



**Evaluation de la toxicité de
sédiments naturels vis-à-vis
d'organismes benthiques - Essais
réalisés dans le cadre de l'activité
Sednet**

Rapport technique

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable
Direction de l'Eau
20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV03000081 - Opération n°2

V. POULSEN

*Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques
Direction des Risques Chroniques*

23 DECEMBRE 2003

Evaluation de la toxicité de sédiments naturels vis-à-vis d'organismes benthiques - Essais réalisés dans le cadre de l'activité Sednet

Rapport technique

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable

Direction de l'Eau
20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV03000081 - Opération n°2

23 DECEMBRE 2003

V. POULSEN

Ce document comporte 12 pages (hors couverture et annexes).

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	V. POULSEN	E. THYBAUD	E. THYBAUD
Qualité	Ingénieur ECOT	Responsable Unité ECOT	Responsable Unité ECOT
Visa			

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	3
2. ETUDE INTERLABORATOIRE – PRÉSENTATION GÉNÉRALE.....	3
2.1 Objectif.....	3
2.2 Organisation	3
2.3 Echantillonnage.....	3
2.3.1 Echantillons d'eau douce	3
2.3.2 Echantillons estuarien et marin.....	4
2.4 Bioessais et analyses physico-chimiques	4
3. ESSAIS RÉALISÉS SUR ORGANISMES BENTHIQUES À L'INERIS	6
3.1 Protocoles expérimentaux	6
3.1.1 Préparation du sédiment	6
3.1.2 Essai sur <i>Hyalella azteca</i>	6
3.1.3 Essai sur <i>Chironomus riparius</i>	7
3.2 Résultats	9
3.2.1 Essais sur <i>Hyalella azteca</i>	9
3.2.2 Essais sur <i>Chironomus riparius</i>	10
3.3 Conclusion provisoire	11
4. LISTE DES ANNEXES	12
CONTEXTE ET ÉVOLUTION GÉNÉRALE.....	2
RÉORGANISATION DES GROUPEs DE TRAVAIL.....	2
SUITE DU TRAVAIL POUR LE WP 3.....	3

1. INTRODUCTION

Dans le cadre de l'ancien groupe de travail n° 1 (voir la réorganisation dans le compte rendu de la conférence générale de septembre 2003 joint en annexe 1), il a été décidé d'effectuer des séries d'essais sur des sédiments naturels communs. L'organisme qui pilotait le groupe de travail s'est chargé de l'organisation du prélèvement et de l'envoi des échantillons. Chaque participant au groupe de travail qui le souhaitait pouvait réaliser des essais biologiques et/ou physico-chimiques.

Le présent rapport présente dans un premier temps l'organisation générale de l'étude et la répartition des essais par laboratoire. Dans un deuxième temps, les protocoles et les résultats obtenus à l'INERIS sont décrits.

2. ETUDE INTERLABORATOIRE – PRESENTATION GENERALE

2.1 OBJECTIF

L'objectif de cette étude était de comparer différentes méthodologies d'évaluation de la toxicité des sédiments couramment utilisées en Europe, spécifiquement les bioessais. D'autre part, il était intéressant de comparer les différentes approches utilisées pour l'interprétation des résultats.

2.2 ORGANISATION

Cinq échantillons (trois points d'échantillonnage en eau douce, un en estuaire et un en milieu marin) ont été prélevés par l'Agence Flamande de l'Environnement (Belgique) et l'institut RIKZ (Pays Bas). Les échantillons ont été répartis dans différents récipients et envoyés aux laboratoires participants. Chaque laboratoire a testé les échantillons avec sa ou ses propres méthodes. L'INERIS a testé les trois échantillons prélevés en eau douce ainsi que l'échantillon prélevé en zone estuarienne.

2.3 ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'une benne. Environ 100 litres de sédiment ont été collectés sur une longueur d'environ 100 mètres, par site de prélèvement. Tous les sédiments ont été homogénéisés avant d'être répartis dans les différents récipients. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C.

Les prélèvements ont eu lieu le 16 septembre 2003.

2.3.1 Echantillons d'eau douce

Les trois échantillons prélevés en eau douce sont issus du bassin versant de la Scheldt. Leur description est la suivante :

- Echantillon 1: (code 333500) "de Rode Loop" :

D'après les données collectées ces dernières années, ce sédiment entraîne un effet sur les trois essais utilisés par l'Agence Flamande de l'Environnement (algues, *thamnocephalus* et hyalles). Cependant, les paramètres chimiques ne mettent pas en évidence de fortes valeurs de contaminants par rapport aux valeurs de référence, et les communautés biotiques vivant *in situ* sont très bonnes.

