentations de laboratoire sur les polluants (Ramade, 1998). (voir écosystème).

Métal lourd (heavy metal) : élément métallique ayant un poids atomique relativement élevé, dont la densité est d'au moins 5,0 (Environnement Canada, 1985). Le terme d'élément trace est communément utilisé pour décrire ces substances (Cunningham et al., 1994). (voir élément trace).

Métrique (metrical) : terme utilisé pour désigner un caractère lorsque sa variation est quantitative (Ex. : longueur du tarse, de l'aile, etc.). La variation est continue et très étendue.

Micronutriments (micronutrients) : éléments minéraux nutritifs nécessaires à de très faibles concentrations aux organismes autotrophes (ex.: bore, manganèse, cuivre, zinc...) (Ramade, 1998).

Musaraignes (grande -) (shorttail shrew) : *Blarina brevicauda*. Taille : de 7 à 10 cm. Poids : de 11 à 22 g. Espèce vivant communément dans les forêts, les prairies, les marais et les broussailles. La grande musaraigne est active le jour et la nuit tout au long de l'année. Elle fait sa propre galerie dans le sol ou dans la neige, mais utilise parfois les galeries d'autres animaux. La grande musaraigne se nourrit d'insectes, de vers, d'escargots et d'autres invertébrés. Elle se nourrit parfois de jeunes micromammifères. Son domaine vital est de 0,2 - 0,4 ha et la densité de population est de l'ordre de 62 ha⁻¹. La durée de gestation est de 21 jours ou plus. Les naissances ont lieu en mars - avril et en août - septembre.

N-O

NOEC (No Observed Effect Concentration) : voir concentration sans effet observé.

Organisme indicateur (indicator organism) : organisme qui accumule les substances toxiques présentes à l'état de trace dans l'environnement. Ces organismes sont alors utilisés quand il est difficile de mesurer directement des faibles concentrations d'un polluant. Il ne faut donc pas confondre bio-indicateur et organisme indicateur. (voir bio-indicateur).

P

Pathogène (pathogenic) : organisme pouvant causer une maladie (Environnement Canada, 1985).

Pentachlorophénol (pentachlorophenol) (PCP) : formule moléculaire : C_6HCl_5O . Le PCP est un biocide utilisé comme algicide, bactéricide, fongicide, herbicide, insecticide et molluscicide dans le domaine agricole, industriel et domestique.

Phénotype déviant (phenodeviant) : caractère dont la valeur chez un individu s'écarte largement de l'étendue "normale" de ce caractère. Pour chaque caractère ainsi décrit, il est nécessaire de justifier et de définir précisément et avec attention ce qui est considéré comme "normal".

Phytodisponibilité (phytoavailability) : quantité d'un élément pouvant être transféré dans les tissus d'une plante au cours d'une période de croissance. Cette quantité est déterminée après récolte, par la mesure de la concentration de l'élément dans les tissus de la plante. La phytodisponibilité est contrôlée par de nombreux facteurs, tels que les formes chimiques des éléments, la composition du sol, le climat et l'aptitude de la plante de prendre, de transférer et d'accumuler les métaux (Morel, 1989).

Phytotoxique (phytotoxic) : toxique pour les plantes (Environnement Canada, 1985).

Plasticité phénotypique (phenotypic plasticity) : capacité d'un caractère, produit par des génotypes identiques, d'exhiber des phénotypes différents sous des conditions environnementales différentes. Une plasticité importante dénote une faible canalisation (Palmer, 1994). (voir canalisation).

Pollution (pollution) : voir contamination.

Q-S

Qualité de l'eau (water quality) : mesure de l'état de l'eau par rapport aux besoins d'une ou de plusieurs espèces (être humain compris).

Qualité du sol (soil quality) : mesure de l'état d'un sol par rapport aux besoins d'une ou de plusieurs espèces (être humain compris).

Qualité environnementale (environmental quality) : mesure de l'état d'un environnement par rapport aux besoins d'une ou de plusieurs espèces (être humain compris).

Relation dose-effet : fonction scientifique d'estimation de la relation entre la dose, ou le niveau d'exposition à une substance, et l'incidence et la gravité d'un effet.

Solution mère : solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution mère sont ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer les solutions d'essai aux concentrations requises (Environnement Canada, 1990).

