

Article

« Détermination du niveau de toxicité des sédiments de rivière par le test de bioluminescence bactérienne »

G. Larbaitgt, M. Bonnefille, D. Peyre et A. Tabonet

Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, vol. 4, n° 3, 1991, p. 329-342.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/705103ar>

DOI: 10.7202/705103ar

Note : les règles d'écriture des références bibliographiques peuvent varier selon les différents domaines du savoir.

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter à l'URI <https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche. Érudit offre des services d'édition numérique de documents scientifiques depuis 1998.

Pour communiquer avec les responsables d'Érudit : info@erudit.org

Détermination du niveau de toxicité des sédiments de rivière par le test de bioluminescence bactérienne

Use of a bacterial bioluminescence assay
to assess toxicity
of river sediments

G. LARBAIGT¹, M. BONNEFILLE², D. PEYRE², A. TABONET²

Reçu le 2 mai 1990, accepté pour publication le 28 janvier 1991*.

RÉSUMÉ

A partir de références bibliographiques encore réduites, les auteurs ont mis au point un protocole expérimental d'évaluation de la toxicité des sédiments de rivière, après extraction au dichlorométhane et mesure de la toxicité par le test de Bioluminescence Bactérienne.

Ce protocole simple appliqué à quarante-trois prélèvements correspondant à des situations de pollution diversifiées, a permis d'établir et de proposer une typologie des sédiments en fonction de leur niveau de toxicité.

Correspondant à une approche nouvelle (tests biologiques de toxicité sur sédiments), la méthodologie apparaît particulièrement intéressante pour la gestion patrimoniale des cours d'eau (réseaux de surveillance, mise en évidence de situations de pollutions), et devrait être intégrée dans les opérations de mesure de l'impact des pollutions toxiques sur les écosystèmes aquatiques.

Mots clés : *Sédiments, toxicité, bioluminescence, microtox, rivières.*

SUMMARY

As toxic substances in river water are not easy to detect and to measure, sediments able to precipitate them have been used, successfully, to quantify metals and a limited number of organics. Actually, analytical determinations, very expensive, time consuming and never exhaustive, are not an adequate means for a general estimation of the presence of toxic organic substances.

1. Conseiller Scientifique à l'Agence de l'Eau Rhone-Méditerranée-Corse, 31, rue Jules Guesde, 69310 Pierre-Benite.

2. Laboratoire de l'Agence de l'Eau Rhone-Méditerranée-Corse.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 mars 1992.

Another developing approach consists in determining effects not the substances themselves (contained in the sediments) but their toxic effects on biotests applied directly on all the sediments or on the extracts. This approach has been used by relatively few teams, principally in North-America and in The Netherlands, in limited areas, to evaluate the local impacts of industrial effluents on sea and-or river waters. On the contrary, the object of this work is to measure the interest of this kind of approach, at a large Water Basin, first to establish the toxic profiles of rivers with areas of pollution, and second to constitute a memorization, susceptible of being compared at regular intervals for an estimation of general depollution policies. Based on data taken from the literature, an organic extraction of sediments with dichloromethane as solvent (without pretreatment) and photobacterium phosphoreum luminescence inhibition test were chosen. Actually, according to the literature, dichloromethane is the most convenient solvent and toxic activities of extracts are well correlated with organic toxic contents in the few cases where, exceptionally, the two approaches have been carried out simultaneously. Similarly, the bacterial luminescence test, Microtox (commercial name), quick and inexpensive, is well correlated with results from other biotests when, occasionally, both were utilised. Moreover, Microtox was well tested in the Agence laboratory.

Different conditions of extraction were carefully tested, before the adoption of the definite protocol : whole sediments (10-g) are mixed (slow agitation in rolling flasks) for 6 hours with dichloromethane (100-mL) and sodium sulphate (50 g). Dichloromethane is then eliminated and the remaining solid materials are washed twice with fresh dichloromethane (2 x 20 mL). Dichloromethane extract and washings are collected, dried over sodium sulphate and concentrated (below 40 °C) to 1 mL, further adjusted to 3 mL. A portion measured accurately of this concentrate is added to ethanol and concentrated to remove dichloromethane.

Bacterial bioluminescence tests, in duplicate, are performed on ethanol extracts, diluted (1 %) in salified (sodium chloride 2 %) distilled water. Estimates of the EC 50 (concentration causing a 50 % reduction in bioluminescence) obtained using linear regression analysis are converted into Toxic Units and referred to the net organic weight, measured separately, at 550 °C. This expression of results is particularly relevant when sediments with different organic net weights are compared.

