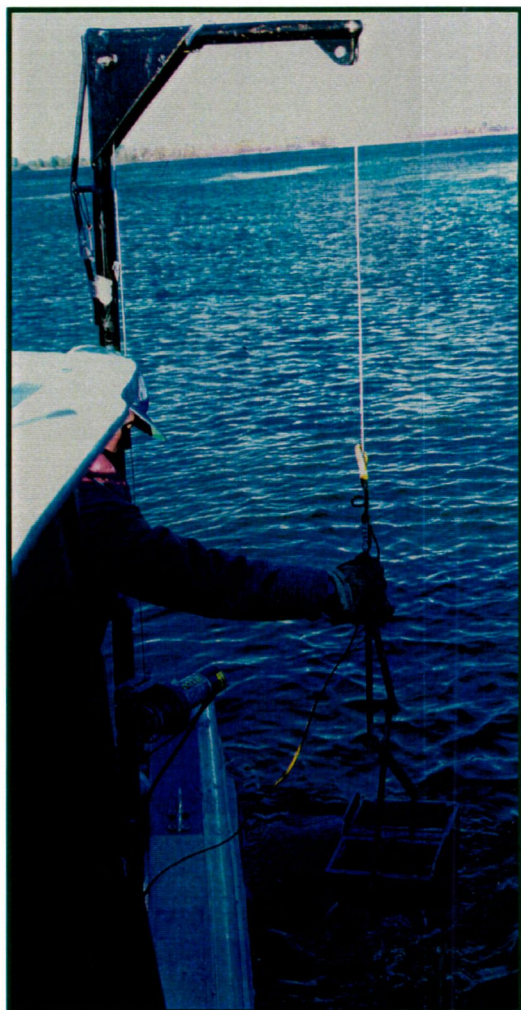




DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE BATTERIE MICRO-BIOANALYTIQUE MULTITROPHIQUE POUR SÉDIMENTS DULCICOLES GUIDE D'ORIENTATION POUR LA SÉLECTION D'UNE BATTERIE MICRO-BIOANALYTIQUE MULTITROPHIQUE

PROJET DE RECHERCHE RÉALISÉ CONJOINTEMENT
AVEC LA SECTION ÉCOTOXICOLOGIE ET CHIMIE
ENVIRONNEMENTALE DU CENTRE SAINT-LAURENT

Préparé pour:

ENVIRONNEMENT CANADA
DIRECTION DE LA PROTECTION DE
L'ENVIRONNEMENT
SECTION ÉCO-INNOVATION TECHNOLOGIQUE
MONTRÉAL, QUÉBEC

Mars 1998



105, iv. étage
Montr. H2Y 2E7
Tél.: (514) 283-2762
Fax: (514) 283-7166

CSL-6445
SC041601 C67d

**ENVIRONNEMENT CANADA
DIRECTION DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT
SECTION ÉCO-INNOVATION TECHNOLOGIQUE
MONTRÉAL, QUÉBEC**

CENTRE DE DOCUMENTATION CSL
105, McGill, 2ième étage
Montréal (Québec) H2Y 2E7
Tél.: (514) 283-2762
Fax: (514) 283-7166

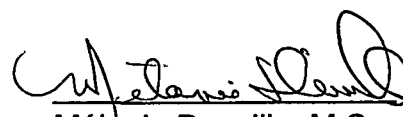
14/05/98

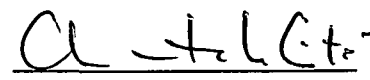
**DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE
BATTERIE MICRO-BIOANALYTIQUE MULTITROPHIQUE
POUR SÉDIMENTS DULCICOLES**

**GUIDE D'ORIENTATION
POUR LA SÉLECTION D'UNE
BATTERIE MICRO-BIOANALYTIQUE MULTITROPHIQUE**

**PROJET DE RECHERCHE RÉALISÉ CONJOINTEMENT AVEC LA
SECTION ÉCOTOXICOLOGIE ET CHIMIE ENVIRONNEMENTALE
DU CENTRE SAINT-LAURENT**

BEAK International incorporée


Mélanie Douville, M.Sc.
Assistante de projet


Chantale Côté, M.Sc.A.
Directrice de projet

Préface

Le présent rapport a été examiné par la section Écotoxicologie et chimie environnementale du Centre Saint-Laurent et la section Éco-Innovation technologique d'Environnement Canada, et sa publication est approuvée. Cette approbation ne signifie pas nécessairement que le contenu reflète les opinions et politiques d'Environnement Canada.

ENVIRONNEMENT CANADA
DIRECTION DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT
SECTION ÉCO-INNOVATION TECHNOLOGIQUE
MONTRÉAL, QUÉBEC

Guide d'orientation pour la sélection d'une batterie micro-bioanalytique multitrophique

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
GLOSSAIRE	II
1. INTRODUCTION.....	1
2. MICROBIOESSAIS DÉVELOPPÉS DANS LE CADRE DU PROJET	5
3. MÉTHODOLOGIE DE SÉLECTION DE LA BATTERIE MICRO-BIOANALYTIQUE MULTITROPHIQUE	6
3.1 Niveau 1 - Concordance avec les bioessais conventionnels, le degré de contamination des sédiments et la structure de la communauté benthique	7
3.2 Niveau 2 - Matrices décisionnelles basées sur des critères scientifiques et pratiques	13
3.3 Génotoxicité.....	17
3.4 Étude interlaboratoire	18
4. PRÉSENTATION DES BATTERIES SUGGÉRÉES.....	19
4.1 Première batterie (dépistage)	19
4.2 Deuxième batterie (confirmation).....	20

5. MICROBIOESSAIS PROMETTEURS : LEUR RELATION AVEC LES CONTAMINANTS PRÉOCCUPANTS ET AVEC LE DÉLAI ANALYTIQUE ET LES COÛTS	23
5.1 Contaminants préoccupants	23
5.2 Délai analytique et coûts.....	24
6. OUTILS POUR L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DES MICROBIOESSAIS ..	25
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	26
8. RÉFÉRENCES	28

ANNEXES

ANNEXE A DESCRIPTION DES MICROBIOESSAIS

ANNEXE B ARTICLES SCIENTIFIQUES

ENVIRONNEMENT CANADA
DIRECTION DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT
SECTION ÉCO-INNOVATION TECHNOLOGIQUE
MONTRÉAL, QUÉBEC

Développement et validation d'une batterie micro-bioanalytique multitrophique pour sédiments dulcicoles

Guide d'orientation pour la sélection d'une batterie micro-bioanalytique multitrophique

Résumé

BEAK International incorporée (BEAK), en collaboration avec la section Écotoxicologie et chimie environnementale du Centre Saint-Laurent (CSL), la section Éco-Innovation technologique d'Environnement Canada et Environmental BioDetection Products Inc. (EBPI), a réalisé une étude d'envergure visant la mise au point d'une batterie de microbioessais pouvant évaluer la toxicité des sédiments d'eau douce.

Dix-neuf microbioessais et deux bioessais conventionnels (survie de *Chironomus riparius* et *Hyalella azteca*) ont été réalisés sur des sédiments entiers, de l'eau interstitielle ou des extraits organiques de quinze échantillons de sédiments provenant de l'écosystème des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent. Les résultats de ces microbioessais ont été comparés quantitativement et qualitativement aux résultats des bioessais conventionnels, des analyses chimiques des différentes fractions de sédiments et à la structure de la communauté benthique de quatre sites d'échantillonnage.

Deux batteries sont suggérées en fonction des objectifs poursuivis lors d'une évaluation de la qualité des sédiments. La première batterie vise le dépistage de la toxicité de plusieurs échantillons et comprend deux microbioessais sur sédiment entier, soit : l'essai algal en phase solide et l'essai ATP. Les microbioessais sont accompagnés d'un support physico-chimique complet des sédiments entiers, lequel inclut des analyses pour détecter la présence de contaminants potentiellement génotoxiques. Si les résultats de l'évaluation de dépistage indiquent que les sédiments sont toxiques pour les organismes et/ou qu'ils contiennent de fortes teneurs en contaminants (p.ex. concentrations supérieures au seuil d'effet néfaste), un ou deux bioessais conventionnels sur sédiment entier (survie de *Hyalella azteca* et/ou *Chironomus riparius*) et quatre microbioessais sur l'eau interstitielle, avec des organismes de niveaux trophiques différents, pourraient être réalisés. Ces microbioessais, lesquels composent la deuxième batterie dite de confirmation, comprennent l'essai avec l'hydre, le Thamnotoxkit F^{MC} ou Daphtoxkit F^{MC}, un essai Microtox[®] (toxicité aiguë) et le SOS Chromotest^{MC}.

Glossaire

ADN : acide désoxyribonucléique. Polymère linéaire porteur de l'hérédité chez tous les organismes vivants.

ATP : adénosine triphosphate joue le rôle de transporteur d'énergie au cours du métabolisme chez les organismes vivants.

Batterie bioanalytique : ensemble de bioessais servant à évaluer la toxicité d'un échantillon donné.

β -galactosidase : enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'un lien β -galactoside.

CI₅₀ : concentration inhibitrice 50 (ou médiane). Il s'agit d'une estimation de la concentration à laquelle une substance provoque une réduction de 50% d'une fonction biologique mesurable.

CL₅₀ : concentration létale 50 (ou médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance estimée létale pour 50% des organismes y étant exposés.

CME0 : concentration minimale avec effet observé. Il s'agit de la concentration la plus faible d'une substance qui provoque des effets nocifs donnés chez des organismes exposés.

Consommateur primaire : se dit d'un organisme animal qui se nourrit de végétaux.

Consommateur secondaire : organisme hétérotrophe qui se nourrit de consommateurs primaires.

CSE : concentration seuil d'effet. Il s'agit de la moyenne géométrique de la CSEO et de la CME0.

CSEO : Concentration sans effet observé. Il s'agit de la concentration d'une substance qui ne provoque aucun effet nocif observable et statistiquement significatif chez des organismes exposés.

Décomposeur : micro-organisme assurant la minéralisation ou la transformation de la matière organique produite par d'autres organismes.

Dulcicole : réfère à l'eau douce

Eau interstitielle : se dit de l'eau retrouvée entre les particules de sédiment.

Estérase : enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'un lien ester sur une molécule organique.

Extraits organiques : fraction organique extraite d'une matrice à l'aide d'un solvant organique peu ou pas polaire (p.ex. dichlorométhane).

Génotoxicité : terme faisant référence aux effets toxiques sublétaux ou létaux suite à l'exposition du matériel génétique des cellules germinales ou somatiques produits par un éventail d'agents.

Hépatocytes : cellules du foie.

Létal : qui entraîne la mort des organismes exposés

Luminescence : émission de lumière par un organisme vivant suite à des activités métaboliques.

Microbioessai : bioessai miniaturisé dont la réalisation requiert peu d'échantillon, est rapide et relativement peu dispendieuse.

Mutagenicité : terme faisant référence aux effets toxiques sublétaux ou létaux suite à une modification dans la structure du matériel génétique d'un organisme amenant un changement dans les caractéristiques phénotypiques de cet organisme.

OFM : oxydases à fonctions mixtes : enzymes qui catalysent l'oxydation des molécules organiques aromatiques coplanaires.

Sublétal : qui provoque un effet nocif chez des organismes exposés mais qui n'entraîne pas directement la mort.

Toxicité : capacité d'une substance de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants.

Toxicité aiguë : effet nocif observable (létal ou sublétal) provoqué chez les organismes soumis à l'essai après une brève période d'exposition à une substance.

Toxicité chronique : effets à long terme associés à des changements dans le métabolisme, la croissance, la reproduction ou l'habileté de survie.

1. Introduction

Depuis plusieurs années, les sédiments sont reconnus comme étant des réservoirs et des sources de contaminants (Adams *et al.*, 1992). Les activités d'entretien et de développement reliées au transport maritime ou à d'autres activités connexes engendrent la resuspension et la redistribution des sédiments et, par conséquent, celles des contaminants qui s'y trouvent (Power et Chapman, 1992).

Afin d'évaluer la toxicité des sédiments et d'aider à la prise de décisions lors de projets de caractérisation, de dragage de sédiments contaminés ou de restauration de sites contaminés, des bioessais ont été mis au point (Burton, 1991). Les plus couramment utilisés sont les bioessais sur sédiment entier avec des invertébrés aquatiques (amphipodes, insectes, oligochètes, etc.). Ces essais conventionnels requièrent le maintien en culture des organismes, demandent plusieurs manipulations et la durée d'exposition est souvent de plusieurs jours.

Pour obtenir une idée plus juste des effets des sédiments contaminés sur l'environnement aquatique, il est recommandé d'utiliser une batterie d'au moins 2 à 3 essais utilisant des organismes de niveaux trophiques différents (Burton *et al.*, 1996a). L'utilisation de microbioessais simples d'application, peu coûteux et rapides est donc de plus en plus répandue (Blaise, 1991). Divers organismes aquatiques, représentant différents niveaux trophiques, sont utilisés dans ces bioessais. Par ailleurs, le développement et l'application de certains de ces microbioessais est souvent récent et par conséquent la démonstration de leur utilité, de leur sensibilité et de leur validation restent à être confirmée.

BEAK International incorporée (BEAK), en collaboration avec la section Écotoxicologie et chimie environnementale du Centre Saint-Laurent (CSL), la section Éco-Innovation technologique d'Environnement Canada et Environmental BioDetection Products Inc. (EBPI), a réalisé une étude visant le développement d'une batterie de microbioessais pour évaluer la toxicité des sédiments dulcicoles. Les objectifs de cette étude étaient (Côté *et al.*, 1998) :

- de déterminer quels microbioessais pouvaient le mieux prédire la toxicité telle que mesurée par les bioessais conventionnels avec des invertébrés aquatiques;
- d'évaluer l'utilité de l'eau interstitielle et des extraits organiques comme matrices de mesure de la toxicité des sédiments entiers;
- d'évaluer la réponse des microbioessais aux substances chimiques en comparaison aux substances d'origine dite naturelle (p.ex. azote ammoniacal et sulfures volatils);
- d'établir une sélection des bioessais les plus prometteurs, en tenant compte de critères quantitatifs et qualitatifs;

- de proposer une batterie de bioessais analytiques de différents niveaux trophiques, laquelle rencontrerait les demandes spécifiques de la gestion des sédiments contaminés.

Dix-neuf microbioessais et deux bioessais conventionnels (Tableau 1) ont été réalisés sur quinze échantillons de sédiments contaminés à différents degrés, lesquels provenaient de divers secteurs du bassin du fleuve Saint-Laurent et des Grands Lacs, notamment de la région du Port de Montréal, de Sorel, du Lac Saint-François, du Lac Saint-Pierre, du Lac Érié et du Lac Ontario. De plus, une série d'analyses physico-chimiques de chacun des échantillons de sédiments a été effectuée et une évaluation de la structure de la communauté benthique a été réalisée à quatre sites d'échantillonnage.

Deux séries de bioessais ont eu lieu, soit en 1995 et en 1996. Lors de la deuxième série de bioessais, l'étude de la structure de la communauté benthique a également été réalisée pour quatre stations d'échantillonnage. Une analyse interlaboratoire s'est déroulée de décembre 1996 à février 1997, afin d'évaluer la répétabilité et la répliquabilité des microbioessais jugés les plus prometteurs. Les résultats des deux séries de bioessais et de l'étude de la structure de la communauté benthique ont été présentés lors des congrès de l'AATW (Annual Aquatic Toxicity Workshop), de la SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) et d'Americana (1997) et ont fait l'objet de deux publications scientifiques.

Ce rapport ne présente pas de façon exhaustive les résultats des différentes étapes du projet. Le lecteur pourra se référer aux deux publications préparées dans le cadre du projet pour obtenir les détails. Les résultats de la première série de bioessais et des analyses physico-chimiques des échantillons de sédiments et d'eau interstitielle utilisés se retrouvent dans la publication de Côté *et al.* (1998a, Annexe B). Quant aux résultats de la deuxième série de bioessais, des analyses physico-chimiques et de l'étude de la communauté benthique ainsi que ceux de l'étude interlaboratoire, le lecteur peut communiquer avec les auteurs pour avoir plus de détails ou pour consulter les rapports d'étape. Enfin, une deuxième publication scientifique présente une synthèse des résultats obtenus concernant l'intégration de microbioessais dans une batterie pour évaluer la toxicité des sédiments d'eau douce (Côté *et al.*, 1998b, Annexe B).

Ce document présente un sommaire des résultats de l'évaluation et constitue un guide d'orientation pour la sélection d'une batterie de microbioessais pouvant assister les responsables de projets reliés à la gestion des sédiments contaminés.

Tableau 1 : Bioessais conventionnels et microbioessais sélectionnés

Bioessais/ organisme d'essai	Mesure d'essai	Durée d'exposition	Fraction ¹	Laboratoires	Référence
Bioessais conventionnels (protocoles standards)					
Amphipode d'eau douce <i>Hyalella azteca</i>	Survie et croissance	14 jours	SED	BEAK International inc., Dorval, Québec	Env. Canada, 1996
Larve de moucheron d'eau douce <i>Chironomus riparius</i>	Survie et croissance	10 jours	SED	BEAK International inc., Dorval, Québec	Env. Canada, 1997
Microbioessais sur phase liquide					
Microtox® <i>Vibrio fischeri</i>	Toxicité aiguë Inhibition de la lumière	15 min.	EI EXT	BEAK International inc., Dorval, Québec	Env. Canada, 1992a.
Inhibition de la croissance algale <i>Selenastrum capricornutum</i>	Toxicité chronique Inhibition de la lumière	72 h	EI	Centre Saint- Laurent, Env. Can. Montréal, Québec	Env. Canada, 1992b.
Thamnotoxkit F ^{MC} <i>Thamnocephalus platyurus</i>	Toxicité aiguë Survie	24 h	EI EXT	BEAK International inc., Dorval, Québec	Creative Selling 1992b
Rotokit F ^{MC} <i>Brachionus calyciflorus</i>	Toxicité aiguë Survie	24 h	EI	BEAK International inc., Dorval, Québec	Creative Selling 1992a
Daphnia I.Q. ^{MC} <i>Daphnia magna</i>	Toxicité aiguë sub létale	1h 15 min	EI	BEAK International inc., Dorval, Québec	Aqua Survey Inc., 1993
Essai algal mesurant l'activité estérasique <i>Selenastrum capricornutum</i>	Toxicité aiguë Inhibition de l'activité des estérase	4 h	EI	Centre Saint- Laurent, Env. Can. Montréal, Québec	Ménard, 1996
Essai avec l'hydre <i>Hydra attenuata</i>	Toxicité aiguë Survie	24-96 h	EI EXT	Centre Saint- Laurent, Env. Can. Montréal, Québec	Trottier, 1995
Microtox® en microplaque <i>Vibrio fischeri</i>	Toxicité aiguë Inhibition de la lumière	15-60 min	EI EXT	Centre Saint- Laurent, Env. Can. Montréal, Québec	Blaise <i>et al.</i> , 1994
Modèle hépatocellulaire (viabilité, OFM, bris d'ADN) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Viabilité des hépatocytes Induction des OFM et des métallothionéines Bris de l'ADN	24-48 h	EXT	Centre Saint- Laurent, Env. Can. Montréal, Québec	Gagné et Blaise, 1995
Mutatox ^{MC} <i>Vibrio fischeri</i> Mutant sombre	Mutagenicité	24 h	EI	BEAK International inc., Dorval, Québec	Microbics Corp. 1995
Algaltokkit F ^{MC} <i>Selenastrum capricornutum</i>	Inhibition de la croissance	72 h	EI	BEAK International inc., Dorval, Québec	Creative Selling, 1996a
Daphtokkit F ^{MC} <i>Daphnia magna</i>	Toxicité aiguë	48 h	EI	BEAK International inc., Dorval, Québec	Creative Selling, 1996b
Microtox® Chronique <i>Vibrio fischeri</i>	Inhibition de la luminescence	16 h	EI EXT	Centre Saint- Laurent, Env. Can Montréal, Québec	Microbics Inc. 1995
SOS Chromotest ^{MC} <i>Escherichia coli</i> PQ37	Réparation de l'ADN (+/-S9 activation métabolique)	2 h	EI EXT	EBPI, Brampton, Ontario	Fish <i>et al.</i> , 1987

Tableau 1 : Bioessais conventionnels et microbioessais sélectionnés (suite)

Bioessais/ organisme d'essai	Mesure d'essai	Durée d'exposition	Fraction ¹	Laboratoires	Référence
Microbioessais sur phase solide					
Essai algal en phase solide <i>Selenastrum capricornutum</i>	Inhibition des estérases	4 h	SED	Centre Saint-Laurent, Env. Can Montréal, Québec	Blaise et Ménard, 1998
SOS Chromotest ^{MC} à contact direct <i>Escherichia coli</i> PQ37	Réparation de l'ADN (+/-S9 activation métabolique)	24 h	SED	EBPI Inc., Brampton, Ontario	Dutka <i>et al.</i> , 1995
Microtox [®] phase solide <i>Vibrio fischeri</i>	Toxicité aiguë Inhibition de la lumière	20 min.	SED	BEAK International inc., Dorval, Québec	Microbics Inc. 1995
ToxiChromoPad ^{MC} <i>Escherichia coli</i>	Toxicité aiguë Inhibition de la β -galactosidase	4 h	SED	EBPI Inc., Brampton, Ontario	EBPI, 1995
Essai ATP Organismes microbiens <i>in situ</i>	Mesure de la biomasse microbienne via l'ATP cellulaire	-	SED	BEAK International inc., Dorval, Québec	Charm Science Inc., 1995

1 : SED : sédiment entier, EI : eau interstitielle, EXT : extraits organiques

2. Microbioessais développés dans le cadre du projet

Trois microbioessais ont été développés dans le cadre de ce projet par le personnel des laboratoires de BEAK et de la section Écotoxicologie et chimie environnementale du Centre Saint-Laurent. Ces trois microbioessais sont l'essai ATP, l'essai algal sur phase solide et l'essai avec l'hydre (*Hydra attenuata*). L'essai ATP a été mis au point par le personnel de BEAK, tandis que celui du Centre Saint-Laurent a développé les deux autres microbioessais. Voici brièvement le principe de chacun d'eux.

Essai ATP

L'essai ATP détermine la viabilité de la biomasse microbienne dans un échantillon de sédiments à partir du contenu cellulaire d'adénosine triphosphate (ATP). Un aliquote de sédiments est filtré et les cellules microbiennes sont lysées, afin d'en libérer l'ATP. Par la suite, de la luciférase et de la luciférine sont ajoutées à la suspension et la luminescence produite par la réaction luciférine-luciférase-ATP est mesurée. La quantité de lumière émise reflète la biomasse microbienne de l'échantillon.

Essai algal sur phase solide

L'essai algal sur phase solide mesure l'inhibition de l'activité estérasiqque causée par les contaminants présents dans un échantillon de sédiments et ce, chez l'algue *Selenastrum capricornutum*. Un aliquote de diacétate de fluorescéine (DAF) est ajouté à une suspension d'algues et de sédiments. Les estérases, présentes dans les algues, clivent le lien ester du DAF, ce qui permet la libération de la fluorescéine. Cette substance fluorescente restera dans les cellules qui possèdent une bonne intégrité membranaire. L'intensité de la fluorescence est mesurée par cytométrie en flux. Cette intensité lumineuse sera plus forte chez les algues saines (Ménard, 1996).

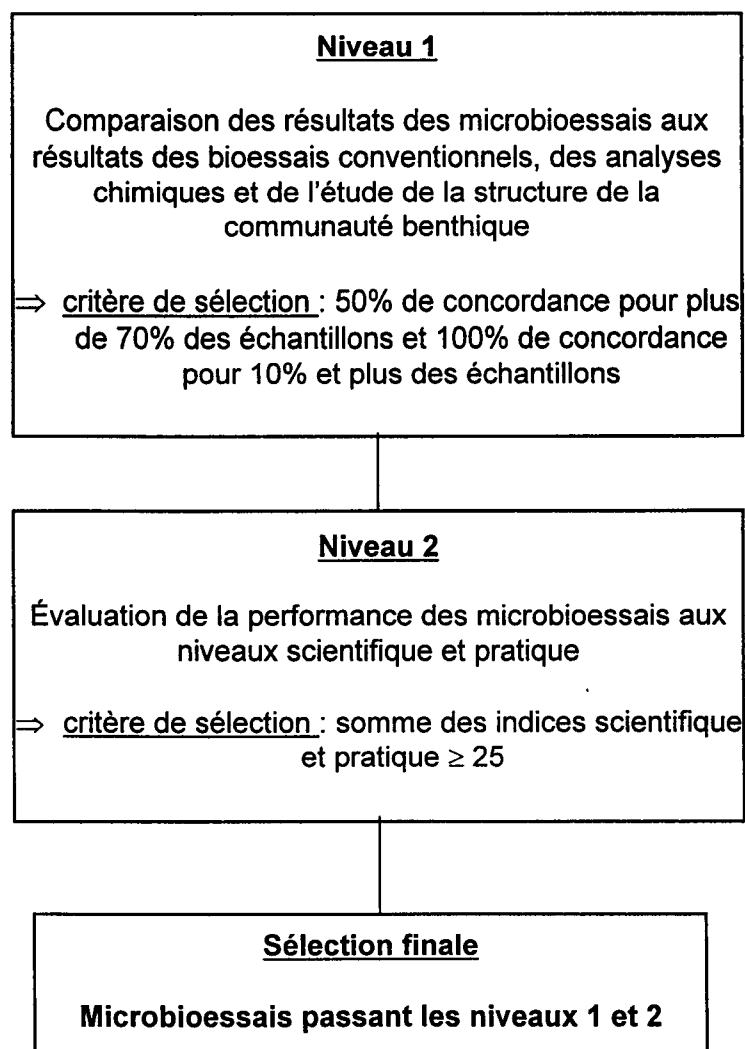
Essai avec l'hydre

L'essai avec l'hydre mesure les effets létaux et sublétaux de liquides sur l'hydre, *Hydra attenuata*. Trois organismes adultes sont placés en présence de l'échantillon à l'étude dans des puits de microplaque. Durant la période d'exposition, qui est de 48 à 96 heures, la survie et les changements morphologiques apparaissant aux tentacules et au corps sont relevés quotidiennement et comparés à ceux retrouvés chez le groupe témoin (Trottier, 1995).

3. Méthodologie de sélection de la batterie micro-bioanalytique multitrophique

La méthodologie élaborée dans le cadre de cette étude pour sélectionner les microbioessais les plus prometteurs est composée de deux niveaux. Le premier niveau consiste à comparer les résultats obtenus avec les microbioessais aux résultats des bioessais conventionnels, des analyses chimiques effectuées sur les échantillons de sédiments, d'eau interstitielle et d'extraits organiques et aux résultats de la structure de la communauté benthique. Le deuxième niveau consiste quant à lui à évaluer la performance des microbioessais aux niveaux scientifique et pratique à partir de critères quantitatifs et qualitatifs. La Figure 1 illustre cette méthodologie.

