

Article

« Étude comparative de huit bioessais à court terme pour l'évaluation de la toxicité de lixiviats de déchets urbains et industriels »

N. Sekkat, M. Guerbet et J. M. Jouany

Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, vol. 14, n° 1, 2001, p. 63-72.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/705409ar>

DOI: 10.7202/705409ar

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

Étude comparative de huit bioessais à court terme pour l'évaluation de la toxicité de lixiviats de déchets urbains et industriels

A comparison of toxicity detection in urban and industrial waste leachates by eight short-term bioassays

N. SEKKAT, M. GUERBET *, J.-M. JOUANY

Reçu le 16 juin 2000, accepté le 9 janvier 2001**.

SUMMARY

Eight ecotoxicological bioassays were evaluated using 14 highly complex liquid samples, including 11 effluents from urban waste and industrial waste lixiviation. Statistical analysis of results revealed that the bioassays have widely varying sensitivities. All were informative – ideally, general ecotoxicological evaluation should spare none. However for routine evaluation of complex liquid mixtures, the Microtox® test is sufficiently sensitive and easy to use and accommodates a large range of samples. Nevertheless Microtox® does not accurately represent natural media and other bioassays, particularly mutagenic tests, are useful complements.

Key-words : *bioassay, ecotoxicology, wastes, leachate.*

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail était d'apprécier l'intérêt ou la redondance de plusieurs bioessais à travers leur application à des échantillons particulièrement complexes. Huit bioessais, plus ou moins couramment utilisés en écotoxicologie, ont donc été testés sur une série de 14 échantillons liquides dont 11 étaient représentés par des effluents de lixiviation de déchets urbains et industriels. L'analyse statistique des résultats montre que les bioessais mis en œuvre présentent des réponses et sensibilités très différentes. Ils sont donc tous informatifs et une évaluation écotoxicologique globale devrait donc tous les prendre en compte, ce qui n'est pas possible dans la réalité. Il apparaît cependant que, pour une surveillance de routine de milieux complexes, le test Microtox® est globalement sensible, facile à mettre en œuvre et applicable à

UER Médecine Pharmacie, Laboratoire de toxicologie, 22 boulevard de l'Université, 76183 Rouen cedex, France.

* Correspondance.

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 janvier 2002.

de grandes séries d'échantillons. Il est néanmoins peu représentatif des milieux naturels et d'autres bioessais ne peuvent que le compléter utilement, en particulier celui visant à déterminer le caractère mutagène du milieu étudié.

Mots clés : *bioessais, écotoxicologie, déchets, lixiviats.*

1 – INTRODUCTION

Le problème des déchets urbains et industriels est une priorité toujours d'actualité. Les quantités produites de déchets ne cessent d'augmenter régulièrement avec le niveau de vie des populations. Un certain nombre de pays a adopté des résolutions législatives visant à limiter la mise en décharge dont le principal inconvénient est le risque majeur de contamination des sous-sols et des nappes phréatiques par les eaux de lixiviation. Des mesures de prévention par le choix de sites de stockage, la mise en place de systèmes d'étanchéification des zones de décharge... ont par ailleurs été prises mais le risque d'entraînement de composés toxiques par les eaux de ruissellement est incontestable. Il est donc nécessaire d'évaluer l'impact réel occasionné par les décharges sur la faune et la flore et, pour cela, les tests écotoxicologiques de laboratoire sont particulièrement indiqués.

Depuis longtemps, il est admis que l'évaluation de l'écotoxicité d'effluents liquides complexes, comme les lixiviats de déchets urbains ou industriels, nécessite l'utilisation simultanée de différents bioessais (TREVORS, 1982 ; MORTIMER, 1985 ; GERSICH *et al.*, 1986 ; DAFOE *et al.*, 1987 ; RETEUNA *et al.*, 1989 ; CROSSLAND, 1992). Les bioessais, pratiqués au laboratoire dans des conditions expérimentales fort éloignées de celles rencontrées dans les milieux naturels, présentent néanmoins l'avantage, par comparaison aux mesures physicochimiques, d'apporter un élément de réponse à la question fondamentale : quels sont les effets d'un effluent sur des organismes vivants dans l'environnement ?

