HAL
open science

Méthodes d'étude de l'écotoxicité : application à l'évaluation de l'impact potentiel des eaux résiduaires d'incendie sur les écosystèmes aquatiques

Eric Thybaud, Véronique Petit

To cite this version:

Eric Thybaud, Véronique Petit. Méthodes d'étude de l'écotoxicité : application à l'évaluation de l'impact potentiel des eaux résiduaires d'incendie sur les écosystèmes aquatiques. Journée de l'AFITE "Risques technologiques et pollution de l'environnement quels outils pour les prévoir et les maîtriser", Oct 1996, Lyon, France. pp.5-18. ineris-00971980

HAL Id: ineris-00971980

https://ineris.hal.science/ineris-00971980

Submitted on 3 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

METHODES D'ETUDE DE L'ECOTOXICITE : APPLICATION A L'EVALUATION DE L'IMPACT POTENTIEL DES EAUX RESIDUAIRES D'INCENDIE SUR LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

Eric THYBAUD - Véronique PETIT
INERIS

L'écotoxicité d'une substance chimique, d'un effluent industriel ou de tout rejet à l'environnement peut être évaluée à l'aide de diverses techniques regroupées schématiquement en deux catégories, les études de laboratoire d'une part et les études en milieu naturel d'autre part (Figure 1).

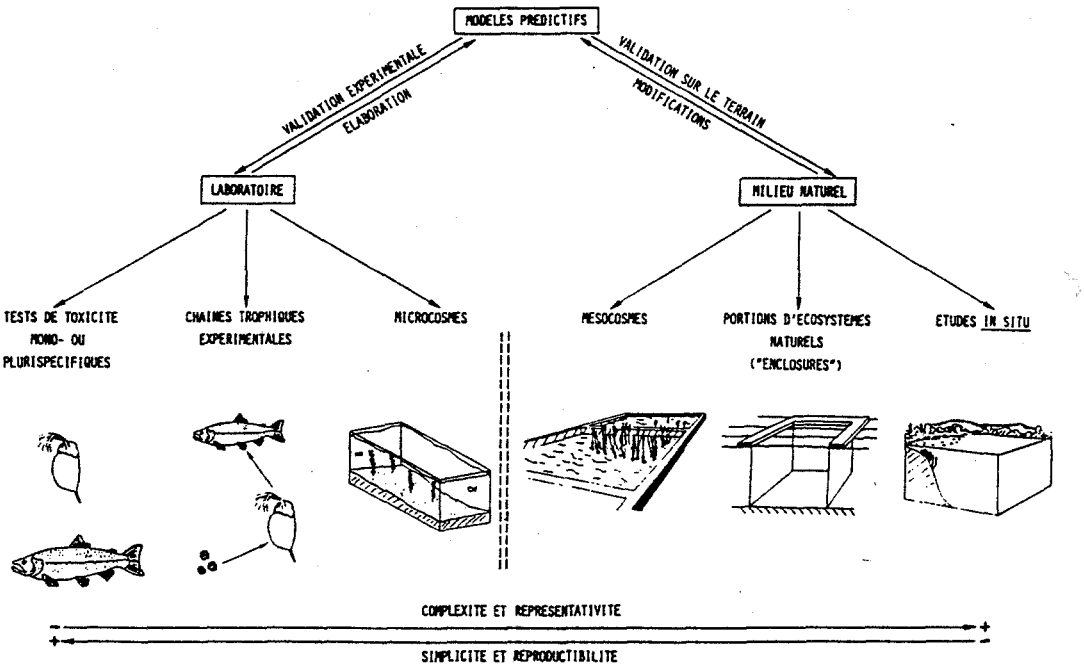


Figure 1 : Principales méthodologies employées en écotoxicologie aquatique.