The protocol has been applied to sediments collected at 43 sites in the principal rivers of Rhône Méditerranée Corse Basin and in special distant from significant domestic and industrial activities.

The toxic amplitude observed (ratio of 1/200 between lowest and highest toxic units obtained with the panel) and the good reproductibility of the whole process (10 % to 25 %) were consistent with a trial subdivision in 5 classes as follow :

Class 1 : Out of pollution – Class 2 : Moderate toxicity – Class 3 : Important toxicity – Class 4 : Very important toxicity – Class 5 : Exceptional toxicity.

The relevancy of this classification was estimated when sediments were classed according to their toxic content. The classification proves to be correct in most cases. Exceptionally toxic sediments were collected in sites affected by large industries and agglomerations as (CHASSE and SAINT-VALLIER) on River Rhone near Lyon and important chemical plants, or CIVORS, on the small River GIER, markedly affected by many various industries. On the contrary sediments of moderate toxicity corresponded to sites relatively far from sources of important pollutions, e.g., ARLES on the River RHONE near the sea and a number of sites on the River SAONE. Moreover, when repeated

sampling was performed on the same sites, the results were consistent, belonging to the same class of toxicity.

The general object of this work was not to determine a definite classification of sediment toxicities, but to assess the relevancy of this approach. In our opinion, it was proved that bioassays on sediment extracts, and specially the bacterial bioluminescence assay, are a valuable tool, before the material impossibility to determine the toxic substances content. Moreover this approach could be used at the Basin. More investigations are necessary to define more accurately the number and level of toxic classes and e.g. to establish correlations with perturbations of benthic communities living in the sediments. It is also a contribution to the general knowledge and action based on biotests performed on effluents and different compartments of rivers.

Key-words : *Sediments, toxicity, bioluminescence, microtox, rivers.*

1 - INTRODUCTION

La pollution des milieux aquatiques par les substances toxiques n'est pas facile à mettre en évidence : si les manifestations spectaculaires (mortalités piscicoles) des rejets accidentels frappent l'opinion, l'imprégnation progressive due aux rejets chroniques passe le plus souvent inaperçue, alors qu'elle peut avoir de graves conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes.

L'utilisation de supports concentrateurs (poissons, sédiments, plus récemment bryophytes) permet certes de dresser des constats de présence, en particulier pour les métaux, mais elle n'est pas extrapolable aux substances organiques, à quelques exceptions près, compte tenu de leur nombre et de leur diversité. Les publications récentes de quelques travaux portant sur l'évaluation globale de la toxicité des sédiments présentent dans ce contexte un grand intérêt. Il ne s'agit plus en effet, de détecter la présence d'un nombre limité de substances, mais de mesurer leurs effets à l'aide de tests biologiques, c'est-à-dire d'évaluer des potentialités toxiques vis-à-vis des organismes.

Les travaux dont nous avons eu connaissance mettent en évidence la pertinence du test d'inhibition de la luminescence bactérienne, avec cependant des résultats variables selon les méthodes de traitement des sédiments.

Ceci nous a conduit, dans un premier temps à sélectionner la méthode préparative qui donnait les résultats les plus réguliers et à en assurer la reproductibilité par standardisation de la technique opératoire et normalisation de l'expression des résultats.

Dans un deuxième temps, le protocole ainsi défini a été appliqué à l'échelle d'un grand bassin hydrographique, en vue d'évaluer l'intérêt de l'approche comme outil de connaissance et de gestion de la qualité des milieux aquatiques.

2 - SYNTHÈSE DES CONNAISSANCES

Le test d'inhibition de la luminescence bactérienne, connu sous le nom commercial de Microtox, BULICH et coll. (1982), mis au point il y a une dizaine d'années, est basé sur la réduction (en 10 minutes ou 15 minutes généralement) de la luminescence de l'espèce bactérienne *Photobacterium phosphoreum*. Destiné initialement à la mesure de la toxicité des effluents industriels ou domestiques, son utilisation pour l'appréciation de la toxicité des sédiments est récente et les travaux publiés sont peu nombreux.