Figure 1 : Méthodologie de sélection de la batterie micro-bioanalytique multitrophique



3.1 Niveau 1 - Concordance avec les bioessais conventionnels, le degré de contamination des sédiments et la structure de la communauté benthique

Les résultats des différents microbioessais ont été comparés aux concentrations chimiques de contaminants, aux résultats des bioessais conventionnels et à la structure de la communauté benthique pour chacun des sites pris séparément. Ceci a permis d'observer dans quelle mesure chaque microbioessai pouvait prédire la toxicité des sédiments et ce, pour chacun des sites à l'étude.

Afin de comparer et d'établir les niveaux de concordance des microbioessais avec les trois items mentionnés précédemment, des critères ont été élaborés pour établir le niveau de danger des échantillons de sédiments, d'eau interstitielle ou d'extraits organiques (3 niveaux : peu ou pas de danger, danger modéré et danger élevé).

Trois types de critères ont donc été considérés :

1. Critères toxicologiques : ils ont été établis pour chacun des essais conventionnels et des microbioessais à partir des résultats obtenus lors de la présente étude, d'études précédentes et de l'expérience du personnel de BEAK dans la réalisation et l'interprétation des bioessais.
2. Critères chimiques : ils ont été établis, pour chacun des contaminants retrouvés dans les sédiments, à partir d'études précédentes (Chapman, 1986) et de critères déjà établis par l'organisme U.S. Fish and Wildlife Service (1988), Environnement Canada et le ministère de l'Environnement du Québec (1992) (Tableau 2). Un échantillon de sédiment était qualifié comme représentant un danger modéré ou élevé, lorsqu'au moins une des substances était retrouvée en concentration reconnue comme présentant un danger modéré ou élevé d'après les critères établis. On a donc considéré qu'un seul contaminant présent dans un sédiment à des concentrations excédant les critères établis pouvait causer des effets néfastes chez les organismes aquatiques qui y sont exposés.

Aucun critère n'a été établi pour l'eau interstitielle et les extraits organiques, étant donné que les résultats des microbioessais recherchés devaient refléter la contamination du sédiment entier. Pour fins de comparaison entre les résultats des microbioessais et la contamination des échantillons d'eau interstitielle et d'extraits organiques, les niveaux de danger établis pour chacun des échantillons de sédiments ont été utilisés.

Tableau 2 : Critères chimiques utilisés pour établir le niveau de danger des sédiments

	Peu ou pas de danger	Danger modéré	Danger élevé	Référence
Azote ammoniacal (ppm)	≤75	>75-200	>200	US Fish and Wildlife Service (1988)
BPC (ppm)	≤0,2	>0,2-1,0	>1,0*	Environnement Canada et MENVIQ, 1992
HAP (ppm)	≤6,8	>6,8-68	>68	Chapman (1986)
Huiles et graisses (ppm)	≤1000	>1000-2000	>2000	US Fish and Wildlife Service (1988)
Rapport SEM-AVS	≤1	>1-10	>10	Présente étude

* : à multiplier par le pourcentage de carbone organique total (COT) du sédiment étudié.

BPC : biphényles polychlorés

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

SEM-AVS : "Simultaneously extracted metals-Acid volatil sulfides"

3. Critères pour la communauté benthique : ils ont été établis à partir des indices de Shannon-Wiener. Cet indice donne une appréciation de la diversité des macroinvertébrés benthiques (Davis et Lathrop, 1992). On a considéré qu'une valeur comprise entre 3 et 5 correspond à un site non ou peu perturbé, tandis qu'une valeur entre 1 et 3 indique un site modérément perturbé et finalement une valeur inférieure à 1 est associée à un site fortement perturbé. En général, une diversité relativement grande reflète un nombre moyen de populations de plusieurs taxons dans la communauté et peut indiquer une eau de bonne qualité. De faibles valeurs de diversité reflètent quant à elle un grand nombre de populations de quelques taxons et peut signifier que les communautés sont perturbées (Wilhm et Dorris, 1968).

Chaque échantillon de sédiment a donc été qualifié comme représentant peu ou pas de danger, un danger modéré ou un danger élevé en fonction des résultats des bioessais, des niveaux de contamination et de la structure de la communauté benthique. On entend par peu ou pas de danger, un sédiment qui ne produit pas ou peu d'effets néfastes chez les organismes qui y sont exposés. Un danger modéré signifie qu'un sédiment peut causer des effets modérément néfastes, tandis qu'un sédiment présentant un danger élevé indique que celui-ci peut causer des effets néfastes pour les organismes benthiques y étant exposés.

La qualification des échantillons obtenue à partir des microbioessais a été comparée à celle obtenue à partir des essais conventionnels, de la contamination et de la structure de la communauté benthique. Quand la qualification était la même, il y avait 100% de

concordance et quand elle différait d'un niveau (peu ou pas de danger *versus* danger modéré *versus* danger élevé), une concordance de 50% était établie.

Voici un exemple illustrant la démarche utilisée pour qualifier le niveau de danger d'un sédiment, selon les trois critères présentés précédemment, et pour établir le niveau de concordance des résultats d'un microbioessai. Le site étudié est le terminal pétrolier 811-96 (PT-811-96) et le microbioessai est le Thamnotoxkit F^{MC}.

- Résultats du Thamnotoxkit F^{MC} : (CL₅₀, %v/v, LSL - Lac Saint-Louis, LSF - Lac Saint-François, PT : terminaux pétroliers)

LSL-J3 : >100%	Long Point : >100% (site référence 1995)
LSL-J4 : 97%	Hamilton : 19,9%
Lancaster : >100%	PT-811-96 : 44,2%
Chenal : >100%	Charron : >100%
Coteau : >100%	MilVick : 22,7%
PT-831 : >100%	Corbeaux : 13,9%
PT-811 : >100%	MilVick2 : 20,7%
PT-841 : 9,2%	LSFest : >100% (site référence 1996)

Les deux sites de référence, soit Long Point et LSFest, ne présentent aucune toxicité (i.e. CL₅₀ > 100%). Quelques sites démontrent une CL₅₀ se situant entre 90-100%. Le prochain bond important se situe à 44% et par la suite les CL₅₀ sont <23%. Les critères pour le Thamnotoxkit^{MC} F ont été établis comme suit : peu ou pas de danger ≥80%, danger modéré 30-79% et danger élevé <30%. Le sédiment du site PT-811-96 (CL₅₀ à 44,2%) représente donc un *danger modéré* pour les organismes aquatiques d'après le Thamnotoxkit^{MC} F.

- Résultats des bioessais conventionnels :

Les niveaux de danger pour les bioessais conventionnels ont été établis à partir des gradients de réponses observés avec les 15 échantillons de sédiments testés. Ceux-ci sont : peu ou pas de danger ≥60%, danger modéré 30-59% et danger élevé <30% de survie. Les résultats des tests pour les sédiments du site PT-811-96 sont : 14% de survie pour *Chironomus riparius* et 20% de survie pour *Hyalella azteca*. Ce sédiment présente donc un *danger élevé* d'après ces bioessais.

- Résultats des analyses chimiques :

Les résultats des analyses chimiques pour les sédiments du site PT-811-96 et la qualification selon les critères chimiques établis (Tableau 2) sont présentés ci-dessous :

- Azote ammoniacal : 72,5 µgN/ml - peu ou pas de danger
- Huiles et graisses : non déterminé
- BPC : 0,35 µg/g - danger modéré
- HAP totaux : 11,9 µg/g - danger modéré

- Rapport SEM-AVS : 0,0747 - peu ou pas de danger

Les sédiments, l'eau interstitielle et les extraits organiques de ce site présentent *un danger modéré*, étant donné que la concentration de BPC et de HAP totaux sont supérieures à ce niveau de danger.

- Résultats de l'étude de la structure de la communauté benthique :

La valeur de l'indice de Shannon-Wiener pour PT-811-96 est de 2,4. Ce sédiment présente un *danger modéré* selon les résultats de diversité des organismes benthiques.

⇒ Il y a donc 100% de concordance entre les résultats du Thamnotoxkit F^{MC} et ceux de la contamination chimique des sédiments et de la structure de la communauté benthique, tandis qu'il y a 50% de concordance avec les résultats des bioessais conventionnels.

Le Tableau 3 présente le pourcentage de concordance de tous les microbioessais. Un microbioessai passait le niveau 1, lorsqu'il présentait au moins 50% de concordance pour plus de 70% des échantillons testés et 100% de concordance pour au moins 10% des échantillons à l'étude avec les bioessais conventionnels, la contamination et la communauté benthique.

Tableau 3 (suite) : Concordance des microbioessais avec les bioessais conventionnels, la contamination et la structure de la communauté benthique

Bioessais	Microbioessais <i>versus</i> essais conventionnels					Microbioessais <i>versus</i> contamination					Microbioessais <i>versus</i> communauté benthique				
	Concordance					Concordance					Concordance				
	100%	50%	0%	Nombre d'échantillons	Concor-dance	100%	50%	0%	Nombre d'échantillons	Concor-dance	100%	50%	0%	Nombre d'échantillons	Concor-dance
Extraits organiques															
Microtox® phase liquide	3	0	6	9	-	3	2	4	9	-	1	3	0	4	✓
Microtox® microplaque*	4	4	1	9	✓	6	2	1	9	✓	4	0	0	4	✓
Microtox® chronique	2	1	1	4	✓	0	3	1	4	-	1	2	1	4	✓
Thamnotoxkit F ^{MC} *	2	5	2	9	✓	4	3	2	9	✓	4	0	0	4	✓
Essai avec l'hydre*	4	5	0	9	✓	5	4	0	9	✓	3	1	0	4	✓
Viabilité des hépatocytes	3	3	3	9	-	5	1	3	9	-	2	1	1	4	✓
SOS Chromotest ^{MC}	3	0	6	9	-	3	2	4	9	-	1	3	0	4	✓

Note : Les astérisques indiquent les microbioessais qui passent le premier niveau.

Tableau 3 (suite) : Concordance des microbioessais avec les bioessais conventionnels, la contamination et la structure de la communauté benthique

Bioessais	Microbioessais versus essais conventionnels Concordance					Microbioessais versus contamination Concordance					Microbioessais versus communauté benthique Concordance				
	100%	50%	0%	Nombre d'échan- tillons	Concor- dance	100%	50%	0%	Nombre d'échan- tillons	Concor- dance	100%	50%	0%	Nombre d'échan- tillons	Concor- dance
Extraits organiques															
Microtox® phase liquide	3	0	6	9	-	3	2	4	9	-	1	3	0	4	✓
Microtox® microplaque*	4	4	1	9	✓	6	2	1	9	✓	4	0	0	4	✓
Microtox® chronique	2	1	1	4	✓	0	3	1	4	-	1	2	1	4	✓
Thamnotoxkit F ^{MC} *	2	5	2	9	✓	4	3	2	9	✓	4	0	0	4	✓
Essai avec l'hydre*	4	5	0	9	✓	5	4	0	9	✓	3	1	0	4	✓
Viabilité des hépatocytes	3	3	3	9	-	5	1	3	9	-	2	1	1	4	✓
SOS Chromotest ^{MC}	3	0	6	9	-	3	2	4	9	-	1	3	0	4	✓

Note : Les astérisques indiquent les microbioessais qui passent le premier niveau.

Les microbioessais de niveau 1 les plus prometteurs sont donc :

- l'essai ATP (sédiment entier)
- le Microtox® phase solide (sédiment entier)
- le ToxiChromoPad^{MC} (sédiment entier)
- ✓ • l'essai algal phase solide (sédiment entier)
- le Microtox® en microplaque (eau interstitielle et extraits organiques)
- le Microtox® chronique (eau interstitielle)
- le Thamnotoxkit F^{MC} (eau interstitielle et extraits organiques)
- le Daphtoxkit F^{MC} (eau interstitielle)
- le Daphnia IQ^{MC} (eau interstitielle)
- ✓ • l'essai avec l'hydre (eau interstitielle et extraits organiques)
- SOS Chromotest^{MC} (eau interstitielle)

Il est important d'observer que les résultats des bioessais conventionnels avec *Hyalella azteca* et *Chironomus riparius* concordent avec les résultats de la contamination des sédiments et de la structure de la communauté benthique et ce, à 100% ou à 50%. Ces essais constituent la base des comparaisons effectuées dans le cadre de cette étude. Il était donc essentiel qu'ils fournissent des résultats cohérents avec le niveau de contamination et la structure de la communauté benthique.

3.2 Niveau 2 - Matrices décisionnelles basées sur des critères scientifiques et pratiques

Les matrices décisionnelles représentent le niveau 2 de la méthodologie de sélection des batteries. Elles ont été développées afin d'établir la performance aux niveaux scientifique et pratique de chacun des bioessais. Différents critères quantitatifs et qualitatifs ont été définis pour attribuer un indice de performance à tous les bioessais. En fait, les bioessais se voient attribuer une note pour chacun des critères, et la somme de ces notes représente l'indice de performance. Les Tableaux 4 et 5 présentent les notes de chacun des bioessais pour chaque critère, ainsi que l'indice de performance des niveaux scientifique et pratique.

Afin de désigner les microbioessais passant le niveau 2, la somme des indices de performance basée sur des critères scientifiques et pratiques a été comptabilisée. La performance de niveau scientifique a été jugée plus importante que celle de niveau pratique. En effet, des critères tels que la pertinence écologique des organismes et les corrélations avec les résultats des essais conventionnels et la contamination des sédiments qualifient plus adéquatement un essai efficace à évaluer le niveau de toxicité des sédiments que les coûts analytiques, la vitesse d'exécution, etc. Ceci, par ailleurs, ne

suppose pas que les critères pratiques ne sont pas pertinents pour sélectionner des essais pouvant être inclus dans une batterie bioanalytique. Ainsi, l'indice de performance de niveau scientifique a été multiplié par 1,5. Un microbioessai passait le niveau 2, lorsque la somme des deux indices était ≥ 25 , soit 50% de la somme maximale. Les microbioessais retenus au niveau 1 et qui passent le niveau 2 sont donc :

- l'essai ATP (sédiments entier)
- ✓ • l'essai algal phase solide (sédiment entier)
- le Microtox® en microplaque (eau interstitielle)
- le Thamnotoxkit F^{MC} (eau interstitielle)
- le Daphtoxkit F^{MC} (eau interstitielle)
- ✓ • l'essai avec l'hydre (eau interstitielle)
- le SOS Chromotest^{MC} (eau interstitielle)

L'essai ATP, le Thamnotoxkit F^{MC} et le SOS Chromotest^{MC} sont les trois microbioessais ayant obtenu les résultats les plus élevés (35,5, 34,5 et 33, respectivement). Encore une fois, il est important de noter que les bioessais conventionnels ont passé le niveau 2.

Mis à part le Microtox® en microplaque, aucun des essais Microtox® réalisés sur l'eau interstitielle n'a pu prédire efficacement la toxicité des sédiments; il s'est avéré que tous les sédiments présentaient peu ou pas de danger. Cette différence entre les résultats peut s'expliquer, en partie, par le fait que la procédure du Microtox® en microplaque permet de mesurer une faible toxicité (i.e. moins de 50% de réduction de la production de lumière chez la bactérie *V. fischeri*). En effet avec cet essai, les résultats peuvent être rapportés en terme de CME0 (concentration minimale d'effets observés), tandis qu'avec le Microtox® conventionnel, la toxicité est rapportée sous forme de CI₅₀ (concentration inhibant 50% de la production de lumière). Ainsi, si un sédiment engendre une réduction de la production de lumière de moins de 50%, il ne sera pas considéré toxique par le Microtox® conventionnel.

Tableau 4 : Matrice décisionnelle basée sur des critères scientifiques

Bioessai/Organisme	Fraction*	Répl- cabilité ¹	Répé- tabilité ²	Pertinence écologique ³	Vali- dation ⁴	Corrélation avec bioessais conventionnels ⁵	Corrélation avec contami- nants ⁵	Corrélation avec substances naturelles ⁶	Indice de performance 7 (X 1,5)
Bioessais conventionnels									
Amphipode <i>Hyalella azteca</i>	SED	1	2	3	3	3	3	3	18 (27)
Moucheron <i>Chironomus riparius</i>	SED	0	2	3	3	3	3	3	17 (25,5)
Bioessais sur sédiment entier									
Essai ATP - bactéries indigènes	SED	1	2	3	1	0	3	3	13 (19,5)
Microtox® phase solide <i>Vibrio fischeri</i>	SED	1	-	0	2	0	0	0	3 (4,5)
ToxiChromoPad ^{MC} <i>Escherichia coli</i>	SED	0	1	0	1	0	3	0	5 (7,5)
Essai algal phase solide	SED	3	2	1	0	3	3	3	15 (22,5)
Bioessais sur eau interstitielle et extraits organiques									
Microtox® <i>Vibrio fischeri</i>	EI/EXT	1	3	0	3	0	0	3	10 (15)
Microtox® en microplaque <i>Vibrio fischeri</i>	EI/EXT	1	2	0	1	0	1,5	3	8,5 (12,75)
Microtox® chronique <i>Vibrio fischeri</i>	EI/EXT	0	2	0	1	1,5	1,5	-	6 (9)
Croissance algale <i>Selenastrum capricornutum</i>	EI	2		1	3	0	0	3	9 (13,5)
Algatoxkit F ^{MC} <i>Selenastrum capricornutum</i>	EI	2	2	1	1	0	0	3	9 (13,5)
Essai algal-inhibiteur estérasiq. <i>Selenastrum capricornutum</i>	EI	2	-	1	0	0	0	3	6 (9)
Thamnotoxkit F ^{MC} <i>Thamnocephalus platyurus</i>	EI/EXT	0	3	0	1	3	3	3	13 (19,5)
Daphtoxkit F ^{MC} <i>Daphnia magna</i>	EI	1	3	1	1	1,5	0	3	10,5 (15,75)
<i>Daphnia</i> I Q ^{MC} <i>Daphnia magna</i>	EI	0	-	1	1	0	0	3	5 (7,5)
Rotokit F ^{MC} <i>Brachionus calyciflorus</i>	EI	0	-	2	1	0	0	3	6 (9)
Essai avec l'hydre <i>Hydra attenuata</i>	EI/EXT	1	3	1	1	3	3	0	12 (18)
Viabilité des hépatocytes <i>O. mykiss</i>	EI/EXT	2	2	1	1	0	0	3	9 (13,5)
SOS Chromotest ^{MC} <i>Escherichia coli</i> PQ37	EI/EXT	1	2	0	3	3#	3#	-	12 (18)

: Utilisation de l'analyse discriminante au lieu de l'analyse de corrélation de Spearman.

*SED Sédiment EI : Eau interstitielle EXT : Extrait organique

- résultats non disponibles

1. Indiquée par le coefficient de variation moyen pour les essais avec toxiques de référence

3 cv<10%

1 : cv entre 20% et 30%

2 cv entre 10% et 20%

0 : cv entre 30% et 40%

2. Répétabilité :

3 : Concordance parfaite (± 5% de différence ou non statistiquement différent)

2 : Bonne concordance (± 20% ou non statistiquement différent)

1 : Concordance moyenne (± 30-40% de différence)

0 Faible concordance (plus de 40% de différence)

3. Pertinence écologique :

3 : Espèce présente dans un sédiment d'eau douce

2 : Espèce présente dans la colonne d'eau du fleuve Saint-Laurent

1 : Espèce d'eau douce abondante en Amérique du Nord

0 : Espèce peu répandue

4. Essai ayant été validé à grande échelle (ex. Microtox®)

3 : plus de 10 publications 1 : entre 4 et une publication(s)

2 : entre 5 et 10 publications 0 : aucune publication

5. Corrélation = 3, absence de corrélation = 0 (corrélation de Spearman, p<0,05)

6. Corrélation = 0, absence de corrélation = 3 (corrélation de Spearman, p<0,05)

7. Somme des points attribués

Tableau 5 : Matrice décisionnelle basée sur des critères pratiques

Bioessai/Organisme	Fraction*	Vitesse d'exécution des tests ¹	Temps entre l'arrivée des échantillons et le résultat ²	Rendement analytique ³	Coût matériel analytique ⁴	Coût instruments analytiques ⁵	Disponibilité organismes ⁶	Indice de performance ⁷ (somme des deux indices)
Bioessais conventionnels								
Amphipode <i>Hyalella azteca</i>	SED	0	0	2	3	3	0	8 (35)
Moucheron <i>Chironomus riparius</i>	SED	0	0	2	3	3	0	8 (33,5)
Bioessais sur sédiment entier								
Essai ATP - bactéries indigènes	SED	3	3	3	2	2	3	16 (35,5)
Microtox® phase solide <i>Vibrio fischeri</i>	SED	2	3	1	2	1	3	12 (16,5)
ToxiChromoPad ^{MC} <i>Escherichia coli</i>	SED	3	3	3	2	3	2	16 (23,5)
Essai algal phase solide <i>Selenastrum capricornutum</i>	SED	0	3	0	2	0	1	6 (28,5)
Bioessais sur eau interstitielle et extraits organiques								
Microtox® phase liquide <i>Vibrio fischeri</i>	EI/EXT	2	3	1	2	1	3	12 (27)
Microtox® en microplaque <i>Vibrio fischeri</i>	EI/EXT	2	3	3	2	1	3	14 (26,75)
Microtox® chronique <i>Vibrio fischeri</i>	EI/EXT	2	2	1	1	1	3	10 (19)
Croissance algale <i>Selenastrum capricornutum</i>	EI	0	1	3	2	1	1	8 (21,5)
Algaltokkit F ^{MC} <i>Selenastrum capricornutum</i>	EI	0	1	1	0	3	3	8 (21,5)
Essai algal-inhibiteur estérasiq 24h <i>Selenastrum capricornutum</i>	EI	1	2	0	2	0	1	6 (15)
Thamnotoxkit F ^{MC} <i>Thamnocephalus platyurus</i>	EI/EXT	3	3	3	1	3	2	15 (34,5)
Daphtoxkit F ^{MC} <i>Daphnia magna</i>	EI	1	1	3	1	3	1	10 (25,75)
Daphnia I Q. ^{MC} <i>Daphnia magna</i>	EI	2	3	3	2	3	0	13 (20,5)
Rotokit F ^{MC} <i>Brachionus calyciflorus</i>	EI	3	3	3	1	3	2	15 (24)
Essai avec l'hydre <i>Hydra attenuata</i>	EI/EXT	2	0	1	2	3	1	9 (27)
Viabilité des hépatocytes <i>O. mykiss</i>	EI/EXT	3	1	1	2	1	1	9 (22,5)
SOS Chromotest ^{MC} <i>Escherichia coli</i> PQ37	EI/EXT	3	3	3	2	2	2	15 (33)

*SED Sédiment EI Eau interstitielle EXT Extrait organique

1 Inclut : maintien et préparation des organismes, préparation des solutions, renouvellements et lecture des résultats

3 : moins de 60 min 1 : entre 2 et 5 h
2 : entre 60 et 120 min 0 : plus de 5 h

2 Temps écoulé entre le début du test et la fin de l'analyse des résultats

3 : 1 journée 1 : de 3 à 4 jours
2 : 2 jours 0 : plus de 4 jours

3 Nombre d'échantillons pouvant être testés dans la même journée

3 : 10 ou plus 1 : entre 6 et 4
2 : entre 7 et 9 0 : 3 ou moins

4. Coût du matériel pour tester un échantillon

3 : moins de 20\$ 1 : entre 100 et 200\$
2 : entre 20 et 100\$ 0 : plus de 200\$

5 Coût des instruments analytiques

3 : moins de 5 000\$ 1 : entre 10 000 et 50 000\$
2 : entre 5 000 et 10 000\$ 0 : plus de 50 000\$

6. Disponibilité des organismes

3 : immédiate (dans la même journée) 1 : entre 1 et 7 jours
2 : en 24 h 0 : plus d'une semaine

7. Somme des points attribués

Comme l'indique le Tableau 4, un microbioessai, soit l'essai avec l'hydre sur l'eau interstitielle, présente des résultats corrélés négativement avec la concentration des substances dites naturelles dans les sédiments, telles que l'azote ammoniacal. Ceci peut expliquer le fait que des sédiments présentant peu ou pas de danger sont qualifiés comme présentant un danger élevé selon les résultats de ce microbioessai. Lors de l'utilisation de cet essai dans l'évaluation de la toxicité de sédiments, il faut alors s'assurer que la toxicité observée est bien reliée à la présence de contaminants et non à celle de l'azote ammoniacal. Pour ce faire, des analyses chimiques servant à déterminer la concentration de cette substance dans l'eau interstitielle peuvent être effectuées. L'essai pourrait être également réalisé à un pH qui minimise (ou élimine) la présence d'azote ammoniacal sous forme non ionisée.

3.3 Génotoxicité

En plus du SOS Chromotest^{MC}, deux autres microbioessais ont été réalisés pour évaluer la mutagénicité et la génotoxicité des sédiments, soit le Mutatox^{MC} et le bris d'ADN. Aucun de ces deux essais n'a pu détecter la présence de génotoxicité dans les sédiments.

Comme l'indique le Tableau 3, les résultats obtenus avec le SOS Chromotest^{MC} sur les extraits organiques n'appuient pas ceux obtenus sur les échantillons d'eau interstitielle. Aucune génotoxicité n'a été mesurée sur les extraits organiques avec cet essai, bien que les contaminants organiques, tels les HAP, y sont pourtant plus concentrés que dans les échantillons d'eau interstitielle. Des études sont présentement en cours dans les laboratoires d'Environnement Canada afin d'optimiser l'emploi du SOS Chromotest^{MC} pour détecter l'activité génotoxique des extraits organiques.

Des analyses discriminantes ont démontré que les concentrations de HAP dans les sédiments peuvent prédire les résultats du SOS Chromotest^{MC} (Côté *et al.*, 1998a). De plus, la plupart des échantillons d'eau interstitielle, qui s'étaient avérés génotoxiques avec cet essai, concordaient avec les résultats des échantillons de sédiments ayant démontré une réduction de la survie des invertébrés benthiques (90% de concordance entre la réponse du SOS Chromotest^{MC} et une diminution significative de la survie de *H. azteca* et *C. riparius*).

Ces résultats suggèrent, à l'heure actuelle, que le SOS Chromotest^{MC} sur l'eau interstitielle est le plus utile pour détecter la présence d'agents génétoxiques. L'utilisation de cette phase particulière du sédiment limite toutefois le test à la détection de substances génétoxiques hydrophiles. L'optimisation de ce test sur la phase extrait organique permettrait d'isoler les contaminants lipophiles, tels que les HAP, reconnus comme substances d'intérêt pour la génotoxicité.

3.4 Étude interlaboratoire

L'étude interlaboratoire a été réalisée avec les cinq microbioessais qui semblaient les plus prometteurs d'après les résultats des deux séries d'essais. Six laboratoires ont participé à cette étude : le Centre Saint-Laurent, l'Institut de Recherche en Biotechnologie, EBPI, BEAK International inc. (laboratoires de Dorval et Brampton, On) et le Cemagref – Division biologie des écosystèmes aquatiques (Lyon, France).