Journée de l'AFITE "Risques technologiques et pollution de l'environnement, quels outils pour les prévoir et les maîtriser", dans le cadre de Pollutec, Lyon, 23 octobre 1996, p. 5 - 18

I. LES ETUDES DE LABORATOIRE

Les moyens d'étude de l'effet potentiel d'une substance chimique ou d'un effluent vis-à-vis des organismes vivants, développés au niveau du laboratoire sont très divers puisqu'ils vont des essais de toxicité monospécifiques (bioessais) jusqu'à l'emploi de microcosmes.

I.1. Les bioessais

De nombreuses espèces tant animales que végétales, de nombreux critères d'effets (mortalité, inhibition de croissance, immobilisation, ...) ont été étudiés par la communauté scientifique. Ces travaux ont conduit à la définition de divers bioessais de laboratoire dont un certain nombre sont maintenant normalisés.
L'objectif d'un bioessai est de déterminer, dans des conditions expérimentales précises, la concentration de toxique ou la durée d'exposition nécessaire pour entraîner un effet déterminé. Ils ont donc pour but la détection et l'évaluation de l'écotoxicité potentielle d'une substance chimique ou de tout autre échantillon vis-à-vis des organismes vivants.

Les essais normalisés tant au niveau national qu'international (AFNOR, ISO, UE, OCDE) présentent en commun un certain nombre de caractéristiques : leur reconnaissance par la communauté scientifique, leur capacité à prédire les effets d'une grande variété de substances sur des organismes différents, leur reproductibilité interlaboratoire, leur sensibilité et enfin leur facilité de réalisation et leur coût modéré.

Leur réalisme « écologique » est quant à lui beaucoup plus discuté, ces bioessais étant réalisés dans des conditions d'environnement conventionnelles (température constante, photopériode contrôlée, milieu artificiel, ...) souvent fort éloignées des conditions environnementales naturelles.

Compte tenu de la grande diversité des espèces animales et végétales dans les écosystèmes aquatiques et terrestres, les essais d'écotoxicité ont été développés vis-à-vis d'organismes représentant différents niveaux trophiques : producteurs primaires (assurant leur développement à partir du gaz carbonique, de l'eau et des sels minéraux et utilisant la lumière comme source d'énergie), consommateurs primaires (herbivores), secondaires (carnivores) et décomposeurs (utilisant la matière organique morte dont ils assurent une minéralisation progressive) (Tableau 1).

Tableau 1 : Tests d'écotoxicité appliqués aux substances chimiques

Niveaux trophiques	Organismes	OCDE	ISO	CEE	AFNOR	CEN
Producteurs primaires	Algues	201 Juin 1984	ISO 8692 Déc. 1990	C3 JO L 383 A Déc. 1993	NF ISO 8692 Déc. 1990	NF EN 28692 Mai 1993
	Plantes terrestres	208 Avril 1998	ISO 112 69/1		X 31 201 Oct. 1982 X 31 202 Sept. 1986 X 31 203 Mai 1994	
Consommateurs primaires	Daphnies	202 Avril 1984	ISO 63 41 1983	C2 SOL 383A	T 90 301 Janv. 1983	
	Vers de terre	207 Avril 1984	ISO 11268/1	87/302 Mai 1988	X 31 251 Mai 1994	
Consommateurs secondaires	Poissons	203 Juillet 1992	ISO 7346/1 7342/2 7346/3 1984	CI JO L 383 A Déc. 1993	T 90 303 T 90 305 T 90 307 Juin 1995	
Décomposeurs	Flore de boues activées		ISO 8192 1986	87/302/CEE Mai 1988	T 90 340 Sept. 1986	
	Pseudomonas putida		ISO - DIS 10712-2 1995			

Producteurs primaires

Des essais d'écotoxicité vis-à-vis des producteurs primaires ont été développés à la fois en milieu aquatique et en milieu terrestre.

En milieu aquatique, celui-ci consiste à déterminer la concentration inhibant de 50% la croissance d'une population d'algues vertes unicellulaires de l'espèce *Raphidocelis subcapitata* ou de l'espèce *Scenedesmus subcapitatus*.