VAN DE GUCHTE et MAAS-DIEPEVEEN (1987), dans le cadre d'un programme de recherches portant sur 42 sédiments provenant du delta du Rhin ne mettent pas en évidence de toxicité pour le Microtox à partir des eaux interstitielles alors qu'ils relèvent des activités toxiques, significatives dans certains cas, avec d'autres tests biologiques (*Daphnie*, *Chlorelle*, *Chironome*, *Brachydanio*). Ils notent cependant la présence de variables explicatives (teneurs en sels excessives, ou présence de NH_3) autres que les substances toxiques proprement dites, et recommandent de pratiquer le test Microtox.

GIESY *et al.* (1987), appliquent deux tests (immobilisation *Daphnie* et Microtox) aux eaux interstitielles obtenues après centrifugation de 30 sédiments de la rivière Detroit et comparent les résultats avec un test biologique pratiqué sur sédiments bruts (réduction de la croissance de *Chironomus tentans*). Les 3 tests indiquent de façon identique les sédiments non toxiques et les sédiments très toxiques. Les auteurs recommandent donc l'application de 2 tests (*Daphnie* et Microtox) pour l'estimation des sédiments de toxicité intermédiaire.

WILLIAMS *et al.* (1986), (étude portant sur 50 sédiments) comparent les résultats du test Microtox, appliqué aux extraits des sédiments avec une eau salée (NaCl 20 ‰), et ceux de deux tests pratiqués sur les sédiments bruts (survie des Amphipodes pendant 10 jours et anomalies des embryons d'Huître en 48 heures). Ils mettent en évidence une corrélation significative ($p < 0,001$) des 3 tests (coefficient de Kendall 0,64) et soulignent que le test Microtox différencie nettement les sédiments provenant d'une baie marine fortement industrialisée, et ceux provenant d'une zone de référence non industrialisée. Ils relèvent cependant une proportion importante de sédiments pour lesquels il n'y a pas accord entre les trois tests.

Ce problème des concordances entre les trois tests est analysé par CHAPMAN (1988), cosignataire de l'étude précédente : il juge remarquable la concordance totale des trois tests dans 44 % des cas compte tenu des voies d'exposition très différentes et il souligne que le test Microtox n'est en défaut que dans 11 % des cas. Il faut, conclue-t-il, standardiser les tests sur sédiments, et il sera possible de les hiérarchiser en fonction de leur toxicité.

TRUE et HEYWARD, (1988), déterminent d'une part la distribution particulière et les concentrations en métaux et hydrocarbures de 36 sédiments d'origine marine, d'autre part la toxicité Microtox à partir des eaux interstitielles et des extraits organiques (dichlorométhane plus ultra-sons). Les toxicités les plus

élevées sont trouvées à partir des extraits organiques des sédiments qui ont à la fois un pourcentage élevé de petites particules et des concentrations importantes en métaux et hydrocarbures. Les auteurs pensent que pour une appréciation complète de la toxicité des sédiments, ils faut mettre en œuvre les deux méthodologies (eaux interstitielles et extraits organiques).

SCHIEWE *et al.* (1985) appliquent le test Microtox aux extraits organiques (dichlorométhane-méthanol) de 18 sédiments d'origine marine. Ils mettent en évidence une corrélation hautement significative ($p = 0,001$) entre la toxicité des extraits et la somme des concentrations en hydrocarbures aromatiques ($r = 0,828$) ainsi que celle des concentrations en naphthalènes ($r = 0,796$), et une corrélation significative ($p = 0,005$) avec la somme des concentrations en hydrocarbures chlorés ($r = 0,669$).

DUTKA et KWAN (1988), à partir des extraits organiques (dichlorométhane) de 19 sédiments du lac Ontario mettent en évidence des toxicités avec les trois tests biologiques utilisés (Microtox, ATP algal, ATP TOX) à des niveaux variables, les plus élevés correspondant aux sédiments proches des sources de pollution, ils ne mettent en évidence aucune toxicité à partir des extraits pratiqués avec de l'eau Milli Q.

En conclusion, le test de bioluminescence bactérienne a déjà été utilisé pour mettre en évidence la toxicité de sédiments d'origine variée : baies et estuaires marins, lacs et rivières.

Deux types de méthodes préparatives ont été utilisées : la centrifugation pour examen des eaux interstitielles d'une part, l'extraction par l'eau ou par un solvant d'autre part.

