

QUEL TEST DE TOXICITÉ CHRONIQUE SUR INVERTÉBRÉS FAUT-IL CHOISIR POUR L'ÉVALUATION DE LA DANGÉROSITÉ DES DÉCHETS ?

Jean-François Férard* et Benoît Ferrari**

Centre des sciences de l'environnement, Metz

Dans cet article, les tests *Ceriodaphnia dubia* 7 jours et *Daphnia magna* 21 jours, utilisables pour l'évaluation de l'écotoxicité des déchets, sont présentés. Les principales différences sont discutées et commentées, et montrent que le test *C. dubia* 7 jours est préférable au test *D. magna* 21 jours. Des résultats obtenus sur des lixiviats de déchets viennent confirmer ce fait.

In this article, the 7-d *Ceriodaphnia dubia* and 21-d *Daphnia magna* tests, which can be used for the ecotoxicology assessment of wastes, are presented. The main differences between them are discussed and commented. They show that it would be preferable to use the 7-d *C. dubia* test than the 21-d *D. magna* test for the ecotoxicology assessment of wastes. Some results are presented and confirmed this statement.

INTRODUCTION

Différentes méthodes d'écotoxicité chronique sur invertébrés sont susceptibles d'être mises en oeuvre pour évaluer, au laboratoire, la dangerosité potentielle des lixiviats (ou percolats) provenant de matrices solides complexes telles que les déchets. Parmi les invertébrés, deux espèces de microcrustacés, représentatifs du zooplancton filtreur, appartenant aux genres *Daphnia* et *Ceriodaphnia* sont les supports biologiques de deux tests, le test *Daphnia magna* 21 jours et le test *Ceriodaphnia dubia* 7 jours, déjà normalisés par diverses instances (Calow, 1993). Très schématiquement, ces deux tests obéissent au même principe, à savoir que de jeunes animaux (d'âge inférieur à 24 heures), provenant d'un élevage (réalisé dans des conditions définies), sont exposés en conditions semi-statiques (i.e. avec renouvellement périodique des milieux) à diverses concentrations de milieu testé : au fur et à mesure du déroulement de l'essai, les jeunes organismes placés en expérience au début de l'essai atteignent eux-mêmes la maturité sexuelle et se reproduisent donnant ainsi lieu à une série de pontes successives (cf. figure 1). Ces deux méthodes d'essai ne présentent donc pas de difficultés particulières, notamment pour ce qui est de l'évaluation des effets qui est simplement basée sur des dénom-

brements (individus morts ou vivants, nombres de jeunes). Compte tenu que la procédure réglementaire en cours de discussion au niveau du ministère de l'Environnement laisse le libre choix entre les deux méthodologies, il est important que l'ensemble des parties en présence (scientifiques, gestionnaires de l'environnement et décideurs) ait une parfaite connaissance des conditions de réalisation de ces deux tests d'écotoxicité, de leurs avantages et inconvénients, afin de mieux les guider dans le choix d'une procédure, ce qui constitue l'objectif de cet article.