En milieu terrestre, deux aspects ont été développés. Le premier consiste à étudier l'inhibition de la germination de semence et à déterminer la concentration inhibant 50% de la germination dans une population de graines mise en expérimentation.
La seconde approche concerne l'étude de l'inhibition de la croissance des parties aériennes et l'inhibition de la croissance des parties racinaires de graines préalablement germées.

Consommateurs primaires

En ce qui concerne les consommateurs primaires, deux essais d'écotoxicité en milieu aquatique font l'objet d'un consensus international. Un essai de toxicité aiguë où est évaluée l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* et un essai de toxicité chronique où l'inhibition de la reproduction de ce même organisme est étudiée.

La *Daphnia magna* est un microcrustacé ayant la particularité de se reproduire, dans des conditions environnementales satisfaisantes, par parthénogenèse, c'est à dire par reproduction asexuée. Ceci présente le double avantage de supprimer d'une part une éventuelle différence de sensibilité liée au sexe et d'autre part de pouvoir disposer d'organismes génétiquement identiques puisque tous issus d'une même daphnie mère.
L'essai d'inhibition de mobilité consiste à déterminer la concentration qui en 48 heures inhibe la mobilité de 50% d'une population de *Daphnia magna* mise en expérimentation.
L'essai d'inhibition de la reproduction consiste à placer des daphnies mères dans diverses concentrations de la substance à expérimenter et à déterminer, après 21 jours, la plus forte concentration n'entraînant pas d'effet sur la reproduction statistiquement significatif par rapport au témoin (NOEC).
En milieu terrestre, deux essais de toxicité vis-à-vis du ver de terre *Eisenia fetida* ont été développés.
Le premier consiste à déterminer la concentration entraînant la mort de 50% des animaux mis en expérimentation, le second permet de définir la plus forte concentration n'ayant pas d'effet sur la production de jeunes par des vers de terre adultes placés dans un substrat contenant la substance d'essai à expérimenter.

Consommateurs secondaires

Le danger potentiel des substances chimiques ou des effluents vis-à-vis des consommateurs secondaires est étudié par l'intermédiaire d'un essai de toxicité aiguë vis-à-vis des poissons. Parmi les diverses espèces recommandées, deux sont couramment utilisées, le poisson zèbre *Brachydanio rerio* et la truitelle, *Oncorhynchus mykiss*. Divers protocoles expérimentaux ont été développés en fonction des caractéristiques de l'échantillon à expérimenter : essai statique (absence de renouvellement du milieu), essai semi-statique (renouvellement périodique du milieu d'essai), essai en continu (renouvellement permanent du milieu d'essai). Dans tous les cas, l'essai consiste à déterminer la concentration qui en 96 heures entraînera la mort de 50% d'une population de poissons. Un essai de toxicité prolongée vis-à-vis des poissons peut également être réalisé. Le principe de celui-ci est identique au précédent, la seule différence étant la durée de l'expérimentation qui est portée à 14 jours.

Des poissons sont également utilisés pour étudier la bioconcentration potentielle des substances chimiques en milieu aquatique. Celle-ci correspond à l'accumulation de ces substances dans des organismes vivants à partir de l'eau.

Le potentiel de bioconcentration de produits chimiques dans les organismes aquatiques est classiquement caractérisé par le facteur de bioconcentration à l'état d'équilibre. Celui-ci correspond au rapport entre la concentration dans les organismes et la concentration dans l'eau.

L'étude de la concentration des substances chimiques par les poissons peut être réalisée selon les protocoles des lignes directrices de l'OCDE pour les essais des produits chimiques.
A l'heure actuelle, 5 protocoles différents sont disponibles. Ils correspondent aux lignes directrices 305A, 305B, 305C, 305D et 305E.

Ces différents protocoles diffèrent :

- par la durée de la phase de contamination, de quelques heures à 8 semaines,
- par l'étude ou non de l'épuration,
- par le protocole de contamination mis en oeuvre, statique, semi-statique, continu.

Le choix du protocole utilisé est fonction des propriétés physico-chimiques et de la persistance de la substance d'essai dans le milieu.