Le but de cette étude était d'évaluer la répétabilité et la réplicabilité des microbioessais sélectionnés. On entend par répétabilité (variabilité intralaboratoire), la variabilité des résultats obtenus lors de différents tests réalisés dans un même laboratoire, sur un même échantillon, par une même équipe, avec le même matériel et dans un court laps de temps. La réplicabilité (variabilité interlaboratoire) réfère quant à elle à la variabilité des résultats obtenus pour un même test réalisé par différents laboratoires sur un même échantillon (ASTM, 1992; Burton *et al.*, 1996b).

Le Tableau 6 présente, de façon synthétisée, la répétabilité et la réplicabilité de chacun des microbioessais sélectionnés.

Tableau 6 : Répétabilité et réplicabilité des microbioessais sélectionnés

Bioessai	Répétabilité	Réplicabilité
Essai avec l'hydre (eau interstitielle)	-	bonne
Thamnotoxkit F ^{MC} (eau interstitielle)	bonne	bonne
Essai algal en phase solide (sédiment entier)	-	bonne
Essai ATP (sédiment entier)	bonne	bonne
SOS Chromotest ^{MC} (extraits organiques)	-	passable

- : non disponible.

Bonne répétabilité : faible valeur de k^1 (statistique de consistance)

Bonne réplicabilité : aucune différence significative entre les résultats obtenus par les différents laboratoires, faible valeur de h^2 (statistique de consistance) ou faible coefficient de variation.

Réplicabilité passable (SOS Chromotest^{MC}) : grande variabilité entre les résultats (évaluation qualitative).

Dans l'ensemble, ces microbioessais présentaient une bonne réplicabilité, donc une faible variabilité interlaboratoire. Le SOS Chromotest^{MC} est le seul microbioessai à ne pas présenter une bonne réplicabilité, ce qui est surprenant pour un essai aussi bien établi. Il

¹ La statistique de consistance k indique la façon dont se compare la variabilité d'un laboratoire, pour un échantillon, à tous les autres laboratoires (Burton *et al.*, 1996b).

² La statistique de consistance h indique dans quelle mesure la moyenne des résultats d'un laboratoire pour un échantillon donné se compare à la moyenne des résultats des autres laboratoires (Burton *et al.*, 1996b).

a par contre été difficile de qualifier la répétabilité pour certains bioessais, étant donné l'obtention de valeurs uniques comme résultats (CL_{50} , CMEQ, CSEO, etc.); les bioessais ayant été réalisés une seule fois.

4. Présentation des batteries suggérées

La méthodologie présentée précédemment a permis de proposer deux batteries de bioessais pour évaluer la toxicité de sédiments contaminés.

La première batterie vise le dépistage de la toxicité de plusieurs échantillons pour des organismes en contact direct avec les sédiments. Si les sédiments s'avèrent toxiques et présentent un danger pour les organismes aquatiques, d'autres essais seront effectués pour pousser plus loin l'analyse, d'où l'utilisation de la deuxième batterie de bioessais, dite de confirmation.

4.1 Première batterie (dépistage)

Comme il a été mentionné précédemment, la première batterie vise le dépistage de la toxicité des sédiments. L'objectif de l'utilisation de cette batterie est de définir le niveau de toxicité de la zone à l'étude en localisant les sites les plus toxiques, ce qui permettra d'optimiser les programmes d'échantillonnage des sédiments et de l'eau dans les sites où des travaux de caractérisation, de dragage ou de restauration sont prévus.

Les microbioessais sélectionnés pour faire partie de la première batterie sont l'essai algal sur phase solide et l'essai ATP. Il a été jugé plus approprié d'utiliser des microbioessais réalisés sur le sédiment entier, lors de cette étape de dépistage, plutôt que ceux réalisés sur l'eau interstitielle en raison du contact direct des organismes avec le sédiment.

En parallèle aux bioessais, il est également recommandé d'effectuer une série d'analyses physico-chimiques des contaminants susceptibles de se retrouver dans les sédiments. Ceci permettra de comparer les résultats des microbioessais aux concentrations de contaminants et aux substances toxiques naturellement présentes dans les sédiments, telles que l'azote ammoniacal, étant donné que certains microbioessais peuvent y être sensibles. Dans le suivi analytique, les contaminants de nature génotoxique devraient être inclus.

Le Tableau 7 présente les diverses conclusions qui pourraient être tirées des résultats des microbioessais et des analyses physico-chimiques considérés dans la première batterie.

Tableau 7 : Critères-guides pouvant servir de base à l'interprétation des résultats des microbioessais lors d'une phase de dépistage

Microbioessais	Analyses physico-chimiques	Conclusions/interprétation
+	+	Les contaminants semblent être biodisponibles et en quantité suffisante pour produire des effets néfastes.
+	-	Des contaminants non mesurés ou d'autres conditions causent une toxicité (p.ex. présence de concentrations importantes d'azote ammoniacal lors des tests).
-	+	Les contaminants ne semblent pas être biodisponibles ou encore en quantité suffisante pour produire des effets néfastes.
-	-	Aucun contaminant et aucune condition ne semble causer une toxicité mesurable. Les concentrations de contaminants ne semblent pas problématiques ni produire d'effets néfastes.

Note : (+) indique une réponse positive donc une différence significative des résultats du groupe témoin ou encore des concentrations élevées de contaminants (>seuil d'effet néfaste), tandis que (-) indique une réponse négative, soit l'absence de différence significative ou encore des concentrations peu élevées de contaminants (≤ seuil d'effets mineurs) (adapté de Chapman *et al.*, 1992).

Advenant les trois premières situations, il est recommandé de poursuivre l'analyse et ce, même si un seul des microbioessais est positif et/ou si un seul des contaminants est en concentration supérieure au seuil d'effet néfaste. C'est ici que s'insère la deuxième batterie.

4.2 Deuxième batterie (confirmation)

La deuxième batterie est constituée d'un (ou deux) bioessai(s) sur sédiment entier et de quatre microbioessais sur l'eau interstitielle. L'objectif de cette deuxième batterie est de valider les résultats de la première batterie et d'évaluer la (géo)toxicité des sédiments sur des organismes de différents niveaux trophiques. Les microbioessais sur l'eau interstitielle permettent également d'évaluer la toxicité de la colonne d'eau pour les organismes s'y retrouvant.

Les microbioessais retenus sont : un ou deux bioessais conventionnels sur sédiment entier (survie de *Hyaella azteca* et/ou *Chironomus riparius*) et quatre microbioessais sur l'eau interstitielle, soit avec une bactérie (Microtox® - toxicité aiguë), un consommateur primaire (Thamnotoxkit F^{MC} ou Daphtoxkit F^{MC}) et un consommateur secondaire (l'essai avec l'hydre).

Bien que les contaminants jugés génotoxiques (i.e. les HAP, Marvin *et al.*, 1995) se retrouveront en plus faible concentration dans l'eau interstitielle que dans les sédiments ou dans les extraits organiques (Harkey *et al.*, 1994), il est recommandé de réaliser le SOS Chromotest^{MC} avec des échantillons d'eau interstitielle, afin d'évaluer le potentiel génotoxique des sédiments. Les résultats des tests sur les extraits organiques, obtenus lors de la présente étude, ne permettent pas de recommander l'insertion de cet essai dans une batterie de bioessais. De plus, l'introduction de la génotoxicité comme variable d'effet dans des batteries d'essais toxicologiques est relativement récente et l'utilisation de tels résultats dans la gestion des sédiments soulève encore des questions. En effet, l'extrapolation d'effets sublétaux mesurés en laboratoire, tels la croissance ou la reproduction, est plus répandue et a été souvent corroborée avec des effets également mesurés sur le terrain (Sarakinis et Rasmussen, 1998).

Des études, présentement en cours, visant à comprendre les répercussions potentielles chez les communautés/populations liées à la présence de substances génotoxiques, apporteront des pistes quant à l'incorporation et l'interprétation des résultats d'essais de génotoxicité dans les stratégies de gestion. Enfin, ce projet n'a pas permis de mettre en évidence des relations entre les réponses génotoxiques obtenues avec les extraits organiques et celles obtenues avec les essais conventionnels, comme ce fut le cas (Tableau 3, section 3.1) avec les échantillons d'eau interstitielle.

Les critères-guides (Tableau 7) présentés dans la section précédente sont également applicables à cette deuxième batterie. Le Tableau 8 présente les deux batteries suggérées.

Tableau 8 : Batteries suggérées pour l'évaluation de sédiments contaminés

	Niveau trophique	Bioessais	Fraction
	Producteur primaire	• Essai algal phase solide	• Sédiment entier
Batterie 1 (dépistage)	Décomposeurs	• Essai ATP	• Sédiment entier
	Inclure une analyse physico-chimique de différents paramètres (p.ex. COT, granulométrie, métaux, HAP, BPC, NH ₃ , SEM et AVS) des sédiments entiers.		
Batterie 2 (confirmation)	Niveau trophique	Bioessais	Fraction
	Consommateurs primaires	• Bioessai conventionnel (survie de <i>H. azteca</i> et/ou <i>C. riparius</i>) • Thamnotoxkit F ^{MC} ou Daphtoxkit F ^{MC}	• Sédiment entier
	Consommateurs secondaires	• Essai avec l'hydre	• Eau interstitielle
	Décomposeurs	• Microtox® (toxicité aiguë) • SOS Chromotest ^{MC}	• Eau interstitielle • Eau interstitielle

Il est à noter qu'aucun microbioessai sur extraits organiques n'a été retenu dans les deux batteries, car le coût des extractions demeure à ce jour très élevé. Les microbioessais réalisés sur cette fraction sont donc moins coût-efficaces que ceux réalisés sur sédiment

entier ou l'eau interstitielle. Bien qu'ils semblent, selon cette étude, prédire efficacement la toxicité des sédiments, leur utilité dans un cadre de gestion reste à être démontrée.

Les deux batteries suggérées dans le cadre de cette étude constituent des outils de dépistage de la toxicité de sédiments contaminés. Elles pourront servir à optimiser des programmes d'échantillonnage des sédiments et de l'eau pour les sites où des travaux de restauration ou de dragage sont prévus. Une adaptation ou des modifications aux batteries proposées pourront être apportées dans les cas où la préoccupation se situe au niveau des effets des contaminants largués lors d'activités de dragage ou de dépôt en eau libre. Ainsi, la substitution de l'eau interstitielle par un éluat lors de tests de toxicité permettrait d'évaluer le danger potentiel relié à ce type d'activités (U.S. EPA, 1994). Cependant, il est à noter que la méthode de sélection élaborée dans le cadre de cette étude avait pour but de déterminer les microbioessais les plus aptes à détecter la toxicité du *sédiment entier*, telle que mesurée par les bioessais conventionnels, les analyses physico-chimiques et la structure de la communauté benthique. L'insertion d'autres essais pourrait s'avérer souhaitable pour ces types d'investigation.

5. Microbioessais prometteurs : leur relation avec les contaminants préoccupants et avec le délai analytique et les coûts

5.1 Contaminants préoccupants

Dans la matrice basée sur des critères scientifiques, la corrélation des résultats des bioessais avec la contamination des sédiments constituait un critère pour établir l'indice de performance. Les corrélations ont été évaluées pour plusieurs contaminants préoccupants. Il peut être intéressant, pour des gestionnaires, d'avoir une idée de la réponse des microbioessais aux contaminants et ce, pour éclairer leur décision quant au choix des microbioessais à réaliser pour évaluer la toxicité des sédiments. Il faut toutefois préciser que les résultats obtenus ne proviennent que d'un échantillonnage restreint (n=15 échantillons) et que les corrélations présentées ci-dessous ne peuvent être utilisées qu'à titre indicatif. Le Tableau 9 présente les microbioessais retenus et les contaminants préoccupants auxquels leurs résultats sont corrélés.

Tableau 9 : Microbioessais corrélés avec les concentrations de contaminants

Fraction	Microbioessais	Contaminants préoccupants
Sédiments	Survie <i>Hyalella azteca</i>	• BPC • HAP • Métaux
	Survie <i>Chironomus riparius</i>	• BPC • HAP • Métaux
	Essai ATP	• Métaux
	Essai algal phase solide	• Métaux
Eau Interstitielle	Microtox® microplaque	• ND
	Thamnotoxkit F ^{MC}	• ND
	Daphtoxkit F ^{MC}	• ND
	Essai avec l'hydre	• HAP
	SOS Chromotest ^{MC}	• HAP

ND : non déterminé

En ce qui concerne les BPC, les concentrations retrouvées dans les sédiments sont généralement en deçà des critères intérimaires (seuil d'effets mineurs) établis par Environnement Canada et le ministère de l'Environnement du Québec (1992), à l'exception des trois échantillons provenant des terminaux pétroliers dont les valeurs pour les BPC sont supérieures au seuil d'effets mineurs. Pour s'assurer de la sensibilité des microbioessais à ces contaminants, il est recommandé d'effectuer d'autres tests avec des échantillons reconnus comme étant contaminés par des BPC.

5.2 Délai analytique et coûts

D'autres critères, importants pour les gestionnaires de projets, peuvent être pris en compte dans le choix d'une batterie de bioessais, notamment, les délais analytiques et les coûts reliés à l'évaluation de la toxicité de sédiments contaminés. Le Tableau 10 présente les microbioessais retenus en fonction du délai analytique et des coûts par échantillon.

Tableau 10 : Microbioessais prometteurs versus le délai analytique et les coûts

Délai analytique ¹ /coûts ²	Microbioessais
Court/faible	• Essai ATP • Thamnotoxkit F^{MC}
Court/élevé ³	• Microtox® microplaque • Essai algal phase solide • SOS Chromotest^{MC}
Moyen/faible	• Daphtoxkit F^{MC}
Long/faible	• Essai avec l'hydre

1 : Temps écoulé entre l'arrivée de l'échantillon et le résultat : court - 1 journée, moyen - 2 à 4 jours, long - plus de 5 jours.

2 : Tient compte du coût du matériel et des instruments analytiques: faible - moins de 5000\$, élevé - plus de 10 000\$ (somme du coût du matériel et de celui des instruments analytiques).

3: Frais d'amortissement du cytomètre en flux non inclus.

Les coûts analytiques ne comprennent pas les coûts reliés au traitement des échantillons pour obtenir la fraction d'essai et à la main d'oeuvre. Ils font seulement référence aux coûts du matériel pour l'évaluation de la toxicité d'un échantillon en tenant compte également de celui des instruments analytiques requis.

Une brève description de chacun des microbioessais prometteurs est présentée à l'Annexe A.

6. Outils pour l'interprétation des résultats des microbioessais

Comme il a été mentionné à la section 3.1, des critères toxicologiques ont été définis pour tous les bioessais utilisés dans le cadre de cette étude. En plus de permettre d'évaluer la performance des microbioessais par rapport aux essais conventionnels, ces critères peuvent servir d'indication pour les gestionnaires et les personnes réalisant les essais pour interpréter les résultats des tests. Par contre, ils ne constituent nullement des critères à être appliqués de manière universelle. Il serait préférable que les résultats pour chaque projet soient utilisés pour définir des critères en se basant sur le gradient de réponses obtenues.

Cette section présente les critères établis dans le cadre de cette étude qui ont servi à définir le niveau de danger d'un échantillon de sédiment pour chacun des microbioessais retenus dans les deux batteries (Tableau 11). Il faut se référer à la section 3.1 pour les détails sur la méthode qui a permis de définir les critères.

Tableau 11 : Critères pour établir le niveau de danger des échantillons

Microbioessais	Peu ou pas de danger	Danger modéré	Danger élevé
Sédiments			
Survie de <i>Hyalella azteca</i> (%)	≥60	30-59	<30
Survie de <i>Chironomus riparius</i> (%)	≥60	30-59	<30
Essai algal phase solide (CME0, %poids humide sédiment/volume)	≥10	0,5-9,9	<0,5
Essai ATP (Unité Relative de Lumière/g poids sédiment humide)	≥1,0E07	4,0E06 - 9,9E06	<4,0E06
Eau interstitielle			
Microtox® microplaque (CL ₅₀ , %v/v)	≥60	15-59	<15
Thamnotoxkit F ^{MC} (CL ₅₀ , %v/v)	≥80	30-79	<30
Daphtoxkit F ^{MC} (CL ₅₀ , %v/v)	≥80	30-79	<30
Essai avec l'hydre (CSE ¹ %v/v)	≥60%	15-59	<15%
SOS Chromotest ^{MC} (facteur d'induction)	<1,2	1,2-1,5	>1,5

1 : Concentration du seuil d'effet : moyenne géométrique de la CME0 et CSE0.

Ces critères, tel que discuté précédemment, ont été définis à partir des résultats de tous les essais réalisés sur 15 échantillons de sédiments. Des essais supplémentaires sur des échantillons de sédiments provenant d'autres sites que ceux étudiés dans le cadre de ce projet devraient être effectués afin de vérifier leur précision et leur application sur une large gamme de sédiments.

7. Conclusion et recommandations

Cette étude de collaboration d'envergure aura permis d'évaluer et de sélectionner les microbioessais les plus prometteurs en terme de prédiction de la toxicité des sédiments, laquelle était traditionnellement évaluée avec des bioessais conventionnels utilisant des invertébrés benthiques. Elle aura également permis de mettre au point de nouveaux essais de dépistage de la toxicité des sédiments (essai ATP et essai algal sur phase solide). À partir de ces résultats, deux batteries de bioessais de niveaux trophiques différents ont été établies, afin de dépister et d'évaluer la toxicité de sédiments contaminés. Ces batteries pourront être utilisées dans le cadre de projets de gestion de sédiments contaminés et être intégrées dans une approche en triade, i.e. conjointement à des évaluations physico-chimiques et de la structure de la communauté benthique. Cette approche est définie comme étant une des plus appropriées pour évaluer la toxicité des sédiments, puisqu'elle combine une batterie de bioessais, une série d'analyses physico-chimiques des sédiments et une évaluation de la structure de la communauté benthique (Day *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1996).

Les microbioessais composant les batteries sont des essais réalisés sur l'eau interstitielle ou sur des sédiments entiers. Bien que les microbioessais effectués sur des extraits organiques aient démontré de bonnes concordances avec les essais conventionnels, la contamination des sédiments et la structure de la communauté benthique, ils n'ont pas été inclus dans les batteries car leur utilité dans un contexte de gestion reste à être confirmée.

La présente étude a également permis de développer des critères de toxicité aidant à interpréter les résultats de chacun des bioessais à l'étude, qui pourront servir de guide aux gestionnaires de projet et au personnel de laboratoire, dans l'élaboration de critères spécifiques à un projet donné.

Étant donné que la plupart des microbioessais retenus dans les deux batteries ne sont pas des essais normalisés, certaines recommandations sont proposées en ce qui a trait à la poursuite de leur validation. Ces recommandations ne limitent en rien l'utilisation des microbioessais comme outils de dépistage de la toxicité de sédiment entier dans une stratégie d'évaluation de leur degré de contamination. Elles ne consistent qu'à proposer des avenues de recherche qui pourront améliorer les batteries mises au point, afin d'évaluer le plus adéquatement possible la toxicité des sédiments. Ainsi, il est recommandé :

- de réaliser des tests additionnels avec l'essai utilisant l'hydre, afin de confirmer ou d'infirmer sa sensibilité à l'azote ammoniacal;
- de poursuivre la validation des microbioessais qui ne sont pas encore normalisés et appliqués couramment par la communauté scientifique (essai algal phase solide, essai ATP et essai avec l'hydre) et ce, par des tests additionnels sur d'autres sédiments contaminés et des études interlaboratoires plus exhaustives, afin de vérifier et d'assurer la répétabilité et la répliquabilité des microbioessais;

- de développer des essais de toxicité sur sédiment entier de type chronique, afin d'estimer les effets à long terme d'activités reliées à la gestion de sédiments contaminés (p.ex. dragage);
- de jauger l'utilité des bioessais réalisés sur extraits organiques pour évaluer la (géo)toxicité des sédiments.

Ces recommandations font déjà l'objet de travaux en cours dans les laboratoires du Centre Saint-Laurent et de BEAK International incorporée.

8. Références

- Adam, W. J., Kimerle, R. A. et J. W. Barnett. 1992. *Sediment quality and aquatic life assessment*. Environ. Sci. Technol. 26(10) : 1865-1875.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1992. *Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method*. E-691-92. Dans *Annual Book of ASTM Standards*. Vol. 14.02. Philadelphie, PA, USA.
- Aqua Survey Inc. 1993. *Daphnia I.Q. toxicity test kit™ instructions (revised)*. 4 p.
- Blaise, C. 1991. *Microbiotests in aquatic ecotoxicology : characteristics, utility and prospects*. Environ. Toxicol. Wat. Qual. 6 : 145-155.
- Blaise, C. et L. Ménard. 1998. A micro-algal solid phase tests to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual. Res. J. Canada*. 33(1): in press.
- Blaise, C., R. Forghani, R. Legault, J. Guzzo et M.S. Dubow. 1994. *A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and microtox reagent*. Biotechniques 16 : 932-937.
- Burton, A.G., Jr. 1991. *Assessing freshwater sediment toxicity*. Environ. Toxicol. Chem. 10 : 1585-1627.
- Burton, A.G., Jr., C. E. Ingersoll, L. C. Burnett, M. Henry, M. L. Himan, S. J. Klaine, P. F. Landrum, P. Ross et M. Tuchman. 1996a. *A comparison of sediment toxicity tests at three Great Lakes Areas of Concern*. J. Great Lakes Res. 22(3) : 495-511.
- Burton, A.G., Jr., Norberg-King, T.J., Ingersoll, C.G., Benoit, D.A., Ankley, G.T., Winger, P.V., Kubitz, J., Lazorchak, J.M., Smith, M.E., Greer, E., Dwyer, F.J., Call, D.J., Day, K.E., Kennedy, P. et M. Stinson. 1996b. *Interlaboratory study of precision : Hyalella azteca and Chironomus riparius freshwater sediment toxicity assays*. Environ. Toxicol. Chem. 15(8) : 1335-1343.
- Chapman, P.M. 1986. *Sediment quality criteria from sediment quality triad : an example*. Environ Toxicol. Chem. 5 : 957-964.
- Chapman, P.M., Power, E.A. et G.A. Burton, Jr. 1992. *Integrative Assessments in Aquatic Ecosystems*. Dans *Sediment toxicity assessment*. Éditeur G. Allen Burton, Jr. Lewis Publishers, inc., Boca Raton.
- Charm Sciences Inc. 1995. *Microbial water quality*, Malden, MA.
- Côté, C., C. Blaise, J.-R. Michaud, L. Ménard, S. Trottier, F. Gagné, P. Riebel et R. Lifshitz. 1998a. *Comparisons between micro-scale and whole sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment*. Environ. Toxicol. Water Qual. 13 : 93-110.

- Côté C., C. Blaise, J. Schroeder, M. Douville et JR Michaud. 1998b. *Investigating the adequacy of selected micro-scale bioassays to predict the toxic potential of freshwater sediments through a tier process*. Water Qual. Res. J. Canada 33(2):253-277.
- Creative Selling. 1992a. *Thamnotoxkit FTM Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Standard operational procedure. 23 p. V241092.
- Creative Selling. 1992b. *Rotokit FTM Rotifer toxicity screening test for freshwater*. Standard operational procedure. 22 p. V241092.
- Creative Selling. 1996a. *Algaltokit FTM Freshwater toxicity test with microalgae*. Standard operational procedure. 28 p. V241092.
- Creative Selling. 1996b. *Daphtokit FTM Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Standard operational procedure. 16 p. V241092.
- Davis, W.S. et J.E. Lathrop. 1992. *Freshwater Benthic Macroinvertebrate Community Structure and Function*. Dans *Sediment classification methods compendium*. U.S. EPA, Washington.
- Day, K.E., B.J. Dutka, K.K. Kwan, N. Batista, T.B. Reynoldson et J.L. Metcalfe-Smith. 1995. *Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and in situ benthic community structure*. J. Great Lakes Res. 21 : 192-206.
- Dutka, B.J. K. Teichgräber et R. Lifshitz. 1995. *A modified SOS-Chromotest procedure to test for genotoxicity and cytotoxicity in sediments directly without extraction*. Chemosphere 31 : 3273-3289.
- Environmental Bio-detection Products Inc. (EBPI). 1995. *ToxiChromoPadTM - Instructions for use*. 6 p. Version 3.1.
- Environment Canada. 1992a. *Biological test method : toxicity test using luminescent bacteria (Photobacterium phosphoreum)*. Report EPS 1/RM/24. Environmental Protection Series, Ottawa.
- Environment Canada. 1992b. *Biological test method : toxicity test using the green algae (Selenastrum capricornutum)*. Report EPS 1/RM/25. Environmental Protection Series, Ottawa.
- Environnement Canada. 1996. *Test for growth and survival in sediment using the freshwater amphipod Hyalella azteca*. Environmental Protection Series. Rapport EPS 1/RM/ final-draft manuscript. 101 p.
- Environnement Canada. 1997. *Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius)*. Environmental Protection Series. Rapport EPS 1/RM/ final-draft manuscript. 105 p.

- Environnement Canada et ministère de l'Environnement du Québec. 1992. *Critères intérimaires pour l'évaluation de la qualité des sédiments du Saint-Laurent*. Centre Saint Laurent, Montréal, Qc. 28 p.
- Fish, F., I. Lampert, A. Halachami, G. Riesenfeld et M. Herzberg. 1987. *The SOS Chromotest kit, a rapid method for the detection of genotoxicity*. Toxic. Assess. 2 : 135-147.
- Fu, L.-J., R.E. Staples et R.G. Stahl, Jr. 1991. *Application of the Hydra attenuata assay for identifying developmental hazards among natural waters and wastewaters*. Ecotox. Environ. Saf. 22 : 309-319.
- Gagné, F. et C. Blaise. 1995. *Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes*. Toxicol. Letters 78, 175-182.
- Giesy, J.P., C.J. Rosiu et R.L. Graney. 1990. *Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water*. Environ. Toxicol. Chem. 9 :233-248.
- Harkey, G.A., Landrum, P.F. et S.J. Klaine. 1994. *Comparaison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays*. Environ. Toxicol. Chem. 13(8) : 1315-1329.
- Marvin, C.H., Lundrigan, J.A., McCarry, B.E. et D.W. Bryant. 1995. *Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from coal-tar-contaminated sediment*. Environ. Toxicol. Chem. 14(12) : 2059-2066.
- Ménard, L. 1996. *Estimation du potentiel toxique des sédiments d'eau douce à l'aide d'un essai de contact direct avec des micro-algues*. Environnement Canada – Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-71, 43 p.
- Microbics Corporation. 1995. *Microtox® M500 Manual. A toxicity testing handbook*. Version 3.
- Power, E. A. et P. M. Chapman. 1992. *Assessing sediment quality*. Dans Sediment toxicity assessment. Éditeur G. Allen Burton, Jr. Lewis Publishers, inc., Boca Raton.
- Sarakinos et J. B. Rasmussen. 1998. Use of bioassay - based whole effluent toxicity (WET) tests to predict benthic community response to a complex industrial effluent. Journal of aquatic ecosystem stress and recovery (soumis).
- Trottier, S. 1995. *Mise au point d'un test de dépistage des effets toxiques létaux et sublétaux (tératogénicité) avec le coelentéré d'eau douce Hydra attenuata*. Environnement Canada-Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent, Montréal, Québec, Rapport scientifique et technique ST-32, 30 p.