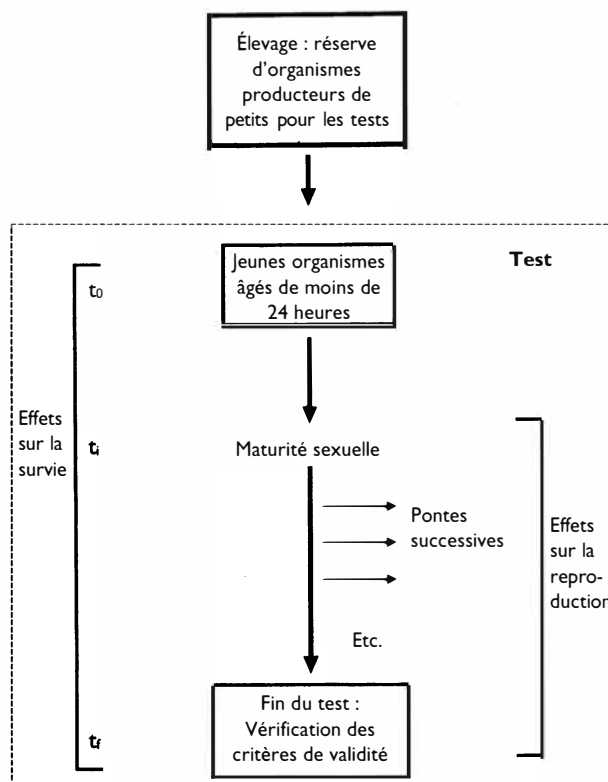


Figure 1 : Schéma synoptique d'un test sur microcrustacé d'eau douce

Le test *Daphnia magna* 21 jours

D'un point de vue historique, la daphnie a été utilisée depuis beaucoup plus longtemps que la cériodaphnie. Une des pre-

mières utilisations est, à notre connaissance, le fait d'un hollandais (Buijendijk, 1918). Les raisons du choix du genre *Daphnia* ont été résumées par Baudo (1987).

La première méthodologie relative à un test daphnie chronique a été publiée en 1972 (Biesinger et Christensen, 1972). Depuis lors, et malgré le fait qu'un certain nombre de procédures normalisées ait détaillé une procédure d'essai (e.g. OCDE, 1984), il n'y eut guère de données précises sur les conditions d'élevage qui précédaient le test (cf. figure 1) et sur la quantité de nourriture à fournir durant l'essai.

Divers auteurs ont signalé les difficultés liées à l'entretien des élevages ou à la réalisation des essais (Blok, 1981 ; Nebeker et al., 1982). Pour pallier ces aléas, différents additifs, non chimiquement définis, ont été utilisés par le passé, avant qu'Elendt et Bias (1990) ne proposent un milieu de culture suffisamment complet pour assurer une survie et une reproduction suffisante dans la plupart des laboratoires. Par ailleurs, l'utilisation d'une nourriture imparfaitement définie (qualitativement et quantitativement) au cours des élevages et des tests représente un des principaux facteurs de variabilité (Calow, 1993).

Le test *Ceriodaphnia dubia* 7 jours

Le test *C. dubia* a vu le jour aux États-Unis où l'agence pour la protection de l'environnement (EPA) a développé des tests de toxicité à court terme (≤ 8 jours) pour évaluer la toxicité chronique des matrices complexes. Ces tests de toxicité à court terme ont été proposés afin de remplacer les tests de toxicité chronique traditionnels. En effet, ces derniers, bien qu'utilisés en routine pour l'évaluation des substances chimiques (dans le cadre des dossiers d'homologation), avaient été jugés inadaptés pour l'évaluation de la toxicité chronique des matrices complexes essentiellement pour des raisons de durée et de coût du test. La première publication décrivant l'utilisation de *C. dubia* dans un test de toxicité chronique date de 1984 (Mount et Norberg, 1984). En 1990, les agences de l'eau françaises ont voulu développer des tests pour évaluer la toxicité chronique des effluents. Parmi l'ensemble des tests retenus, Garric et al. (1992) ont proposé en particulier le test *C. dubia* 7 jours. Par la suite, ce test a fait l'objet d'une enquête inter-comparaison réalisée en 1992-1993 à la demande du comité inter-agences de l'Eau et pilotée par le cabinet Beture-Setame. Depuis, quelques laboratoires en France (Cemagref, CSE, Institut Pasteur Lille, IRH, LSE...) continuent à travailler sur ce test, avec ou sans modification de la méthodologie dite du rapport inter-agences.