Décomposeurs

Le danger potentiel des substances chimiques ou des effluents vis-à-vis des décomposeurs est évalué à l'aide de deux essais. Le premier concerne l'inhibition de la consommation d'oxygène des boues activées tandis que le second permet d'évaluer l'inhibition de croissance d'une souche pure de *Pseudomonas putida.*
L'essai d'inhibition de la consommation d'oxygène consiste à déterminer la concentration qui inhibe 50% de la consommation d'oxygène de la flore microbienne d'une boue activée. Cette dernière correspondant à un amas biologique (floc) formé, au cours du traitement d'une eau résiduaire, par la croissance de bactéries et d'autres microorganismes en présence d'oxygène dissous.
L'essai utilisant *Pseudomonas putida* consiste à évaluer la concentration inhibant de 50% la croissance d'une population monospécifique de cette bactérie.

Un cas particulier des bioessais de laboratoire est représenté par les tests plurispécifiques dont les chaînes trophiques expérimentales. Ces modèles d'étude sont plus significatifs que les

essais monospécifiques et permettent, outre l'étude des effets toxiques directs, la mise en évidence et la quantification des phénomènes de toxicité indirecte et/ou de bioamplification.

I.2. Les microcosmes

Les microécosystèmes ou microcosmes ont pour but de reproduire, à l'échelle du laboratoire, un écosystème naturel simplifié possédant un nombre réduit d'espèces caractéristiques des principaux niveaux trophiques. La complexité et la taille de ces dispositifs peuvent aller de la simple boite de Pétri ou du bécher jusqu'à la rivière de laboratoire (Figure 2).

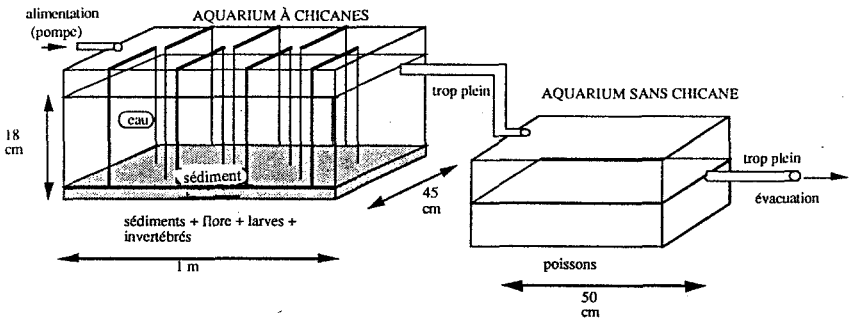


Figure 2 : Système d'aquariums vu de profil.

Ils peuvent être purement aquatiques, ou terrestres, ou mixtes (aquatique et terrestre).
A l'heure actuelle, il n'existe pas de microcosmes « standard » normalisé.
Les dispositifs les plus utilisés sont des systèmes dynamiques, les modèles statiques (sans renouvellement en continu de l'eau) ayant en général une courte durée de vie et n'étant donc représentatifs que pour des études à court terme.
Ces systèmes permettent d'étudier les processus de dégradation des substances chimiques dans l'environnement, leur devenir ou leurs effets écotoxicologiques.
Ceux-ci sont estimés de façon plus réaliste que lors des tests de toxicité car les microcosmes permettent de tenir compte des altérations possibles du potentiel toxique d'une substance, en particulier des phénomènes d'adsorption ou de biodégradation.

II. LES ETUDES *IN SITU*

Les possibilités d'étude de l'écotoxicité des substances chimiques ou des effluents vis-à-vis de la faune et de la flore *in situ* sont variées et reposent sur l'utilisation de mésocosmes, d'enceintes artificielles ou d'écosystèmes réels.

II.1. Les mésocosmes

Odum (1984) fut le premier à utiliser le terme mésocosme. Il le proposa pour définir les études qui se situaient, au niveau de la taille, entre les études de laboratoire (microcosmes) et celles de terrain (macrocosmes).