- US Environmental Protection Agency. 1994. *ARCS assessment guidance document*. EPA-905-B94-002. Great Lakes National Program Office, Chicago, IL, 247 p.
- US Fish and Wildlife Service, Environment Ontario, National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Army Corps of Engineers, Waters Sewerage Department of Detroit, Michigan Department of Natural Resources, U.S. EPA, Environment. 1988. *Final report of the upper Great Lakes connecting channels study. Vol. II*. 626 p.
- Wilhm, J.L. et T.C. Dorris. 1968. *Biological parameters for water quality criteria*. Bioscience 18:477-481.

A

Annexe A
Description des microbioessais

DESCRIPTION SOMMAIRE DES MICROBIOESSAIS SÉLECTIONNÉS AU COURS DE CETTE ÉTUDE

Essai algal sur phase solide

Référence :

Ménard, L. 1996. *Estimation du potentiel des sédiments d'eau douce à l'aide d'un essai de contact direct avec des micro-algues*. Environnement Canada. - Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-71, 43 pages.

L'essai est basé sur l'inhibition de l'activité des estérases chez les algues. L'inhibition est mesurée à l'aide d'un fluorochrome, le diacétate de fluorescéine (DAF). L'intensité de la fluorescence dépendra de l'état physiologique des algues. Une algue saine émettra une forte intensité de lumière tandis qu'elle diminuera chez une algue atteinte par un stress toxique. La cytométrie en flux est utilisée pour la lecture des données de fluorescence. La procédure de l'essai se fait comme suit : un volume de 20 mL d'algues (1×10^6 cellules / mL) de l'espèce *Selenastrum capricornutum* est prélevé d'une culture stérile de 6 à 7 jours puis transféré dans une éprouvette. À ce volume, 2 g de sédiment témoin sont ajoutés. Ces deux étapes sont répétées pour le sédiment test. La concentration de sédiment la plus élevée est donc de 10 %. À partir de celle-ci, des dilutions 1:2 (10:20) sont effectuées jusqu'à l'obtention d'une concentration de 0,16 %. Des triplicatas sont préparés pour chacune des concentrations de sédiments et pour le témoin. Les éprouvettes sont scellées hermétiquement avec une pellicule de parafilm puis mises dans un agitateur sous rotation continue (25 RPM) à la température de la pièce. Une décantation de 5 minutes est réalisée aux temps d'incubation de 4 et 24 h afin d'éliminer les particules sédimentaires de plus de 25 μm . Un aliquote de 2 mL est ensuite prélevé du surnageant à chaque concentration, puis 10 μL de DAF sont ajoutés. Après une période de 15 minutes, les tubes sont passés au cytomètre pour la lecture de la fluorescence liée à l'activité enzymatique. Les CMEO, CSEO ou CI_{50} sont les paramètres de mesure calculés avec cet essai.

Essai ATP

Référence :

Charms Science inc. 1995. *Microbial water quality*. Malden, MA.

Cet essai utilise le contenu cellulaire d'adénosine triphosphate (ATP) comme mesure de la viabilité de la biomasse microbienne dans chaque échantillon. L'ATP est mesurée à l'aide d'une trousse luciférine/luciférase. Environ 2 g de sédiments humides sont placés dans un tube de verre de 8 mL contenant de l'eau déchlorée et le tout est mélangé pendant 5 min. Le tube doit reposer pendant 3 min avant qu'un aliquote de 1 mL soit retiré pour

mesurer l'ATP. Les cellules microbiennes sont recueillies sur un filtre de 45 µm et les cellules sont par la suite lysées afin de libérer l'ATP qu'elles contiennent. La luciférase est ensuite ajoutée et le tube est agité pour quelques secondes. Le substrat (luciférine) est ajouté et la luminescence est mesurée après 20 secondes grâce à un luminomètre 400. La quantité de lumière produite reflète la quantité d'ATP présente qui elle reflète la biomasse microbienne. Les résultats sont exprimés en Unité Relatives de Lumière (URL) par g de sédiment en poids sec.

Essai Microtox® en microplaque

Référence :

Blaise, C., R. Forghani, R. Legault, J. Guzzo et M.S. Dubow. 1994. *A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and microtox reagent*. Biotechniques 16 : 932-937.

Des dilutions des échantillons sont préparées, à partir de 150 µl, dans des microplaques de polystyrène transparent de 96 puits. Quatre-vingts µl de diluant sont pipettés à l'aide d'une micropipette et placés dans chacun des puits d'une microplaque de plastique blanc opaque. Les bactéries (Microtox reagent, une culture congelée à sec de *Vibrio fischeri*) sont reconstituées et 0,3 mL est transféré dans un tube de verre contenant 2,7 mL de diluant. Vingt µl de la solution contenant les bactéries diluées sont pipettés dans chaque puits de la microplaque opaque et incubés à 15°C pendant 15 min. La luminescence initiale est mesurée grâce au ML1000 Microplate Luminometer (Dynatech Laboratories). Immédiatement après, 100 µl sont pris des puits contenant les échantillons et transférés dans les puits correspondants de la microplaque opaque. Les lectures de luminescence sont prises après 15 min. Les valeurs de CI_{50} sont calculées en utilisant l'analyse de régression linéaire.

Thamnotoxkit F^{MC}

Référence :

Creative Selling. 1992a. *Thamnotoxkit FTM Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Standard operational procedure. 23 p. V241092.

Le Thamnotoxkit F^{MC} est une trousse disponible commercialement (Creative Selling Limited, Deinze, Belgique) servant à réaliser des tests de toxicité aiguë pour l'eau douce. L'organisme d'essai est le micro-crustacé *Thamnocephalus platyurus* (Creative Selling, 1992). Les organismes arrivent sous forme de kystes. Ils sont incubés pendant 24 à 48 heures pour permettre l'éclosion. Lorsqu'éclos, les organismes sont placés dans des microplaques contenant de l'eau interstitielle et celles-ci sont incubées à la noirceur à 25°C pendant 24 h. Les organismes ayant survécu sont observés au binoculaire et la CL_{50} est calculée en utilisant la méthode probit.

Daphtoxkit F^{MC}

Référence :

Creative Selling. 1996a. *Daphtoxkit FTM Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Standard operational procedure. 16 p. V241092.

Le Daphtoxkit^{MC} F est constitué d'une trousse comprenant tout le matériel nécessaire à la réalisation d'essais biologiques avec *Daphnia magna*, incluant les organismes sous forme de kystes "dormants" ou éphippies. Le principe de l'essai est le même que celui de l'essai conventionnel d'une durée de 48 h. Les éphippies sont d'abord placés dans un milieu de culture dont les conditions environnementales favorisent l'éclosion des œufs ou kystes. Des néonates apparaissent après 3 à 4 jours d'incubation et ceux-ci sont utilisés pour débiter les essais. Après 48 h d'exposition aux échantillons d'eau interstitielle, la mortalité des daphnies est enregistrée et une CL₅₀ est alors calculée.

Essai avec l'hydre - *Hydra attenuata*

Références :

Blaise, C. et T. Kusui. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. Environ. Toxicol. Water Qual. 12: 53-60.

Fu, L.-J., R.E. Staples et R.G. Stahl, Jr. 1991. *Application of the Hydra attenuata assay for identifying developmental hazards among natural waters and wastewaters*. Ecotox. Environ. Saf. 22 : 309-319.

Johnson, E.M., Gable, B.E.G., Newman, L.M. et R. Giacobbe. 1990. *The hydra assay manual : a practical guide to the supplies, techniques and mechanics of the assay*. Department of anatomy and development biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA.

Trottier, S. 1995. *Mise au point d'un test de dépistage des effets toxiques létaux et sublétaux (tératogénicité) avec le coelentéré d'eau douce Hydra attenuata*. Environnement Canada-Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent, Montréal, Québec, Rapport scientifique et technique ST-32, 30 p.

Pour les conditions de culture, se référer à Johnson *et al.*, 1990. Brièvement, trois hydres adultes sont placées dans un puits de microplaque de 12 puits contenant 4 mL de l'échantillon à tester. Sept concentrations sont préparées en triplicata. Les organismes sont exposés pendant 48 et 96 heures à 23°C ± 1°C. Les hydres sont observées quotidiennement au microscope pour relever tout changement morphologique. Les observations relevées au niveau des tentacules et du corps pour les organismes d'essai sont comparées à celles des organismes contrôles. En présence d'une substance toxique, l'hydre peut montrer des signes mineurs d'intoxication (tentacules bulbés) ou subir des dommages plus importants (raccourcissement) pouvant aller jusqu'à la mort (stade tulipe). Cette dernière se traduit par la désintégration de l'organisme. La concentration

minimale avec effet observé est définie par la concentration causant l'apparition de tentacules bulbées. Les CL_{50} sont calculées pour 48 et 96 heures d'exposition.

SOS Chromotest^{MC}

Référence :

Fish, F., I. Lampert, A. Halachami, G. Riesenfeld et M. Herzberg. 1987. *The SOS Chromotest kit, a rapid method for the detection of genotoxicity*. Toxic. Assess. 2 :135-147.

La trousse SOS Chromotest^{MC} (Environmental Biodetection Products inc., Brampton, ON) est utilisée pour mesurer la génotoxicité des échantillons d'eau interstitielle et d'extraits organiques. Les bactéries *E. coli* PQ37 modifiées génétiquement sont incubées à 37°C pour deux heures avec les échantillons. Après l'incubation, l'activité de la β -galactosidase est mesurée par mesures spectrophotométriques et reflète la génotoxicité des sédiments. L'activité de l'alkaline phosphatase, qui procure une mesure indirecte de la viabilité cellulaire est également mesurée. Chaque échantillon est testé en présence ou non d'une solution d'activation métabolique. Les résultats sont positifs quand la valeur du facteur d'induction est supérieure à 1,2, et négatifs si la valeur est inférieure à 1,2.

B

Annexe B

Articles scientifiques

Comparisons between Microscale and Whole-Sediment Assays for Freshwater Sediment Toxicity Assessment

Chantale Côté,¹ Christian Blaise,² Jean-René Michaud,³ Lucie Ménard,² Sylvain Trottier,² François Gagné,² Ran Lifshitz⁴

¹ BEAK International Incorporated, 455 Boulevard Fénélon, Suite 104, Dorval, Québec, Canada, H9S 5T8

² St. Lawrence Center, Environment Canada, 105 McGill Street, Montréal, Québec, Canada, H2Y 2E7

³ Environment Canada, Technological Development Division, 105 McGill Street, Montréal, Québec, Canada, H2Y 2E7

⁴ Environmental Biodetection Products, Inc., 14 Abacus Road, Brampton, Ontario, Canada, L6T 5B7

Received 16 January 1997; revised 14 May 1997; accepted 18 June 1997

ABSTRACT: The use of several microscale assays for evaluating freshwater sediment toxicity was investigated to develop a representative and cost-effective test battery. The bioassays evaluated (18 assays total) included microscale assays performed on solid-phase, pore water, and organic extracts as well as conventional standardized whole-sediment assays with *Chironomus riparius* and *Hyalella azteca* on 10 sediment samples collected in the St. Lawrence/Great Lakes system. Selected sediment physical and chemical characteristics were also conducted to aid in the interpretation of results. Benthic invertebrate assays such as *C. riparius* and *H. azteca* endpoints were found to correlate well to contaminant levels. Microscale assays such as ATP (adenosine triphosphate) measurement of sediment microbial biomass gave promising results to predict whole-sediment toxicity to benthic invertebrates. Most assays on pore water did not adequately represent whole-sediment toxicity, whereas organic extracts appeared to be more representative, alleviating some potential confounding factors such as interference due to toxicity caused by ammonia. © 1998 by John Wiley & Sons, Inc. *Environ Toxicol Water Qual* 13: 93–110, 1998

Keywords: sediment toxicity; microscale assay; extract; pore water; contaminants

INTRODUCTION

High levels of contaminants in aquatic sediment may cause irreversible adverse effects to organisms that inhabit contaminated regions of indigenous ecosystems.

Correspondence to: Chantale Côté

For example, several researchers have noted consistent association between the frequency of idiopathic lesions in aquatic biota and the contamination of the underlying sediment (e.g., Malins et al., 1984; Mix, 1986; Gardner et al., 1991). Remedial action requires a realistic assessment of the hazard posed to humans and aquatic wildlife. Historically, analytical chemistry has played an

important role in contaminant identification and subsequent hazard assessment. However, it is now widely accepted that realistic hazard assessment requires the use of toxicological methods that have the ability to integrate the effects of all components, both known and unknown, in a complex environmental matrix (U.S. EPA, 1994; Keddy et al., 1995).

Effective assessment of sediment toxicity requires cost-effective screening tools. For example, microscale assays for the toxicity assessment of complex environmental mixtures are becoming increasingly popular (Blaise, 1991). These assays possess several attributes that make them attractive choices for inclusion in a comprehensive battery of bioassays. These aforementioned attributes include small sample requirement, high sample throughput, low cost, and ease of operation. Popular choices include microbial assays such as the bacterial bioluminescence test (Microtox®) and crustacean assays such as the *Daphnia magna* test. These assays have been successfully employed to evaluate pore water toxicity and whole-sediment toxicity (Dutka and Kwan, 1988; Giesy et al., 1988; 1990; Giesy and Hoke, 1989; Becker et al., 1990; Schubauer-Berigan and Ankley, 1991; Ankley et al., 1992; Benton et al., 1995; Day et al., 1995a). While recently developed microscale assays deserve attention and consideration, few research efforts have critically evaluated their efficacy and reliability.

The goal of this paper is to evaluate a wide range (16) of microscale assays for freshwater sediment (geno)toxicity assessment. This was accomplished through comparisons with well-known whole-sediment bioassays using the benthic invertebrates *Hyaella azteca* and *Chironomus riparius*. More specifically, the objectives were (1) to investigate the ability to discriminate between natural and anthropogenic substances, (2) to conduct a preliminary selection of promising assays for short-term toxicity assessment, (3) to identify those microscale assays that consistently predict whole-sediment toxicity measured using benthic invertebrates, and, finally, (4) to investigate the use of sediment organic and pore water extracts as surrogates for whole sediment.

This work is part of a three year research program aimed at selecting a multitrophic test battery to effectively assess freshwater sediment toxicity. At this initial stage, promising assays will be selected primarily on the basis of their ability to predict whole-sediment toxicity. Those microscale assays that meet this criterion will be subjected to further evaluation. Subsequent evaluation will include repeated testing and further scrutiny taking into consideration attributes such as cost, ecological relevance, sample throughput, sensitivity, and ease of operation.

METHODS

Site Description and Sample Collection

Sediment samples from three areas in the St. Lawrence River system were collected by Ponar dredge during the fall of 1995. Three samples were taken from the petroleum terminals in the Montreal Harbor. Five samples were collected in Lakes St. Francis and St. Louis (west of Montreal). Two additional samples were provided by the National Water Research Institute (Burlington): Hamilton Harbor in Lake Ontario and Long Point in Lake Erie. Sites in Lake St. Francis were initially selected for high levels of inorganic contaminants. Previous studies at Hamilton Harbor and Long Point indicated that these two sites can provide suitable positive and negative control sediments, respectively (e.g., Krantzberg and Boyd, 1992; Mayer and Nagy, 1992; Day et al., 1994, 1995b).

Sediments were placed in polyethylene buckets lined with food grade polyethylene bags and transported to the laboratory where they were maintained at 4°C until processing. Samples were homogenized by hand prior to whole-sediment toxicity testing or pore water extraction.

Pore Water Extraction

Sediment pore water was extracted by centrifugation within 2–3 weeks after sediment collection. Samples were centrifuged for 30 min at 3000 g in 1 L bottles at 4°C. Supernatant was then removed and placed in 50 mL tubes for a second centrifugation at 7200 g for 40 min at 4°C. Supernatant aliquots were combined, redistributed into completely filled 50 mL plastic tubes, and immediately refrigerated at 4°C. All liquid-phase assays and pore water chemical characterizations were carried out within 24 h of sediment processing.

Organic Extraction and Cleanup

Sediment extracts were prepared via Soxhlet extraction with dichloromethane. Approximately 100 g of wet sediment was dried with magnesium sulfate and transferred to an extraction thimble. Samples were extracted with 600 mL of dichloromethane (DCM) for 18 h at 5–6 cycles per hour. Extracts were reduced to approximately 5 mL via rotary evaporation. Sample cleanup employed either gel permeation or silica gel chromatography. Gel permeation chromatography (GPC; i.e., EPA method 3640) removes lipids and other high molecular weight substances that can hamper the performance of aqueous bioassays. Silica gel cleanup preceded PCB quantification via gas chromatography.

Prior to toxicity assessment, DCM extracts were placed in high-purity dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 2.5 g equivalent of dry sediment per milliliter. Extracts were stored at room temperature. Selected microscale assays were performed within 5 days of solvent exchange.

Physical and Chemical Analyses

Particle size distribution of sediment samples were determined by LVM Tech, Laval, Quebec. The techniques employed involved wet sieving for particles greater than 80 μm and hydrometer for particles smaller than 80 μm .

Organic contaminants [polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)] were measured in both pore water and organic extracts. Subsamples of post-GPC material were dissolved in pesticide grade benzene and PAH concentrations (21 compounds) were measured via gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) in selected ion monitoring mode. PCB concentrations were measured using gas chromatography/electron capture detection (GC/ECD).

A standard EPA liquid extraction procedure was used for pore water organic extraction, PAH and PCB measurements (U.S. EPA, 1983). Liquids samples were spiked with internal standards prior to extraction to assess analytical recovery efficiency. Mean recoveries of 3, 4, and 5 ring PAH ranges from 55 to 85%.

Method detection limits reached for organic analyses ranged from 0.01 to 0.05 $\mu\text{g/L}$ for aromatic hydrocarbons and 0.1 $\mu\text{g/L}$ for polychlorinated biphenyls in pore water samples and were evaluated at 0.1 mg/kg for both classes of substances in sediment samples.

Metals and acid volatile sulfides (AVS) in sediment and pore water samples were extracted using the AVS-simultaneously extracted metals (SEM) procedure of Allen et al. (1993). Metals concentrations were determined using inductively coupled plasma (ICP) method.

Ammonia concentrations in sediment and pore water samples were determined using a colorimetric method from EPA (U.S. EPA, 1979). Total organic carbon and dissolved organic carbon in sediment and pore water were measured using standard techniques (Clesceri et al., 1989).

Bioassays

Bioassays performed on whole sediments, pore water, and sediment extracts are listed in Table I. Assays for which a standard Environment Canada protocol is available are not described here (e.g., growth inhibition of the green alga *Selenastrum capricornutum*). For

methodological details concerning these tests, the reader is referred to the appropriate references in Table I. Less conventional procedures are briefly described below.

SOS Chromotest

The SOS Chromotest kit [Environmental Biodetection Products, Inc. (EBPI), Brampton, Ontario] using the procedure described by Fish et al. (1987) was used to measure genotoxicity in pore water samples. Genetically engineered *E. coli* PQ37 cells were incubated at 37°C for 2 h with the liquid samples. Postexposure β -galactosidase activity, under the express control of the SOS response pathway, was measured via spectrophotometric measurements and reflected the sample genotoxicity. Alkaline phosphatase activity, which provides an indirect measure of cell viability, was also measured. Each pore water extract was tested both in the presence and absence of a metabolic activation mixture (final concentration 1% v/v). Results were classified as positive when the induction factor value was greater than 1.2 and negative if the value was less than 1.2.

Hydra Assay (*Hydra attenuata*)

The static acute toxicity assay was conducted according to published methods (Fu et al., 1991; Trottier, 1995; Blaise and Kusui, 1997). Conditions for hydra maintenance and culturing are described elsewhere (Johnson et al., 1990). Briefly, three adult hydra were placed into each well of a 12-well tissue culture dish containing 4 mL of the sample to be tested. Seven concentrations were tested in triplicate. Animals were exposed for 48 and 96 h at 23°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) with morphological changes noted using daily microscopic observations. Observations were compared with normal animals with respect to the size and shape of body column and tentacles. Hydra with shortened tentacles and body (tulip phase), the phase which immediately precedes death of the polyp, are selected to determine the lethal endpoint. Tulip phase and/or dead hydra are scored and LC_{50} values are calculated for 48 and 96 h exposures.

Microtox-Based Microplate Assay

The Microtox-based microplate technique is fully described in Blaise et al. (1994). An abbreviated description of the test method follows. Sample dilutions with a total volume of 150 μL were prepared in standard 96-well polystyrene transparent microplate. Eighty microliters of diluent were micropipetted into each well of an opaque plastic white microplate. The bacteria (Microtox reagent, a freeze-dried culture of *Vibrio fischeri*) were reconstituted (Environment Canada, 1992a)

TABLE I. Selected biological tests—freshwater sediment (SED), interstitial water (IW), and organic extracts (EXT)

Assay/Test Organism	Assessment Endpoint	Exposure Period	Test Matrix	Laboratory	Reference
Conventional Sediment Assays (Standardized Protocols)					
Freshwater amphipod (<i>Hyalella azteca</i>)	Survival and growth	14 days	SED	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Environ. Canada (1994b)
Freshwater midges (<i>Chironomus riparius</i>)	Survival and growth	10 days	SED	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Environ. Canada (1994a)
Liquid Phase Microscale Assays					
Microtox™ (<i>Vibrio fischeri</i>)	Acute sublethal light inhibition	15 min	IW EXT	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Environ. Canada (1992a)
Algae growth inhibition (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	Chronic sublethal growth inhibition	72 h	IW	St. Lawrence Centre, Environ. Canada, Montreal, Quebec	Environ. Canada (1992b)
Thamnotoxkit F™ (<i>Thamnocephalus platyurus</i>)	Acute survival	24 h	IW EXT	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Creative Selling (1992b)
Rotokit F™ (<i>Brachionus calyciflorus</i>)	Acute survival	24 h	IW	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Creative Selling (1992a)
Daphnia IQ™ (<i>Daphnia magna</i>)	Acute sublethal fluorescent ingestion inhibition	1 h 15 min	IW	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Aqua Survey Inc. (1993)
Algae assay 24 h (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	Acute sublethal esterase inhibition	4 h	IW	St. Lawrence Centre, Environ. Canada, Montreal, Quebec	R&D project
Hydra assay (<i>Hydra attenuata</i>)	Acute survival	24–96 h	IW EXT	St. Lawrence Centre, Environ. Canada, Montreal, Quebec	Trottier (1995)
Microtox™ microplate (<i>Vibrio fischeri</i>)	Acute sublethal light inhibition	15–60 min	IW EXT	St. Lawrence Centre, Environ. Canada, Montreal, Quebec	Blaise et al. (1994)
Viability of hepatocyte cells (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Viability	24–48 h	EXT	St. Lawrence Centre, Environ. Canada, Montreal, Quebec	Gagné and Blaise (1995)
SOS Chromotest™ (<i>Escherichia coli</i> PQ37)	SOS DNA repair (±S9 metabolic activation)	2h	IW EXT	EBPI, Inc., Brampton, Ontario	Fish et al. (1987)
Solid Phase Microscale Assays					
Direct SOS Chromotest (<i>Escherichia coli</i> PQ37)	SOS DNA repair (±S9 metabolic activation)	24 h	SED	EBPI, Inc., Brampton, Ontario	Dutka et al. (1995)
Microtox™ solid phase (<i>Vibrio fischeri</i>)	Acute sublethal light inhibition	20 min	SED	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Microbics Corp. (1995)
ToxiChromoPad™ (<i>Escherichia coli</i>)	Acute Inhibition of β-galactosidase	4 h	SED	EBPI, Inc., Brampton, Ontario	EBPI (1995)
ATP test Microbial organisms in situ	Microbial biomass measurements via cellular ATP	—	SED	BEAK International Incorporated, Dorval, Quebec	Charm Sciences, Inc. (1995)

and then 0.3 mL was transferred into a small glass tube containing 2.7 mL of Microtox diluent. Twenty microliters of diluted bacteria were micropipetted into each well of the opaque microplates and allowed to thermally equilibrate to 15°C for 15 min. Initial light readings were measured using a microluminometer (ML1000 Microplate Luminometer, Dynatech Laboratories). Immediately after, 100 μ L were taken from the sample microplate wells and transferred into corresponding opaque microplate wells. Luminescent readings were taken after 15 min. EC_{50} values were determined using linear regression analysis.

Inhibition of Algal Esterase Activity

Cells from a 6 or 7 day old culture of *Selenastrum capricornutum* were exposed to pore water samples for 24 h in an incubator with constant light at 21°C. Algal cells were then centrifuged to eliminate the sample and the cells were resuspended in a $NaHCO_3$ buffer. Initial green autofluorescence (530 nm) was determined by flow cytometric measurements. Ten microliters of fluorescein diacetate (FDA) were then added. After a 15 min incubation period, a second flow cytometric measurement was taken. Esterase activity inhibition or stimulation was indicated by a green fluorescence reduction or augmentation due to FDA cleavage, respectively. The minimum concentration eliciting a significant enzyme inhibition [lowest observed effect concentration (LOEC)] was determined as the measurement endpoint of the test.

Cell Viability Using Rainbow Trout Hepatocyte Primary Culture

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 10–15 cm long, were obtained from a commercial fish hatchery and were fed trout chow once daily. Hepatocytes were collected by the double perfusion method with some modifications (Gagné and Blaise, 1995). Cells were distributed in a 96-well microplate at a density of 10^6 mL^{-1} in sterile L-15 medium supplemented with 1% FBS (foetal bovine serum), 100 units of penicillin, 100 mg/L of streptomycin, and 1 mg/L amphotericin B. Cells were exposed to sediment organic extracts for 48 h at 15°C and subsequently analyzed for viability (Gagné and Blaise, 1995).

Daphnia IQ™

This commercially available kit uses a fluorescent substrate to measure uptake and enzyme activity in vivo (Aqua Survey Inc., Flemington, NJ). Starved *Daphnia magna* were exposed to pore water samples in 10 mL

vials for 1 h. A nonfluorescent substrate was then added, taken up by the organisms, and metabolized. Metabolites are fluorescent under ultraviolet light. An EC_{50} (effective concentration) was determined for each sample by counting the proportion of brightly fluorescent *Daphnia*. Decreased fluorescence is believed to reflect a reduction in the long-term survival of organisms (Janssen and Persoone, 1993).

