

# Développement d'un système d'alerte précoce basé sur des bioessais pour la gestion des risques liés aux sites d'enfouissement au Japon

Shino Mohri, *Graduate School of Natural Science and Technology (Okayama University)*

Yoshiro Ono, *Department of Environmental and Civil Engineering (Okayama University)*

Masato Yamada and Yuzo Inoue, *Research Center for Material Cycles and Waste Management National Institute for Environmental Studies*  
ono@cc.okayama-u.ac.jp

*Avertissement: La traduction de cet article rédigé initialement en anglais a été effectuée par la rédaction. Les tableaux et les remerciements ont été maintenus en anglais, sous leur forme originale*

Au Japon, l'opinion publique est devenue très méfiante vis-à-vis des installations de gestion et de traitement des déchets, en particulier les centres de stockage de déchets ultimes. Le projet présenté ici vise à développer une nouvelle méthodologie, reposant sur des bioessais de toxicité et qui permettrait de surveiller les risques d'impacts liés au fonctionnement de ces sites, et principalement ceux liés aux lixiviats. Une batterie de bioessais a été proposée et testée avec une méthode de scores qui permet de caractériser les effets toxicologiques des lixiviats bruts et traités. Les résultats obtenus montrent que les effets toxiques révélés ne sont pas systématiquement corrélés à la salinité et au contenu en métaux lourds des lixiviats. En complément des analyses chimiques, une méthodologie basée sur une batterie de bioessais peut alors être proposée comme outil fiable et économique de gestion des centres de stockage de déchets ultimes.

**The objections of residents, who suspect that solid waste treatment and disposal facilities emit hazardous substances into surrounding areas, make it difficult to construct and operate these facilities all over Japan. We discuss herein some issues and perspectives regarding the application of toxicity tests to solid waste management, especially to the monitoring of leachate from waste disposal sites. We investigated various toxic potencies and attempted simple scoring of the results for risk management and risk communication to citizens. The data of control experiments and chemical analysis showed that the toxicities observed in leachates weren't derived from salinity and heavy metals alone. Our scoring results demonstrate the feasibility of a biotest battery for practical use.**

## INTRODUCTION

Au Japon, l'opinion publique est devenue de plus en plus exigeante vis-à-vis des projets d'ouverture et des conditions de gestion des sites d'enfouissement de déchets. Les débats publics expriment les inquiétudes concernant les risques écologiques et sanitaires liés à ces projets. Généralement, les méthodes de

gestion des risques sont principalement basées sur l'évaluation de la dangerosité des déchets admis sur le site d'enfouissement, sur le contrôle des effluents liquides et gazeux générés pendant la durée d'exploitation, et sur une période de surveillance nécessaire après fermeture du site. Les lixiviats, qui contiennent une large part de la charge toxique et écotoxique, font l'objet d'une surveillance particulière et subissent des traitements spécifiques. Les réglementations en vigueur exigent un grand nombre d'analyses chimiques, mais ne concernent en réalité qu'une faible partie des substances toxiques susceptibles d'être présentes dans les lixiviats. Cette approche ne permet donc pas d'obtenir une évaluation du risque global, malgré le coût important lié à la mise en œuvre d'un dispositif expérimental lourd et complexe. Les bioessais permettent d'évaluer l'écotoxicité d'un effluent aqueux en mesurant les effets toxiques sur des organismes vivants. Ils peuvent, mieux que des analyses chimiques, rendre compte de la réalité d'effets cumulatifs ou synergiques, y compris ceux qui résulteraient de substances indétectables car à l'état de traces. Les bioessais ne sont cependant pas requis par les réglementations environnementales au Japon, et aucun protocole n'est actuellement standardisé. L'objectif de l'étude présentée est de démontrer la faisabilité de la mise en œuvre d'une batterie de bioessais qui permettrait de contrôler efficacement la qualité écotoxique des lixiviats et de servir d'outil pour la gestion des centres d'enfouissement. Les résultats obtenus doivent pouvoir permettre de concevoir une telle batterie d'essais, de développer une grille d'interprétation des résultats obtenus, de démontrer la pertinence et la fiabilité de la méthodologie ainsi mise au point, avant de la soumettre au jugement des responsables de la gestion des sites d'enfouissement et aux autorités de tutelle.