Les mésocosmes sont définis comme des écosystèmes artificiels placés dans des conditions environnementales naturelles.
En 1991, la SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) a défini les mésocosmes comme des installations dont le volume, dans le cas d'un système lentique, est supérieur à 15 m^3, ou la longueur, dans le cas d'un système lotique, supérieure à 15 m.

L'utilisation de systèmes expérimentaux de type mésocosmes, peut permettre de mettre en place des scénarios beaucoup plus réalistes du point de vue écologique que les systèmes de laboratoire, tout en permettant de mieux connaître, voire de minimiser, les variations de nombreux paramètres, ce qui facilite l'interprétation de l'éventuelle réponse de certains d'entre eux suite à l'introduction de polluants. Ces systèmes peuvent permettre d'évaluer l'impact des perturbations causées par les échantillons testés à la fois sur des paramètres structuraux et sur des paramètres fonctionnels des écosystèmes.

II.2. Les enceintes artificielles

L'utilisation d'enceintes délimitant une portion d'un milieu naturel réel a pour objectif d'accroître la représentativité des systèmes d'étude.
Selon les cas, ces enceintes artificielles isolent une ou deux phases de l'écosystème, la colonne d'eau seule dans le cas des sacs pélagiques ou la colonne d'eau et le sédiment sous-jacent dans le cas des enceintes benthiques ou luminocorals.

Les enceintes pélagiques sont constituées d'un sac surmonté d'un dispositif flottant. Ces installations courantes en milieu marin ont essentiellement été utilisées pour étudier la dynamique des peuplements planctoniques et les perturbations induites par divers polluants.
Les enceintes benthiques quant à elles sont généralement constituées par une paroi rigide enfoncée dans le sédiment. Ce type d'enceinte permet d'étudier les processus survenant à l'interface eau/sédiments.

Le choix de la taille de ces dispositifs dépend de la densité des populations encloses et de la taille des organismes étudiés. Les petites enceintes (diamètre de quelques dizaines de centimètres) sont utilisées pour les études portant sur les microorganismes et le

phytoplancton. Celles de taille moyenne (2 à 3 mètres) conviennent pour les études sur le zooplancton et les organismes benthiques dont la densité est faible. Enfin les grandes enceintes sont utilisées pour les poissons et les organismes benthiques de grande taille.

Le coût élevé et les difficultés techniques d'installation limitent beaucoup l'utilisation de ce procédé.

II.3. Les expérimentations en milieu naturel

Ce sont sans doute les expérimentations pour lesquelles la représentativité écologique serait maximale.
Les milieux utilisés pour de telles expérimentations sont très variées, depuis la simple mare jusqu'à l'utilisation de lac en passant par des rizières ou des milieux lotiques plus ou moins importants.
Mais, d'un point de vue éthique, l'utilisation de telles expérimentations ne doit pas être encouragée. En effet, même si les informations ainsi obtenues ont une grande valeur scientifique, l'introduction volontaire d'un produit chimique toxique, persistant ou non, dans l'environnement est un non sens écologique.

III. COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNIQUES

Les principaux avantages et inconvénients des différentes méthodes d'études décrites précédemment sont présentées dans le tableau 2.

<u>Tableau 2</u> : Principaux avantages et inconvénients des techniques utilisées en écotoxicologie