- Echantillon 2 : (code 305000) “de Wamp” :

Ce site pourrait être considéré comme un site de référence, car aucun effet écotoxicologique n’a été observé lors des études précédentes. Les dosages chimiques ont mis en évidence de très faibles valeurs de concentrations en contaminants et les communautés biologiques sont très bonnes.

- Echantillon 3: (code 306200) “de Scheppelijke Nete” :

Sur ce site, les communautés biologiques sont bonnes, mais des effets écotoxicologiques ont été observés et les composants chimiques suivants ont été mesurés à des concentrations non négligeables : Cd, Hg, Zn, PCB’s.

2.3.2 Echantillons estuarien et marin

Les deux échantillons suivants ont été prélevés dans l’estuaire de la Scheldt :

- Echantillon 4: Echantillon d’eau saumâtre, prélevé juste en aval du port d’Anvers.
- Echantillon 5: Echantillon marin, prélevé dans l’estuaire Westerschelde , à proximité d’un site présentant de fortes concentrations de retardants de flamme. Du fait de l’inadéquation entre sa salinité et le mode de vie en eau douce des organismes utilisés à l’INERIS, cet échantillon n’a pas été traité au laboratoire d’écotoxicologie.

2.4 BIOESSAIS ET ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

La répartition de réalisation des essais parmi tous les participants est détaillée dans les tableaux 1, 2 et 3.

Tableau 1 : Analyses physico-chimiques réalisées sur les sédiments naturels

INSTITUT	PAYS	ACTIVITE
Université d’Anvers	Belgique	coordination
Agence Flamande de l’Environnement	Belgique	échantillonnage
		analyse chimique de : arsenic, cadmium, chrome, cuivre, mercure, plomb, nickel, zinc, huiles minérales, composés organohalogénés, pesticides organo chlorés, PCBs and HAPs
		teneur en argile et en matière organique
Université de Cantabria	Espagne	analyse élémentaire (C,N,O,S), COT, indice phénol, paramètres microstructuraux
Université de Reading	Angleterre	granulométrie
CNRSSP	France	extractions chimiques pour la spéciation des métaux

Tableau 2 : Bioessais réalisés sur les sédiments naturels et /ou sur eau interstitielle

INSTITUT	PAYS	ACTIVITE
----------	------	----------

INSTITUT	PAYS	ACTIVITE
Université de Cadiz	Espagne	microtox
		<i>Equinocardium</i>
Agence Flamande de l'Environnement	Belgique	algues <i>Thamnocephalus</i> <i>Hyalella azteca</i>
Département d'Océanographie and d'Environnement Marin/AZTI	Espagne	<i>Corophium s.p.</i>
RIKZ	Pays Bas	<i>Corophium volutator</i> : test aigu
		<i>Nereis diversicolor</i> : test chronique
		<i>Corophium volutator</i> : test chronique
		microtox mutatox DR-calux ER calux QPID-TIE
INERIS	France	<i>Hyalella azteca</i>
		<i>Chironomus riparius</i>
Institut Fédéral d'Hydrobiologie	Allemagne	algues
		bactéries sur eau interstitielle
		daphnies sur eau interstitielle
		Bioessai profilant la physiologie au niveau des communautés (CLPP)
CNRSSP	France	microtox
		algues
Université de Metz	France	algues <i>Brachionus calyciflorus</i>
Université de Venise	Italie	microtox <i>Paracentrotus lividus</i> (+ éventuellement des bivalves)
Ville de Hambourg	Allemagne	<i>Daphnia magna</i> algues microtox

INSTITUT	PAYS	ACTIVITE
		<i>Arthrobacter globif.</i> (sédiment entier)
ISSEP	Belgique	Microtox <i>Brachionus calyciflorus</i>
RIZA	Pays Bas	<i>Chironomus riparius</i>
		chydorides
		nématodes
		bactéries sur eau interstitielle
daphnies sur eau interstitielle		
Institut Norvégien pour la Recherche sur l'Eau	Norvège	Batterie non précisée

Tableau 3 : Indices réalisés sur les sédiments naturels

INSTITUT	PAYS	ACTIVITE
Université d'Anvers	Belgique	Indices biotiques Indice oligochètes

Certains essais sont réalisés dans plusieurs laboratoires. De ce fait, cette étude de cas pourra servir, en partie, de test d'intercalibration, pour ces essais spécifiquement.