UTILISATION COMPARÉE DE LA DAPHNIE ET DE LA CÉRIODAPHNIE POUR L'ÉVALUATION DE LA DANGEROUSITÉ DES DÉCHETS

Le tableau I résume les principales conditions expérimentales de ces deux tests dans l'état actuel de la normalisation. Les parties de ce tableau qui apparaissent en italique montrent

les différences entre ces deux tests. Seules certaines de ces différences qui nous apparaissent spécialement importantes au regard du problème posé seront discutées ci-dessous.

– La périodicité journalière des renouvellements des milieux du test cériodaphnie constitue un indiscutable avantage car elle diminue les risques de transformation des diverses substances présentes dans les milieux complexes entre 2 changements. En effet, l'ajout de nourriture algale consomme le CO_2 dissous (du fait de la photosynthèse), ce qui provoque une augmentation du pH dans les milieux (dont l'importance varie en fonction de la capacité tampon différente d'un milieu à l'autre, cf. § Milieu). Ceci étant, plus l'intervalle entre deux changements va se prolonger, plus la probabilité de voir apparaître ou disparaître des espèces chimiques sera importante du fait de cette augmentation de pH, nonobstant les effets propres de l'augmentation du pH sur la survie et la reproduction des microcrustacés. Or le protocole EPA (1994) prévoit un changement tous les jours pour le test cériodaphnie, ce qui diminue d'autant les deux phénomènes mentionnés ci-dessus.

Il est donc important de choisir la méthode d'essai qui diminue le plus possible les effets des variations de pH, qu'il s'agisse d'effets sur la composition chimique du milieu ou qu'il s'agisse d'effets sur les daphnies.

– La durée plus courte du test cériodaphnie est aussi un avantage car les lixiviats (ou percolats) de déchets sont susceptibles d'évoluer dans le temps au cours de leur conservation. Nous avons pu montrer au cours d'un travail réalisé récemment pour le compte de l'Ademe dans le cadre d'une étude sur l'écocompatibilité des déchets que deux percolats, provenant l'un de scories de seconde fusion au plomb et l'autre de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) se caractérisaient par des cinétiques d'écotoxicité différentes. Les figures 2 et 3 rassemblent les résultats obtenus avec le test Microtox (Afnor, 1991) pour des percolats de MIOM et de scories conservés à 4°C, à l'obscurité dans des flacons en polyéthylène. Par exemple, l'écotoxicité des percolats de MIOM diminue d'un facteur égal à 13,7 entre le premier jour et le douzième jour de conservation. Au contraire, l'écotoxicité des percolats de scories augmente d'un facteur égal à 3,8 entre le premier et le quatrième jour de conservation.

En l'absence d'autres données écotoxicologiques (car il n'y a pas à notre connaissance d'autres résultats d'écotoxicité

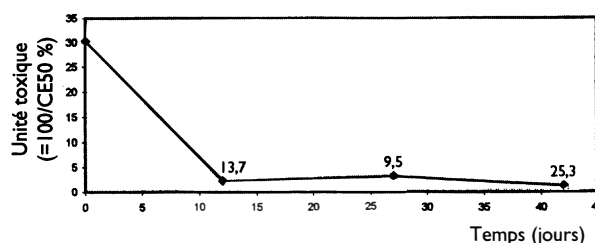


Figure 2 : Évolution de la toxicité des MIOM en fonction du temps. % de variation par rapport à JO - Test Microtox

Tableau 1 : Résumé des conditions expérimentales normalisées du test *Daphnia magna* 21 jours et du test *Ceriodaphnia dubia* 7 jours