Thamnotoxkit F™ and Rotoxkit F™

The Thamnotoxkit F and Rotoxkit F are commercially available kits (Creative Selling Ltd., Deinze, Belgium) for acute freshwater toxicity testing using the fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus* (Creative Selling, 1992a) and the rotifer *Brachionus calyciflorus* (Creative Selling, 1992b), respectively. The test animals were hatched overnight from cysts. After approximately 24 h, the animals were placed in multiwell microplates with sediment pore water. Plates were incubated in the dark at 25°C for 24 h. Survival of organisms was verified under a binocular microscope and LC_{50} s were calculated using either probit or moving average regression methods (Stephan, 1986).

Microtox™ Solid-Phase Test

This solid phase of the Microtox procedure (Microbics Corporation, 1995) measures the inhibition of luminescence in the marine bacterium *Vibrio fischeri*. The bacterial suspension was added to plastic tubes containing the serially diluted sediment samples and exposed for 15 min at 15°C. Bacteria were then separated from sediment by filtering prior to light emission measurements with a Microtox® Model 500 Toxicity Analyzer (Microbics Corporation, Carlsbad, CA). A sediment was considered toxic if the sample concentration inhibiting 50% of light was lower than 1%. Results were reported as EC_{50} , expressed as grams of dry sediment per assay milliliter.

ToxiChromoPad™

A solid-phase application of the Toxi-Chromotest was developed by Kwan (1993) and is commercialized as the ToxiChromoPad™ (EBPI, 1995). The assay is based on the ability of toxicants to inhibit the activity of β -galactosidase in the mutant strain *E. coli* OR85. The test bacteria are directly exposed to the sediment samples in small tubes for 2 h at 37°C. After incubation, a drop from each tube is transferred onto a chromogenic pad placed in a small Petri dish. Petri dishes were then incubated overnight (16 h) at 37°C. Pads were then rinsed with water and visually checked for a blue color

development, which indicates β -galactosidase activity. Toxic samples inhibit color development in this bioassay. Results were reported as EC_{100} (i.e., the minimal concentration causing a 100% of enzyme activity inhibition), expressed as grams of dry sediment per assay milliliter.

Direct SOS-Chromotest™

The procedure for the direct contact SOS Chromotest published recently is similar to the ToxiChromoPad with the exception of the strain used (*E. coli* PQ37) and incubation period. Further details can be found in Dutka et al. (1995). The results are expressed as EC_{100} , i.e., the minimal concentration of sample inhibiting completely (100%) the β -galactosidase activity.

ATP Test

This test uses the cellular adenosine triphosphate (ATP) content as a measure of the viable microbial biomass in each sediment sample. ATP measurements were made using a luciferin/luciferase kit (Charm Sciences, Inc., 1995). Approximately 2 g of wet sediment was placed in a glass tube with 8 mL of dechlorinated water and mixed thoroughly for 5 min. The tube was allowed to settle for 3 min before a 1 mL aliquot was removed for ATP measurement. Microbial cells were collected on a syringe filter and subsequently lysed to release ATP. Luciferase was then added and the tube was mixed for a few seconds. The substrate (luciferin) was then added and luminescence measurements were taken after 20 s. The quantity of light produced reflects the amount of ATP present, which in turn reflects the total microbial biomass (Stewart et al., 1988). Results are expressed as relative light units (RLU) per gram of dry sediment.

Data Analyses

The toxicity of some sediment pore water samples provided LC_{50} or EC_{50} values of greater than 100% (i.e., 50% effect level never achieved). In such instances, threshold values were calculated as the geometric mean of LOEC and no observed effect concentration (NOEC) values (U.S. EPA, 1985). All pore water results were expressed as percent volume per volume. All organic extract toxicity results were expressed as equivalent grams of dry sediment per milliliter of assay. The effects of whole sediment on the growth of *C. riparius* and *H. azteca* were reported as milligrams of dry tissue per individual at the end of the tests.

Where necessary, results were log-transformed to equalize the variance over the range of observations (Ricker, 1973) and meet the normality assumptions of ordinary least squares regression and analysis of vari-

ance. Normality of residual errors was assessed by visual inspection of normal probability plots. Chemical concentrations below the detection limits were attributed values of half the detection limit to allow log transformation (e.g., U.S. EPA, 1989). Amphipod and chironomid percentage survival data were arcsine-transformed (Zar, 1984) for similar reasons.

Analysis of variance (ANOVA) was used to investigate the effect of sediment samples on benthic invertebrate toxicity responses. Multiple comparison Tukey-HSD tests were used when statistical differences were obtained. Discriminant analyses using the benthic invertebrate results and SOS Chromotest results were performed to predict group membership from chemical data as predictors. Posterior probabilities using Mahalanobis distance square were used to redistribute observations into groups and identify misclassified observations. Spearman pairwise correlations using log-transformed variables were used to investigate relationships among assays and chemical concentrations. Further relationships among variables were examined using linear regressions. All data analyses were performed using SYSTAT (1994) and SAS (SAS Institute, Inc., 1987).

Quality Assurance

All assays and chemical characterizations of coded samples were performed within 6 weeks of sediment collection. Pore water was extracted within 2–3 weeks after sample collection. As previously mentioned, liquid-phase assays and pore water chemical characterizations were initiated within 24 h. Liquid-phase reference toxicant tests were conducted to ensure the health of amphipod and chironomid cultures. Reference toxicants were routinely used to ensure performance of all liquid-phase bioassays.

Quality assurance for assays performed on organic extracts was accomplished using a solvent blank and an extract of the reference sediment (Long Point). The solvent blank was subjected to the identical extraction and cleanup procedures.

RESULTS

Physical and Chemical Properties of Sediment and Pore Water Samples

Sediment sample characteristics are presented in Table II and pore water sample chemical concentrations are presented in Table III. Overall, differences between samples were mostly attributed to AVS, organic contaminants, and oil and grease. Based on chemical char-

TABLE II. Summary of selected sediment samples characteristics

Sample No.	Sample Location	SEM Metals ($\mu\text{mol/g}$)	AVS ($\mu\text{mol/g}$)	SEM-AVS	Total PAH ($\mu\text{g/g}$)	Total PCB ($\mu\text{g/g}$)	Mineral Oil & Grease ($\mu\text{g/g}$)	NH ₃ ($\mu\text{g N/mL}$)	TOC (% g/g)	Gravel (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
1	Lake St. Louis J3	3.14	8.4	0.37	< 0.10	< 0.10	160	0.37	2.00	0	37	46	17
2	Lake St. Louis J4	4.06	19.4	0.21	< 0.10	< 0.10	370	1.27	2.40	0	11	72	17
3	Lake St. Francis West	4.54	29.4	0.15	< 0.10	< 0.10	600	5.09	4.30	0	24	72	4
4	Lake St. Francis Middle	2.01	15.8	0.13	< 0.10	< 0.10	230	3.36	2.80	0	27	70	3
5	Lake St. Francis East	4.55	14.1	0.32	< 0.10	< 0.10	420	0.63	3.20	0	22	74	4
6	Petroleum terminal 831	8.40	9.0	0.94	10.40	0.70	7,900	8.62	3.80	0	45	49	6
7	Petroleum terminal 811	11.37	25.2	0.45	26.85	1.90	23,000	9.97	5.00	2	13	75	10
8	Petroleum terminal 841	5.03	9.0	0.56	13.85	0.80	3,600	4.37	1.90	0	54	42	4
9	Long Point	1.27	29.7	0.04	< 0.10	< 0.10	180	4.06	9.20	0	1.8	80.7	17.6
10	Hamilton Harbor	18.80	18.6	1.01	207.50	< 0.10	3,200	10.20	3.60	0	10	87	3

acterizations, the samples collected in the St. Lawrence River system were either clearly contaminated with PAH or were below detection. PCB levels were above detection in sediment samples from the petroleum terminal areas from the Montreal Harbor. Concentrations of simultaneously extracted metals (SEM) were generally low. Based on the results presented in Table II, it appears that sediments from Lake St. Louis, Lake St. Francis, and Long Point are relatively uncontaminated. AVS, ammonia, total organic carbon, and dissolved organic carbon were also measured to aid in interpreting the toxicity results. AVS values ranged from 8 to 30 $\mu\text{mol/g}$ with the two highest values in relatively uncontaminated sediments. Total organic carbon (TOC) measurements were generally below 5%. Ammonia lev-

els were higher in contaminated areas such as the Montreal and Hamilton Harbors. All sediment samples were characterized by a high silt content ranging from 46 to 87%.

Whole-Sediment Assays Using Invertebrates

Survival and growth results for two invertebrate species are illustrated in Figs. 1 and 2. The Long Point (LP) sediment was used as a reference for pairwise comparisons. ANOVA revealed a significant effect of site on growth and survival. Post hoc comparisons (Tukey-HSD procedure) showed that 4 and 5 samples out of 10, for *H. azteca* and *C. riparius* survival, respectively, were

TABLE III. Summary of chemical concentrations in interstitial water samples

Sample No.	AVS ($\mu\text{mol/mL}$)	NH ₃ ($\mu\text{g N/mL}$)	Dissolved Organic Carbon (mg/L)	Total PAH ($\mu\text{g/L}$)	Total PCB ($\mu\text{g/L}$)	Total Metals (mg/L)
1	0.00016	0.50	3.20	< 0.10	< 0.10	0.095
2	< 0.0001	0.92	2.30	< 0.10	< 0.10	0.147
3	0.0031	6.15	3.90	< 0.10	< 0.10	1.037
4	0.003	4.64	3.20	< 0.10	< 0.10	0.117
5	0.0055	0.77	3.00	< 0.10	< 0.10	0.688
6	0.00017	8.35	7.90	9.98	< 0.10	0.402
7	0.0009	7.59	11.00	20.53	< 0.10	0.306
8	0.0021	3.94	4.90	5.76	< 0.10	0.177
9	0.0014	5.81	6.40	< 0.10	< 0.10	0.257
10	0.000025	8.69	13.00	10.89	< 0.10	0.278

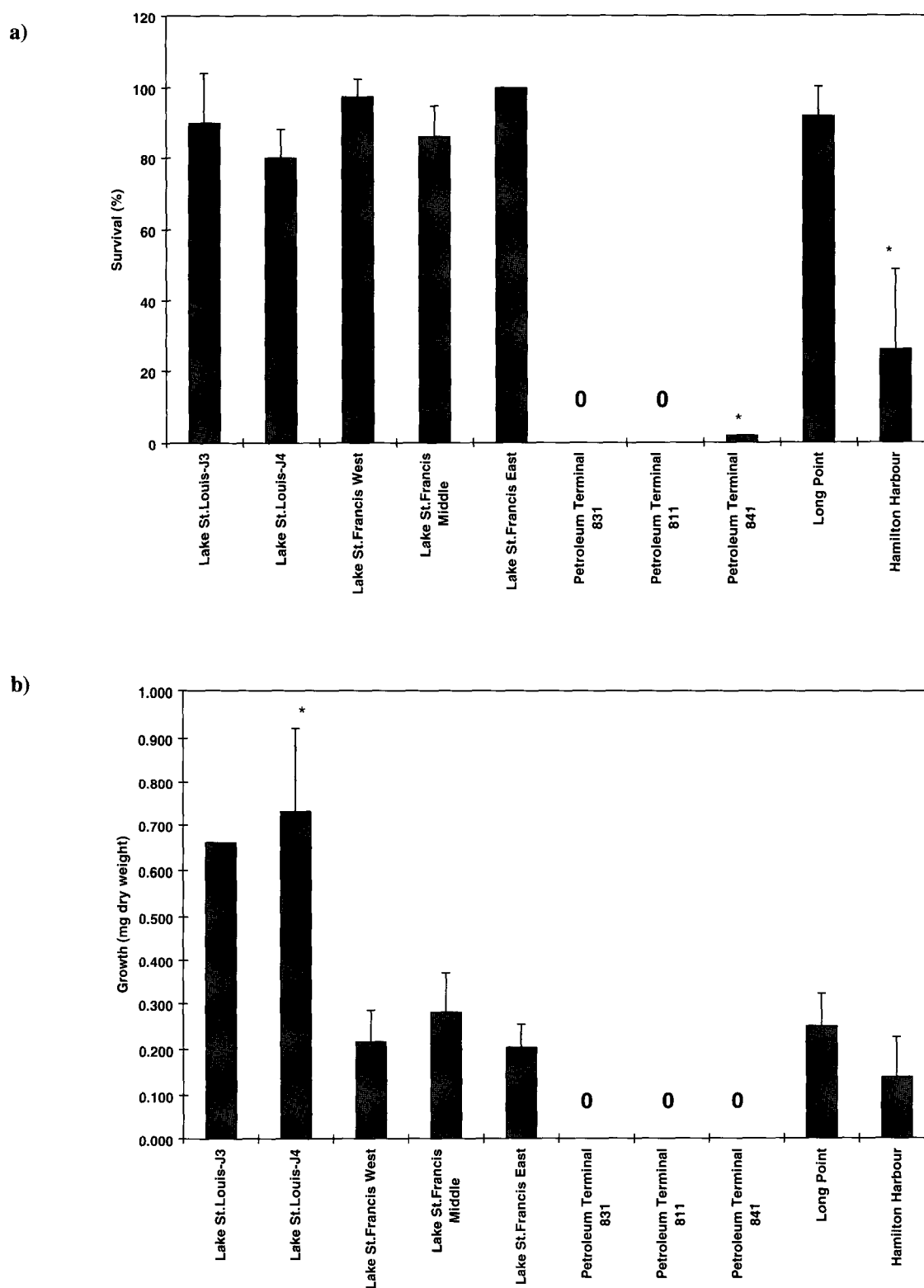


Fig. 1. Percent survival (a) and growth (b) of *Hyalella azteca* exposed to 10 sediment samples. Growth is expressed as milligrams dry weight per individual. Mean values were calculated from five replicates. Error bars are 1 standard deviation of the mean. Asterisks indicate that the sample is significantly different from the Long Point sediment used as a reference, and the symbol "0" indicates that there are no survivors.

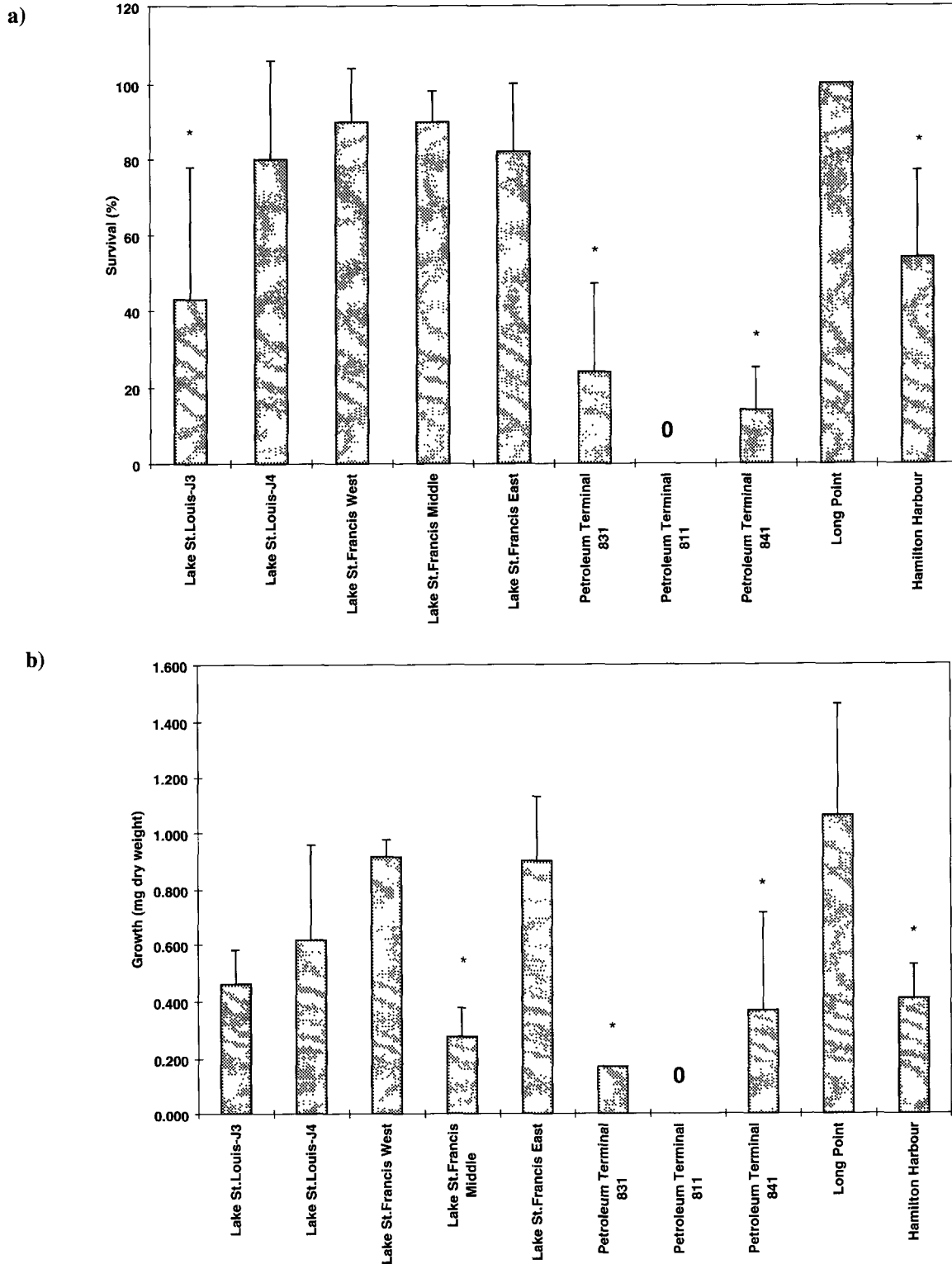


Fig. 2. Percent survival (a) and growth (b) of *Chironomus riparius* exposed to 10 sediment samples. Growth is expressed as milligrams dry weight per individual. Mean values were calculated from five replicates, except for Long Point and Lake St. Louis sediment, where $N=4$. Observations removed (2) had very large studentized residuals and were considered as outliers. Error bars are 1 standard deviation of the mean. Asterisks indicate that the sample is significantly different from the Long Point sediment used as a reference, and the symbol "0" indicates that there are no survivors.

significantly different from LP. Pairwise comparisons to the reference sediment revealed that 4 out of 10 samples significantly impair the growth of *C. riparius*. Pairwise comparisons to investigate *H. azteca* growth impairment were not possible because several samples were highly toxic and contained no survivors.

It is useful if we can correlate organism response with sediment contamination. Discriminant function analyses were used to determine if sediment contamination levels can predict the outcome of whole-sediment toxicity assays with chironomids and amphipods. The analyses were performed using selected chemical variables as predictors of membership in two groups: toxic and nontoxic. Predictors were PCB, PAH, metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn), NH₃, oil and grease, and SEM-AVS ratio. A backward stepping procedure was used to select those variables that can discriminate between the two groups (toxic and nontoxic).

The discriminant analyses revealed that group membership can be predicted using organic contaminant levels (e.g., PCB, PAH, and oil and grease). Only two samples were misclassified according to classification matrices. Posterior probabilities for group membership revealed that Lake St. Louis J3 and Lake St. Francis M sediments were misclassified as toxic despite the fact that they caused marked growth inhibition to *C. riparius* (see Fig. 2b). Although these two samples were incorrectly classified into *effect/no effect* groups with the two invertebrate species, suggesting the presence of potential outliers, all the data presented in Figs. 1 and

2 were used for comparisons with other bioassays except for the amphipod growth results.

Spearman correlations were used to investigate relationships between the whole sediment invertebrate test results and physicochemical parameters (Table IV). Although the number of observations are rather limited ($N = 10$), some statistically significant correlations were obtained. For instance, survival of *H. azteca* and *C. riparius* is negatively correlated with the concentrations of PAH, PCB, and the SEM-AVS ratio. The growth of *C. riparius* was positively correlated with the silt and clay proportion in sediments ($r_s = 0.67$, $p = 0.05$).

Comparisons of Microscale Assays to Whole-Sediment Invertebrates Assays

i. Whole-Sediment Microscale Assays. Three sediment microscale assays were compared to invertebrate toxicity results using Spearman correlations (Table IV). The measurement of microbial biomass via ATP was the only endpoint among the three whole-sediment microscale assays to be correlated with one of the invertebrate assays (*H. azteca* survival). The results indicated that the ATP test was positively correlated with the survival of *H. azteca* ($r_s = 0.64$, $p = 0.047$) and negatively correlated with metal concentrations (SEM metals and SEM-AVS ratio). The relationship between ATP values and *H. azteca* survival data is presented in Fig. 3. ToxiChromoPad results are negatively correlated with the concentrations of PAH and the

TABLE IV. Spearman correlation coefficients matrix for sediment bioassays and selected parameters^a

	<i>H. azteca</i> Survival	<i>C. riparius</i> Survival	<i>C. riparius</i> Growth	ToxiChromoPad	ATP Test	Microtox Solid Phase
Total PAH	-0.781*	-0.719*	-0.564	-0.696*	-0.559	-0.348
Total PCB	-0.785*	-0.815**	-0.815**	-0.365	-0.306	-0.037
Total SEM metals	-0.608	-0.705	-0.433	-0.673*	-0.648*	-0.430
AVS	0.216	0.500	0.653	-0.067	0.316	-0.225
SEM-AVS	-0.675*	-0.815**	-0.567	-0.648*	-0.721*	-0.200
Ammonia	-0.608	-0.340	-0.283	-0.818**	-0.272	-0.358
TOC	0.043	0.274	0.417	-0.321	0.369	-0.224
Silt	0.171	0.332	0.552	-0.134	0.043	-0.511
Clay	0.025	0.028	0.436	0.154	0.117	0.346
Silt and clay	0.243	0.438	0.667*	0.042	0.030	-0.394
<i>H. azteca</i> survival				0.462	0.638*	0.304
<i>C. riparius</i> survival				0.377	0.608	0.152
<i>C. riparius</i> growth				0.133	0.467	0.267

^a Coefficients approaching 1 or -1 are, respectively, highly positively or negatively correlated. Expected correlations are positive for comparisons between assays and negative for comparisons with chemicals. Asterisks indicate statistical significance of $p < 0.05$ (*) and $p < 0.005$ (**), respectively ($N = 10$).

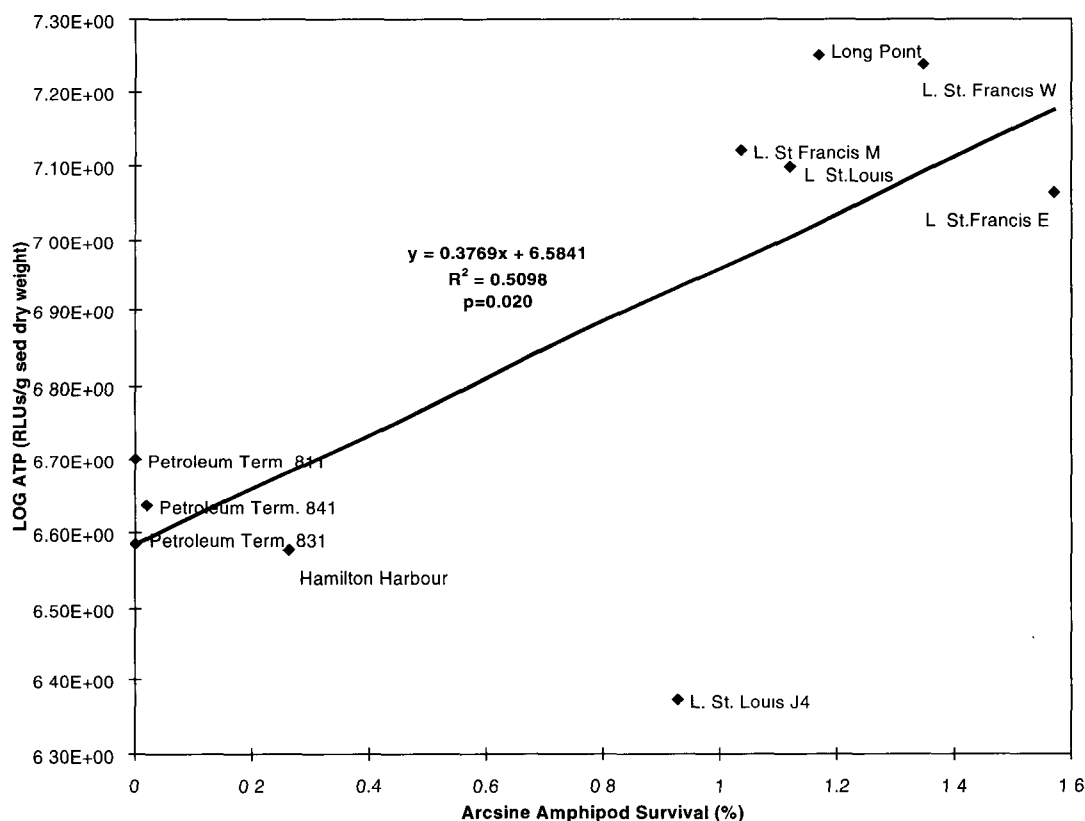


Fig. 3. Survival of *H. azteca* versus ATP values. Amphipod survival data and ATP values were arcsine- and log-transformed, respectively.

SEM-AVS ratio. ToxiChromoPad results were also negatively correlated ($r_s = -0.82$, $p = 0.004$) with sediment ammonia levels. A range of toxic responses was obtained with the solid-phase Microtox assay with the 10 sediment samples, but no correlations were observed either with chemical concentrations or conventional whole-sediment assays.

ii. *Liquid-Phase Microscale Assays on Pore Water Samples.* Three assays did not respond to any pore water samples and were therefore not considered for further analyses. The Microtox luminescence assay, the rotifer assay (Rotokit F®), and the growth inhibition assay using *S. capricornutum* did not exhibit toxicity at the highest test concentration (90, 100, and 90%, respectively).

Again, Spearman correlations were used to compare microscale assays to whole-sediment invertebrate assays (Table V). With the exception of hydra survival, no statistically significant correlations were obtained with the limited set of observations ($N = 10$). However, the Spearman correlation coefficients may indicate trends between certain variables. Comparisons of microscale

assay results to pore water chemical concentrations revealed few significant correlations.