Technique	Avantages	Inconvénients
Tests de toxicité	- Faible coût - Standardisables - Réponses quantifiables - Simples à utiliser - Indispensables pour le screening - Répétabilité	- Difficultés pour extrapoler les réponses au niveau de l'écosystème - Problème du choix de l'espèce test - Simplification excessive des conditions environnementales
Microcosmes	- Possibilités de suivre et de modéliser le devenir, la biodégradation et la bioaccumulation des toxiques - Prise en compte des composantes abiotiques (sédiments par exemple) - En cours de standardisation	- Reproductibilité limitée - Peu utilisables pour les études à long terme
Mésocosmes	- Réalisme important - Etude simultanée du devenir des substances et de leurs effets écotoxicologiques - Possibilités de validation pour prédire les effets dans les écosystèmes naturels - Contrôle du niveau de contamination - Simplification des communautés - Validation des modèles prédictifs - Possibilités d'études à long terme - Mise en évidence des processus écologiques - En cours de standardisation	- Coût - Peu reproductible - Absence de contrôle de certains paramètres - Parfois trop grande complexité pour interpréter les résultats - Taille limitée
Enceintes artificielles	- Communautés réelles - Possibilités d'études à long terme - Possibilités de validation de modèles - Etude des processus clés dans les écosystèmes - Etudes simultanées du devenir des substances et de leurs effets écotoxicologiques	- Coût - Méconnaissance des « antécédents » écotoxicologiques - Maintenance - Pas standardisable - Effet de bord (« wall effect ») - Echelle réduite - Peu ou pas reproductible - Echanges avec le milieu extérieur possibles
Milieu naturel	- Représentativité - « Vérité »	- Problème éthique - Résultats parfois difficilement transposables à d'autres milieux - Méconnaissance des « antécédents » écotoxicologiques - Aucun contrôle possible

Du fait de l'extrême simplification des conditions expérimentales (en particulier environnementales) liée aux bioessais de laboratoire, la transposition des résultats ainsi

obtenus peut parfois conduire à un excès d'optimisme ou à l'inverse de pessimisme quant à l'impact d'une substance ou d'un effluent sur le milieu naturel (Figure 3).
Ainsi par exemple, des phénomènes de synergie entre substances rejetées et substances présentes dans le milieu, ou des phénomènes de biotransformation ou de transformation abiotique peuvent conduire à des concentrations efficaces réelles plus faibles que les concentrations seuils entraînant des effets biologiques au laboratoire (faux négatif A). A l'inverse, une réduction de la toxicité peut être observée en milieu naturel à la suite de phénomène d'adsorption sur les sédiments par exemple (faux positif B).

Les microcosmes et les mésocosmes possèdent, quant à eux, une représentativité par rapport au milieu naturel nettement supérieure car ils intègrent toutes les composantes du milieu qu'elles soient biotiques ou abiotiques, tout en permettant un contrôle des conditions de contamination et une connaissance des antécédents écotoxicologiques des milieux d'étude.