Les bioessais développés sont nombreux et il n'est pas facile de sélectionner le ou les plus pertinents d'entre eux. Si le test sur daphnies est très couramment pratiqué, il existe d'autres bioessais de laboratoire utilisant des micro-organismes qui présentent également un intérêt certain dans le cadre d'une évaluation globale du risque écotoxicologique de milieux complexes. Le choix est souvent fait selon le type de toxicité étudié (aiguë, chronique ou génétique) et le niveau trophique (producteur, consommateur primaire ou secondaire, décomposeur) sur lequel doit être évalué l'impact de l'échantillon étudié. D'autres critères sont également à prendre en considération. C'est ainsi que l'exploitation d'un test plutôt qu'un autre peut aussi être liée à des obligations législatives, économiques ou plus simplement à une habitude d'une équipe ou d'un laboratoire. Le choix d'un essai ayant fait l'objet d'une normalisation est par ailleurs à retenir. La standardisation des méthodes facilite en effet la validation et la comparaison des résultats, notamment par l'utilisation de solutions de référence parfaitement calibrées et définies.

L'objectif de ce travail a donc été de s'intéresser à une série 8 bioessais couramment pratiqués en écotoxicologie et de comparer leurs résultats sur une

même série de 11 effluents liquides complexes représentés par des lixiviats de déchets industriels et de 3 solutions de référence. Ces différents essais de laboratoire, basés sur l'utilisation d'organismes variés, ont été pratiqués selon les recommandations et protocoles décrits dans la littérature afin de comparer les résultats fournis par chacun d'entre eux et de sélectionner le ou les bioessais les plus informatifs.

2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Bioessais

Au cours de ce travail, nous avons mis en œuvre 8 tests choisis en raison de la fréquence de leur utilisation dans des essais d'écotoxicité aiguë et de la diversité des organismes pris en compte dans ces essais. Il s'agit de tests décrits dans la littérature ou ayant faits d'une normalisation, pour lesquels nous ne détaillerons pas le protocole expérimental.

L'essai protozoaire *Colpidium campylum* est basé sur l'inhibition de croissance d'une population de ciliés. Cet essai décrit par DIVE *et al.* (1991) permet d'établir une concentration inhibitrice médiane (CI50) pour chacun des échantillons étudiés.

L'essai lentille utilise la lentille terrestre *Vicia lens*. L'essai simplifié développé par JOUANY *et al.* (1984) permet la détermination d'une inhibition de croissance du végétal et la détermination d'une CI50.

Le test Microtox® est un test bactérien qui repose sur la mesure de luminescence de bactéries marines *Vibrio fischeri* (FERNANDEZ *et al.*, 1995) et a fait l'objet d'une normalisation dans le cadre des essais d'évaluation de la qualité des eaux (norme ISO 11348, 1998). Le protocole expérimental, décrit la société Beckman (1982) qui commercialise ce bioessai, est basé sur l'évaluation d'une inhibition de la bioluminescence (CI50) d'une population bactérienne.

Le test daphnies est l'un des essais écotoxicologiques les plus couramment pratiqués (norme ISO 6341, 1996). Il consiste à déterminer la concentration d'échantillon étudié provoquant une inhibition de la mobilité de la moitié d'une population de microcrustacés d'eau douce *Daphnia magna* (CI50).

Le test *Artemia* est réalisé sur des larves de microcrustacés marins *Artemia salina* sur lesquels l'effet toxique est mesuré par le taux de mortalité (CL50) après 24 heures d'exposition à différentes concentrations (BARAHONA *et al.*, 1999).

Le test *Scenedesmus subspicatus* est un essai d'inhibition de la croissance (CI50) d'une population de micro-algues d'eau douce (norme ISO 8692, 1989).