Stabilité du développement (developmental stability) : fait référence à l'aptitude d'un génotype à former un phénotype prédéterminé sous des conditions environnementales particulières. La stabilité de développement est due à une suite de processus qui tendent à combattre ou à tamponner la perturbation de la précision du développement, tels que les systèmes de rétrocontrôle négatif qui régulent l'activité enzymatique (concentration et vitesse de catalyse) à l'intérieur des cellules et entre les cellules, la régulation nerveuse centrale ou hormonale des structures non-contiguës (Palmer, 1994). (Fig. 4).

Station de traitement des eaux usées (water treatment sludge) : ensemble des installations de traitement des eaux usées où l'on emploie des procédés chimiques, physiques ou biologiques pour traiter les eaux (Environnement Canada, 1985).

Stress (stress) : cause proximale d'un effet défavorable sur un organisme ou un système.

T

Tests de toxicité (toxicity tests) : tests mesurant les réponses d'un système biologique à une substance pour déterminer si elle est toxique (Cunningham et al., 1994). Il existe des tests létaux, sublétaux et à long terme (voir test létaux, tests de toxicité, à long terme, tests sublétaux).

Tests de toxicité à long terme : ces tests peuvent être distingués en différents type de tests de bioessais : effets mutagènes, effets tératogènes, tests d'inhibition de croissance et effets de concentrations sublétales (Ramade, 1998).

Tests létaux (lethality testing) : tests déterminant des concentrations létales à 50% dans des expositions à court terme (de 24 à 96h) sur des organismes de référence (Ex. Daphnies), test qui constitue un bioessai très répandu en toxicologie aquatique (Ramade, 1998).

Tests sublétaux (sublethal testing) : tests déterminant les effets, autres que létaux, d'un polluant sur des organismes. Les tests sublétaux se distinguent en cinq types : bioessais de croissance, bioessais d'inhibition d'activité biologique (reproduction), test de mobilité et test de motilité bactérienne (Ramade, 1998).

Tibia (tibiae) : chez les insectes, le quatrième segment de la patte, entre le fémur et le tarse.

Toxicité (toxicity) : particularité propre à diverses substances dont l'absorption a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants en provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme

résultant de l'exposition permanente et prolongée à des faibles concentrations d'un toxique (Ramade, 1998). (voir toxicité aiguë, chronique).

Toxicité aiguë (acute toxicity) : toxicité qui provoque de graves troubles biologiques ou la mort d'un organisme dans un court délai (≤ 96 heures) (Pierce et al., 1998).

Toxicité chronique (chronic toxicity) : toxicité liée à l'absorption continue de petites doses de polluants à long terme, qui a un effet néfaste sur les organismes. Le résultat ultime de la toxicité chronique est la mort, mais les effets habituels sont plutôt sublétaux (inhibition de la croissance, de la reproduction...). Ces effets sont irréversibles à long terme.

Toxicologie (toxicology) : étude des effets négatifs des substances chimiques sur les individus, ou les éléments qui les composent, et plus particulièrement aux mécanismes des effets nocifs et aux conditions dans lesquels ils se produisent (Forbes et Forbes, 1997). La toxicologie s'intéresse aux effets des produits chimiques sur les individus et non pas sur l'écosystème comme le fait l'écotoxicologie. (voir écotoxicologie).

Toxicologie de l'environnement (environmental toxicology) : étude des impacts des produits chimiques présents dans l'environnement sur les organismes biologiques (Klaassen et Eaton, 1991).

Traitement primaire des eaux usées (primary wastewater treatment) : première étape du traitement des eaux usées, qui retient les objets solides de grande taille dans des tamis, et les sédiments et la matière organique dans des chambres de décantation (Pierce et al., 1998).

Traitement secondaire des eaux usées (secondary wastewater treatment) : après le traitement primaire, enlèvement de la matière organique biodégradable des eaux usées à l'aide de bactéries et d'autres micro-organismes, dans des boues activées ou des filtres bactériens (Pierce et al., 1998).

Traitement tertiaire des eaux usées (tertiary wastewater treatment) : enlèvement des nitrates, phosphates, composés chlorés, sels, acides, métaux et composés organiques toxiques après le traitement secondaire (Pierce et al., 1998).

V - X

Variation bilatérale (bilateral variation) : terme général faisant référence à tous les modèles de variation entre les côtés (droit et gauche) chez les organismes présentant une symétrie bilatérale (asymétrie fluctuante, asymétrie directionnelle, antisymétrie, ect.) (Palmer, 1994). (voir asymétrie fluctuante, asymétrie directionnelle, antisymétrie).