Paramètre	Méthodologie OCDE (1996)	Méthodologie EPA (1994)
Espèce	<i>Daphnia magna</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
Critère de toxicité	NOEC/LOEC ou CEx	NOEC/LOEC ou CEx
Type de test	Semi-statique	Semi-statique
Renouvellement des milieux	Au moins 3 fois par semaine	Tous les jours (voir texte)
Durée du test	21 jours	7 jours (voir texte)
Élevage préalable	Conditions non précisées	Conditions précisées (voir texte)
Type de nourriture	Algue	Algue(s) + Levure + Cérophyll + Nourriture pour poisson (voir texte)
Apport nutritif	0,1 à 0,2 mg de carbone (COT)/Daphnie/Jour	0,1 ml de mélange (Levure + Cérophyll + Nourriture pour poisson) + 0,1 ml de concentré d'algue représentant 3 à 3,5.10 ⁶ cellules/jour et par ceriodaphnie (voir texte)
Age des organismes au début du test	< à 24 heures	8 heures - 24 heures
Lumière	≤ 1200 Lux	300 à 500 Lux
Milieu d'essai	Milieu M4 ou M7, Milieu ISO ou Milieu ASTM	Eau reconstituée de dureté moyenne ou Eau minérale diluée à 20 % ou Eau naturelle
Volume	50-100ml	15 ml
Température	20°C ± 2°C	25°C ± 1°C
Photopériode	16 heures de lumière/8 heures d'obscurité	16 heures de lumière/8 heures d'obscurité
Organismes/Concentration	10	10
Nombre de réplicats	10	10
Contrôle de la mortalité dans les témoins	≤ 20 % chez les adultes	≤ 20 % chez les adultes
Contrôle de la reproduction dans les témoins	≥ 60 petits par mère	3 pontes dans au moins 60 % des mères survivantes, 15 petits pondus par mère survivante

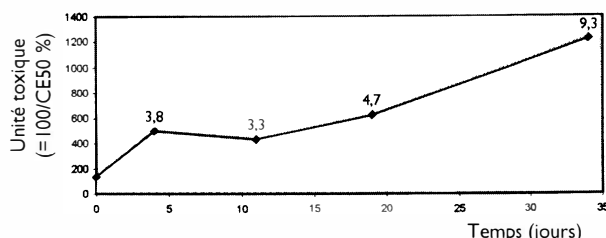


Figure 3 : Évolution de la toxicité des scories en fonction du temps. % de variation par rapport à JO - Test Microtox

dans la littérature relatifs à la conservation des lixiviats ou percolats de déchets), il est nécessaire de postuler une possible variation d'écotoxicité en fonction du temps de conservation, ce qui avantagerait de facto l'essai le plus court.

– Pour *D. magna*, il est maintenant prouvé que la nutrition des daphnies-mères dans les élevages affecte non seulement la taille, mais surtout la sensibilité, des jeunes daphnies auxquelles elles donnent naissance et qui servent pour le test (Enserink et al., 1990 ; Cox et al., 1991). Or les conditions des élevages qui précèdent le test sont peu définies pour le test daphnie, alors que pour le test cériodaphnie il est nécessaire de réaliser un « élevage intermédiaire » dans des conditions très proches du test proprement dit (en terme de milieu et de nourriture). Cet élevage intermédiaire permet d'ailleurs de sélectionner pour le test des jeunes cériodaphnies à partir de cériodaphnies-mères qui ont elles-mêmes pondus un nombre suffisant de jeunes cériodaphnies (au moins 8 selon la norme EPA). Cette pratique est à

l'évidence un indicateur de la qualité des élevages intermédiaires et de la capacité à satisfaire ultérieurement les conditions de validité de l'essai (cf. tableau 1).

– Le type et la quantité de nourriture ont évidemment un effet sur le nombre de petits retrouvés dans les cultures témoins de daphnies ou de cériodaphnies (Cotelle et Ferard, 1996 ; Ferrari et Ferard, 1996). En outre, il est préférable que la préparation de cette nourriture soit le moins possible sujette à interprétation de la part des expérimentateurs. En ce sens, le test *C. dubia* est caractérisé par une ration alimentaire bien définie au niveau des essais (ou des élevages).
– Les milieux d'essais susceptibles d'être utilisés sont relativement variés. Mis à part, leur rôle tampon vis-à-vis de l'augmentation du pH dans les récipients, les milieux utilisés n'ont pas tous les mêmes capacités à complexer des substances minérales.