L'essai *Chlamydomonas* est un test rapide de cytotoxicité (LUSTIGMAN *et al.*, 1999). Il est basé sur l'utilisation de l'algue chlorophycée *Chlamydomonas reinhardtii*, mutant sans paroi CX15, pour laquelle le critère retenu est l'immobilisation (CI50). Bien que n'ayant pas fait l'objet d'une normalisation, sa mise en œuvre permet de comparer les réponses de deux bioessais utilisant un matériel algal (GIRLING *et al.*, 2000).

Le SOS Chromotest décrit par QUILLARDET *et al.* (1985) est un test de mutagenèse utilisant la bactérie *Escherichia coli*, souche PQ37, avec et sans activa-

tion métabolique S9 mix. Pour la comparaison des résultats, il a été décidé d'attribuer une valeur nulle lorsque le facteur d'induction sans activation métabolique est inférieur à 1,50 tandis qu'une note égale au facteur d'activation diminué de 1,50 est retenue dans les autres cas.

2.2 Échantillons

Pour ce travail comparatif, nous avons utilisé d'une part 3 solutions pures de référence, d'autre part 11 lixiviats de déchets industriels et urbains.

Les 3 solutions de référence ont été préparées dans de l'eau déminéralisée. En premier lieu, nous avons retenu une solution de dichromate de potassium à 352 mg Cr/L, soit environ 1 g $K_2Cr_2O_7$ /L, car il s'agit d'un composé notamment préconisé dans la norme ISO 6341 pour valider le test daphnies. En raison de son caractère particulièrement oxydant, deux autres composés, l'un métallique et l'autre organique, ont été retenus pour l'ensemble des 8 bioessais. Les deux autres solutions de référence ont ainsi été constituées par une solution de sulfate de cuivre II à 440 mg Cu/L, élément connu pour ses propriétés antifongiques et représentant des composés métalliques, et une solution de laurylsulfate de sodium à 1 g/L, antibactérien représentant des composés organiques.

Les lixiviats ont été préparés par l'IRH (Institut de Recherches Hydrologiques) de Nancy selon la norme Afnor XP X31-210 (1998). Il s'agit de lixiviats préparés à partir d'échantillons prélevés sur différents sites contaminés et choisis en fonction de leur représentativité des différents types de déchets urbains et industriels rencontrés dans l'environnement.

Les déchets urbains ou industriels sont d'abord mis en contact pendant 16 heures avec de l'eau préalablement distillée et saturée en oxygène et dioxyde de carbone afin de réaliser une lixiviation en milieu acide favorable à l'entraînement des métaux lourds présents dans les échantillons. Cette opération est renouvelée 3 fois de suite, à raison de 100 grammes de matière brute par litre d'eau, avec séparation de chaque lixiviat par centrifugation. À l'issue de cette phase préparatoire, les 3 lixiviats successivement obtenus sont mélangés pour obtenir l'échantillon utilisé pour les bioessais.

Une étude physicochimique succincte est enfin effectuée pour les 11 échantillons de lixiviats auxquels viennent s'ajouter 3 solutions de référence. Elle porte sur les mesure de pH, de résistivité, de demande chimique en oxygène (DCO) et le dosage de l'élément majoritaire caractéristique du déchet (*tableau 1*). Une étude analytique approfondies et plus exhaustives aurait sans doute permis de mieux définir les différents types de déchets mais cette approche beaucoup plus lourde à mettre en œuvre n'allait pas dans le sens d'une évaluation comparative globale basée sur des bioessais.

2.3 Analyse statistique

Afin de comparer globalement les résultats obtenus par les 8 bioessais sur les 14 échantillons étudiés, une analyse statistique en composantes principales a été pratiquée au moyen du logiciel Statgraphics®. Ce type d'analyse multifactorielle permet de prendre en considération l'ensemble des résultats et de visualiser les bioessais dont les réponses sont proches, donc redondantes, ou au contraire différentes, donc complémentaires.