Xénobiotique (xenobiotic) : substance étrangère aux organismes vivants. Ces substances possèdent des propriétés toxiques, même lorsqu'elles sont présentes dans le milieu à des très faibles concentrations.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, M. S. et J. D. NISWANDER. 1967. Developmental 'noise' and a congenital malformation. *Genet. Res.* 10: 313-317.
- AFNOR. 1994. Recueil des normes françaises : Qualité des eaux. 1er éd. AFNOR, Paris-La-Défense, France.
- AMIARD, J. -C., T. CAQUET et L. LARGADIC. 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. Pp. XXI-XXXI dans Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Éditeurs: L. Lagadic, T. Caquet, J. -C. Amiard et F. Ramade. Lavoisier Tec Doc, Paris, 320 p.
- BUTLER G. C. 1978. Principles of ecotoxicology, scope 12. John Wiley et sons, Chichester, England.
- BUTTERWORTH, F. M., L. D. CORKUM et J. GUZMAN-RINCON (Éds.). 1995. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook. Plenum Press, New-York.
- CHUBINISHVILI, A. T. 1998. Developmental homeostasis in populations of the marsh frog (*Rana ridibunda pall.*) living under the conditions of chemical pollution in the middle Volga region. *Russian Journal of Ecology* 29 : 63-65.
- CLARKE, G. M. 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environ. Pollut.* 82: 207-211.
- CLARKE, G. M. 1998. Developmental stability and fitness: the evidence is not quite so clear. *Am. Nat.* 152: 762-766.
- CLARKE, G. M. et R. M. WARWICK. 1994. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Natural Research Council, London, UK.
- CLARKE, G. M. et T. J. RIDSDILL-SMITH. 1990. The effect of Avermectin B1 on developmental stability in the bush fly, *Musca vetuatissima*. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 265-269.
- CUNNINGHAM, W. P., T. H. COOPER, E. GORHAM et M. T. HEPWORTH (Éds.). 1994. Environmental encyclopedia. 2 éd. Gale Research, Detroit, MI.
- DAWSON-SHEPHERD, A., R. M. WARWICK, K. R. CLARKE et B. E. BROWN. 1992. An analysis of fish community responses to coral mining in the Maldives. *Environmental Biology of Fishes* 33: 367-380.

- DeANGELIS, D. L. 1996. Indirect effects: concepts and approaches from ecological theory. Pp. 25-41 dans *Ecotoxicology: ecological dimensions*. Éditeurs: D. J. Baird, L. Maltby, P. W. Greig-Smith et P. E. T. Douben.
- EMLLEN, J. M., D. C. FREEMAN et J. H. GRAHAM. 1993. Nonlinear growth dynamics and the origin of fluctuating asymmetry. Pp 123-140 *Developmental instability: origins and evolutionary significance*. Éditeur: T. Markow. The Netherlands: Kluwer, Dordrech.
- ENVIRONNEMENT CANADA. 1985. L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Guide SPE 6-EP-84-1. Burlington, Canada.
- ENVIRONNEMENT CANADA. 1990. Méthodes d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Rapport SPE 1/RM/10. Ottawa, Canada.
- EPA. 1999. <http://www.epa.gov/OCEPAterms/bterms.html>.
- FLAMMARION, P. 1997. Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P 450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. Thèse de doctorat. Université de Metz, Metz, France.
- FORBES, V. E. et T. L. FORBES (Éds.). 1997. *Écotoxicologie : théorie et applications*. Institut national de la recherche agronomique, Paris, France.
- FOSSI, M. C. et C. E. LEONZIO. 1994. *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, Ann Arbor, Boca Raton.
- FREEMAN, D. C., J. H. GRAHAM et J. M. EMLLEN. 1993. Developmental stability in plants: symmetries, stress, epigenesis. *Genetica* 89: 97-119.
- GAUCH, H. G. 1982. *Multivariate analysis in community ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- GRAHAM J. H., D. C. FREEMAN et J. M. EMLLEN. 1993a. Developmental stability: a sensitive indicator of population under stress. Pp. 136-158 dans *Environmental toxicology and risk assessment*. Éditeurs: W. G. Landis, J. S. Hughes et M. A. Lewis. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- GRAHAM, J.H., D.C. FREEMAN, D.C. et EMLLEN, J.M. 1993b. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. Dans *Developmental instability: its Origins and Evolutionary Implication*. Éditeur: T. A. Markow. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- GRAHAM J. H., J. M. EMLLEN et D. C. FREEMAN. 1993c. Developmental stability and its applications in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 2: 175-184.