3. ESSAIS REALISES SUR ORGANISMES BENTHIQUES A L'INERIS

3.1 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

3.1.1 Préparation du sédiment

Dès réception, les quatre sédiments testés ont été stockés à 4 °C à l'abri de la lumière pendant deux jours, de façon à les laisser décanter. A l'issue de cette décantation, le surnageant a été éliminé par siphonage. Les sédiments ont ensuite été tamisés à 2 mm puis homogénéisés et replacés à 4 °C avant le lancement des essais.

3.1.2 Essai sur *Hyalella azteca*

Les essais ont été réalisés selon le protocole décrit dans la norme Afnor XP T 90-338-1 de septembre 2003 intitulée : “ Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de *Hyalella azteca* – Partie 1 : sédiments naturels ”.

Les organismes utilisés pour réaliser les essais proviennent de l'élevage de hyalelles du laboratoire. Dix jeunes hyalelles, âgées de 7 à 14 jours, sont introduites par béccher, chacun contenant du sédiment (artificiel ou à tester) et du milieu d'essai selon un ratio sédiment / milieu de 1/4 en volume. Les bécchers sont placés dans une enceinte thermostatée dont la température est maintenue à 23°C±2°C. Les essais bénéficient d'un éclairage compris entre 500 et 1000 lux avec une photopériode de 16h d'éclairage et de 8h d'obscurité. Une aération continue de la colonne d'eau est mise en place. Le volume de milieu d'essai est complété 3 fois par semaine afin de compenser l'évaporation induite par cette aération.

Le milieu d'essai a les caractéristiques suivantes : pH de 8,0 ± 0,2, teneur en oxygène dissous supérieure à 7 mg.l⁻¹, conductivité de 350 ± 60 µS.cm⁻¹ et dureté de 110 ± 30 mg CaCO₃.l⁻¹.

La composition du sédiment artificiel utilisé comme référence est donnée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Composition du sédiment artificiel utilisé pour les hyalelles

Constituants	% massiques en équivalent sec
Tourbe brune	6,5 %
Kaolin	33,25 %
Sable quartzique (0,8 – 2 mm)	60,0 %
CaCO ₃	0,1 %
Tetramin [®]	0,15 %
COT mesuré	1,81 %

Ce sédiment est mis à maturer avec du milieu d'essai pendant dix jours, dans les conditions de l'essai, avant le lancement des tests.

Deux séries de récipients d'essai ont été réalisées en parallèle :

- une série nourrie, à raison de 125 µl de Tetramin[®] par jour ouvré et par récipient d'une solution de Tetramin[®] à 10 g/l.
- une série non nourrie.

Deux séries de récipients d'essai sont réalisées par condition d'essai (type de sédiment / type d'alimentation) : l'une pour la détermination de la survie des organismes et de leur croissance¹ à 14 jours, l'autre à 28 jours.

3.1.3 Essai sur *Chironomus riparius*

Les essais ont été réalisés selon le protocole décrit dans le projet de ligne Directrice de l'OCDE 218, version 2, de 2003 intitulée : " Sediment-Water Chironomid toxicity test using spiked sediment ".

¹ La croissance est déterminée en retranchant à la taille finale mesurée la taille initiale des organismes.

Les organismes utilisés pour réaliser les essais proviennent de l'élevage de chironomes du laboratoire. Dix larves de 48 heures sont introduites par béccher, chacun contenant du sédiment artificiel et du milieu d'essai selon un ratio sédiment / milieu de 1/4 en volume. Les béchers sont placés dans une enceinte thermostatée dont la température est maintenue à $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les essais bénéficient d'un éclairage compris entre 500 et 1000 lux, avec une photopériode de 16h d'éclairage et de 8h d'obscurité. Une aération continue de la colonne d'eau est mise en place. Le volume de milieu d'essai est complété 3 fois par semaine afin de compenser l'évaporation induite par cette aération.

Le milieu d'essai a les caractéristiques suivantes : pH de $8,0 \pm 0,2$, teneur en oxygène dissous supérieure à 7 mg.l^{-1} , conductivité de $350 \pm 60 \mu\text{S.cm}^{-1}$ et dureté de $110 \pm 30 \text{ mg CaCO}_3.\text{l}^{-1}$.

La composition du sédiment artificiel utilisé comme référence est donnée dans le tableau ci-dessous. Ce sédiment est utilisé depuis plusieurs années au laboratoire et donne des résultats satisfaisants en terme de survie, de croissance² et d'émergence.

Tableau 5 : Composition du sédiment artificiel utilisé pour les chironomes

Constituants	% massiques en équivalent sec
α - cellulose	4,75 %
Kaolin	30 %
Sable quartzique (0,8 – 2 mm)	65 %
CaCO_3	0,1 %
Tetramin [®]	0,15 %
COT mesuré	2,6 %

Ce sédiment est mis à maturer avec du milieu d'essai pendant dix jours, dans les conditions de l'essai.