Le solvant généralement utilisé est le dichlorométhane : il est employé seul, combiné aux ultra-sons, ou en association avec le méthanol. Les extraits ainsi obtenus présentent des toxicités plus élevées, que les extractions aqueuses ou les eaux interstitielles, avec une plus grande fréquence de détection.

Les toxicités mises en évidence par le test de bioluminescence bactérienne ont montré des corrélations satisfaisantes avec celles mises en évidence par d'autres tests biologiques, ou avec les concentrations en certaines substances toxiques quand ces diverses déterminations ont pu être effectuées en parallèle.

Enfin, l'expression des toxicités est très variable d'une publication à l'autre, empêchant toute comparaison.

Notre but étant de disposer d'un moyen simple et reproductible pour l'appréciation comparative de la potentialité toxique des sédiments, en particulier dans le cadre d'un réseau d'observation de la qualité des milieux aquatiques, nous avons été conduits à sélectionner la méthode préparative par extraction au dichlorométhane.

3 - PROTOCOLE OPÉRATOIRE

Après élimination des éléments grossiers (cailloux, graviers, débris divers) le sédiment est homogénéisé. Une partie (10 à 50 g) est utilisée pour la détermination du taux de matières sèches (105 °C) et du taux de matières organiques (525 °C).

Une autre partie (10 g) est mise en agitation pendant 6 heures (agitateur à rouleaux) en présence de 100 ml de dichlorométhane et de 50 g de sulfate de sodium.

L'extrait organique, additionné du dichlorométhane de rinçage du résidu solide (2 x 20 ml), est filtré sur sulfate de sodium, concentré par évaporation à 1 ml environ, puis ramené à 3 ml exactement mesurés (rinçage de l'évaporateur).

Une partie de cet extrait dichlorométhane (0,1 ml ou 1 ml selon la toxicité présumée du sédiment) est additionnée d'éthanol (3 ml ou 10 ml respectivement), puis l'ensemble est réduit à un volume de 1 ml environ par évaporation.

La phase alcoolique, ramenée à 3 ml exactement mesurés (rinçage de l'évaporateur) est diluée à 1 % dans de l'eau distillée salée à 2 % en NaCl. Cette solution aqueuse est soumise au test de luminescence bactérienne (15 °C pendant 10 mn).

La Cl.50 (en %) obtenue (moyenne de 2 essais) est transformée en Unités Toxiques rapportées au poids de matières organiques (mo en grammes) contenues dans la prise d'essai :

$$UT/g.mo = \frac{100}{Cl.50} \cdot \frac{K}{mo}$$

avec K coefficient tenant compte des volumes de dichlorométhane utilisés, soit K = 30 (0,1 ml) ou K = 3 (1 ml).

Parallèlement, à chaque série d'extractions, un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions opératoires ; la série est validée si la diminution de luminescence due au blanc est inférieure à 30 %.

4 - SÉDIMENTS ÉTUDIÉS

La plupart des sédiments ont été prélevés par les Services Régionaux de l'Aménagement des Eaux et le Service Navigation Rhône-Saône, dans le cadre du Réseau National de Bassin, programme de surveillance de la qualité des cours d'eau, géré par l'Agence.

Les points de prélèvements concernent les principaux cours d'eau du bassin : le Rhône du lac Lemman à la Méditerranée (500 kms environ), la Saône de Cendrecourt à Lyon et ses affluents (Ouche, Grosne, Veyrie), les affluents du Rhône en aval de Lyon (Gier, Isère, Durance), et certains fleuves côtiers méditerranéens : Var, Argens, Lez et Robine.

Ce programme de prélèvements a été complété, par l'examen de situations hors agglomérations domestiques ou industrielles, afin de disposer de sédiments de référence (Gier, Bourbre, Cance, Morge).

Les méthodes de prélèvement varient avec les caractéristiques locales (profondeur, accessibilité, etc.) et les équipements utilisés (dragues embarquées sur bateaux, carottage, pelletage ou raclage en berge, etc.)

Les sédiments ont été acheminés dès leur prélèvement au laboratoire en glacières (10 °C maximum), et dans la mesure où ils n'ont pas été traités dans les 24 heures après réception, ils ont été conservés par congélation à - 18 °C.

5 - RÉPÉTABILITÉ DE LA MÉTHODE

La répétabilité de la méthode a été évaluée, sur cinq sédiments, selon la procédure suivante :

- pour chaque sédiment, réalisation de quatre extractions simultanées sur quatre prises d'essai différentes ;
- mesure de la toxicité Microtox sur chacun des extraits obtenus.