- GRAY, J. S., K. R. CLARKE et G. HOBBS. 1990. Detection of initial effects of pollution on marine benthos: an example from the Ekofisk and Eldtisk oilfields. North Sea Marine Ecology Progress Series 66: 285-299.
- GROENENDIJK, D., L. W. M. ZEINSTRA et J. F. POSTMA. 1998. Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a metal-contaminated river. Environ. Toxicol. Chem. 17 : 1999-2005.
- HARVEY, I. F. et K. J. WALSH. 1993. Fluctuating asymmetry and lifetime matind success are correlated in males of damselfly *Coenagrion puella* (Odonata: Coenagrionidae). Ecol. Entomol. 18: 198-202.
- HUGGET, R. J., R. A. KIMERLE, P. M. Jr. et H. L. BERGAM (Éds.) 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton.
- JONES, J. S. 1987. An asymmetrical view of fitness. Nature 325: 298-299.
- KEISSER, J. A. Fluctuating odontometric asymmetry and maternal alcohol consumption. Ann. Hum. Biol. 19: 513-520.
- KLAASSEN, C. D. et D. L. EATON. 1991. Principles of toxicology. Pp.12-49 dans Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 4th éd. Editeurs : M. O. Amdur, J. Doull et C. D. Klaassen. Pergamon Press, New-York.
- KOEMAN, J. H. 1983. General introduction to ecotoxicology. Dans Ecology indicators for quality assessment of air, water, soil and ecosystems, environmental monitoring and assessment 3. Éditeur: J. Haeck. Best.
- LAGADIC, L., T. CAQUET et J. -C. AMIARD. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : Principes et définitions. Pp. 1-9 dans Biomarqueurs et écotoxicologie : Aspects fondamentaux. Éditeurs : L. Lagadic, T. Caquet, J. -C. Amiard et F. Ramade. Masson, Paris.
- LAGADIC, L., T. CAQUET, J. -C. AMIARD et F. RAMADE. 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Tec Doc - Londres et New-York, Paris, France.
- LEARY, R. F. et F. W. ALLENDORF 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress in conservation biology. Trends Ecol. Evol. 4: 214-217.
- LEARY, R. F., F. W. ALLENDORF et K. L. KNUDSEN. 1992. Genetic, environmental, and developmental causes of meristic variation in rainbow trout. Acta. Zool. Fennica. 191: 79-95.

- MAHAFFEY, K. R., S. G. CAPAR, B. C. GLADEN et B. A. FOWLER. 1981. Concurrent exposure to lead, cadmium, and arsenic. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 463-481.
- MANLY, B. F. J. 1994. *Multivariate statistical methods. A primer.* 2nd ed. Chapman and Hall, London, UK.
- MARKOW, T. A. 1992. Genetics and development stability: an integrative conjecture on etiology and neurobiology of schizophrenia. *Psychological Medicine* 22: 295-305.
- MATHER, K. 1953. Genetical control of stability in development. *Heredity* 7: 297-336.
- McCARTHY, J. F. et L. R. SHUGART (Éds.) 1990. *Biomarkers of environmental contamination.* Lewis Publishers, Boca Raton, Floride, USA.
- McKENZIE, J. A. et G. M. CLARKE. 1988. Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Genetics* 120: 213-220.
- McKENZIE, J. A. et K. O'FARELL. 1993. Modification of developmental stability and fitness: malathion-resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Gentica* 98: 67-76.
- METCALFE, J. L. 1989. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environ. Poll.* 60: 101-139.
- MIDGLEY, G. F., S. J. E. WAND et C. F. MUSIL. 1998. Repeated exposure to enhanced UV-B radiation in successive generations increases developmental instability (leaf fluctuating asymmetry) in a desert annual. *Plant, Cell and Environment* 21: 437-442.
- MØLLER, A. P. 1992a. Parasites differentially increase the degree of fluctuating asymmetry in secondary sexual characteristics. *J. Evol. Biol.* 5: 691-699.
- MØLLER, A. P. 1992b. Female swallow preference for symmetrical male sexual ornaments. *Nature* 357: 238-240
- MØLLER, A. P. 1994. Directional selection on directional asymmetry - testes size and secondary sexual characters in birds. *Proc. R. Soc. Lond. - Series B: Biol. Sci.* 258: 147-151.
- MØLLER, A. P. 1997. Developmental stability and fitness - a review. *American Naturalist* 149: 916-932.
- MØLLER, A. P. 1998. Developmental instability of plants and radiation from Chernobyl. *Oikos* 81: 444-448.