Lors de ces essais, les organismes sont nourris tous les jours ouvrés, aux doses suivantes :

- De J0 à J5, 250 μl de Tetramin[®] sont distribués par jour et par récipient d'une solution de Tetramin[®] à 10 g/l.
- De J5 à J28, 500 μl de Tetramin[®] sont distribués par jour et par récipient d'une solution de Tetramin[®] à 10 g/l.

Deux séries de récipients d'essai sont réalisées par type de sédiment : l'une pour la détermination de la survie des organismes et de leur croissance² à 10 jours, l'autre pour le suivi des émergences entre 10 et 28 jours.

² La croissance est déterminée en retranchant à la taille finale mesurée la taille initiale des organismes.

3.2 RESULTATS

3.2.1 Essais sur *Hyalella azteca*

Les résultats des essais réalisés sur *Hyalella azteca* sont présentés dans les tableaux 6 et 7. L'analyse des résultats s'effectue de la manière suivante. Dans un premier temps, on ne s'intéresse qu'aux résultats concernant les séries non nourries. Si aucune toxicité n'est observée, l'analyse s'arrête et le sédiment est considéré comme étant non toxique. Si une toxicité est notée, les résultats des séries nourries sont inclus. Si une toxicité est observée, le sédiment est définitivement considéré comme toxique. Si aucune toxicité n'est observée, le sédiment ne peut être classé, la toxicité observée en absence de nourriture pouvant être due au manque d'éléments nutritifs dans le sédiment naturel.

Dans le cas présent, on observe une inhibition non négligeable de la croissance des organismes à 14 jours pour les quatre sédiments testés, en absence de nourriture ajoutée. Aucune inhibition n'est observée à 28 jours dans les mêmes conditions, ni lors des mesures en conditions nourries. Ceci signifie que les sédiments testés sont suffisamment riches en éléments nutritifs pour nourrir les organismes. Par contre, ces résultats indiquent qu'un retard de croissance est observé à 14 jours, et que ce retard est rattrapé pendant le reste de la durée d'expérimentation.

Tableau 6 : Résultats de l'essai *Hyalella azteca* en conditions non nourries

		Survie		Croissance ³			
		14 jours	28 jours	14 jours (µm)	Inhibition / témoin	28 jours (µm)	Inhibition / témoin
Sédiment témoin		94 %	86 %	599,4	-	677,9	-
Sédiments d'eau douce	De Rode Loop	92 %	90 %	145,1	75,8 %	973,8	0
	De Wamp	88 %	74 %	65,3	89,1 %	793,7	0
	De Scheppelijke	96 %	92 %	158,0	73,7 %	1266,7	0
Sédiment d'eau saumâtre		66 %	46 %	77,6	87,1 %	655,3	3,3 %

³ La croissance est déterminée en retranchant à la taille finale mesurée la taille initiale des organismes.

Tableau 7 : Résultats de l'essai *Hyaella azteca* en conditions nourries

		Survie		Croissance ³			
		14 jours	28 jours	14 jours (µm)	Inhibition / témoin	28 jours (µm)	Inhibition / témoin
Sédiment témoin		100 %	96 %	994,5	-	1377,1	-
Sédiments d'eau douce	De Rode Loop	96 %	96 %	825,0	17,0 %	1829,1	0
	De Wamp	100 %	96 %	1128,5	0	1845,8	0
	De Scheppelijke	98 %	100 %	1037,0	0	2390,5	0
Sédiment d'eau saumâtre		92 %	90 %	1036,4	0	1552,5	0

3.2.2 Essais sur *Chironomus riparius*

Les résultats concernant les essais sur *Chironomus riparius* sont présentés dans le tableau 8. Une toxicité est observée pour tous les sédiments testés, quelque que soit l'inhibition observée : croissance ou émergence, excepté pour l'émergence des sédiments DE RODE LOOP.

Tableau 8 : Résultats des essais sur *Chironomus riparius*

		Survie	Croissance ³		Emergence	
		10 jours	10 jours (µm)	Inhibition / témoin	Cumulée à 28 jours	Inhibition / témoin
Sédiment témoin		94 %	8265,7	-	80 %	-
Sédiments d'eau douce	De Rode Loop	92 %	5726,6	30,7 %	80 %	0
	De Wamp	92 %	6204,6	24,9 %	70 %	12,5 %
	De Scheppelijke	66 %	5165,2	37,5 %	44 %	45,0 %
Sédiment d'eau saumâtre		94 %	5278,2	36,1 %	68 %	15,0 %

³ La croissance est déterminée en retranchant à la taille finale mesurée la taille initiale des organismes.