Les résultats apparaissent dans le *tableau 1*.

Tableau 1 Répétabilité de la méthode.

Table 1 Repeatability of the method.

N° sédiments	Cl.50 (%)		Coefficient de variation
	Moyenne	Ecart-type	
1	11,5	2,8	24,3 %
2	3,6	0,5	13,9 %
3	9,5	1,9	20,0 %
4	4,2	0,4	9,5 %
5	3,7	0,3	8,1 %

La répétabilité du test peut être évaluée à 15 % en moyenne, de l'ordre de 10 % pour les sédiments très toxiques et de 20 à 25 % pour les sédiments moyennement ou peu toxiques.

6 - RÉSULTATS

6.1 Proposition de typologie

Pour l'ensemble des sédiments étudiés, (tableaux 3, 4 et 5) le rapport entre la toxicité maximale (8076 UT/g.mo) et la toxicité minimale (34 UT/g.mo) est d'environ 240 : ceci nous a conduit à déterminer 4 niveaux de toxicité, choisis selon une progression géométrique (de raison 3 environ), qui délimitent 5 classes de qualité des sédiments (*tableau 2*).

Tableau 2 Proposition de typologie.

Table 2 Proposed classification.

N° classe	Limites de classes (toxicité en UT/g.mo)	Coefficient de variation
1	Inférieure à 100	Situation hors pollution
2	de 100 à 300	Toxicité modérée
3	de 300 à 1 000	Toxicité importante
4	de 1 000 à 3 000	Toxicité très importante
5	supérieure à 3 000	Toxicité exceptionnelle

6.2 Examen des résultats

6.2.1 Sédiments de très forte toxicité

On a regroupé sous cette appellation (*tableau 3*) les sédiments de toxicité très importante et exceptionnelle (classes N° 4 et 5).

Les sédiments de toxicité exceptionnelle correspondent essentiellement à des situations connues de forte contamination comme le Rhône à Chasse, Vaugris et St-Vallier (sous l'influence des rejets de l'agglomération Lyonnaise et d'une forte concentration d'industries chimiques minérales et de synthèse organique) et le Gier à Givors (pollution organique et toxique considérable : agglomérations importantes et industries métallurgiques).

Les sédiments de toxicité très importante (outre ceux déjà cités ci-dessus pour des prélèvements effectués à des dates différentes) ont pour origine notamment des sites sous influence directe d'agglomérations très importantes (Montpellier pour le Lez, Narbonne pour la Robine) ou affectés par des rejets industriels importants (synthèse d'organochlorés pour la Durance aux Mées, ou ensemble de la vallée très industrialisée de l'Isère en ce qui concerne le site de Chateauneuf).

Tableau 3 Sédiments de très forte toxicité.

Table 3 Highly toxic sediments.

Classes	UT/g.mo	Cours d'eau	Site	Date de prélèvement
(5)	8076	Rhône	Chasse	11-10-89
	3669	Gier	Givors	02-10-89
	3620	Gier	Givors	25-10-89
	3610	Rhône	St-Vallier	05-10-89
	3609	Argens	Roquebrune	19-09-89
	3143	Rhône	Vaugris	29-11-89
(4)	2809	Rhône	Chasse	25-10-89
	2688	Lez	Lattes	15-09-89
	2296	Robine	Av. Narbonne	15-09-89
	1798	Rhône	Valence	05-10-89
	1698	Saône	Scey sur Saône	26-10-89
	1587	Durance	Les Mées	20-09-89
	1267	Saône	Chaux-les-Ports	26-10-89
	1243	Gier	Givors	31-05-89
	1208	Grosne	Varennes	22-09-89
	1135	Mourachonne	Pegomas	12-09-89
	1126	Saône	Charrey	30-10-89
	1033	Isère	Chateaufort	12-10-89

6.2.2 Sédiments toxiques

Les sédiments toxiques (*tableau 4*) regroupent les classes N° 2 et N° 3 de toxicité modérée et importante.

Ils comprennent la plus grande partie des sédiments du bassin de la Saône et de ses affluents (Ouche, Grosne, Petite Veyle) affectés par de nombreux rejets industriels et urbains, ainsi que les sédiments du Rhône près de la Méditerranée (Arles) dont la toxicité est nettement inférieure à celle des sédiments prélevés dans le cours moyen (aval de Lyon).