Cet article présente un projet d'une durée de trois ans (2001-2003) : « An Early Warning System for Chemical Risk Management of Landfill sites with Batteries of Biotests in Japan ». À l'issue du projet, les outils et méthodologies développés doivent permettre une amélioration du contrôle du risque d'impact écotoxique lié au fonctionnement des sites d'enfouissement.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Echantillonnage

Des lixiviats bruts et des effluents traités ont été collectés. Les échantillons ont été prélevés dans des réservoirs de rétention des lixiviats et en sortie des installations de traitement des lixiviats dans six centres d'enfouissement de déchets municipaux et/ou industriels, tous munis de systèmes d'étanchéité, de captage et de traitement des lixiviats. Les échantillons ont été conservés au laboratoire à une température de 4 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

### Bioessais et analyses chimiques

Diverses évaluations de la toxicité ont été réalisées : toxicité aiguë, génotoxicité, biomarqueurs, cytotoxicité, pour les lixiviats bruts et traités (tableau 1).

Les échantillons ont été filtrés et le pH a été ajusté à une valeur comprise entre 7 et 8. Des analyses chimiques ont aussi été conduites sur les mêmes échantillons : paramètres usuels de la qualité de l'eau, contenus en métaux lourds et quelques composés organiques. La combinaison des résultats des bioessais et des analyses chimiques a permis d'obtenir une information utile pour évaluer l'impact potentiel des lixiviats et effluents sur la qualité des eaux au voisinage des centres d'enfouissement.

### Méthode des scores

Pour établir une batterie optimisée de bioessais, nous avons procédé à un classement hiérarchisé des résultats de ceux-ci. Les résultats des essais expérimentaux doivent conduire à la formulation d'un score qui permette un classement selon une grille d'évaluation prédéfinie. Nous proposons une grille comportant deux critères et trois niveaux pour chacun d'entre eux (tableau 2).

Le score de niveau 1 signifie que l'échantillon n'a pas d'effet toxique significatif : pour les critères de génotoxicité ou l'induction de biomarqueurs, ce score signifie que l'échantillon n'a pas d'effet significatif au risque  $p < 0,05$ , alors que pour la cytotoxicité, il signifie que l'échantillon non dilué ne permet pas d'atteindre la CE50.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les scores de toxicité obtenus à l'issue des bioessais réalisés sur 14 échantillons sont présentés dans le tableau 3. Le niveau 3 est atteint pour quelques bioessais pour tous les lixiviats bruts, alors que les concentrations en éléments toxiques (en particulier les métaux lourds), déterminées par l'analyse chimique, ne sont pas les plus élevées. La méthode basée sur les bioessais permet dans ce cas d'obtenir une information sur

Test name	Test organisms or test details	REFERENCE
Hep G2: survival NB-1: survival	Human hepatocellular carcinoma cell lines Human neuroblastoma cell lines	Scheers et al. 2001 Ekwall et al. 1998
Bacteria:umu -test(-S9) Bacteria:umu -test(+S9) Goldfish: Comet Mussel: Comet Goldfish:MN (blood) Goldfish: MN(gill)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002  Alkaline single cell gel (comet) assay  micronucleus test	Oda et al. 1985  Pandurangi et al. 1995  Tanisho et al. 1998
Mussel: phagocytosis Medaka: EROD Medaka:Vtg	<i>Mytilus</i> Cytochrome P450 1A(CYP1A)induction Vitellogenin (Vtg) induction	Wan et al. 1993 Whyte et al. 2000 Sumpter et al. 1995
Mussel: lethality FETAX Medaka: lethality Thamno: lethality	<i>Mytilus</i> Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus( FETAX) OECD TG203 Thamnotoxkit F ( <i>Thamnocephalus platyurus</i> )	/ Annual Book of ASTM Standards / Persoone et al. 1998
Algae: cell growth Algae: cell growth Algaltox: cell growth Duckweed: frond growth Lettuce: root length Lettuce: germination	<i>Selenastrum capricornutum</i> (NIES35)OECD TG201 TOXKIT Algal beads ( <i>Selenastrum capricornutum</i> ) Lemna minor 1769 OECD TG221 <i>Lactuca sativa</i> <i>Lactuca sativa</i>	/ / OECD 2000 Wong et al. 1987 Wong et al. 1990
ToxAlert: luminescence	ToxAlert 100 system ( <i>Vibrio fischeri</i> NRRL B-11177)	/

Table 1 : Bioassays used in the project

Genotoxicity , Biomarker	Score
0.05 < p	1
0.01 < p < 0.05	2
p < 0.01	3

Cytotoxicity , Ecotoxicity	Score
EC50,LC50 > 100%	1
100% > EC50,LC50 > 10%	2
10% > EC50,LC50	3

Table 2 : Scoring designs of test results for a biotest battery  
(EC50 : Median effective concentration ; LC50 : Median lethal concentration)