En particulier, certains milieux recommandés pour le test *D. magna* contiennent de l'EDTA (M4 ou M7), ce qui a pour effet de sous-estimer la toxicité des matrices minérales, ce qui est souvent le cas des lixiviats (ou percolats) de déchets.

Tableau 2 : Résultats de l'évaluation de la toxicité de 2 lixiviats issus d'un même MIOM à partir du test *Ceriodaphnia dubia* 7 jours et du test *Daphnia magna* 21 jours

Test	CI50	Moyenne des CI50	CV %
Cériodaphnie 1	12,2 %	9,75 %	35,5 %
Cériodaphnie 2	7,3 %		
Daphnie	Pas de toxicité observée		

L'État de l'art de l'évaluation de l'écotoxicité des déchets que nous avons réalisé, en 1995, dans le cadre du programme de recherche sur l'écocompatibilité des déchets a montré que la daphnie avait surtout été utilisée pour une évaluation de la toxicité aiguë. Le test chronique (sur 28 jours) avec *D. magna* a été mis en œuvre par Millemann et Parkhurst (1980) puis par Lambolez et al. (1994), mais aucune publication ne mentionne à ce jour la mise en œuvre du test *C. dubia* 7 jours, et encore moins la comparaison des deux méthodes d'essai sur un même échantillon.

Le tableau 2 résume les résultats que nous avons obtenu sur un lixiviat de MIOM (aimablement fourni par Polden) et réalisé selon la norme Afnor X-31210 (1992) avec 1 seule lixiviation de 24 heures. Les essais sur cériodaphnies et sur daphnies ont été réalisés dans les conditions définies par Ferrari et Férard (1996). Aucune écotoxicité n'a été observée avec le test *D. magna* 21 jours, tandis qu'une nette écotoxicité a été observée avec le test *C. dubia* : la concentration moyenne qui inhibe 50 % de la reproduction ($n = 2$), calculée à l'aide du logiciel ICP (aimablement fourni par l'agence de protection de l'environnement, USA), était de 9,7 % avec un coefficient de variation de 35 %.

CONCLUSION

Ces résultats démontrent, il est vrai sur un seul échantillon, que le test *C. dubia* 7 jours est plus sensible que le test *D. magna* 21 jours. Il serait souhaitable de pouvoir réaliser la comparaison des deux méthodes d'essai sur davantage de déchets. En outre, beaucoup de questions restent encore sans réponse : comparaison du pouvoir tampon de différents milieux ; effets des variations de pH sur la spéciation des substances et la physiologie des cladocères testés ; effets des conditions de stockage.

Malgré son intérêt, l'essai *Ceriodaphnia dubia* 7 jours est encore peu pratiqué en France, ce qui peut s'expliquer par les contraintes techniques qu'il impose par rapport au test daphnie : petitesse des organismes, nécessité de réaliser un élevage intermédiaire, changement tous les jours, plus grande sensibilité des élevages. *A contrario*, ce dernier inconvénient peut, en fait, être un avantage car il évitera de tester des animaux en mauvaises conditions physiologiques, comme cela est souvent le cas avec la daphnie.

En résumé, si le test daphnie 21 jours s'applique bien à l'évaluation des substances pures (notification des nouvelles substances), il faut lui préférer le test cériodaphnie 7 jours dès lors qu'il s'agit de tester des matrices complexes susceptibles d'évoluer en fonction du temps : c'est pour cette raison qu'il est normalisé dans plusieurs pays (États-Unis, Canada) pour évaluer les effluents industriels.