Tableau 1 Nature et caractéristiques physico-chimiques des lixiviats.**Table 1** *Nature and physicochemical characteristics of lixiviates.*

Échantillon	Type	Nature	pH	Résistivité (Ω/cm)	DCO ($\text{mg O}_2/\text{L}$)	Élément d'intérêt particulier	
						Nature	Concentration (mg/L)
1	Référence	Solution étalon de laurylsulfate de sodium	6,3	2 690	1 774	détergent anionique	1 000
2		Solution étalon de bichromate de potassium	4,7	830	160	chrome	352
3		Solution étalon de sulfate de cuivre II	5,1	790	4	cuivre	440
4	Lixiviat de déchet	Décharge d'ordures ménagères	7,3	94	5 300	fer	31
5		Terres souillées par des sels métalliques	7,9	6 800	60	aluminium	7
6		Terres souillées par des composés phénolés	7,3	8 770	126	aluminium	10
7		Terres souillées par des composés phénolés et des résidus de pétrochimie	8,9	2 890	1 630	phénol	500
8		Sables de fonderie usagés	8,4	9430	158	phénol	11
9		Terres souillées par des métaux et pesticides	6,7	1 200	49 fer	aluminium 15	10
10		Sables souillés par des hydrocarbures aromatiques	7,4	3 690	118	aluminium fer	19 29
11		Sables souillés par des hydrocarbures aliphatiques	7,2	4 110	260	aluminium fer	18 27
12		Déchets liquides de solvants chlorés	6,8	790	47 760	chrome zinc	4 4
13		Déchets liquides de cataphorèse	7,4	770	14 560	–	–
14		Déchets liquides d'usines de savons, colles, verniss et peintures	6,4	940	56 320	–	–

3 – RÉSULTATS

Les mesures d'écotoxicité pratiquées sur ces 14 échantillons (11 lixiviats de déchets et 3 solutions de référence) sont notées dans le *tableau 2*. Dans un souci d'harmonisation des résultats et afin de faciliter leur comparaison, les résultats sont notés en équitox selon la transformation suivante : nombre d'équitox = $(1/CE \text{ ou } CI50) \times 100$ avec une valeur de CE ou de CI50 exprimée en pourcentage de dilution aqueuse du lixiviat soumis à l'essai pour laquelle une activité 50 % est relevée. Le caractère toxique d'un échantillon est de ce fait d'autant plus marqué que le résultat du bioessai exprimé en équitox est plus élevé.

Tableau 2 Toxicité des 14 échantillons (valeurs exprimées en nombres d'équitox) selon les 8 bioessais.

Table 2 Toxicity in equitox number of 14 samples according to 8 bioassays.

Échantillon	Daphnies	Microtox	Colpidium	Vicia lens	Artemia	Chlamydomonas	Scenedesmus	SOS Chromotest
1	38,5	1250	105	1,3	154	51	1,8	0
2	814	20,4	64	14	40	7,4	200	0,64
3	2 700	1 000	–	17	294	625	59	0
4	16	10,4	94	2,9	1	14	15	0
5	38,5	1	1,1	40	0	1,4	3	0
6	8,3	24	1,5	0	0	1,2	1,2	0
7	8,7	42	3,2	1,2	4	1,1	1,5	0
8	12,5	41	1,9	0	0	1,3	0	0
9	10,5	2,6	1,7	0	1	0	5	0
10	1,2	8,7	1,5	0	0	0	5,9	1,92
11	2 700	37	96	10	24	74	2,8	0
12	7,7	83	11,5	7,1	2,9	6,9	5,9	0
13	2,2	87	4,9	15,4	4	6,7	1,7	0
14	1 000	9 000	–	2,7	3 570	11 110	3 570	0

Les solutions de référence sont essentiellement destinées à servir de base comparative avec les mesures biologiques pratiquées avec des échantillons particulièrement complexes dont la composition est très imparfaitement connue. Ces essais nous permettent également de vérifier la réponse des matériels biologiques. C'est ainsi que nous relevons une valeur de 814 équitox pour la solution de dichromate de potassium, ce qui correspond après calcul, à une concentration en $K_2Cr_2O_7$ de 1,23 mg/L qui se situe dans la fourchette de 0,9 à 1,5 mg/L recommandée par le protocole standardisé.