Endpoint	Test name \ Sample name	A-1	A-2	C-1	C-2	D-1	D-2	D-3	D-4	E-1	E-2	F-1	F-2	G-1	G-2
Cytotoxicity	Hep G2: survival	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
	NB-1: survival	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2
Genotoxicity	Bacteria:umu-test(-S9)	2	1	3	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
	Bacteria:umu-test(+S9)	3	1	3	2	2	2	3	2	2	1	3	2	2	2
	Goldfish: Comet	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2	3	3	2	2
	Mytilus: Comet	2	1	1	1	3	2	-	-	3	2	1	1	3	3
	Goldfish: MN: blood	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Goldfish: MN: gill	2	2	2	2	3	2	3	3	2	2	3	2	2	2
Biomaker	Mytilus: phagocytosis	2	2	1	2	3	2	-	-	1	2	3	2	1	3
	Medaka: EROD	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	1	2	2
	Medaka: Vtg	2	2	2	3	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2
Acute lethality	Mytilus: lethality	1	1	2	1	3	1	-	-	1	1	2	1	1	1
	FETAX	4	1	3	2	3	3	3	3	2	3	3	2	2	2
	Medaka: lethality	3	1	3	1	3	2	3	3	1	1	3	1	1	1
	Thamno: lethality	2	2	3	2	2	1	1	2	2	1	3	1	2	2
Growth inhibition	Algae: cell growth	2	2	3	2	3	2	2	3	1	1	2	2	1	1
	Algae: cell growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1
	Algaltox: cell growth	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	3	1	3	3
	Duckweed: frond growth	2	2	3	1	3	2	2	3	2	1	2	2	2	2
	Lettuce: root length	1	1	2	2	2	2	2	3	1	2	2	2	2	2
	Lettuce: germination	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
Inhibition	ToxAlert: luminescence	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1	1	1

Table 3 : Scoring results of toxicity tests from leachate samples  
 A-G : landfill name, -1(-3,-4) :Raw leachate, -2 :Treated leachate, - : Not measured

la toxicité des lixiviats qui ne peut pas être obtenue sur la seule base des analyses chimiques. Cependant, les seuls résultats des bioessais ne peuvent pas permettre d'identifier la cause chimique de la toxicité et de proposer un traitement curatif adapté. Une méthodologie combinant l'approche chimique et l'approche écotoxicologique doit donc être développée pour une meilleure gestion des sites.

## CONCLUSIONS

Des bioessais utilisés en tant que tests de toxicité sont utilisés couramment dans les industries chimiques et pharmaceutiques pour évaluer le risque sanitaire, dans le cadre des réglementations en vigueur. De nombreux tests permettent de caractériser les risques aigus, chroniques, carcinogènes, mutagènes, etc. Dans le domaine de l'environnement, ces tests ne sont préconisés au Japon que lors de risques survenant après des crises ou des dispersions polluantes accidentelles. Les résultats de notre étude permettent de proposer l'utilisation de tests de toxicité dans une perspective d'une meilleure gestion environnementale des systèmes d'élimination des déchets industriels et urbains. Le développement de techniques et de méthodologies reste nécessaire pour disposer d'un système d'alerte précoce basé sur des bioessais, et fait l'objet de travaux menés par le National Institute for Environmental Studies ([www.nies.go.jp](http://www.nies.go.jp)), en collaboration avec de nombreux laboratoires universitaires et instituts de recherche. Les discussions et échanges interdisciplinaires sont nécessaires dans un domaine où la responsabilité des scientifiques est fortement engagée vis-à-vis d'une demande sociale exigeante à juste titre.

## Remerciements

This study was supported by a grant from the Ministry of Environment, Japan. The authors would like to thank the experimental collaboration of A. Yasuhara (chemical analysis), Y. Inoue (priority list) and H. Takigami (FETAX) in NIES, A. Sakoda and Y. Sakai (TIE/TRE) in the Institute of Industrial Science, University of Tokyo, Japan, N. Kinase (goldfish) in the Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, T. Kusui (Mussel) in the College of Technology, Toyama Prefectural University, M. Kunimoto (micro biotest) in the School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, H. Okamura (ecotoxicity) in the Faculty of Maritime Sciences, Kobe University, and R. Shoji (Leaching test), Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo National College of Technology, and also the managers and researchers of the waste management division at the sampling sites.