Parmi les sédiments de toxicité modérée on note les sédiments du Rhône en amont de Lyon (Poincaré), site éloigné de rejets importants, certains sédiments de la Saône, et ceux prélevés sur des cours d'eau de faible débit (Cance, Morge) en principe hors pollution.

6.2.3 Sédiments hors pollution

Les sédiments regroupés dans le *tableau 5* correspondent essentiellement à des sédiments prélevés à proximité des sources des cours d'eau (Bourbre, Gier à Pinay), sites choisis pour être en situation hors pollution, ce qui a été vérifié sur le terrain, ainsi que ceux prélevés à Pougny (Rhône) point situé à quelques kilomètres en aval du lac Léman.

Tableau 4 Sédiments toxiques.

Table 4 Toxic sediments.

Classes	UT/g.mo	Cours d'eau	Site	Date de prélèvement
(3)	974	Saône	Cendrecourt	26-10-89
	817	Grosne	Varenes	20-06-89
	781	Ouche	Crimolois	22-09-89
	769	Rhône	Arlès	16-11-89
	704	Saône	Charrey	03-08-89
	587	Saône	Ouroux	30-10-89
	492	Saône	Auxonne	26-10-89
	472	Saône	Auxonne	03-08-89
	399	Saône	Mazarick	03-08-89
	394	Var	Nice	12-09-89
	360	Rhône	Arlès	10-10-89
	304	Petite Veyle	Grièges	03-10-89
	(2)	246	Saône	Ouroux
227		Saône	Alleriot	03-08-89
212		Cance	Vocance	24-07-89
191		Petite Veyle	Grièges	02-06-89
171		Saône	Cendrecourt	12-09-89
158		Rhône	Poincaré	04-10-89
155		Morge	Pt Reynauds	11-10-89

Tableau 5 Sédiments hors pollution.

Table 5 Sediments from non polluted area.

Classes	UT/g.mo	Cours d'eau	Site	Date de prélèvement
(1)	79	Bourbre	Rongy	06-09-89
	69	Rhône	Pouigny	04-10-89
	59	Gier	Pinay	17-07-89
	48	Gier	Pinay	25-10-89
	43	Bourbre	Les sables	06-09-89
	34	Gier	Pinay	11-10-89

On relève donc au total deux discordances portant d'une part sur les sédiments de la Morge et de la Cance, classés toxiques alors que situés théoriquement en zone hors pollution, d'autre part sur ceux du Rhône à Pouigny dont le classement en sédiments hors pollution est très surprenant compte tenu de la localisation du site de prélèvement.

Les prélèvements n'ayant pas pu être répétés, il est impossible de préciser si les discordances relevées, correspondent à des situations de pollution irrégulières ou au niveau de toxicité choisi pour différencier les classes 1 et 2, niveau qui devra être validé par l'examen d'un nombre important de situations hors pollution.

6.3 Répétition de prélèvements sur un même site

Huit sites ont fait l'objet de deux prélèvements, en moyenne à deux mois d'intervalle, et deux sites ont été examinés à trois reprises sur une période de quatre mois environ (tableau 6).

Tableau 6 Répétition de prélèvements sur un même site.

Table 6 Repeated sampling on same sites.

Cours d'eau	Site	Chronologie des prélèvements	UT/g.mo	Classe
Gier	Pinay	1	59	1
		2	24	1
		3	48	1
Saône	Auxonne	1	472	3
		2	492	3
Rhône	Arles	1	360	3
		2	769	3
Rhône	Chasse	1	8 076	5
		2	2 809	4
Saône	Charrey	1	704	3
		2	1 126	4
Saône	Ouroux	1	246	2
		2	587	3
Grosne	Varennes	1	817	3
		2	1 208	4
Petite Veyle	Grieges	1	191	2
		2	304	3
Gier	Givors	1	1 243	4
		2	3 669	5
		3	3 620	5
Saône	Centrecourt	1	171	2
		2	974	3

Pour neuf sites, les toxicités mesurées à des dates différentes peuvent être considérées comme comparables :

– Pour trois d'entre eux (Gier à Pinay, Saône à Auxonne, Rhône à Arles, le classement obtenu est identique.