L'examen global du *tableau 2* montre tout d'abord que le pH, la résistivité et la demande chimique en oxygène, qui sont des critères physicochimiques

généraux couramment retenus pour évaluer le caractère général d'un effluent, ne sont que très faiblement corrélés aux résultats biologiques. Les seules corrélations nettes sont relevées entre la DCO et les tests Microtox® ($r = 0,706$ $p < 0,01$) *Chlamydomonas* ($r = 0,714$ $p < 0,01$) et *Scenedesmus* ($r = 0,720$ $p < 0,01$). Cette observation tend à rappeler que des critères physicochimiques globaux peuvent servir d'indicateur de qualité mais sont insuffisants pour évaluer de façon correcte la toxicité d'effluents complexes comme les lixiviats de déchets.

On constate d'autre part une très grande diversité de sensibilité des organismes utilisés, que ce soit pour les solutions de référence (échantillons 1 à 3) ou pour les lixiviats de déchets (échantillons 4 à 14). On observe que le test Microtox® s'avère être l'essai le plus sensible pour 7 échantillons parmi les 14 étudiés avec lesquels il présente la plus forte valeur exprimée en équitox. Le test daphnies, couramment utilisé pour évaluer la qualité des eaux, est un bioessai également sensible qui donne les plus fortes valeurs, en particulier pour les deux solutions de référence à base de dichromate de potassium et de sulfate cuivreux.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les résultats obtenus avec les 8 bioessais sur les 14 échantillons. On observe tout d'abord que le maximum d'information est porté par les deux premiers axes principaux F1 (40,8 %) et F2 (20,1 %). Le positionnement des indicateurs biologiques sur une représentation plane F1-F2 permet donc de visualiser les relations entre ces différents bioessais tout en conservant plus de 60 % de l'information initiale (figure 1).

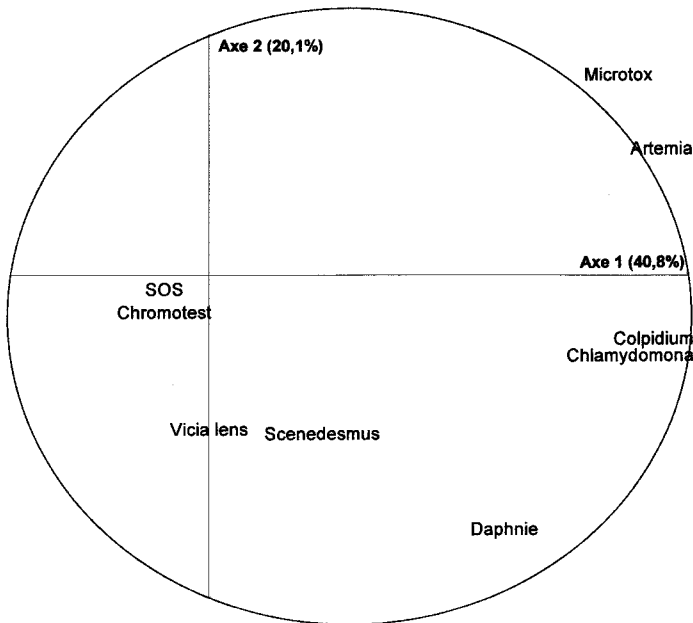


Figure 1 Positionnement des 8 bioessais par ACP.
PCA positions of 8 bioassays.

On remarque que le test Microtox® sur bactéries luminescentes et le bioessai *Artemia* sont proches sur le graphique, ce qui confirme l'excellente corrélation mesurée entre ces deux bioessais ($r = 0,957$ $p < 0,01$). Également sur l'axe F1, les tests *Colpidium* et *Chlamydomonas* présentent également une grande similitude de réponse, traduite par une corrélation sensiblement moins bonne mais néanmoins satisfaisante entre ces deux essais ($r = 0,798$ $p < 0,05$). Ces quatre essais biologiques (Microtox®, *Artemia*, *Colpidium* et *Chlamydomonas*) présentent donc une réponse sensiblement voisine vis-à-vis des différents échantillons étudiés.