## Références bibliographiques

- Annual Book of ASTM Standards (1993), Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus* (FETAX), E-1439-91.
- Cherry D.S., Currie R.J., Soucek D.J., Latimer H.A. and Trent G.C., An integrative assessment of a watershed impacted by abandoned mined land discharges, *Environmental Pollution*, Volume 111, Issue 3 (2001), 377-388.
- Edwards F.G., Egemen E., Brennan R. and Nirmalakhandan N., Ranking of toxics release inventory chemicals using a level III fugacity model and toxicity, *Water Science and Technology*, Volume 39, Issues 10-11 (1999), 83-90.
- Ekwall B., Kunimoto M., MEIC evaluation of acute systemic toxicity : Part VI. The prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 *in vitro* methods, *ATLA*, 26 (1998), 617-658.
- Höfer T. and Steinhäuser K. G., Use of Health Hazard Criteria for Estimating the Hazard Potential of Chemicals to Water in Case of a Spill, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 31, Issue 1 (2000), 1-12.
- Kamranut W. and Pascoe D., A comparison of methods for measuring acute toxicity to *Hydravulgaris*, *Chemosphere*, Volume 41, Issue 10 (2000), 1543-1548.
- Ming Shi and Elaine M. Faustman, Development and characterization of a morphological scoring system for medaka (*Oryzias latipes*) embryo culture, *Aquatic Toxicology*, Volume 15, Issue 2 (1989), 127-140.
- Mitchell R.R., Sumner C.L., Blonde S.A., Bush D.M., Hurlburt G.K., Snyder E.M. and Giesy J.P., SCRAM : A Scoring and Ranking System for Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Substances for the North American Great Lakes — Resulting Chemical Scores and Rankings, *Human and Ecological Risk Assessment*, Volume 8, Issue 3 (2002), 537-557.
- Noever D.A., Matsos H.C., Cronise R.J., Looger L.L. and Relwani R.A., Computerized *in vitro* test for chemical toxicity based on *Tetrahymena* swimming patterns *Chemosphere*, Volume 29, Issue 6 (1994), 1373-1384.
- Oda Y.S., Nakamura I., Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research*, 147 (1985), 219-229.
- OECD *Lemna* sp., Growth inhibition test. OECD TG 221 (2000).
- Pandurangi R., Petras M., Ralph S. and Vrzoč M., Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp, *Environ. Mol. Mutagen*, 26 (1995), 345-356.
- Persoon G., Development and validation of Toxkit microbioassays with invertebrates, in particular crustaceans. Chapter 30, *Microscale Testing in Aquatic Toxicology*, Eds by Wells, P.G., Lee, K. and Blaise, C., CRC Press (1998) 437-449.
- Persoon G., Marsalek B., Blinova I., Torokne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nalecs-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbioassays for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology* Volume 18 (2003) 395-402
- Reinhardt C.A., Pelli D.A. and Zbinden G. Interpretation of cell toxicity data for the estimation of potential irritation. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 23, Issue 2 (1985) 247-252
- Scheers EM, Ekwall B, Dierickx P.J., *In vitro* long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on Hep G2 cells and comparison with acute human toxicity data, *Toxicol In Vitro*. 15(2) (2001) 153-61.
- Sumpter J.P., Jobling S., Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environmental Health Perspectives* 103(1995)173-178.
- Tanisho, T., Yagi, K., Iwasaki, K., Shimoi, N., Kinae, M., Hayashi, T. and Sofuni Monitoring of coastal water contaminated with mutagens and/or carcinogens using micronucleus test in fish (in Japanese) *Environ. Mutagen Res.*, 20(1998), 1-9.
- Van Dolah R.F., Hyland J.L., Holland A.F., Rosen J.S. and Snoots T.R. A benthic index of biological integrity for assessing habitat quality in estuaries of the southeastern USA *Marine Environmental Research*, Volume 48, Issues 4-5 (1999) 269-283
- Vorhees D.J., Kane Driscoll S.B., von Stackelberg K., Cura J.J. and Bridges T.S. An Evaluation of Sources of Uncertainty in a Dredged Material Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*, Volume 8, Issue 2 (2002) 369-389
- Wan, C. P., Park C.S., and Lau B.H.S., A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay *Journal of Immunological Methods*. 162(1993)1-7
- Weiß M., Kördel W., Kuhn-Clausen D., Lange A.W. and Klein W. Priority setting of existing chemicals. *Chemosphere*, Volume 17, Issue 8 (1988) 1419-1443
- Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J., Tillitt D.E., Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure, *Critical Rev. in Toxicol.* 30(4)(2000)347-570.
- Wong W., Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 6(1987) 409-414.
- Wong W., Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. *Water, Air, Soil Pollut.* 52(1990) 369-376.
- Woo Y.T., Lai D., McLain J.L., Manibusan M.K., Dellarco V. Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products. *Environmental Health Perspectives*. 110 Suppl 1 (2002) 75-87