* Jean-François Férard

Professeur d'écotoxicologie à l'Université de Metz, Centre des sciences de l'environnement - I, rue des Récollets - BP 4025 - 57045 Metz Cedex 1

** Benoît Ferrari

Étudiant en Thèse sous la responsabilité du Professeur Jean-François Férard

Bibliographie

1. Association Française de normalisation (Afnor). 1991. Détermination de l'inhibition de la luminescence de *Photobacterium phosphoreum*. Norme expérimentale T 90-320. Paris, France.
2. Association Française de normalisation (Afnor). 1992. Essais de lixiviation des résidus solides. Norme expérimentale X31-210. Paris, France.
3. Baudo, R. 1987. *Ecotoxicological testing with Daphnia*. In R.H. Peters and R. de Bernardi, eds., *Daphnia*, Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 45 : 461-482.
4. Biesinger K.E. and G.M. Christensen. 1972. *Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of Daphnia magna*. J. Fish. Res. Bd. Canada, 29 : 1691-1700.
5. Blok, H. 1981. *Measuring the reproduction rate of Daphnia magna*. INSERM, 106 : 337-346.
6. Buijendijk, F.J.J. 1918. *Combined action of narcotics and potassium cyanide on daphne*. Archives Néerlandaises de physiologie, 2 : 521-524.
7. Calow, P. 1993. *Handbook of Ecotoxicology*, Vol. 1. Blackwell Science Ltd, London, UK, 478 p.
8. Cooney, J.D., G.M. Degraeve, E.L. Moore, B.J. Lenoble, T.L. Pollock and G.J. Smith. 1992. *Effects of environmental and experimental design factors on culturing and toxicity testing of Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem., 11 : 839-850.
9. Cotellet, S. and J.F. Férard. 1996. *Effects of algae frozen at different temperatures on chronic assessment endpoints observed with Daphnia magna*. Ecot. Environ. Safety, 33 : 137-142.
10. Cox, E.J., C. Naylor, M.C. Bradley and P. Calow. 1991. *Effect of differing maternal ration on adult fecundity and offspring size in laboratory cultures of Daphnia magna Straus for ecotoxicological testing*. Aquat. Tox., 24 : 63-75.
11. Elenet, B.P. and W.R. Bias. 1990. *Trace nutrient deficiency in Daphnia magna cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on the life history parameters of Daphnia magna*. Wat. Res., 24 : 1157-1167.
12. Enserink, L., W. Luttmer and H. Maas-Diepeveen. 1990. *Reproductive strategy of Daphnia magna affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests*. Aquat. Toxicol., 17:15-16.
13. Environmental Protection Agency. 1994. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. EPA 600/4-91-002. 3ème édition. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH.
14. Ferrari, B. and J.F. Férard. 1996. *Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem., 15 : 765-770.
15. Garric, J., J.F. Férard et E. Vindimian. 1992. *Essais biologiques pour l'estimation de la toxicité chronique des effluents*. Numéro spécial. rapport final. Ministère de l'Environnement/Agences de l'Eau, Neuilly-sur-Seine, France.
16. Lambolez, L. P. Vasseur, J.F. Férard and T. Giesbert. 1994. *The environmental risks of industrial waste disposal : an experimental approach including acute and chronic toxicities studies*. Ecot. Environ. Safety, 28 : 317-328.
17. Millemann, R.E. and B.R. Parkhurst. 1980. *Comparative toxicity of solid waste leachates to Daphnia magna*. Environment International, 4 : 255-260.
18. Mount, D.J. and T.J. Norberg. 1984. *A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test*. Environ. Toxicol. Chem., 3 : 425-434.
19. Nebeker, A.V. 1982. *Evaluation of Daphnia magna renewal life-cycle test method with silver and endosulfan*. Wat. Res., 16 : 739-744.
20. Organization for Economic Cooperation and Development. 1984. *Daphnia spp., acute immobilization and reproduction test*. OECD Guideline for testing Chemicals n°202. Organization for Economic Cooperation and Development, Geneva, Swiss.
21. Organization for Economic Cooperation and Development. 1996. *Daphnia magna reproduction test*. OECD Guideline for testing Chemicals n°202, part II, revised draft. Organization for Economic Cooperation and Development, Geneva, Swiss.