Table V indicates that hydra survival was negatively correlated with PAH concentrations ($r_s = -0.80$) and positively correlated ($r_s = 0.64$) with *H. azteca* survival. It is also strongly negatively correlated with ammonia concentrations. These relationships were confirmed using linear regression analyses (Fig. 4). Despite levels of PAH below detection, samples from Long Point and Lake St. Francis (M) were as toxic to *H. attenuata* as several highly contaminated samples (e.g., petroleum terminals 831 and 841). These results suggest that pore water toxicity to *H. attenuata* is predominantly causing by the presence of ammonia. Although total ammonia concentrations were low (< 5 mg/L for 5 out of 10 samples), *H. attenuata* may be very sensitive to this substance.

iii. *Microscale Assays on Organic Extracts.* Based on small sample size requirement, eight microscale assays were selected for toxicity assessment of organic extracts from five sediment samples (samples 6–10 in Table II). The maximum concentration tested was 0.25 equivalent

TABLE V. Spearman correlation coefficients matrix for bioassays performed on interstitial water and selected parameters^a

	Thamnotoxkit F	Daphnia IQ	Hydra Test	Algal 24 h Test	Microtox Microplate
Total PAH	-0.311	-0.539	-0.802*	0.261	-0.362
Total SEM metals	0.321	-0.139	-0.095	-0.522	-0.510
AVS	0.395	0.345	0.121	-0.406	-0.384
SEM-AVS	-0.306	-0.358	-0.025	-0.058	0.308
Ammonia	-0.052	-0.430	-0.820**	-0.174	-0.459
Dissolved organic carbon	-0.112	-0.383	-0.896**	0.058	0.334
<i>H. azteca</i> survival	0.366	0.498	0.638*	-0.407	0.158
<i>C. riparius</i> survival	0.322	0.304	0.316	-0.349	0.038
<i>C. riparius</i> growth	0.238	0.433	0.417	-0.401	0.218

^a Coefficients approaching 1 or -1 are, respectively, highly positively or negatively correlated. Expected correlations are positive for comparisons between assays and negative for comparisons with chemicals. Asterisks indicate statistical significance of $p < 0.05$ (*) and $p < 0.005$ (**), respectively ($N = 10$ except for *C. riparius* data, where $N = 9$).

gram of sediment per milliliter of assay medium with a final DMSO concentration of 1% v/v. With the exception of the Microtox microplate assay, no toxicity was measured with the method blank.

Assay results were compared to sediment PAH concentrations and invertebrates survival data using Spearman correlations (Table VI). Statistically significant correlations were obtained despite the small sample size ($N = 6$ or 5). Only Microtox microplate results (corrected for blank toxicity) were correlated to *C. riparius* survival data ($r_s = 0.90$, $p = 0.04$). Although the Spearman correlation coefficients were not significant, the results revealed that Rotoxkit F ($r_s = 0.872$) and hepatocyte viability ($r_s = 0.860$) assays may be well suited to predict amphipods survival.

Table VII summarizes the results obtained for toxicity assays on all matrices examined. The summary reveals that few of the assays examined can consistently and reliably predict toxicity to benthic invertebrates. Among the most promising assays are the Rotoxkit F, the hydra survival, the Microtox microplate, and the ATP test.

Genotoxicity Assessment Using the SOS Chromotest and the Direct-Contact SOS Chromotest

The direct-contact sediment genotoxicity assay did not reveal any evidence of genotoxicity. The liquid-phase SOS-Chromotest on pore water samples in the presence of S9 metabolic activation mixture revealed significant genotoxicity in samples from Montreal Harbor, Hamilton Harbor and Lake St. Louis J3.

Discriminant analyses showed that PAH contamination can predict SOS Chromotest outcome. With the exception of the Lake St. Louis J3 sample, all samples were correctly classified using PAH concentration data.

Genotoxic porewater samples coincide with sediment samples, causing reduction of survival of benthic invertebrates (90% coincidence between SOS response and *C. riparius* and *H. azteca* significant survival reduction).

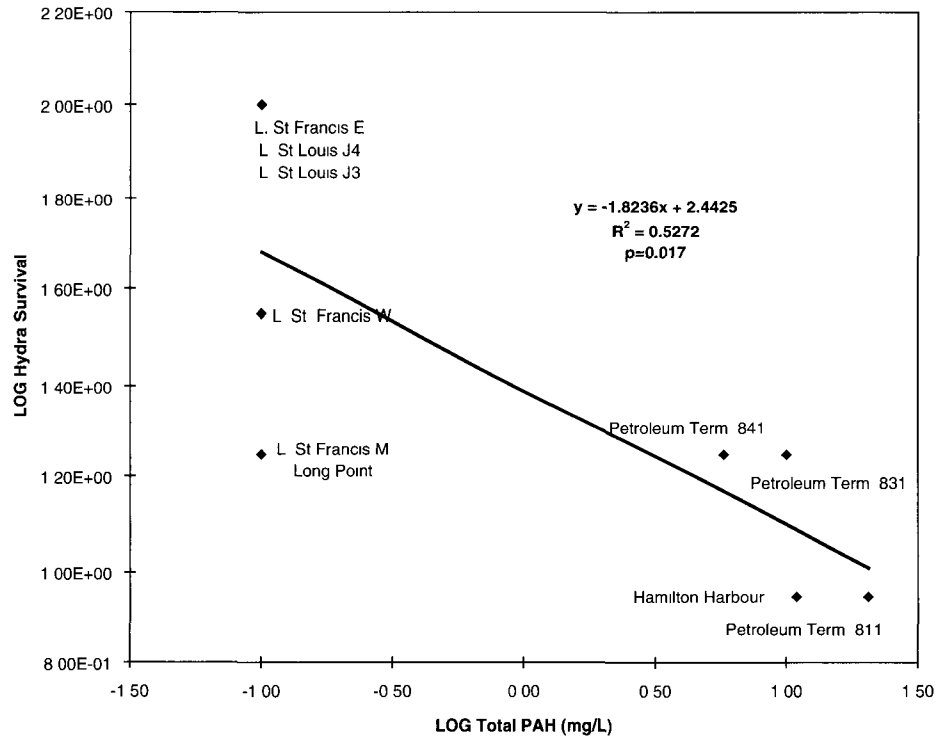
DISCUSSION

Although the organisms employed in the microscale assays examination represent different trophic levels and may be exposed through different routes, it is reasonable to expect an empirical relationship between microscale assay results and more ecologically relevant sediment assays such as *Hyalella azteca* and *Chironomus riparius*. Whole-sediment assays using these organisms are well accepted by a variety of regulatory authorities (Environment Canada, 1994a, b; U.S. EPA, 1994; Keddy et al., 1995) and the responses measured have been related to effects in the field (Reynoldson and Day, 1994; Day et al., 1995a).

Prior to comparisons with microscale assay results, *C. riparius* and *H. azteca* data were analyzed to ensure that the observed responses were related to sediment contamination. Discriminant analyses demonstrated that sediment contamination can reliably predict the outcome (*toxic vs nontoxic*) of the whole-sediment invertebrate bioassays. Correlation analyses confirmed that natural sediment characteristics (e.g., particle size distribution, organic content, ammonia, and acid volatile sulfide levels) were not empirically related to sediment toxicity. Other researchers also have demonstrated that natural factors do not significantly affect the survival, growth, and reproduction of *C. riparius* and *H. azteca* (Ankley et al., 1994; Day et al., 1995b).

Among the solid-phase microbioassays, the ATP test seems to be the most promising tool to predict survival

a)



b)

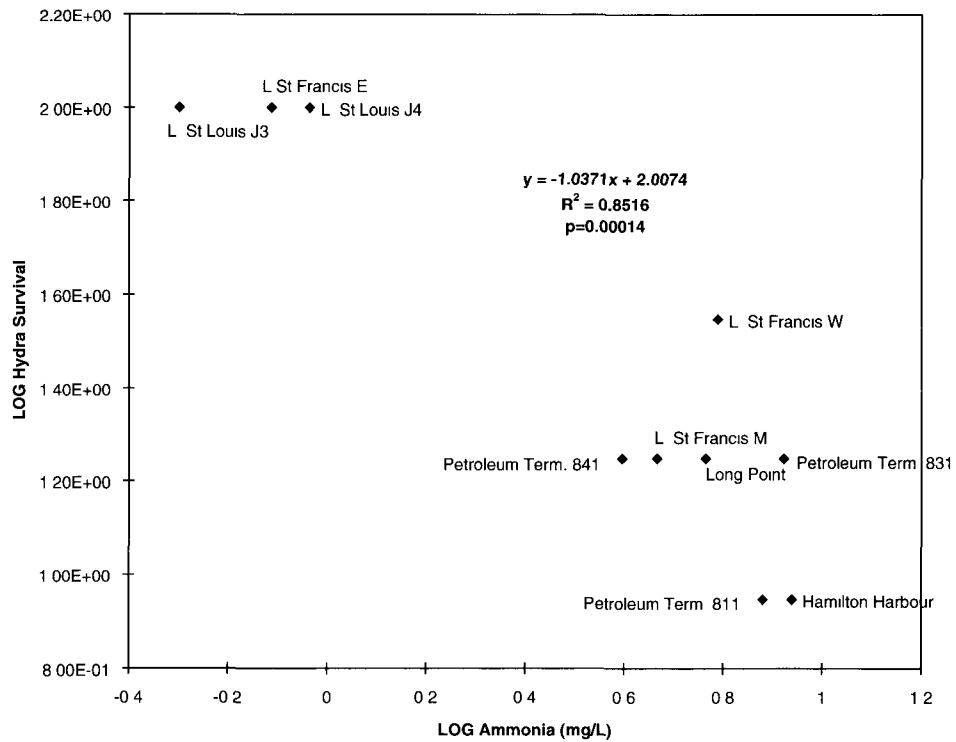


Fig. 4. Selected examples of relationships between the hydra assay performed on pore water samples and (a) total PAH and (b) ammonia concentration. All data were log-transformed.

TABLE VI. Spearman correlation coefficients matrix for bioassays performed on organic extracts and selected parameters^a

	Thamnotoxkit F	Microtox	Rotokit F	Hydra Test	Microtox Microplate	Viability of Hepatocytes
Total PAH	-0.841*	-0.435	-0.580	-0.985**	-0.377	-0.137
<i>H. azteca</i> survival	0.103	-0.205	0.872	0.289	0.718	0.860
<i>C. riparius</i> survival	0.500	0.100	0.500	0.359	0.900*	-0.447

^a Coefficients approaching 1 or -1 are, respectively, highly positively or negatively correlated. Expected correlations are positive for comparisons between assays and negative for comparisons with chemicals. Asterisks indicate statistical significance of $p < 0.05$ (*) and $p < 0.005$ (**), respectively ($N = 6$ except for *C. riparius* and *H. azteca* data, where $N = 5$).

of *H. azteca*. The results obtained with the other two solid-phase microbioassays (the ToxiChromoPad and the Microtox) appear to be less promising. Neither assay elicited results that empirically related to *H. azteca* and *C. riparius*. Despite this lack of correspondence, the ToxiChromoPad results were correlated with PAH concentration, SEM-AVS ratio, and ammonia ($r_s = 0.82$, $p = 0.004$). The strong correlation with ammonia—a natural constituent of freshwater sediment

—complicates the interpretation of bioassay results. For example, relatively uncontaminated sediment samples from Long Point and Lake St. Francis W were moderately toxic with this assay despite the fact that they were not toxic on *H. azteca* and *C. riparius* assays. Subsequent whole-sediment TIE (Toxicity Identification Evaluation) procedures currently under development (Ho, personal communication) could be used to confirm that the ToxiChromoPad responds to natural

TABLE VII. Summary of the results presenting correlations between microscale assays and whole-sediment assays using benthic invertebrates and selected chemical characteristics (SED, freshwater sediment; IW, interstitial water; EXT, organic extracts)

Assay/Test Organism	Test Matrix	Correlation with Benthic Invertebrates	Correlation with Organic Contaminants	Correlation with Metals	Correlation with Natural Contaminants
Freshwater amphipod (<i>Hyalella azteca</i>)	SED	—	Yes	Yes	No
Freshwater midges (<i>Chironomus riparius</i>)	SED	—	Yes	Yes	No
Microtox TM (<i>Vibrio fischeri</i>)	EXT	No	No	—	—
Thamnotoxkit F TM (<i>Thamnocephalus platyurus</i>)	IW	No	No	No	No
Viability of trout hepatocytes	EXT	No	Yes	—	—
Rotokit F TM (<i>Brachionus calyciflorus</i>)	EXT	Maybe	No	—	—
Daphnia IQ TM (<i>Daphnia magna</i>)	IW	No	No	No	No
Algae assay 24 h (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	IW	No	No	No	No
Hydra assay (<i>Hydra attenuata</i>)	IW	Yes	Yes	No	Yes
Microtox TM microplate (<i>Vibrio fischeri</i>)	EXT	No	Yes	—	—
Microtox TM solid phase (<i>Vibrio fischeri</i>)	IW	No	No	No	No
ToxiChromoPad TM (<i>Escherichia coli</i>)	EXT	Yes	No	—	—
ATP test microbial organisms <i>in situ</i>	SED	No	Yes	No	Yes
	SED	Yes	No	Yes	No

rather than anthropogenic chemicals. Despite the results obtained here, it should be noted that other researchers have documented good correspondence between the ToxiChromoPad and solid-phase Microtox endpoints and whole-sediment benthic invertebrate endpoints (Giesy et al., 1990; Winger et al., 1993; Day et al., 1995a).

Pore waters are often used in toxicity testing to predict whole-sediment or water column (pelagic) exposure (Ankley et al., 1991; Di Toro et al., 1991; Burgess et al., 1993; Harkey et al., 1994; Kemble et al., 1994). Of the 12 bioassays employed, 3 of them (the standard Microtox® luminescence, the *Selenastrum* growth inhibition, and Rotoxkit F assays) did not exhibit any response at the highest tested concentration. Only one assay was found to correlate with invertebrate endpoints. Survival of *Hydra attenuata* consistently corresponded with survival of the freshwater amphipod *H. azteca*. However the results presented in Fig. 4 indicate that the observed toxicity to hydra may be due to ammonia. Nevertheless, a strong response was obtained when the hydra were exposed to organic extracts contaminated with PAH (Table VI).

The use of organic extracts for toxicity assessment has been questioned and criticized because it is difficult to interpret the results obtained in the context of hazard posed to biota inhabiting contaminated sites. Regardless of this difficulty, one would expect an empirical relationship between whole-sediment toxicity and extract toxicity. Such a relationship could be used to assist in the interpretation of extract results and their use in the management of contaminated sites. The organic extract results presented indicate that some microscale assays, such as the Microtox microplate, the Rotoxkit F, and the hepatocyte viability assay, may be capable of predicting the amphipod and chironomid toxicity of sediments contaminated with organic pollutants. Furthermore, the ability to eliminate confounding factors, such as ammonia and sulfides, is a positive attribute of the use of extracts. Furthermore, sensitivity is rarely an issue because extracts are highly concentrated.

Although the reference sediment extract was moderately toxic for the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* and the fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus*, this sediment is from a noncontaminated area and has been previously used as reference sediment (Day et al., 1995a). Therefore care must be taken in the interpretation of extract results, and only those samples that elicit a response significantly above the reference should be denoted positive.

Since genotoxic effects can reduce the long-term survival of exposed organisms, some researchers recommend the inclusion of genotoxicity assays in any integrated test battery (McGeorge et al., 1985; Blaise et

al., 1988; Ho et al., 1994). The results obtained in this study indicate that the SOS Chromotest is useful for the detection of genotoxic substances in pore waters. The requirement of S9 metabolic activation suggests that the response is due to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons. It is well known that most PAHs require metabolic activation (West et al., 1988; Donnelly et al., 1988; Marvin et al., 1995).

We have attempted to demonstrate the utility of microscale assays for sediment toxicity assessment and to evaluate their merits for inclusion in a test battery. Selection of bioassays for a representative test battery is never a simple task. Several attempts have been made to select toxicity assays for a sediment test battery (Dutka and Kwan, 1988; Giesy and Hoke, 1989; Giesy et al., 1990). However, few researchers have investigated the potential use of microscale assays (Day et al., 1995a). Despite the low number of samples analyzed thus far, the summarized results presented in Table VII will enable us to make decisions regarding test battery composition. However, since few of the microscale assays examined provided clear trends, further testing is underway to determine their suitability for inclusion in a test battery. Furthermore, it should be noted that the absence of relationships between the whole sediment toxicity endpoints examined and the results obtained on the microscale assays does not conclusively rule out their utility.

The second stage of this project will involve further scrutiny of those assays that deserve attention. In addition, benthic community assessment will be conducted to assist in the selection of relevant microscale assays.

We gratefully acknowledge several people for their support and assistance: Laura Savoy and Dany Boudrias for excellent technical assistance in the laboratory, Ruben Gandia for his assistance in the field, and P. A. White for his helpful comments and revision of this manuscript. We are also grateful to Kristin Day for providing sediments from Long Point, to Annette Lawson and Tom Murphy for providing sediments from Hamilton Harbor, and to Guido Persoone for providing some Rotoxkit F™ and Thamnotoxkit F™. This study was a collaborative effort of Environment Canada, Technological Development Division, the St. Lawrence Centre and BEAK International Incorporated. Financial support for this study was partially granted by the St. Lawrence Vision 2000 plan.

REFERENCES

- Allen, H. E., G. Fu, and B. Deng. 1993. Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1441-1453.

- Ankley, G. T., M. K. Schubauer-Berigan, and J. R. Dierkes. 1991. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: Pore water versus elutriate. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**:1359–1366.
- Ankley, G. T., K. Lodge, D. J. Call, M. D. Balcer, L. T. Brooke, P. M. Cook, R. G. Kreis, Jr., A. R. Carlson, R. D. Johnson, G. J. Niemi, R. A. Hoke, C. W. West, J. P. Giesy, P. D. Jones, and Z. C. Fuying. 1992. Integrated assessment of contaminated sediments in the lower Fox river and Green Bay, Wisconsin. *Ecotox. Environ. Saf.* **23**:46–63.
- Ankley, G. T., D. A. Benoit, J. C. Balogh, T. B. Reynoldson, K. E. Day, and R. A. Hoke. 1994. Evaluation of potential confounding factors in sediment toxicity tests with three freshwater benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**:627–635.
- Becker, D. S., G. R. Bilyard, and T. C. Ginn. 1990. Comparisons between sediment bioassays and alterations of benthic macroinvertebrate assemblages at a marine superfund site: Commencement Bay, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**:669–685.
- Benton, M. J., M. L. Malott, S. S. Knight, C. M. Cooper, and W. H. Benson. 1995. Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:411–414.
- Blaise, C. 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility and prospects. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **6**:145–155.
- Blaise, C., and T. Kusui. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **12**:53–60.
- Blaise, C., G. Sergy, P. Wells, N. Bermingham, and R. van Coillie. 1988. Biological testing: development, application and trends in Canadian environmental protection laboratories. *Tox. Assessment* **3**:385–406.
- Blaise, C., R. Forghani, R. Legault, J. Guzzo, and M. S. Dubow. 1994. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and microtox reagent. *Biotechniques* **16**:932–937.
- Burgess, R. M., K. A. Schweitzer, R. A. McKinney, and D. K. Phelps. 1993. Contaminated marine sediments: water column and interstitial toxic effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**:127–138.
- Charm Sciences, Inc. 1995. Charm 4000D Luminometer System, Malden, MA.
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, and R. R. Trussel. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWA-WPCF, 17th ed., Method 5310.
- Creative Selling. 1992a. Thamnotoxkit F™. Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater. Standard Operational Procedure (V241092). Creative Selling Ltd., Deinze, Belgium.
- Creative Selling. 1992b. Rotoxkit F™. Rotifer Toxicity Screening Test for Freshwater. Standard Operational Procedure (V241092). Creative Selling, Deinze, Belgium.
- Day, K. E., R. S. Kirby, and T. B. Reynoldson. 1994. Sexual dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigen): Impact on interpretation of growth in whole-sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**:35–39.
- Day, K. E., B. J. Dutka, K. K. Kwan, N. Batista, T. B. Reynoldson, and J. L. Metcalfe-Smith. 1995a. Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and *in situ* benthic community structure. *J. Great Lakes Res.* **21**:192–206.
- Day, K. E., R. S. Kirby, and T. B. Reynoldson. 1995b. The effect of manipulations of freshwater sediments on responses of benthic invertebrates in whole-sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:1333–1343.
- Di Toro, D. M., C. S. Zarba, D. J. Hansen, W. J. Berry, C. E. Cowan, S. P. Pavlou, H. E. Allen, N. A. Thomas, and P. R. Paquin. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**:1541–1583.
- Donnelly, K. C., K. W. Brown, and D. G. DiGiullio. 1988. Mutagenic characterization of soil and water samples from a superfund site. *Nuclear Chem. Waste Manag.* **8**:135–141.
- Dutka, B. J., and K. K. Kwan. 1988. Battery of screening tests approach applied to sediment extracts. *Tox. Assess.* **3**:303–314.
- Dutka, B. J., K. Teichgräber, and R. Lifshitz. 1995. A modified SOS-Chromotest procedure to test for genotoxicity and cytotoxicity in sediments directly without extraction. *Chemosphere* **31**:3273–3289.
- Environment Canada. 1992a. Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (*Photobacterium phosphoreum*). Report EPS 1/RM/24, Environmental Protection Series, Environment Canada, Ottawa.
- Environment Canada. 1992b. Biological Test Method: Toxicity Test Using the Green Algae (*Selenastrum capricornutum*). Report EPS 1/RM/25, Environmental Protection Series, Environment Canada, Ottawa.
- Environmental Bio-detection Products, Inc. 1995. Toxi-ChromoPad™. Instructions for Use, Version 3.1.
- Environnement Canada. 1994a. Test for Growth and Survival in Sediment Using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Rapport EPS 1/RM/final-draft manuscript. Environmental Protection Series, Environnement Canada.
- Environnement Canada. 1994b. Test for Growth and Survival in Sediment Using the Freshwater Amphipod (*Hyalella azteca*). Rapport EPS 1/RM/final-draft manuscript. Environmental Protection Series, Environnement Canada.
- Fish, F., I. Lampert, A. Halachami, G. Riesenfeld, and M. Herzberg. 1987. The SOS Chromotest kit, a rapid method for the detection of genotoxicity. *Toxic. Assess.* **2**:135–147.
- Fu, L.-J., R. E. Staples, and R. G. Stahl, Jr. 1991. Application of the *Hydra attenuata* assay for identifying developmental hazards among natural waters and wastewaters. *Ecotox. Environ. Saf.* **22**:309–319.

- Gagné, F., and C. Blaise. 1995. Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. Lett.* **78**:175-182.
- Gardner, G. R., P. P. Yevich, J. C. Harshbarger, and A. R. Malcolm. 1991. Carcinogenicity of Black Rock Harbor sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder. *Environ. Health Perspect.* **90**:53-66.
- Giesy, J. P., and R. A. Hoke. 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.* **15**:539-569.
- Giesy, J. P., R. L. Graney, J. L. Newsted, C. J. Rosiu, A. Benda, R. G. Kreis, Jr., and F. J. Horvath. 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**:483-498.
- Giesy, J. P., C. J. Rosiu, and R. L. Graney. 1990. Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**:233-248.
- Harkey, G. A., P. F. Landrum, and S. J. Klaine. 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**:1315-1329.
- Ho, K. T., L. J. Mills, C. Mueller, S. C. Anderson and A. R. Malcolm. 1994. The influence of sediment extract fractionation methods on bioassay results. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **9**:145-154.
- Janssen, C. R., and G. Persoone. 1993. Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. I. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**:711-717.
- Johnson, E. M., B. E. G. Gable, L. M. Newman, and R. Giacobbe. 1990. The Hydra Assay Manual: A Practical Guide to the Supplies, Techniques and Mechanics of the Assay. Department of Anatomy and Development Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA.
- Keddy, C. J., J. C. Greene, and M. A. Bonnell. 1995. Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotox. Environ. Saf.* **20**:221-251.
- Kemble, N. E., W. G. Brumbaugh, E. L. Brunson, F. J. Dwyer, C. G. Ingersoll, D. P. Monda, and D. F. Woodward. 1994. Toxicity of metal-contaminated sediments from the upper Clark Fork River, Montana, to aquatic invertebrates and fish in laboratory exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**:1985-1997.
- Krantzberg, G., and D. Boyd. 1992. The biological significance of contaminants in sediment from Hamilton Harbour, Lake Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**:1527-1540.
- Kwan, K. K. 1993. Direct toxicity assessment of solid phase samples using the Toxi-Chromotest kit. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **8**:223-230.
- Malins, D. C., B. B. McCain, D. W. Brown, S. Chan, M. S. Myers, J. T. Landahl, P. G. Prohaska, A. J. Friedman, L. D. Rhodes, D. G. Burrows, W. D. Gronlund, and H. O. Hodgins. 1984. Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Sci. Technol.* **18**:705-713.
- Marvin, C. H., J. A. Lundrigan, B. E. McCarry, and D. W. Bryant. 1995. Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from coal-tar-contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**:2059-2066.
- Mayer, T., and E. Nagy. 1992. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulates from Hamilton Harbour. *Wat. Poll. Res. J. Can.* **27**:807-831.
- McGeorge, L. J., J. B. Louis, T. B. Atherbolt, and G. J. McGarrity. 1985. Mutagenicity analyses of industrial effluents: results and considerations for integration into water pollution control programs. In M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss, and S. Nesnow (Eds.), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*, Vol. IV, pp. 247-268. Plenum, New York.
- Microbics Corporation. 1995. Microtox® M500 Manual. A Toxicity Testing Handbook, Version 3. Microbics Corporation, Carlsbad, CA.
- Mix, M. C. 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: A critical literature review. *Marine Environ. Res.* **20**:1-141.
- Reynoldson, T. B., and K. E. Day. 1994. An Assessment of Sediment Quality and Benthic Invertebrate Community Structure in Collingwood Harbour. An Area of Concerns: towards De-listing. N.W.R.I. Contribution 94-42, Environment Canada, Burlington, Ontario.
- Ricker, W. E. 1973. Linear regression in fishery research. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **30**:409-434.
- SAS Institute, Inc. 1987. SAS/STAT™ Guide for Personal Computers, Version 6. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Schubauer-Berigan, M. K., and G. T. Ankley. 1991. The contribution of ammonia, metals and nonpolar organic compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an Illinois river tributary. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**:925-939.
- Stephan, C. E. 1986. LC50 Calculation Program, Version 2.1. U.S. EPA, Duluth, MN.
- Stewart, G., T. Smith, and S. Denyer. 1988. Genetic engineering for bioluminescent bacteria. *Food Sci. Technol. Today* **3**:19-22.
- SYSTAT 1994. Using SYSTAT, Version 6. SYSTAT, Inc., Evanston, IL.
- Trottier, S. 1995. Mise au Point d'Un Test de Dépistage des Effets Toxiques Létaux et Sublétaux (Tératogénicité) avec le Coelentéré d'Eau Douce *Hydra attenuata*. Rapport Scientifique et Technique ST-32. Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada-Région du Québec, Montréal, Québec, 30 p.
- U.S. EPA. 1979. EPA Methods for the Chemical Analysis of Water and Wastes. Method 350.2.

- U.S. EPA. 1983. Methods for the Chemical Analysis of Water and Wastes. EPA 600/4-79-020, Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- U.S. EPA. 1985. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. EPA 600/4-85-014, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- U.S. EPA. 1989. Risk Assessment Guidance for Superfund. Volume I. Human Health Evaluation Manual, Part A (EPA/540/1-89/002). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- U.S. EPA. 1994. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. EPA 600/r-94/024, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN.
- West, W. R., P. A. Smith, G. M. Booth, and M. L. Lee. 1988. Isolation and detection of genotoxic components in a Black River sediment. *Environ. Sci. Technol.* **22**:224–228.
- Winger, P. V., P. Lasier, and H. Geitner. 1993. Toxicity of sediments and pore water from Brunswick Estuary, Georgia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **25**:371–376.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Côté C., C. Blaise, J. Schroeder, M. Douville et JR Michaud. 1998. *Investigating the adequacy of selected micro-scale bioassays to predict the toxic potential of freshwater sediments through a tier process*. Water Qual. Res. J. Canada 33(2):253-277.