– Pour les cinq autres sites (Rhône à Chasse, Saône à Charrey et à Ouroux, Grosne à Varennes et Petite Veyle à Grieges) le déclassement (une classe d'écart) est peu significatif compte tenu de la répétabilité du test, l'une des toxicités mesurées étant souvent très proche de la limite de classe (écart inférieur à 20 %).

– Pour un site (Gier à Givors) deux résultats sont identiques (classe 5), le troisième significativement différent, étant situé dans la classe 4 immédiatement inférieure.

Seul le dixième site (Saône à Cendrecourt) met en évidence deux résultats plus discordants, l'un en classe 2 et l'autre classe 3 mais en marge de la classe 4.

7 - DISCUSSION

7.1 Méthodologie

En fonction des données bibliographiques, nous avons choisi un rapport masse de sédiment/volume de solvant de 1/10, le sulfate de sodium comme agent déshydratant et l'éthanol comme solvant de reprise pour éliminer le dichlorométhane à la fois peu soluble dans l'eau (20 g/l) et de toxicité importante (Cl.50 de 2 g/l environ).

Plusieurs essais méthodologiques ont permis de définir les conditions de réalisation de certaines phases du protocole :

– la centrifugation des sédiments, préalable à l'extraction, n'a pas été adoptée en raison de l'obtention fréquente de masses compactes lors de la mise en contact avec le dichlorométhane et le sulfate de soude, ne permettant pas une extraction efficace ; les extractions sont effectuées sur 10 g de sédiment brut, en présence de 50 g de sulfate de sodium, quantité trouvée suffisante même pour les sédiments très humides (jusqu'à 80 % d'humidité) ;

– l'extraction proprement dite a été limitée à une seule opération d'une durée de 6 heures, suivie après la séparation de la phase liquide, de deux rinçages successifs du sédiment pour parfaire l'extraction ;

– la dilution de l'extraction alcoolique (1 % en eau distillée) avant réalisation de l'essai, est une précaution destinée à éliminer la toxicité de l'éthanol (Cl.50 : 30 g/l environ) et du résidu éventuel de dichlorométhane ;

– les Cl.50 des extraits dilués de sédiments (concentrations réduisant la luminescence de 50 %, peuvent varier de 1 % à 30 % selon leur toxicité) ;

– le critère de validité de l'essai (réduction de luminescence maximale de 30 % pour l'essai à blanc) a été vérifié expérimentalement ; son incidence est négligeable par rapport aux Cl.50 observées et ne justifie pas une correction des résultats ;

– l'expression des résultats (Unités Toxiques par gramme de matières organiques) est une normalisation des résultats entre des sédiments dont le taux d'humidité et la composition granulométrique peuvent être différents ; elle apparaît indispensable si la fraction fine des sédiments, support préférentiel des matières organiques et des substances toxiques, n'est pas séparée au cours de la phase préparative.

7.2 Choix de l'approche

Différents auteurs, en particulier TRUE et HEYWARD, (1988), considèrent que le test Microtox doit être pratiqué à la fois sur les eaux interstitielles, les extraits aqueux et les extraits organiques des sédiments, qui apparaissent comme différents éléments d'une même approche. Dans la perspective de la mise au point d'un outil de gestion des milieux aquatiques, nous avons délibérément choisi l'extraction organique, procédé qui, d'après les données bibliographiques, montrait des corrélations significatives avec les teneurs en substances toxiques dans les deux cas où cela a été effectué et présentait également une plus grande régularité de résultats positifs. Nous avons effectivement vérifié ce dernier point car pour 25 sédiments appartenant à toutes les classes toxiques pour lesquels les différentes approches ont été comparées, les extraits aqueux et les eaux interstitielles n'ont permis de déceler une toxicité que dans 20 % et 30 % des cas respectivement.

Il est donc certain que nous n'aurions pas obtenu une échelle de toxicité comparable à partir d'extraits aqueux ou d'eaux interstitielles. Ces méthodes préparatives gardent cependant toute leur valeur s'il s'agit, de façon plus approfondie, de mieux spécifier la nature et les caractéristiques des polluants toxiques ou d'anticiper l'effet possible de leur relargage.

7.3 Représentativité des résultats

La répétabilité de la méthode, évaluée de 15 % à 25 % selon le niveau de toxicité des sédiments, nous paraît tout à fait acceptable compte tenu de l'hétérogénéité du matériau (sédiment sans préparation spéciale) et des diverses phases successives du protocole (évaporations et reprises) susceptibles d'introduire des causes de dispersion.