Sur l'axe F2, on remarque la proximité de position des bioessais *Vicia lens* et *Scenedesmus* traduisant une similarité de réponse de ces deux mesures végétales qui peuvent donc apparaître redondantes dans ce type d'étude. En revanche, les tests *Scenedesmus* et *Chlamydomonas*, utilisant tous deux un matériel algal, sont sensiblement différents l'un de l'autre.

Les deux autres bioessais, SOS Chromotest et test daphnies, mis en œuvre au cours de cette étude sont graphiquement situés de façon distincte l'un de l'autre et par rapport aux 6 autres tests pratiqués durant cette étude.

Pour le SOS Chromotest, la réponse est totalement indépendante des 7 autres bioessais. Cette différence de réponse semble logique puisqu'il s'agit d'un test utilisant des bactéries, donc un matériel biologique différent de celui des autres bioessais. Par ailleurs, cela confirme l'intérêt de prendre en considération le caractère mutagène, que ce soit par ce test ou par un autre du même type, qui n'est pas appréhendé par les autres tests.

La même remarque peut être faite pour le test daphnies, un des essais d'écotoxicologie les plus fréquemment mis en œuvre et dont la réponse sensiblement différente dans notre étude confirme l'intérêt de son utilisation.

Il apparaît d'autre part que le test *Colpidium* est très complémentaire de l'essai lentille *Vicia lens*, ces deux variables étant pratiquement indépendantes. De plus, ce couple d'essais *Colpidium* et *Vicia lens* possède une très grande sensibilité et une très large « couverture horizontale » dans l'évaluation de l'écotoxicité d'effluents particulièrement complexes.

4 - CONCLUSIONS

Il est très net que les 8 bioessais utilisés n'apportent pas les mêmes informations, tant du point de vue de leurs sensibilités respectives que du classement écotoxicologique qui peut être obtenu pour les 14 échantillons de cette étude. À l'exception des tests Microtox® et *Artemia* d'une part, *Colpidium* et *Chlamydomonas* d'autre part dont les réponses sont concordantes, les bioessais ne sont pas redondants et devraient donc logiquement être retenus sans exception pour une évaluation globale du risque écotoxicologique. Il convient cependant de relativiser cette observation car les sources de variabilité des résultats obtenus avec des bioessais sur des milieux complexes sont nombreuses et difficilement contrôlables par l'expérimentateur, ce que de nombreuses études interlaboratoires ont pu clairement démontrer (KALLQVIST *et al.*,

1989 ; NYHOLM *et al.*, 1992 ; FORBES, 1998). Outre la variabilité biologique, les conditions expérimentales de lixiviation, même si elles sont parfaitement définies et reproductibles, sont très éloignées d'un entraînement par les eaux de ruissellement sur un site naturel.

Dans ces conditions, le choix d'un ou de plusieurs tests parmi les nombreux bioessais existant est particulièrement délicat mais il est cependant évident qu'il est impossible de les mettre tous en œuvre dans la routine, en particulier pour des raisons économiques. Il faut donc choisir les bioessais les plus représentatifs du milieu naturel en choisissant des espèces différentes appartenant aux différents maillons de la chaîne alimentaire (algue, daphnies...), les plus informatifs en évitant les bioessais redondants, les plus sensibles pour être utilisables avec des échantillons de nature très diverse.