ABSTRACT

A battery of 20 bioassays was applied to assess test and endpoint performance in detecting the toxic potential of 15 freshwater sediment samples collected in the St. Lawrence River/Great Lakes systems. The bioassays included eighteen micro-scale assays performed either on whole sediment, pore water or sediment organic extracts, as well as two standardized whole sediment bioassays undertaken with macroinvertebrates (*Chironomus riparius* and *Hyalella azteca*). Selected sediment physical and chemical parameters were also analyzed to aid in the interpretation of results. Several qualitative and quantitative criteria were established for evaluating the reliability and usefulness of the micro-scale bioassays in predicting sediment toxicity based on a two-tier system. In Tier 1, micro-scale testing results were compared for general concordance with those of the benthic bioassays, benthic community structure index and with sediment contaminant levels. Micro-assays which complied with Tier 1 standards were further evaluated via a Tier 2 process consisting of selected (quantitative and qualitative) scientific and practical criteria. Of the 20 bioassays investigated, the two benthic assays and seven micro-scale assays successfully passed the double-tiered assessment. Micro-scale tests whose results most closely matched those of the benthic tests for appraisal of whole sediment toxicity, sediment contamination level and benthic community structure index included three bacterial assays (ATP assay, a microplate adaptation of the Microtox[®] assay, SOS Chromotest[™]), one algal assay (algal solid phase test) and three micro-invertebrate assays (Thamnotoxkit[™] F, Daphtoxkit[™] F and *Hydra* assay). Two selected batteries, composed of the seven micro-scale assays and benthic invertebrate bioassays, are proposed for cost-effective appraisal of freshwater sediment toxicity.

Investigating the Adequacy of Selected Micro-Scale Bioassays to Predict the Toxic Potential of Freshwater Sediments through a Tier Process

CHANTALE CÔTÉ,^{1*} CHRISTIAN BLAISE,^{2*} JULIE SCHROEDER,¹ MÉLANIE DOUVILLE¹ AND JEAN-RENÉ MICHAUD³

¹BEAK International Incorporated, 455, boulevard Fénelon, bureau 104, Dorval, Québec H9S 5T8

²Centre Saint-Laurent, Environment Canada, 105 McGill, Montréal, Québec H2Y 2E7

³Eco-Innovation Technologique, Environment Canada, 105 McGill, Montréal, Québec H2Y 2E7

A battery of 20 bioassays was applied to assess test and endpoint performance in detecting the toxic potential of 15 freshwater sediment samples collected in the St. Lawrence River/Great Lakes systems. The bioassays included 18 micro-scale assays performed either on whole sediment, pore water or sediment organic extracts, as well as two standardized whole sediment bioassays undertaken with macroinvertebrates (*Chironomus riparius* and *Hyalella azteca*). Physical and chemical parameters of selected sediments were also analyzed to aid in the interpretation of results. Several qualitative and quantitative criteria were established for evaluating the reliability and usefulness of the micro-scale bioassays in predicting sediment toxicity based on a two-tier system. In Tier 1, micro-scale testing results were compared for general concordance with those of the benthic bioassays, benthic community structure index and with sediment contaminant levels. Micro-assays which complied with Tier 1 standards were further evaluated via a Tier 2 process consisting of selected (quantitative and qualitative) scientific and practical criteria. Of the 20 bioassays investigated, the two benthic assays and seven micro-scale assays successfully passed the double-tiered assessment. Micro-scale tests whose results most closely matched those of the benthic tests for appraisal of whole sediment toxicity, sediment contamination level and benthic community structure index included three bacterial assays (ATP assay, a micro-plate adaptation of the Microtox® assay, SOS Chromotest™), one algal assay (algal solid-phase test) and three micro-invertebrate assays (Thamnotoxkit™ F, Daphtoxkit™ F and *Hydra* assay). Two selected batteries, composed of the seven micro-scale assays and benthic invertebrate bioassays, are proposed for cost-effective appraisal of freshwater sediment toxicity.

Key words: freshwater sediments, toxicity, micro-scale assay, benthic invertebrate bioassay, test battery

Introduction

Contaminant levels (e.g., heavy metals, pesticides, PAHs and nutrients) reported in dredged sediments are a major cause of concern regarding

*Corresponding author

their potential impact on water quality and aquatic biota (Lee and Jones 1987; Burton 1991). Because of the inherent difficulty of properly assessing hazard associated with dredging solely by chemical analysis, which cannot account for bioavailability or various complex chemical interactions, toxicity test methods using benthic invertebrates were first developed (Burton 1996). These invertebrates have traditionally been accepted as ecologically relevant test species since they interact with other trophic levels and often control energy, nutrient and organic material cycling dynamics (Burton et al. 1992). Invertebrate testing procedures, involving several days of organism exposure to large volumes of whole sediment, are well developed and currently comprise well-accepted standard methodologies in use by various regulatory agencies for sediment toxicity assessment (US EPA 1994; Environment Canada 1996, 1997).

Since a single test species can never adequately reflect contaminant effects to all biota present in the environment, toxicity assessments are commonly conducted using several test species representing different trophic levels (Cairns 1986). In particular, short-term exposure micro-scale toxicity test batteries have been used successfully in recent sediment studies and have even shown good correlation with benthic organism responses and/or contaminant levels (Burton et al. 1989; Day et al. 1995; Burton et al. 1996; Côté et al. 1998). These tests are proving to be attractive to the scientific community at large because of their cost-effectiveness in providing rapid results. Practical applications with small-scale test assemblages include toxicity screening of large numbers of samples, early warnings of ecosystem stress, as well as the targeting of chemicals needing further assessment (Trevors 1986; Burton et al. 1992; Rathburn et al. 1996). At present, micro-scale tests are not universally accepted, however, since several methods have not yet been validated or standardized, and since factors affecting test responses to contaminated sediments are not fully understood (Burton et al. 1989; Giesy and Hoke 1989).

In 1995, a joint venture partnership was struck between BEAK International Incorporated (Dorval office and Environmental Biodetection Products Inc., Brampton, Ontario) and Environment Canada (Centre Saint-Laurent; Eco-Innovation Technologique, Environmental Protection) to (1) conduct a comprehensive study to assess the suitability of various micro-scale tests for sediment toxicity assessment, and (2) recommend an appropriate testing strategy for future cost-effective investigations of sediment-associated contamination. Performance of micro-scale tests was appraised by comparing their toxicity responses with those of benthic organism bioassays and benthic community structure index, as well as with sediment contaminant characteristics. In total, 15 sediment samples were collected and assessed with 20 different toxicity test methods described in detail by Côté et al. (1998). The approach employed to rank the suitability of the small-scale bioassays for freshwater sediment hazard assessment is described herein.

Methods

Collaborative Study—1995 and 1996

Test selection

A battery of 18 micro-scale tests was selected for our study based on several criteria (e.g., ecological relevance of bioassay organisms, sample throughput capability, availability of organisms, testing repeatability and reproducibility), BEAK and CSL laboratory testing experience with specific bioassays, and/or valued judgement influenced by reports in the scientific literature (see Côté et al. 1998 for further details). Tests included an array of liquid/solid-phase methods and diverse endpoints, displaying responses of bacteria, algae, various aquatic invertebrates and fish cells (Table 1). Partners performed those specific tests which they were either developing or applying in their particular laboratories. Prior to actual testing of sediments, reference toxicant testing was undertaken for all bioassays in order to build control charts which confirmed their procedural reliability. Conventional benthic invertebrate test methods developed with *Hyalella azteca* (Environment Canada 1996) and *Chironomus riparius* (Environment Canada 1997) were also included in our study to compare their responses to those of the micro-scale test methods.

Sediment samples

In the fall of 1995 and 1996, 15 sediment samples were collected by Ponar dredge during two outings from areas in Lake Erie, Lake Ontario and the St. Lawrence River. Sites were selected to represent a wide range of (inorganic and organic) contamination and included a relatively clean sediment (negative control) and a contaminated sediment (positive control). Sediments were placed in polyethylene buckets lined with polyethylene bags and transported to the laboratory where they were maintained at 4°C until processing. Details relating to site selection, sediment sampling, preservation and laboratory processing (i.e., homogenisation, subsample preparation, sediment pore water extraction and whole sediment organic solvent extraction) have been previously reported (Côté et al. 1998).

Sediment analyses

Toxicity responses were measured on whole sediment, pore water and/or organic extracts, depending on the capability of particular biotests to assess each of these media. Selected physical and chemical parameters were also analyzed on whole sediment, pore water and organic extract samples (Côté et al. 1998). Heavy metals, PCBs, PAHs, and oil and grease were quantified because of their relevance as sediment contaminants and because they are often detected in sediments impacted by anthropogenic activities. Ammonia, particle size distribution, total organic carbon and acid volatile sulfides were also characterized in sediments and extracts. In addition to toxicity and chemical analyses, benthic community structure

Table 1. Selected biological tests performed on whole sediment (SED), interstitial water (IW) and/or sediment organic extracts (EXT)

Assay/test organism	Assessment endpoint	Exposure period	Test matrix	Performing laboratory	Reference
<i>Conventional sediment assays (standardized protocols)</i>					
Freshwater amphipod <i>Hyalella azteca</i>	Survival and growth	14 d	SED	BEAK International	Env. Can. 1996
Freshwater midge <i>Chironomus riparius</i>	Survival and growth	10 d	SED	BEAK International	Env. Can. 1997
<i>Liquid phase micro-scale assays</i>					
Microtox® <i>Vibrio fischeri</i>	Light inhibition	15 min	IW/EXT	BEAK International	Env. Canada 1992a
Algal growth inhibition assay <i>Selenastrum capricornutum</i>	Growth inhibition	72 h	IW	Centre Saint-Laurent	Env. Canada 1992b
Thamnotoxkit™F <i>Thamnocephalus platyurus</i>	Survival	24 h	IW/EXT	BEAK International	Creative Selling 1992a
Rotokit™ F <i>Brachionus calicyflorus</i>	Survival	24 h	IW	BEAK International	Creative Selling 1992b
Daphnia I.Q.™ <i>Daphnia magna</i>	Ingestion inhibition	1 h 15 min	IW	BEAK International	Aqua Survey Inc. 1993
Algal enzymatic assay <i>Selenastrum capricornutum</i>	Esterase inhibition	4–24 h	IW	Centre Saint-Laurent	Ménard 1996
Hydra assay <i>Hydra attenuata</i>	Survival	24–96 h	IW/EXT	Centre Saint-Laurent	Trottier et al. 1997
Microtox® microplate <i>Vibrio fischeri</i>	Light inhibition	15–60 min	IW/EXT	Centre Saint-Laurent	Blaise et al. 1994

(continued)

Table 1. (concluded)

Assay/test organism	Assessment endpoint	Exposure period	Test matrix	Performing laboratory	Reference
Trout hepatocyte cell assay <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cell viability	24–48 h	EXT	Centre Saint-Laurent	Gagné and Blaise 1996
Algaltoxkit™ F <i>Selenastrum capricornutum</i>	Growth inhibition	72 h	IW	BEAK International	Creative Selling 1996a
Daphtoxkit™ F <i>Daphnia magna</i>	Survival	48 h	IW	BEAK International	Creative Selling 1996b
Microtox® chronic <i>Vibrio fischeri</i>	Light inhibition	16 h	IW/EXT	Centre Saint-Laurent	Microbics Inc. 1995
SOS Chromotest™ <i>Escherichia coli</i> PQ37	SOS DNA repair (+/-S9 metabolic activation)	2 h	IW/EXT	EBPI Inc.	Fish et al. 1987
Solid-phase micro-scale assays					
Algal solid-phase assay <i>Selenastrum capricornutum</i>	Esterase inhibition and membrane integrity	4–24 h	SED	Centre Saint-Laurent	Blaise and Ménard 1998
Direct SOS Chromotest™ <i>Escherichia coli</i> PQ37	SOS DNA repair (+/-S9 metabolic activation)	24 h	SED	EBPI Inc.	Dutka et al. 1995
Microtox® solid-phase test <i>Vibrio fischeri</i>	Light inhibition	20 min	SED	BEAK International	Microbics Inc. 1995
ToxiChromoPad™ <i>Escherichia coli</i>	β-galactosidase inhibition	4 h	SED	EBPI Inc.	EBPI 1995
ATP Test Endemic microbial populations	Microbial biomass estimate of sediment	—	SED	BEAK International	Charm Science Inc. 1995

was investigated at four sites during the 1996 survey and appraised with a biotic index (Shannon and Wiener 1949).

Quality assurance

Biological testing and chemical characterization of coded samples were undertaken within six weeks of sediment collection. Pore water was extracted within 2 to 3 weeks of sample collection. Liquid phase assays and interstitial water chemical analyses were initiated within 24 h. Liquid phase tests with reference toxicants were routinely conducted to confirm the health of amphipod and chironomid cultures and to ensure adequate performance of all liquid phase bioassays. Quality assurance for bioassays performed on organic extracts was accomplished using a solvent blank and an extract of the reference (non-toxic) sediment (Long Point station in Lake Erie). As with all sediment sample extracts, the solvent blank was subjected to an identical extraction and cleanup procedure (Côté et al. 1998).

Micro-Scale Assay Performance Assessment

A grading scheme inspired from Dutka et al. (1988) for site screening was adapted to determine whether micro-scale tests could be good predictors of either (1) benthic invertebrate bioassay response, (2) benthic community structure response, and/or (3) sediment contaminant characteristics. To facilitate response comparison for these three classes, three hazard levels were established, based on criteria and taking into account the toxicity or contaminant gradient displayed by each class for the 15 sediment samples studied as well as professional judgement (see below). This scheme allowed us to assign bioassay responses and contaminant concentrations for sediments into levels indicating slight or no hazard, moderate hazard or high hazard (Tables 2a and 2b).

Since most microbioassays assessed in our study were recently developed, it was not possible to assign hazard levels based on previous data and therefore to fix such levels prior to testing of the 15 sediment samples. For relatively well-standardized bioassays with benthic organisms (i.e., *H. azteca* and *C. riparius*), and the Microtox solid phase, hazard levels were based on previously established (or interim) criteria. For all other tests, differing endpoints and sensitivities required that we look at their individual overall responses before assigning hazard levels based on "professional judgment". Assignment of hazard levels for bioassays (Table 2a) is best understood by considering Thamnotoxkit™ F test results obtained on interstitial waters for the 15 sediment samples. This micro-biotest gave the following LC₅₀ results (expressed in % v/v) reproduced hereafter in ascending order of hazard: 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 97, 44.2, 22.7, 19.9, 13.9, 9.2. Based on this particular range of LC₅₀s, it is clear that 100 and 97% values stand out from the 44.2% value and that the 9.2 to 22.7% values stand out from the latter. Hence, valued judgement applied for this set of LC₅₀ results is able to propose the following hazard levels for Thamnotoxkit™ F: slight or no hazard (≥80%),

Table 2a. Hazard levels assigned for bioassays performed on 15 investigated sediment samples based on the response gradient obtained for each test

	Slight or no hazard	Moderate hazard	High hazard
Whole sediment assays			
Survival of <i>Chironomus riparius</i>	≥60%	30-59%	<30%
Growth of <i>Chironomus riparius</i> (mg per organism)	≥0.5%	0.4-0.49	<0.4
Survival of <i>Hyalella azteca</i>	≥60%	30-59%	<30%
Growth of <i>Hyalella azteca</i> (mg per organism)	≥0.1	0.05-0.1	<0.05
Microtox® solid-phase ¹ (IC ₅₀ mg/L dry wt)	≥5000	1000-4999	<1000
ToxiChromoPad™ (IC ₁₀₀ % dry wt sediment/volume)	≥0.1	0.03-0.099	<0.03
ATP test (relative light units/g of dry wt sediment)	≥1.0E07	4.0E06-9.9E06	<4.0E06
Algal solid-phase assay (LOEC in % wet weight sediment/volume)	≥ 10	0.5-10	<0.5
Interstitial water assays			
Thamnotoxkit™ F (LC ₅₀ in % v/v)	≥80%	30-79%	<30%
Rotokit™ F (LC ₅₀ in % v/v)	≥80%	50-79%	<30%
Algal growth inhibition assay (TEC ² in % v/v)	≥80%	50-79%	<30%
Daphnia IQ™ (LC ₅₀ in % v/v)	≥60%	30-59%	<30%
Algal enzymatic assay (LOEC in % v/v)	≥80%	50-79%	<30%
<i>Hydra</i> test (TEC ² in % v/v)	≥60%	15-59%	<15%
Microtox® liquid phase (IC ₅₀ in % v/v)	≥80%	30-79%	<30%
Microtox® microplate (LOEC in % v/v)	≥60%	15-59%	<15%
Trout hepatocyte viability (TEC ² in % v/v)	≥60%	20-59%	<20%

(continued)

Table 2a. (concluded)

	Slight or no hazard	Moderate hazard	High hazard
Algaltoxkit™ F (EC ₅₀ in % v/v)	≥60%	15–59%	<15%
Daphtoxkit™ F (LC ₅₀ in % v/v)	≥80%	30–79%	<30%
Chronic Microtox® (TEC ² in % v/v)	≥60%	15–59%	<15%
SOS Chromotest™ (induction factor)	≤1.19	1.2–1.5	>1.5
Organic Extracts³			
Microtox® (IC ₅₀ g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.001	0.0001–0.001	<0.0001
Thamnotoxkit™ F (LC ₅₀ g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.01	0.001–0.01	<0.001
Rottoxkit™ F (LC ₅₀ g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.1	0.01–0.1	<0.01
<i>Hydra</i> test (TEC ² g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.005	0.0001–0.005	<0.0001
Microtox® microplate (TEC ² g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.001	0.0001–0.001	<0.0001
Trout hepatocyte viability (TEC ² g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.01	0.001–0.01	< 0.001
Chronic Microtox® (TEC ² g dry wt sed. equiv./mL assay)	≥0.01	0.001–0.01	<0.0001
SOS Chromotest™ (induction factor)	≤1.19	1.2–1.5	>1.5

¹ Interim criteria used by Environment Canada, Quebec Region.

² TEC: threshold effect concentration: geometric mean of LOEC and NOEC.

³ Highest test concentration corresponded to 0.25 g sediment dry wt equivalent/mL of assay.

Table 2b. Hazard levels assigned for contaminant classes analyzed in 15 sediment samples

	Slight or no hazard	Moderate hazard	High hazard	Reference
Ammonia (mg/kg)	≤75	>75–200	>200	US Fish and Wildlife 1988
PCBs (mg/kg)	≤0.2	>0.2–1.0	>1.0	Env. Canada and min. Env. Québec 1992
PAHs (mg/kg)	≤6.8	>6.8–68	>68	Chapman 1986
Oil and grease (mg/kg)	≤1000	>1000–2000	>2000	US Fish and Wildlife 1988
SEM-AVS ratio ¹	≤1	>1–10	>10	Present study

¹ Ratio of simultaneously extracted metals (SEM) and acid volatile sulfides (AVS).

moderate hazard (30–79%), and high hazard (<30%).

Hazard levels based on sediment contaminant concentrations (Table 2b) were inspired by US EPA criteria defining “moderately polluted” and “heavily polluted” sediments (US Fish and Wildlife Service et al. 1988) or from defined biological effect levels established by Environment Canada and ministère de l’Environnement du Québec (1992). When data for a specific parameter were unavailable, criteria were taken from literature values defining biological effects. Hazard level assignment for each sediment site was based on the highest contaminant concentration determined for any one parameter. For example, if chemical data indicated no contamination from all analyzed parameters except PCBs, hazard level would then be assigned according to that parameter. In this scheme, we assume that the presence of any one class of contaminants can potentially cause adverse effects on its own and suffices to rank sediments into a specific level of hazard.

The Shannon Wiener index was used to rank sediments based on benthic community surveys conducted at four sampling sites. The H' index, which provides an estimation of severely or moderately polluted sites (Shannon and Wiener 1949), was estimated as follows:

$$H' = - \sum (n_i/N) \log_2 (n_i/N)$$

where n_i = number of individuals of taxon i , and N = total number of individuals.

In general, relatively high diversity reflects moderate population numbers of a large number of taxa in the community and may indicate good water quality, while low values reflect high population numbers of a

few taxa and may indicate impaired communities (Wilhm and Dorris 1968). In this work, the H' index identifies three levels of polluted sediments:

	Non-polluted	Moderately polluted	Highly polluted
Shannon Wiener index:	≥ 3	1-3	< 1

Adequacy of micro-scale tests to assess toxic hazard of freshwater sediments was appraised with a two-tiered system. In Tier 1, micro-scale test results were compared with those of benthic invertebrate bioassays, benthic community structure index and with sediment contaminant levels. Microbioassays having successfully passed Tier 1 level criteria (see below) were further evaluated via a Tier 2 process consisting of various (quantitative and qualitative) scientific and practical criteria.

Tier 1: Agreement of micro-scale test results with benthic invertebrate assays, benthic community structure index and sediment contamination

Hazard levels assigned for each microbiotest, regardless of the sediment matrix from which they were derived (i.e., pore water, organic extract or whole sediment), were compared to those of the benthic invertebrate tests, sediment contaminant characteristics and benthic community index (Table 3). Chemical data from pore waters and organic extracts were not considered in this scoring comparison since the main objective was to identify microbiotests which could specifically relate to whole sediment contaminant levels. We considered that there was 100% agreement between two tests when hazard levels coincided, 50% agreement when they were off by one level and 0% (no agreement) when off by two levels. Based on a *priori* overall inspection of data, we ruled that a micro-scale test would successfully pass Tier 1 if it were able to achieve 100% agreement with benthic invertebrate assays, sediment contaminant levels and benthic community index for at least 10% of the sites and 50% agreement for at least 70% of the sites. These Tier 1 pass/fail criteria obliged microbioassays to show some (initial) semi-quantitative relationship with sediment toxicity by demonstrating a certain degree of agreement, as stated previously, with benthic bioassay responses, contaminant concentrations and benthic community index. As an example, the Microtox® solid-phase test passed Tier 1 in that it demonstrated 100% agreement for 20% (3/15), 27% (4/15) and 50% (2/4) of compared sample sites with benthic invertebrate, contaminants and benthic community test results, respectively (Table 3). It further showed 50% or more agreement for 73% (11/15), 73% (11/15) and 100% (4/4), respectively, for the same sediment sites.

Tier 2: Adequacy of micro-scale tests based on (quantitative and qualitative) scientific and practical criteria

Eligible tests were further assessed with scientific and practical cri-

Table 3. Agreement of micro-scale tests with benthic invertebrate bioassays, contaminant levels and benthic community structure index according to Tier 1 criteria (see text for details)

Assays	Micro-scale tests versus benthic invertebrate tests Agreement					Micro-scale tests versus contamination Agreement					Micro-scale tests versus benthic community structure Agreement				
	100%	50%	0%	Number of samples	Agree- ment ¹	100%	50%	0%	Number of samples	Agree- ment ²	100%	50%	0%	Number of samples	Agree- ment ³
Conventional assays															
<i>H. azteca</i> survival ²	—	—	—	—	—	14	1	0	15	✓	2	2	0	4	✓
<i>C. riparius</i> survival ²	—	—	—	—	—	11	4	0	15	✓	1	3	0	4	✓
Whole sediment assays															
ATP test ²	9	3	3	15	✓	10	4	1	15	✓	1	3	0	4	✓
Microtox® solid phase ²	3	8	4	15	✓	4	7	4	15	✓	2	2	0	4	✓
ToxiChromoPad™ ²	6	8	1	15	✓	9	5	1	15	✓	4	0	0	4	✓
Solid-phase algal assay ²³	3	2	0	5	✓	5	0	0	5	✓	3	1	0	4	✓
Interstitial water assays															
Microtox® liquid phase	7	1	7	15	—	8	2	5	15	—	1	3	0	4	✓
Microtox® microplate ²	4	9	2	15	✓	5	8	2	15	✓	2	2	0	4	✓
Microtox® chronic ²	2	2	1	5	✓	2	2	1	5	✓	2	1	1	4	✓
Algal growth inhibition	5	1	4	10	—	6	0	4	10	—	—	—	—	—	—

(continued)

Table 3. (concluded)

	Number of samples					Number of samples					Number of samples				
	100%	50%	0%	Agreement ¹		100%	50%	0%		Agreement ²	100%	50%	0%		Agreement ³
Algaltokit™ F	2	0	3	5	—	0	2	3	5	—	0	3	1	4	—
Algal enzymatic assay	5	1	4	10	—	6	0	4	10	—	—	—	—	—	—
Thamnotokit™ F ²	11	2	2	15	✓	12	1	2	15	✓	2	2	0	4	✓
Daphtokit™ F ²³	5	0	0	5	✓	3	2	0	5	✓	1	3	0	4	✓
Daphnia IQ™ ²	6	2	2	10	✓	7	1	2	10	✓	—	—	—	—	—
Rotokit™ F	5	1	4	10	—	6	0	4	10	—	—	—	—	—	—
Hydra assay ²	7	8	0	15	✓	8	7	0	15	✓	3	1	0	4	✓
Viability of hepatocyte cells	4	3	8	15	—	6	2	7	15	—	2	2	0	4	✓
SOS Chromotest™ ^b	6	9	0	15	✓	8	7	0	15	✓	4	0	0	4	✓
Organic extracts assays															
Microtox® liquid phase	3	0	6	9	—	3	2	4	9	—	1	3	0	4	✓
Microtox® microplate ²	4	4	1	9	✓	6	2	1	9	✓	4	0	0	4	✓
Microtox® chronic	2	1	1	4	✓	0	3	1	4	—	1	2	1	4	✓
Thamnotokit™ F ²	2	5	2	9	✓	4	3	2	9	✓	4	0	0	4	✓
Hydra assay ²	4	5	0	9	✓	5	4	0	9	✓	3	1	0	4	✓
Viability of hepatocyte cells	3	3	3	9	—	5	1	3	9	—	2	1	1	4	✓
SOS Chromotest™ (+S9)	3	0	6	9	—	3	2	4	9	—	1	3	0	4	✓

¹ A micro-scale test successfully passes Tier 1 when it is able to achieve 100% agreement with conventional assays, sediment contaminant levels and benthic community structure index for at least 10% of the sites and 50% agreement for at least 70% of the sites.

² Indicates assays that pass Tier 1.

³ This recently developed assay only became available near the latter stages of our study and was appraised with only 5 sediment samples.

teria selected and agreed upon by partners during the collaborative study. Scientific criteria included reproducibility, repeatability, ecological relevance and validation, as defined in Table 4. Spearman correlations ($p < 0.05$) of microbiotests with benthic invertebrate bioassay results and with (natural and xenobiotic) contaminant levels were also considered to augment the discriminatory power of the appraisal process (Côté et al. 1998). Practical criteria included test preparation time, result time, sample throughput, cost of consumable materials, cost of analytical equipment and availability of organisms, as defined in Table 5.