Les différents niveaux de toxicité obtenus à partir des extraits de l'ensemble des sédiments étudiés, sont cohérents avec les situations de pollution telles qu'elles peuvent être supposées en fonction des rejets connus en amont. Il est de plus intéressant de constater que, des prélèvements effectués au même point, à quelques semaines ou quelques mois d'intervalle, donnent dans la grande majorité des cas des résultats identiques (même niveau de toxicité ou une seule classe d'écart), ce qui traduit à notre avis la cohérence générale de l'approche.

L'extraction au dichlorométhane, peut apparaître comme non représentative des mobilisations possibles dans le milieu naturel : elle prend cependant en compte essentiellement des substances organiques toxiques, qui dans les conditions du milieu, peuvent être mobilisées ou métabolisées par les micro-organismes ou les organismes benthiques.

Enfin, est-il acceptable de se baser sur le seul test Microtox pour en déduire un état de toxicité vis-à-vis de l'écosystème aquatique ?

D'autres tests sont possibles, LACAZE *et al.* (1989), en particulier, ont appliqué aux extraits aqueux des sédiments de la SEINE un bioessai basé sur l'inhibition de croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum*. Aucun cependant ne présente la simplicité de mise en œuvre du test de bioluminescence bactérienne.

La méthodologie que nous proposons permet par l'étendue des niveaux de toxicité observés une hiérarchisation des situations de pollution intéressante qui devra dans l'avenir être appuyée par des études complémentaires, portant principalement sur l'examen des populations naturelles (en particulier benthiques). Elle devrait de plus s'intégrer dans une stratégie de connaissance de la qualité des rejets et du milieu naturel basée sur des tests biologiques de toxicité.

CONCLUSION

La méthodologie présentée, simple et reproductible, conduit à une hiérarchisation de la toxicité des sédiments de rivière. Des études complémentaires sont nécessaires pour apprécier d'une part les limites d'une approche basée sur un seul test biologique, d'autre part la cohérence de l'échelle de toxicité choisie en fonction de situations de plus en plus diversifiées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BULICH A.A., GREENE M.W. et ISENBERG D.L., 1982. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. *Process Biochem*, mars-avril, 45-47.
- CHAPMAN P.M., 1988. Marine Sediment Toxicity tests In J.J. LICHTENBERG, F.A. WINTER, C.I. WEBER and L. FRADKIN (editors) *Chemical and Biological characterization of Sludges Sediments, Dredges/ Spoils and Drilling Muds*, ASTM STP 976, American Society for Testing and Materials. Philadelphie, pp. 391-402.
- DUTKA B.J. and KWAN K.K., 1988. Battery of screening tests approach applied to sediment extracts – *Toxicity Assessment* Vol. 3 : 303-314.
- GIESY J.P., GRANEY R.L., NEWSTED J.L., ROSIU C.J., 1987. Toxicity of Sediments in the Detroit River : relative sensitivities of three assays. Presented at the Eighth Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Environmental Chemistry. November 9-12 Pensacola, Florida, paper n° 296.
- LACAZE J.C., CHESTERIKOFF A. et GARBAN B., 1989. Bio-évaluation de la pollution des sédiments de la Seine (région parisienne) par l'emploi d'un bioessai basé sur la croissance à court terme de la microalgue *Selenastrum capricornutum* Printz. *Revue des Sciences de l'Eau*, 2, 405-427.
- SCHIEWE M.H., HAWK E.G., ACTOR D.I. and KRAHN M.M., 1985. Use of bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments. *Can Fish and Aquatic Sciences*, 42, 1244-1248.
- TRUE C.J. and HEYWARD A.A., 1988. Relationships between Microtox test results, Extraction methods and Physical and Chemical compositions of Marine Sediment samples – Accepted for Publication in *Toxicity Assessment*, Vol. 4, 7.
- VAN DE GUTCHE C. and MAAS-DIEPEVEEN, 1987. Screening sediments for Toxicity : A water-concentration related problem. Presented at the 14th Annual Aquatic Toxicity, Workshop. November 1-4, Toronto, Canada.
- WILLIAMS L.G., CHAPMAN P.M., GINN T.C., 1986. A comparative Evaluation of marine sediment toxicity using, bacterial luminescence, oyster embryo and amphipod sediment bioassays, *Marine Environmental Research*, 19, 225-249.