3.3 CONCLUSION PROVISOIRE

A ce stade de l'évaluation de la toxicité des sédiments naturels testés sur *Hyaella azteca* et *Chironomus riparius*, la seule conclusion qui peut être formulée est que ces sédiments présentent une certaine toxicité :

- pour les chironomes à la fois sur la croissance et l'émergence des organismes,
- pour les hyalles : un retard de croissance est observé.

Cependant, les données physico-chimiques et les résultats des autres bioessais ne sont pas encore disponibles. Toute cette campagne sera analysée lors d'une réunion de travail qui aura lieu fin janvier à Lisbonne. A cette occasion, nous pourrons tirer les conclusions complètes concernant la toxicité de ces sédiments sur les organismes testés et mettre éventuellement en rapport la toxicité observée sur *Hyaella azteca* et *Chironomus riparius* avec les concentrations de certains polluants.

4. LISTE DES ANNEXES

Repère	Désignation précise	Nb/N° pages
1	SEDNET - Compte-rendu de la conférence tenue à Venise du 28 au 30 septembre 2003	3

ANNEXE 1

SEDNET - Compte-rendu de la conférence tenue à Venise du 28 au 30 septembre 2003

CONTEXTE ET EVOLUTION GENERALE

Cette conférence a fait le point sur l'avancée des travaux de Sednet à mi-parcours, les attentes de l'Union Européenne compte tenu des financements, la nouvelle organisation des groupes de travail et la suite des travaux ainsi que les rendus attendus.

La première phase de Sednet (les premiers 18 mois) avait pour but, pour l'ensemble des WG, de poser les problèmes relatifs à l'évaluation et la gestion des sédiments contaminés. La deuxième phase (d'ici fin 2004) va consister à donner des solutions. A travers cet objectif, il a été demandé à Sednet par l'Union Européenne de fournir plusieurs types de documents et de développer divers modes de communication, avec différentes dates butoir :

- Un guide général d'environ 50 pages concernant la "gestion durable des sédiments", pour fin 2004,
- Des états d'avancement (20 pages chacun), pour la mi-2004 concernant :
 - Les sédiments en relation avec la Directive Cadre Eau
 - Les sédiments en relation avec les Framework programmes 6 et 7 de l'UE.
- Un document guide sous forme de livre d'environ 200 pages, par WG, pour fin 2004 contenant :
 - L'état de l'art
 - Des synthèses des méthodes existantes et expérimentations menées
 - Des solutions et des recommandations
- Des informations mises à jours régulièrement sur le site Web

D'une manière générale, il a été demandé de se focaliser sur des cas concrets.

REORGANISATION DES GROUPES DE TRAVAIL

Ces demandes précises de la part de l'UE font suite à un manque de rendu des différents WG, notamment le WG 1 "Etude et caractérisation des sédiments". Ce manque de communication autour de l'activité de ce WG a conduit à la réorganisation des 6 WG en 5 "Work Packages", les WG 1 et 2 fusionnant en WP 3 :

- WP 1 : Comité de coordination, de synthèse, de diffusion au niveau des acteurs
- WP 2 : Gestion au niveau du bassin versant
- WP 3 : Evaluation de la qualité et de l'impact
- WP 4 : Traitement des matériaux dragués
- WP 5 : Gestion du risque

SUITE DU TRAVAIL POUR LE WP 3

En ce qui concerne le WP 3, la prochaine étape va consister à faire circuler la table des matières du livre que nous devons rédiger. Une personne sera chargée de faire la compilation des textes par chapitre. Je me suis engagée à participer à la rédaction de cet ouvrage en apportant mes compétences dans le domaine de l'écotoxicologie d'eau douce. Le travail, à ce niveau, consistera à faire la compilation des méthodes biologiques existantes et utilisées pour évaluer la toxicité des sédiments contaminés, chacun dans son pays.

Lors du prochain workshop qui se tiendra fin janvier 2004 à Lisbonne, dont le thème sera la biodisponibilité des contaminants et les TIE, une réunion de travail aura lieu la veille afin de faire le point et définir le contenu du livre. D'autre part, au cours de ce workshop, les résultats des essais sur sédiments naturels actuellement en cours (à l'INERIS, essais sur chironomes et hyalelles) seront présentés et discutés.

Une autre réunion, spécifiquement sur l'avancée du document, aura lieu au printemps. Date et lieu exacts à définir.