Pour la surveillance en routine, on peut préconiser en premier lieu le test Microtox® qui offre une bonne sensibilité tout en étant facile à mettre en œuvre et parfaitement adapté à des grandes séries d'échantillons (TOUSSAINT *et al.*, 1995). En revanche, pour la caractérisation écotoxicologique de milieux liquides complexes comme des lixiviats de déchets, il serait souhaitable de mettre en œuvre simultanément un test *Colpidium* sur protozoaire, un test *Vicia lens* sur végétal et enfin un test daphnies sur microcrustacé d'eau douce. Ces trois bioessais offrent en effet une bonne indépendance de réponse tout en présentant une sensibilité très satisfaisante. L'information fournie par ces trois bioessais est donc particulièrement intéressante tout en s'appuyant sur des protocoles expérimentaux qui ne posent pas de problème technique particulier. Il convient cependant d'y ajouter un essai de génotoxicité, comme le SOS Chromotest, qui apporte un complément d'information sur le caractère potentiellement mutagène qu'une évaluation globale du risque écotoxicologique doit prendre en considération.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 1998. Déchets. Essais de lixiviation. Norme XP X31-210.
- BARAHONA M.V., Sanchez-Fortun S., 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina*. *Environ. Poll.*, 104 (3), 469-476.
- BECKMANN Instrument Inc., 1982. Microtox system operating manual. *Beckman Instructions 015-555879*.
- CROSSLAND N.O., 1992. Hazard assessment in freshwater ecosystems. *Toxicol. Lett.*, 64, 511-517.
- DAFOE T., CAREY J.H., MC GRINDLE S.H., WELLS P.E., WILSON R.C.H., 1987. Relationships between the biological testing of industrial effluents and the quality of receiving waters. *Water Poll. Res. J. Canada*, 22, 251-269.
- DIVE D., BLAISE C., LE DU A., 1991. Standard protocol proposal for undertaking the *Colpidium campylum* ciliate protozoan growth inhibition test. *Angew. Zool.*, 78, 79-90.
- FERNANDEZ A., TEJEDOR C., CABRERA F., CHORDI A., 1995. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphorum*. *Water Res.*, 29, 1281-1286.
- FORBES V.E., 1998. Sources and implications of variability in sensitivity to chemicals for ecotoxicological risk assessment. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 20, 407-418.

- GERSICH F.M., HAYES M.A., 1986. Acute toxicity tests with *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* in support of national pollutant discharge elimination permit requirements. *Water Res.*, 20, 939-941.
- GIRLING A.E., PASCOE D., JANSSEN C.R., PEITHER A., WENZEL A., SHAFER H., NEUMEIER B., MITCHELL G.C., TAYLOR E.J., MAUND S.J., LAY J.P., JUNTNER I., CROSSLAND N.O., STEPHENSON R.R., PERSOONE G., 2000. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotox. Environ. Saf.*, 45, 2, 148-176.
- ISO 8692, 1989. Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*.
- ISO 6341, 1996. Qualité de l'eau. Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Strauss.
- ISO 11348, 1998. Qualité de l'eau. Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri*.
- JOUANY J.M., RIVALAIN AUGER C., SAVALLE J.F., GUERBET M., VASSEUR P., 1984. Essai simplifié d'écotoxicologie à deux niveaux, végétal et mammifères. *Act. Symp. Int. Ecotoxicologie Terrestre*, Les Arcs, SEFA Ed., 579-586.
- KALLQVIST T., CARLBERG G.E., KRINGSTAD A., 1989. Ecotoxicological characterization of industrial wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 18, 321-336.
- LUSTIGMAN B., LEE L.H., FANFAN W., 1999. Effect of cadmium on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*, 9th Gen. Meeting of the American Soc. For Microbiology, Chicago, Illinois, USA, 30/05-03/06/1999.
- MORTIMER D.C., 1985. Freshwater aquatic macrophytes as heavy metal monitors: the Ottawa river experience. *Environ. Monitor. Asses.*, 5, 311-323.
- NYHOLM N., KRISTENSEN P., 1992. Screening methods for assessment of biodegradability of chemicals in seawater - results for a ring test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 23,161-172.
- QUILLARDET P., HOFNUNG M.,1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147, 65-78.
- RETEUNA C., VASSEUR P., CABRIDENC R., 1989. Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. *Hydrobiologia*, 188, 149-153.
- TOUSSAINT M.W., SHEDD T.R., VAN DER SCHALE W.H., LEATHER G.R., 1995. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 907-915.
- TREVORS J.T., 1982. Differences in the sensitivity of short term bioassays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 655-659.