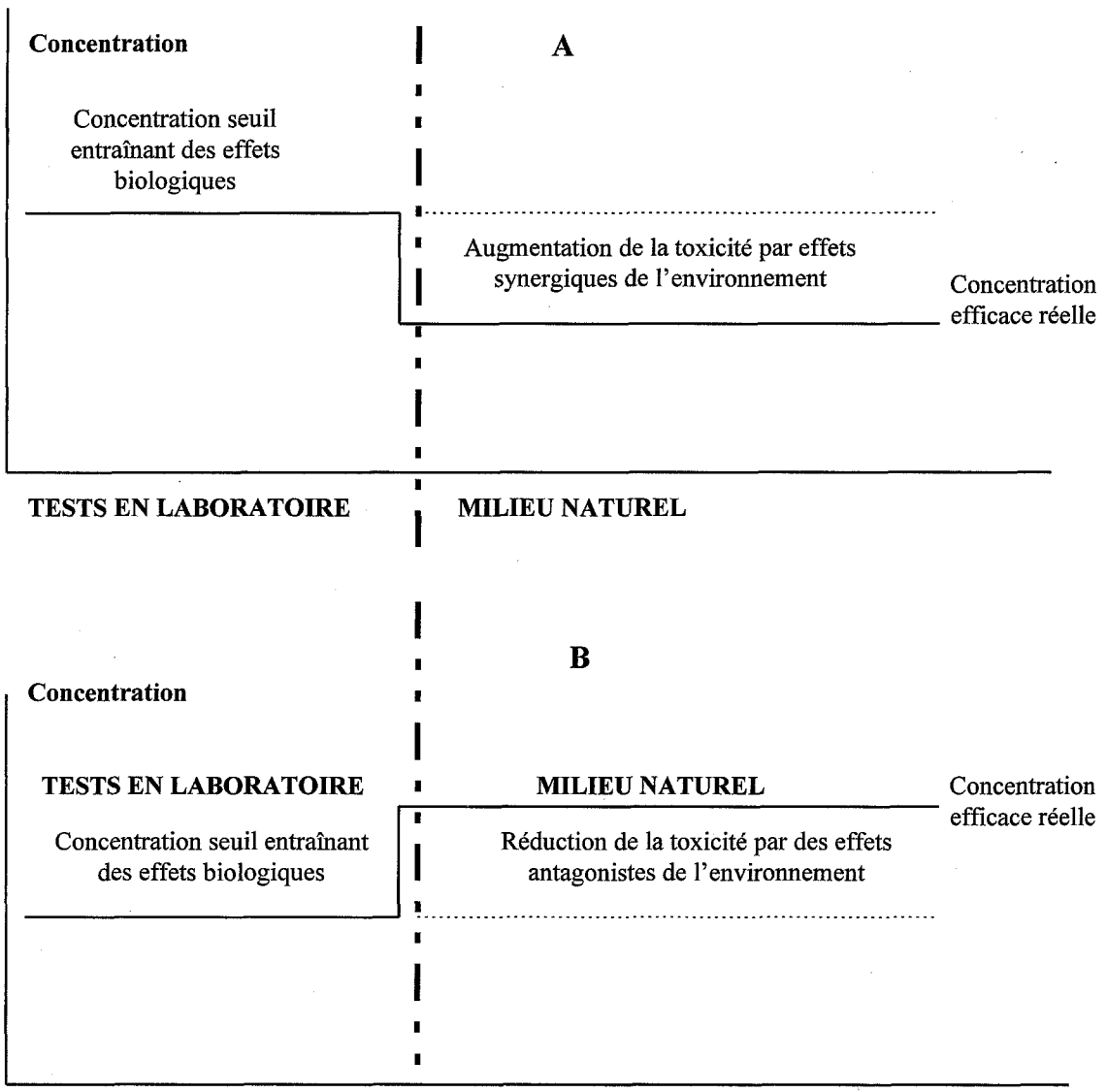
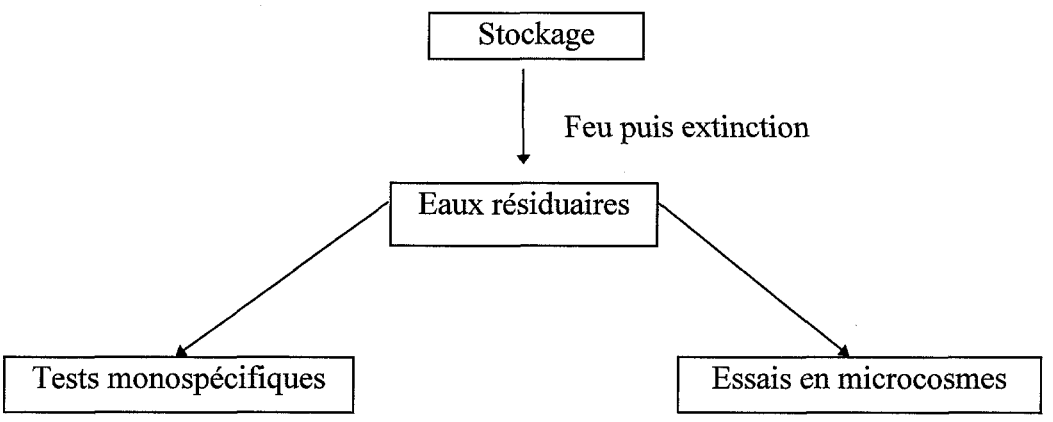


Figure 3 : Situations hypothétiques de « faux négatif » (A) et de « faux positif » (B) pouvant survenir lors de l'évaluation des risques potentiels d'une substance par des tests de laboratoire (d'après Kimerle, 1979 in Cairns, 1984).