- MØLLER, A. P. 1999. Asymmetry as a predictor of growth, fecundity and survival. *Ecology Letters* 2: 149-156.
- MØLLER, A. P. et J. P. SWADDLE. 1997. *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- MØLLER, A.P. et A. POMIANKOWSKI. 1993. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica*: 267-279.
- MOREL, R. 1989. Analyse des facteurs de la croissance de la plante pour la définition du concept de fertilité des sols. Pp 57-73 dans *Fertilità del suolo e nutrizione della piante*. Editeurs : SISS et SICA.
- MORIARTY, F. 1983. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, London.
- NAUGLER, C.T. et S. M. LEECH. 1994. Fluctuating asymmetry and survival ability in the forest tent caterpillar moth *Malacosoma disstria*: implications for pest management. *Entomol. Exp. Appl.* 70: 295-298.
- OSTBYE, K., S. A. OXNEVAD et L. A. VOLLESTAD. 1997. Developmental stability in perch (*Perca fluviatilis*) in acidic aluminium-rich lakes. *Can. J. Zool. - Revue Canadienne de Zoologie* 75: 919-928.
- PALMER, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. Pp. 335-364 Dans *Developmental instability: origins and evolutionary significance*. Éditeur: T. Markow. The Netherlands: Kluwer, Dordrecht.
- PALMER, A. R. 1996. Waltzing with asymmetry. *BioScience* 46: 518-532.
- PALMER, A. R. et C. STROBECK. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17: 391-421.
- PALMER, A. R. et C. STROBECK. 1992. Fluctuating asymmetry as a mesure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zool. Fennica* 191: 57-72.
- PANKAKOSKI, E., I KOIVISTO et H. HYVÄRINEN. 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew *Sorex araneus*. *Acta Zool. Fennica* 191: 137-144.
- PANKAKOSKI, E., I. KOIVISTO, H. HYVÄRINEN et J. TERHIVUO. 1994. Shrews as indicators of heavy metal pollution. Pp. 137-149 dans *Advances in biology of shrews*.

Éditeurs: J. F. Merritt, G. L. J. Kirkland et R. K. Rose. Carnegie museum of natural history special publication.

PARENT, S. 1990. Dictionnaire des sciences de l'environnement. Editions Brocquet Inc., Ottawa, Canada.

PARSONS, P. A. 1990. Fluctuating asymmetry: an epigenetics measure of stress. Biol. Rev. 65: 131-145.

PASSINO, D. R. M. et S. B. SMITH. 1987. Acute bioassays and hazard evaluations of representative contaminants detected in Great Lakes Fish. Environ. Toxicol. Chem. 6: 137-144.

PIERCE, R. C., D. M. WHITTLE et J. BURTON BRAMWELL. 1998. Les contaminants chimiques dans les écosystèmes aquatiques du Canada. Pêche et océan. ISBN : 0-660-95962-3. Éditions du gouvernement du Canada, Ottawa, Canada.

RAMADE, F. 1992. Précis d'écotoxicologie. Masson, Paris. 295 p.

RAMADE, F. 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Biogéochimie et écologie des eaux continentales et littorales. ISBN : 2-84074-152-0. Édiscience international, Paris.

RASMUSON, M. 1960. Frequency of morphological deviants as a criterion of developmental stability. Hereditas 46: 511-535.

REEVE, E. C. R. 1960. Some genetic tests on asymmetry of sternopleural chaeta number in *Drosophila*. Genet. Res. 1: 151-172.

ROSENBERG, D. M. et V. H. RESH. 1993. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Chapman and Hall New-York, New-York, USA.

ROY, B. A. et M. L. STANTON. 1999. Asymmetry in wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. J. Evol. Biol. 12: 440-449.

SANCHEZ-GALAN, S., A. R. LINDE, J. I. IZQUIERDO et E. GARCIAVAZQUEZ. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*) - complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 412:219-225.