Because it was deemed that scientific criteria (e.g., ecological relevance, correlation between benthic invertebrate tests and sediment contamination results) should be given more overall weight than practical criteria (e.g., analytical cost and speed of testing) in defining micro-scale test adequacy to evaluate sediment toxicity, scores established for scientific criteria were enhanced by a factor of 1.5. As an example, the amphipod bioassay conducted with *Hyalella azteca* amassed a total of 18 points based on scientific criteria (Table 4). This tally was enhanced 1.5 times (weight factor owing to scientific criteria) to 27 (18×1.5). Final score for this bioassay then became 35 ($27 + 8$) when marks based on practical criteria were added on (Table 5). Successful passing of Tier 2 for a microbiotest was set at ≥ 25 after summation of both scientific and practical criteria scores. This value represents 50% of the maximum number of points obtainable for a toxicity test.

Results and Discussion

Eighteen micro-scale bioassays (Table 1) were appraised for their ability to relate to freshwater sediment toxicity by comparing their responses to benthic invertebrate test response, sediment contaminant levels and in situ benthic community responses measured in samples collected from 15 sites representing a diversified array of (in)organic contamination. After assigning hazard levels for each bioassay based on its gradient of responses to specific sediment media (Table 2a) and for contaminant parameters analyzed (Table 2b), response agreement of micro-scale bioassays was gauged against benthic invertebrate bioassays, contaminant concentrations and benthic community index (Table 3).

Of the initial 18 micro-scale tests, 11 passed the acceptance criteria set by the Tier 1 process. Barring the direct SOS Chromotest™ (Table 1), eliminated due to a lack of positive responses, all four other small-scale solid-phase assays successfully complied with Tier 1 criteria (Table 3). This is not an unexpected result since experimental protocols for the Microtox® solid-phase assay, the ToxiChromoPad™ assay and algal solid-phase assay, clearly favour "intimate contact" of assay micro-organisms with the sediment matrix. As shown, their toxicity responses generally agree with those elicited by benthic invertebrate bioassays and the benthic community structure index, and also with contaminant levels (Table 3). While the

Table 4. Decisional matrix for bioassays based on Tier 2 scientific criteria (see text for details)

Bioassay/Organisms	Fraction*	Repro- ducibi- lity ¹	Repeat- ability ²	Ecological relevance ³	Vali- dation ⁴	Correlation with benthic invertebrate bioassays ⁵	Correlation with contami- nants ⁵	Correlation with natural substances ⁶	Point total (X 1.5) ⁷
Conventional assays									
Amphipod <i>Hyalella azteca</i>	SED	1	2	3	3	3	3	3	18 (27)
Midge <i>Chironomus riparius</i>	SED	0	2	3	3	3	3	3	17 (25.5)
Whole sediment micro-scale assays									
ATP test - indigenous microbes	SED	1	2	3	1	0	3	3	13 (19.5)
Microtox® solid-phase <i>Vibrio fischeri</i>	SED	1	n.a.**	0	2	0	0	0	3 (4.5)
ToxiChromoPad™ <i>Escherichia coli</i>	SED	0	1	0	1	0	3	0	5 (7.5)
Algal solid-phase assay	SED	3	2	1	0	3	3	3	15 (22.5)
Interstitial water and organic extracts assays									
Microplate based Microtox® <i>Vibrio fischeri</i>	IW/EXT	1	2	0	1	0	1.5	3	8.5 (12.75)
Microtox® chronic <i>Vibrio fischeri</i>	IW/EXT	0	2	0	1	1.5	1.5	-	6 (9)
Thamnotoxkit™ F <i>Thamnocephalus platyurus</i>	IW/EXT	0	3	0	1	3	3	3	13 (19.5)
Daphtoxkit™ F <i>Daphnia magna</i>	IW	1	3	1	1	1.5	0	3	10.5 (15.75)
Daphnia I.Q.™ <i>Daphnia magna</i>	IW	0	n.a.	1	1	0	0	3	5 (7.5)
Hydra assay <i>Hydra attenuata</i>	IW/EXT	1	3	1	1	3	3	0	12 (18)
SOS Chromotest™ <i>Escherichia coli</i> PQ37	IW/EXT	1	2	0	3	3***	3***	n.a.	12 (18)

(continued)

Table 4. (concluded)

*SED, sediment; IW, interstitial water; EXT, organic extract.

**n.a., not available.

***Discriminant analysis instead of Spearman correlation.

¹As indicated by coefficient of variation for reference toxicant testing: 3, cv<10%; 2, cv between 10 and 20%; 1, cv between 20 and 30%; 0, cv between 30 and 40%.

²Observed agreement in bioassay endpoint values (EPV) generated for each of two coded (blind) subsamples: 3, perfect agreement ($\pm 5\%$ difference in EPV with overlapping 95% confidence intervals); 2, good agreement ($\pm 20\%$ difference in EPV with overlapping 95% confidence intervals); 1, moderate agreement ($\pm 30\text{--}40\%$ difference in EPV with overlapping 95% confidence intervals); 0, poor agreement (more than 40% difference in EPV with no overlap in 95% confidence intervals).

³Ecological relevance: 3, species present in freshwater sediment; 2, species present in the water of the St. Lawrence River; 1, freshwater species present in North America; 0, infrequent species.

⁴Validation (e.g., Microtox®): 3, 10 publications and more; 2, between 5 and 10; 1, between 4 and 1; 0, no publication.

⁵Correlation (Spearman, $p<0.05$) = 3; no correlation = 0.

⁶Correlation (Spearman, $p<0.05$) = 0; no correlation = 3.

⁷Weight factor (see text for details).

Table 5. Decisional matrix for bioassays based on Tier 2 practical criteria (see text for details)

Bioassay/Organisms	Fraction*	Test preparation time ¹	Time to result ²	Sample throughput ³	Cost of consumable material ⁴	Cost of analytical instruments ⁵	Availability of organisms ⁶	Point total (sum of tier 2 process) ⁷
Conventional assays								
Amphipod <i>Hyaella azteca</i>	SED	0	0	2	3	3	0	8 (35)
Midge <i>Chironomus riparius</i>	SED	0	0	2	3	3	0	8 (33.5)
Whole sediment micro-scale assays								
ATP test - indigenous microbes	SED	3	3	3	2	2	3	16 (35.5)
Microtox® solid-phase <i>Vibrio fischeri</i>	SED	2	3	1	2	1	3	12 (16.5)
ToxiChromoPad™ <i>Escherichia coli</i>	SED	3	3	3	2	3	2	16 (23.5)
Solid-phase algal assay	SED	0	3	0	2	0	1	6 (28.5)
Interstitial water and organic extracts assays								
Microplate based Microtox® <i>Vibrio fischeri</i>	IW/EXT	2	3	3	2	1	3	14 (26.75)
Microtox® chronic <i>Vibrio fischeri</i>	IW/EXT	2	2	1	1	1	3	10 (19)
Thamnotoxkit™ F <i>Thamnocephalus platyurus</i>	IW/EXT	3	3	3	1	3	2	15 (34.5)
Daphtoxkit™ F <i>Daphnia magna</i>	IW	1	1	3	1	3	1	10 (25.75)
<i>Daphnia</i> I.Q.™ <i>Daphnia magna</i>	IW	2	3	3	2	3	0	13 (20.5)
<i>Hydra</i> assay <i>Hydra attenuata</i>	IW/EXT	2	0	1	2	3	1	9 (27)
SOS Chromotest™ <i>Escherichia coli</i> PQ37	IW/EXT	3	3	3	2	2	2	15 (33)

(continued)

Table 5. *(concluded)*

*SED, sediment; IW, interstitial water; EXT, organic extracts.

¹Includes culture and maintenance of organisms, experimental setup and endpoint measurement: 3, less than 60 min; 1, between 2 and 5 h; 2, between 60 and 120 min; 0, more than 5 h.

²Time between test initiation and endpoint measurement: 3, 1 day; 2, 2 days; 1, 3 to 4 days; 0, more than 4 days.

³Number of samples tested on the same day: 3, 10 or more; 2, between 7 and 9; 1, between 6 and 4; 0, 3 or less.

⁴Material cost for one sample: 3, less than \$40; 2, between \$20 and \$100; 1, between \$100 and \$200; 0, more than \$200.

⁵Cost of analytical instruments: 3, less than \$5000; 2, between \$5000 and \$10,000; 1, between \$10,000 and \$50,000; 0, more than \$50,000.

⁶Availability of organisms: 3, on the same day; 2, in 24 h; 1, between 1 and 7 days; 0, more than one week.

⁷Total points: sum of Tier 2 scientific (Table 4) and practical (Table 5) scores.

ATP test is not, *sensu strictu*, a real toxicity test, but rather a direct measure of the viable indigenous microbial biomass present in each sediment sample, it nevertheless appears to reflect sediment hazard in terms of benthic invertebrate bioassay and *in situ* benthic response as well as contaminant loadings. Not surprisingly, benthic bioassays with *H. azteca* and *C. riparius* compared well with contaminant levels and benthic community structure index (Table 3), thereby proving eligible for subsequent Tier 2 evaluation. Compliance of interstitial water and organic extract micro-scale assays with Tier 1 criteria was notably less, as only 7/13 of the former and 3/7 of the latter met set requirements (Table 3). While various physico-chemical and biological processes inherent to sediment-pore water interactions (Burton 1991, Liss and Ahlf, 1997) and specific solvent extraction procedures (Ho et al. 1994) can modulate toxicity responses and influence potential relationships which can exist among sediment fractions (i.e., whole sediment, pore water and sediment organic extracts), this study nevertheless indicates that some interstitial and organic extract micro-scale assays can be predictive of whole sediment toxicity.

Conventional (benthic invertebrate) bioassays and micro-scale assays, having passed Tier 1 appraisal, were further assessed with selected scientific (Table 4) and practical (Table 5) criteria. As explained earlier, successful compliance with this Tier 2 evaluation required candidate tests to amass a point total of at least 25 after summation of their scientific and practical scores (Table 5). Of the 11 micro-scale tests subjected to Tier 2 evaluation, 4 failed to meet grading objectives set by either scientific (Table 4) and/or practical (Table 5) criteria. Unsuccessful assays included the Microtox® solid phase, the ToxiChromoPad™, the Microtox® chronic and the Daphnia I.Q.™ tests. As can be seen from Table 4, failure of these four assays essentially stems from overall lack of reproducibility and ecological relevance as well as poor (or inexistent) statistical correlation with benthic invertebrate response and/or sediment chemical contamination. Surprising, perhaps, is the poor performance of the Microtox® solid-phase assay which, contrary to our results, had been previously reported to correlate well with *C. riparius* and *H. azteca* survival and growth sediment tests (Day et al. 1995). While it did exhibit semi-quantitative concordance with benthic invertebrate bioassays, benthic community structure response and contaminant levels under Tier 1 (Table 3), absence of significant correlations under Tier 2, coupled with nitrogen ammonia correlation (Côté et al. 1998), a substance which can be of either natural or anthropogenic origin, clearly ruled in its disfavour (Table 4).

Of the 20 bioassays employed in this study, the two conventional assays and seven micro-scale assays performed sufficiently well to comply with the double-tiered assessment process (Table 6). It was clearly essential that our study confirm overall performance and sediment toxicity predictive potential for the *H. azteca* and *C. riparius* benthic invertebrate bioassays, since they comprised the reference for comparison with the micro-scale assays. In this sense, our investigation demonstrated their high scientific rating (see their respective point total in Table 4) and corroborated the

Table 6. Summary of Tier 1 and Tier 2 bioassay evaluation process

Bioassays	Passed Tier 1	Passed Tier 2
Conventional assays		
<i>H. azteca</i> survival	✓	✓
<i>C. riparius</i> survival	✓	✓
Whole sediment assays		
ATP test	✓	✓
Microtox® solid-phase	✓	
ToxiChromoPad™	✓	
Algal solid phase assay	✓	✓
Pore water assays		
Microtox® microplate	✓	✓
Microtox® chronic	✓	
Thamnotoxkit™ F	✓	✓
Daphtoxkit™ F	✓	✓
Daphnia IQ™	✓	
<i>Hydra</i> assay	✓	✓
SOS Chromotest™	✓	✓

results of recent studies revealing good correlations between conventional bioassays and sediment contamination (Besser et al. 1996) and between conventional bioassays and benthic community structure (Day et al. 1995).

Micro-scale tests whose results most closely matched those of conventional tests for appraisal of whole sediment toxicity, sediment contamination level and benthic community structure index included three bacterial assays (ATP assay, a microplate adaptation of the Microtox® assay and SOS Chromotest™), one algal assay (algal solid-phase test) and three micro-invertebrate assays (Thamnotoxkit™ F, Daphtoxkit™ F and *Hydra* assay). The ATP assay, a very simple biotic index of active microbial flora present within sediments (Côté et al. 1998), appears to hold promise as a rapid screening tool to detect sediment toxicity potential. Because the use of ATP as a general measure of sediment hazard is limited to this study, however, this assay will require substantially more validation with additional sediment samples. No Microtox® assay, with the exception of its adaptation in 96-well microplates (Blaise et al. 1994), presented acceptable results in terms of toxicity prediction toward sediments. Unlike the latter, all pore water samples tested with the acute Microtox® liquid-phase assay were reported to be non toxic (Côté et al. 1998). Result discrepancy is partially explainable by the fact that marginal toxicity effects (i.e., less than 50% decreases in light reduction of the *V. fischeri* bacterial reagent) resulted following pore water exposure tests. While measurable endpoint values based on LOECs could be determined for the Microtox® microplate procedure because test concentration replicates enabled

hypothesis testing, the conventional acute Microtox® test procedure only allowed IC50s greater than 50% v/v to be reported. Although further testing with a 90% acute v/v Microtox assay test procedure could have been envisaged, sediment pore waters were too old to reassess (>72 h) after interlaboratory (BEAK International and Centre Saint-Laurent) toxicity data had been compared. In the presence of S9 metabolic activation mixture, the SOS Chromotest™ detected genotoxicity in pore water samples. Discriminant analysis attributed its response to PAH contamination and SOS response was also found to be linked to that of benthic invertebrate survival (Côté et al. 1998). Lack of correlation between the SOS Chromotest™ and organic extracts prepared from sediments, clearly more contaminated with PAHs than pore waters (Côté et al. 1998), may be attributed to extraction procedure, cited recently as a key factor in false negative or positive results (Ho et al. 1994; Day et al. 1995). The algal solid-phase test was the only phytotoxicity assay employed in this work which holds promise for sediment toxicity assessment. It has recently been appraised with certified reference material sediments and various natural sediments and appears to have good discriminatory power to demarcate the toxic potential of sediments based on their degree of contamination (Blaise and Ménard 1998). Further validation studies with solid media are presently ongoing with this assay at the Centre Saint-Laurent laboratories. Thamnotoxkit™ F and Daphtoxkit™ F (commercially sold by Bio-International), two of three micro-invertebrate cyst-based assays evaluated herein, fared equally well in predicting sediment toxicity via pore water assessment. An earlier study had reported similar sensitivity responses for both bioassay indicators exposed to contaminated water samples (Persoone et al. 1993). Less sensitive than its counterparts, the Rotokit™ F was unable to detect toxicity in any of the sediment pore waters (Côté et al. 1998). Although the use of *Hydra* species in the field of toxicology is not new (Stebbing and Pomroy 1978; Johnson and Gabel 1982), the development and application of more cost-effective procedures to evaluate the toxic potential of complex environmental samples is a rather recent endeavour. As well as demonstrating ample capabilities to screen hazard in industrial wastewaters (Fu et al. 1991; Blaise and Kusui 1997; Trottier et al. 1997), this study will have shown that the *Hydra* assay is also able to augment its scope of usefulness for the investigation of sediment interstitial waters. Equally important to note is the rather impressive sensitivity response of the micro-invertebrate tests which successfully passed tiers 1 and 2, owing to the fact that lethality was the measured endpoint for this group in contrast to all other micro-scale assays where sublethal endpoints were invariably measured.

In conclusion, our study showed that seven micro-scale assays, along with the two conventional assays, appear reliable to assess the toxic potential of freshwater sediments (Table 6). If these nine bioassays were to be considered to appraise hazards linked to the displacement of freshwater sediments (e.g., dredging activities), we would suggest using them in a two-battery tiered approach (Table 7). The first battery, composed of the

Table 7. Suggested batteries for assessing the toxic potential of freshwater sediments based on results of this study

	Trophic level	Assays	Fraction
Battery 1 (screening)	Primary producers	Algal solid-phase test	Whole sediment
	Decomposers	ATP assay	Whole sediment
	Include physicochemical analysis of specific parameters (NH ₃ , SEM, AVS, TOC, grain size, metals, PAHs, PCBs) in whole sediment.		
	Trophic level	Assays	Fraction
Battery 2 (confirmatory)	Primary consumers	Conventional assay (<i>H. azteca</i> and/or <i>C. riparius</i> survival)	Whole sediment
		Thamnotoxkit™ F or Daphtoxkit™ F	Pore water
	Secondary consumers	<i>Hydra</i> assay	Pore water
	Decomposers	Microtox® acute assay SOS Chromotest™	Pore water Pore water

algal solid-phase and ATP assays, complemented with comprehensive physicochemical analysis of key parameters, would essentially prove useful as an initial cost-effective screen for toxicity in the whole sediment fraction. Absence of measurable toxicity in both bioassays, coupled with demonstrated contaminant concentrations all falling below recognized levels of hazard, should then suffice to curtail the need for further testing. Positive bioassay responses displayed by either the algal solid-phase assay or the ATP assay and/or the significant presence of (geno)toxic classes of chemicals (e.g., metals, PCBs and PAHs) in sediment would, however, signal a potential toxicity problem and trigger the conduct of a second (confirmatory) battery. Because they are direct contact assays with benthic organisms having undergone a substantial degree of validation, conventional tests with *H. azteca* and/or *C. riparius* would be essential here to confirm suspected whole sediment toxicity. In the second battery as well, micro-scale assays conducted on pore waters (comprising Thamnotoxkit™ F or Daphtoxkit™ F, the *Hydra* assay as well as bacterial tests, including an acute Microtox® assay and the SOS Chromotest™) would also be useful to demonstrate potential hazards toward water column biota stemming from movement of contaminated sediments. Genotoxic potential, in particular, should be evaluated with at least one micro-scale assay. Recent studies recognize the importance for genotoxicity measurements in test batteries owing to the large spectrum of potentially harmful effects which genotoxicants can exert on aquatic organisms (Blaise et al. 1988; Ho et al. 1994; White et al. 1996). In this sense, con-

ducting the SOS Chromotest™ on pore waters in the second confirmatory battery is justified. Although the micro-scale assays identified in the test batteries are presently applicable and appear promising for whole sediment and pore water hazard assessment, further validation with additional sediment samples will be required to insure their reliability as useful tools for cost-effective freshwater sediment management and decision-making.

Acknowledgments

This study was the collaborative effort of Environment Canada's Québec Region (Eco-Innovation Technologique of Environmental Protection and the Centre Saint-Laurent of Environmental Conservation) and BEAK International Incorporated. The authors thank N. Bermingham for useful discussions and Ran Lifshitz and Nelson Batista for their technical contribution. Respective managements are gratefully acknowledged for their support of this applied research initiative. Financial support for this study came from the Saint-Lawrence Vision 2000 Action Plan and from BEAK International Incorporated

References

- Aqua Survey Inc. 1993. Daphnia I.Q. toxicity test kit™ instructions (revised).
- Besser JM, Giesy JP, Kubitz JA, Verbrugge DA, Coon TA and Braselton WE. 1996. Assessment of sediment quality in dredged and undredged areas of the Trenton Channel of the Detroit River, Michigan USA, using the sediment quality triad. *J. Great Lakes Res.* 22:683–696.
- Blaise C, Sergy G, Wells PG, Bermingham N and van Coillie R. 1988. Biological testing: development, application and trends in Canadian environmental protection laboratories. *Toxicity Assessment* 3:385–406.
- Blaise C, Forghani R, Legault R, Guzzo J and Dubow MS. 1994. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and microtox reagent. *Biotechniques* 16:932–937.
- Blaise C and Ménard L. 1998. A micro-algal solid-phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual. Res. J. Canada* 33(1):133–151.
- Blaise C and Kusui T. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12:53–60.
- Burton AG. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10:1585–1627.
- Burton AG, Ingersoll CE, Burnett LC, Henry M, Hinman ML, Klaine SJ, Landrum PF, Ross P and Tuchman M. 1996. A comparison of sediment toxicity tests at three Great Lakes areas of concern. *J. Great Lakes Res.* 22:495–511.
- Burton GA, Nelson MK and Ingersoll CG. 1992. Freshwater benthic toxicity tests, p. 167–182. *In* G.A. Burton (ed), *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers Inc.
- Burton AG, Stemmer BL, Winks KL, Ross PE and Burnett LC. 1989. A multi-trophic level evaluation of sediment toxicity in Waukegan and Indiana har-

- bours. Environ. Toxicol. Chem. 8:1057–1066.
- Cairns, J. 1986. The Myth of the Most Sensitive Species. BioScience. 36:670–672.
- Chapman PM. 1986. Sediment quality criteria from sediment quality triad: an example. Environ. Toxicol. Chem. 5:957–964.
- Charm Sciences Inc. 1995. Microbial Water Quality, Malden, MA.
- Côté C, Blaise C, Michaud JR, Ménard L, Trottier S, Gagné F, Riebel P and Lifshitz R. 1998. Comparisons between micro-scale and whole sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment. Environ. Toxicol. Water Qual. 13:93–110.
- Creative Selling. 1992a. Thamnotoxkit™ F. Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard operational procedure. V241092.
- Creative Selling. 1992b. Rotoxkit™ F. Rotifer toxicity screening test for freshwater. Standard operational procedure. V241092.
- Creative Selling. 1996a. Algaltoxkit™ F Freshwater toxicity test with microalgae. Standard operational procedure. V241092.
- Creative Selling. 1996b. Daphtoxkit™ F Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard operational procedure. V241092.
- Day KE, Dutka BJ, Kwan KK, Batista N, Reynoldson T and Metcalfe-Smith J. 1995. Correlations between solid-phase microbial screening assays, Whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and *in situ* benthic community structure. J. Great Lakes Res. 21:192–206.
- Dutka BJ, Jones K, Kwan KK, Bailey H and McInnes R. 1988. Use of microbial and toxicant screening tests for priority site selection of degraded areas in water bodies. Water Res. 22:503–510.
- Dutka BJ, Teichgräber K and Lifshitz R. 1995. A modified SOS-Chromotest procedure to test for genotoxicity and cytotoxicity in sediments directly without extraction. Chemosphere 31:3273–3289.
- Environmental Bio-detection Products Inc. 1995. ToxiChromoPad™—Instructions for use, version 3.1.
- Environment Canada. 1992a. Biological test method: toxicity test using luminescent bacteria (*Photobacterium phosphoreum*). Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/24, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa.
- Environment Canada. 1992b. Biological test method: growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*, Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/25, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa.
- Environment Canada. 1996. Test for growth and survival in sediment using the freshwater amphipod *Hyaella azteca*. Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/ final-draft manuscript, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa.
- Environment Canada. 1997. Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/ final-draft manuscript, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa.
- Environnement Canada and ministère de l'Environnement du Québec. 1992. Critères intérimaires pour l'évaluation de la qualité des sédiments du Saint-Laurent. Centre Saint Laurent, Montréal, Québec.
- Fish F, Lampert I, Halachmi A, Riesenfeld G and Herzberg M. 1987. The SOS Chromotest kit, a rapid method for the detection of genotoxicity. Toxic. Assess. 2:135–147.

- Fu LJ, Staples RE and Stahl Jr RG. 1991. Application of the *Hydra attenuata* assay for identifying developmental hazards among natural waters and wastewaters. *Ecotox. Environ. Saf.* **22**:309–319.
- Gagné F and Blaise C. 1996. Flow cytometry measurement of mixed function oxidase (MFO) activity and cell viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes: method development. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **11**:53–63.
- Giesy JP and Hoke RA. 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.* **15**:539–569.
- Ho KT, Mills LJ, Mueller C, Anderson SC and Malcolm AR. 1994. The influence of sediment extract fractionation methods on bioassay results. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* **9**:145–154.
- Johnson EM and Gabel BEG. 1982. Application of the *Hydra* assay for rapid detection of environmental hazards. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1**:57–71.
- Lee F and Jones RA. 1987. Water quality significance of contaminants associated with sediments: an overview, p. 1–34. *In* Dickson KL, Maki A and Brungs WA (ed.), *Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems*. Pergamon Press, SETAC.
- Liss W and Ahlf W. 1997. Evidence from whole sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **36**:140–147.
- Ménard L. 1996. Mesure de l'activité estérasique de *Selenastrum capricornutum*: technique par cytométrie en flux pour les échantillons aqueux. Méthode CPQ403E0. Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, Montréal, Québec.
- Microbics Corporation. 1995. Microtox® M500 Manual. A toxicity testing handbook. Version 3. Microbics Corporation, Carlsbad, CA.
- Persoon G, Goyvaerts M, Janssen C, de Coen W and Vangheluwe M. 1993. Cost-effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of Toxkits: Final Report. Laboratory for biological research in aquatic pollution, University of Ghent.
- Rathburn JE, Huellmantel LL, Tracey M, Smith VE and Ahlgren K. 1996. Rapid sediment assessment: indicator analysis and screening analysis approaches. *J. Great Lakes Res.* **22**:523–533.
- Shannon CE and Wiener W. 1949. The mathematical theory of communication, p. 19–27, 82–83 and 104–107. The University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Stebbing ARD and Pomroy AJ. 1978. A sublethal technique for assessing the effects of contaminants using *Hydra littoralis*. *Water Res.* **12**:631–635.
- Trevors JT. 1986. Bacterial growth and activity as indicators of toxicity. p. 9–26. *In* Bitton G and Dutka B (ed.), *Toxicity testing using microorganisms*, vol.1. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Trottier S, Blaise C, Kusui T and Johnson EM. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay: technical methodology. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **12**:265–271.
- US EPA 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/R-94/024, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington, D.C.
- US Fish and Wildlife Service, Environment Ontario, National; Oceanic and Atmospheric Administration, US Army Corps of Engineers, Water Sewerage Dept. of Detroit, Michigan Dept. of Natural Resources, US EPA and Environment Canada. 1988. Final report of the Upper Great Lakes con-

necting channel study, vol. II.

White P, Rasmussen J and Blaise C. 1996. Comparing the presence, potency and potential hazard of organic compounds extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ. Molec. Mutagen.* **27**:116–139.

Wilhm, JL and Dorris TC. 1968. Biological parameters for water quality criteria. *Bioscience* **18**:477–481.