IV. EXEMPLE D'APPLICATION SUR DES EAUX D'EXTINCTION D'INCENDIE

Afin d'évaluer l'impact potentiel des eaux d'extinction d'un incendie de stockage de produits phytosanitaires la méthodologie suivante a été retenue :



Les essais monospécifiques suivants ont été réalisés :

- Inhibition de la mobilité de *Daphnia magna.*
- Mortalité poisson, *Brachydanio rerio* (Danio) *et Onchorynchus mykiss* (truitelle).
- Inhibition de croissance des algues, *Raphidocelis subcapitata.*
- Inhibition de croissance *Lemna minor* (lentille d'eau).
- Inhibition de l'émission lumineuse de *Vibrio fisheri* (Microtox).

Les essais en microcosmes ont été réalisés en utilisant des dispositifs expérimentaux constitués de deux aquariums placés en série et alimentés en continu par de l'eau de réseau (3l/h) (Figure 2). Les aquariums amont contiennent du sédiment, des macrophytes et des macroinvertébrés, tandis que les aquariums aval ne contiennent que des poissons.

Divers paramètres biologiques ont ensuite été étudiés sur une période de 3 mois environ :

- Mortalité et croissance des truitelles, des gastéropodes (*Lymnea palustris*) et des crustacés (*Gammarus pulex*).
- Emergence de larves d'insecte (*Chironomus riparius*).

- Croissance des végétaux (*Elodea sp*, *Lemna minor* et Mousse de Java).
- Croissance du périphyton.

Les différents résultats sont présentés dans les tableaux 3, 4 et 5.

<u>Tableau 3</u> : Résultats des essais monospécifiques. Les résultats sont exprimés en mg d'eaux résiduaires / l de milieu d'essai

% effet	Algue CI 72h	Daphnie CE 24h	Truites CL 96h	Danio CL 96h	Lentilles CI 72h	Microtox CI 15min
10%	0,1	4,7	0,13	0,1	$1,2.10^{-12}$	80
50%	3,2	12,5	0,56	0,30	$1,6.10^{-4}$	62,2
100%	20	74	8	1	100	1250

Les microcosmes ont été ensuite contaminés à deux concentrations différentes, 0,3 mg/l et 1 mg/l. La contamination s'est déroulée sur un temps court (1 heure).

<u>Tableau 4</u> : Résultats des essais sur microcosmes (animaux)
1 : effet significatif par rapport au témoin
0 : absence d'effet significatif par rapport au témoin

	Truites			Lymnés		Chironomes
	Mortalité	Croissance		Mortalité	Croissance en longueur	Emergence
		Poids	Longueur			
0,3 mg/l	0	1	0	0	0	1
1 mg/l	0	1	0	1	1	1

<u>Tableau 5</u> : Résultats des essais sur microcosmes (végétaux)
1 : effet significatif par rapport au témoin
0 : absence d'effet significatif par rapport au témoin

	Périphyton		**Elodée (inhibition)**	**Lentilles d'eau (stimulation)**	**Mousse de Java (inhibition)**
	Biomasse	Production			
0,3 mg/l	0	0	0	1	0
1 mg/l	1	0	1	0	0

Dans le cas présent, il apparaît que les essais monospécifiques de laboratoire conduisent, au moins pour les lentilles d'eau et les truitelles, à des concentrations seuils entraînant un effet biologique plus faible que les concentrations efficaces observées lors des essais en microcosme.
Les tests monospécifiques, du fait de leur rapidité et de leur faible coût sont des modèles irremplaçables pour évaluer en première approche l'écotoxicité d'une substance chimique ou d'un effluent. En revanche, la caractérisation fine de l'écotoxicité réelle de ces produits nécessite la réalisation d'études plus longues dans des conditions expérimentales plus proches de la réalité et prenant en compte des critères d'effets plus sensibles tel que la croissance ou la reproduction.

En conclusion, il apparaît bien que les différentes méthodes d'étude de l'écotoxicité fournissent des informations très différentes, de valeurs écologiques variables, ces différentes approches sont donc plus complémentaires que concurrentes.