SCHUBERT, J., E. J. RILEY et S. A. TYLER. 1978. Combined effects in toxicology. A rapid systematic testing procedure : Cadmium, mercury, and lead. Environ. Health 4: 763-776.

- SIKAMAKI, P. et A. LAMMI. 1998. Fluctuating asymmetry in central and marginal populations of *Lychnis viscaria* in relation to genetic and environmental factors. *Evolution* 52: 1285-1292.
- SOMMER, C. 1996. Ecotoxicology and developmental stability as an *in situ* monitor of adaptation. *Ambio* 25: 374-376.
- SOULÉ, M. E. 1967. Phenetics of natural populations. II. Asymmetry and evolution in a lizard. *Amer. Nat.* 101: 141-160.
- SOULÉ, M. E. et J. CUZIN-ROUDY. 1982. Allometric variation. 2. Developmental instability of extreme phenotypes. *Am. Nat.* 120: 765-786.
- SUMMER, F. B. et R. R. HUESTIS. 1921. Bilateral asymmetry and its relation to certain problems in genetics. *Genetics* 6: 445-485.
- THORNHILL, R. et P. SAUER. 1992. Genetic side effects on the fighting ability of sons and daughters and mating success of sons in a scorpionfly. *Anim. Behav.* 43: 225-264.
- TIMOFEEF-RESSOVSKY, N. V. 1934. Über der Einfluss des Genotypischen milieus und der Aussenhebedigunen auf die Realisation des Genotypes. *Genmutation vti bei Drosophila funebris* Nachr. Acad. Wiss. Gottingen II. Math-phys. K1. Fg. 6: 106.
- TRACY, M., D. C. FREEMAN, J. M. EMLÉN, J. H. GRAHAM et R. A. HOUGH. 1995. Developmental instability as a biomonitor of environmental stress. Pp. 313-337 dans *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Éditeurs: F. M. Butterworth, L. D. Corkum et J. Guzman-Ricon. Plenum Press, New York.
- UENO, H. 1994. Fluctuating asymmetry in relation to two fitness components, adult longevity and male mating success in a ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecol. Entomol.* 18: 87-88.
- VALENTINE, D. W. et M. SOULÉ. 1973. Effect of p,p' - DDT on developmental stability of pectoral fin rays in the grunion, *Leuresthes tenuis*. *Fish. Bull.* 71: 921-926.
- VALENTINE, D. W., M. E. SOULÉ et P. SAMALLOW. 1973. Asymmetry analysis in fishes: a possible indicator of environmental stress. *Fish. Bull.* 71: 357-370.
- VAN STRAALLEN, N. M. et J. A. C. VERKLEIJ. 1991. *Leerboek Ecotoxicologie*. VU Publ., Amsterdam. 422 p.
- VAN VALEN, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16: 125-142.

- VOLMER, J., W. KÖRDEL et W. KLEIN. 1988. A concept for environmental risk assessment of new chemicals. Pp.411-416 Proceedings of the first european conference on ecotoxicology. Éditeurs: H. Høkke, H. Tyle et F. Bro-Rasmussen. 17-19 oct. 1988, Conference Organizing Committee, Lyngby, Copenhagen, Denmark.
- WADDINGTON, C. H. 1940. Organizers and genes. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- WADDINGTON, C. H. 1957. The strategy of the genes. George Allen Unwin., London.
- WALKER, C. H. 1996. Biomarkers and environmental risk assessment. Pesticide Outlook, Febuary: 26-31.
- WASHINGTON, H. G. 1984. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. Water Research 18: 653-692.
- WATSON, P. J. et R. THORNHIL. 1994. Fluctuating asymmetry and sexual selection. Trends Ecol. Evol. 9: 21-25.
- WAUTERS, L. A., A. A. DHONDT, H. KNOTHE et D. T. PARKIN. 1996. Fluctuating asymmetry and body size as indicators of stress in red squirrel populations in woodland fragments. J. Appl. Ecol. 33: 735-740.
- WEYL, H. 1952. Symmetry. Princeton University Press, Princeton.
- YABLOKOV, A. V. 1986. Population Biology, MIR Publishers, Moscow.
- ZAKHAROV, V. M. 1992. Population phenogenetics: Analysis of developmental stability in natural populations. Acta Zool. Fenn. 191: 7-30.
- ZAKHAROV, V. M. et H. J. GRAHAM. Éd. 1992. Developmental stability in the natural populations. Acta Zool. Fennica 191: 1-200.
- ZAKHAROV, V. M., A. V. VALETSKY et A. V. YABLOKOV. 1997. Dynamics of developmental stability of seals and pollution in the Baltic sea. Acta Theriologica (Suppl 4): 9-16.
- ZEEMAN, M. et J. GILFORD. 1993. Ecological hazard evaluation and risk assessment under EPA's Toxic Substances Control Act (TCSA): an introduction. Pp. 7-22 dans Environmental toxicology and risk assessment. Éditeurs: J. S. Hugues et M. A. Lewis. American Society for Testing and Materials, ASTM STP 1179, Philadelphia.

ANNEXE

Contributions aux articles à signatures multiples, soumis ou à soumettre inclus dans cette thèse

Bonzom, J.-M., Cloutier, C., Belleville, S. et Bergeron, J.-M. Valorisation sylvicole des boues de stations d'épuration municipales au Québec : les risques pour la faune. Cahiers d'études et de recherche francophones/Agricultures (à soumettre).

Bonzom, J.-M. = rédacteur principal; Cloutier, C. et Belleville, S. = participation à la rédaction; Bergeron, J.-M = révision des versions préliminaires et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., Cloutier, C., and Bergeron, J.-M. Cadmium, lead, and mercury concentrations in leaves and growth response for two tree species following sewage sludge application. J. Env. Qual. (soumis).

Bonzom, J.-M. = Rédacteur principal et réalisation de la plupart des travaux; Cloutier, C. = aide pour l'utilisation de SAS; Bergeron, J-M = révision des versions préliminaires et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., and Bergeron, J-M Cadmium, lead, and mercury accumulation in small mammals following sewage sludge application to forest land. J. Env. Qual. (soumis)

Bonzom, J.-M. = Rédacteur principal et réalisation de la plupart des travaux; Bergeron, J-M = révision des versions préliminaires et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., Duhamel, R., Belleville, S., et Bergeron, J.-M. Détermination de certains parasites dans le sol et dans les micromammifères suite à l'épandage sylvicole de boues d'épuration. Bioresource Technology (à soumettre)

Bonzom, J.-M. et Duhamel, R. = rédacteurs, Duhamel, R. = recherche des parasites dans le sol; Belleville, S. et Bonzom, J.-M. = recherche des parasites dans les micromammifères; Bergeron, J.-M. = révision des premières versions et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., Siriex, F., Labrie, G, and Bergeron, J.-M. Procedure with papain enzyme to clean bones of small mammals. J. Mammal. (soumis)

Bonzom, J.-M. = rédacteur et participation à l'ensemble des travaux; Siriex, F. et Labrie, G = aide technique; Bergeron, J.-M. = révision des premières versions et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., Belleville, S., and Bergeron, J.-M. Part I. Fluctuating asymmetry of voles (*Microtus pennsylvanicus*) as a biomonitor of sewage sludge application to forests. J. Env. Qual. (soumis)

Bonzom, J.-M. = rédacteur principal et participation à tous les travaux; Belleville, S. = aide dans les mesures d'asymétrie et dans les analyses statistiques; Bergeron, J.-M. = révision des versions préliminaires et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., Belleville, S., and Bergeron, J.-M. Part II. Fluctuating asymmetry of *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) as a biomonitor of sewage sludge application to forests. J. Env. Qual. (soumis)

Bonzom, J.-M. = Rédacteur principal et participation à tous les travaux; Belleville, S. = aide dans les mesures d'asymétrie et dans les analyses statistiques; Bergeron, J.-M = révision des versions préliminaires et support financier.

=====

Bonzom, J.-M., Ait-Aissa S., Brion F., Réale D., Poulsen V., Bergeron, J.-M., Porcher J.-M., and Thybaud, E. Fluctuating asymmetry and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): two complementary biomarkers to monitor aquatic ecosystems. *Aquatic Toxicology* (à soumettre)

Bonzom, J.-M. = rédacteur principal et participation à tous les travaux; Ait-Aissa S. et Brion F. = dosage EROD; Réale D. = aide dans les analyses statistiques; Poulsen V. = responsable du fonctionnement des mésocosmes; Bergeron, J.-M. = révision des versions préliminaires et support financier; Porcher J.-M. et Thybaud, E. = support financier et technique.