

CENTRE DE DOCUMENTATION CSL
1^{er} étage
L 12Y 2E7
2762
Fax (514) 233-7166
27/03/02

TD
427
'S33
B65
1995

ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES SÉDIMENTS MARINS PROVENANT DE DEUX ZONES PORTUAIRES DU SAINT-LAURENT

Rapport soumis à la
Direction de la Protection de l'Environnement
Environnement Canada - Région du Québec

Manon Bombardier
Écotoxicologie et chimie environnementale
Laboratoire régional

Centre Saint-Laurent
Environnement Canada - Région du Québec

Septembre 1995

COLLABORATEURS

Ont participé à la réalisation des bioessais et (ou) à la révision du rapport:

Personnel du laboratoire régional, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada (Montréal, Qc):

Normand Bermingham, scientifique senior

Richard Legault, biologiste

Manon Harwood, biologiste

François Gagné, biochimiste

Raymond Vezeau, chef de la Section Écotoxicologie et Chimie Environnementale

Ont réalisé les essais sur amphipodes et oursins:

Personnel de l'Institut d'océanographie Bedford, Environnement Canada (Dartmouth, N-É):

Ken Doe, chef de la Section Toxicologie

REMERCIEMENTS

Nous aimerions également remercier Sylvie Brucher, Nusrat Sharmeen et Brian Walker pour la réalisation des essais de toxicité sur hépatocytes de truites, André Fouquet, Patrice Turcotte et Stéphane Lorrain pour leurs conseils judicieux sur certains aspects du rapport, ainsi que les membres du laboratoire de chimie du Centre Saint-Laurent, la firme Novamann International (Côte de Liesse, Québec) et l'Institut national de recherche sur les eaux (Burlington, Ontario) pour les analyses physico-chimiques des sédiments.

AVANT-PROPOS

En vertu de l'Art. 71(3)a de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE), tout projet d'immersion en mer ou de dragage de sédiments contaminés par une (ou des) substance toxique doit être évalué afin de déterminer les impacts potentiels de ces activités sur l'environnement. Cette réglementation régit non seulement la nature et la quantité des substances présentes, mais également leur toxicité pour la faune benthique. Selon maints auteurs, la faune benthique est particulièrement vulnérable aux effets néfastes causés par les activités de dragage (Ross et Munawar, 1994; Brown et Neff, 1993; USEPA, 1991; Giesy et Hoke, 1989). Ainsi, les organismes marins peuvent être considérés comme des instruments analytiques qui nous permettent de déterminer les impacts environnementaux des substances présentes. Il importe toutefois de noter que la manifestation d'un effet toxique lors de l'exécution d'un essai biologique ne nous permet pas, selon l'état actuel de nos connaissances, de déterminer avec certitude quelle(s) composante(s) chimique(s) est responsable de cet effet et si cet effet se produit réellement dans le milieu. Les bioessais sont néanmoins considérés comme les meilleurs outils présentement disponibles pour évaluer les impacts de mélanges de contaminants (Giesy et Hoke, 1989).

Des critères intérimaires de qualité environnementale pour l'évaluation de la contamination des sédiments ont été mis au point en 1992 par Environnement Canada. Ces critères représentent des niveaux de gestion des concentrations de divers produits chimiques dans les sédiments du Saint-Laurent. En vue d'appliquer l'Art. 71(3)a de la LCPE, Environnement Canada a entrepris le Programme d'immersion en mer en 1988. Le présent document s'inscrit dans cette démarche en proposant une batterie de bioessais marins pour l'évaluation de la toxicité des sédiments du Saint-Laurent. L'usage des biotests, tel que décrit ici, pourrait fournir certaines informations sur les effets biologiques, nécessaires pour déduire les critères de qualité environnementale. Il permettrait également de donner une base cohérente et scientifiquement défendable à toute décision relative à l'utilisation des déblais de dragage dont la qualité chimique est mise en cause.

AVIS DE RÉVISION

Le présent rapport a été examiné par la section de l'Assainissement des eaux, Direction de la protection de l'environnement, Environnement Canada et par la section Écotoxicologie et chimie environnementale, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada.

La publication de ce rapport ne signifie pas nécessairement que le contenu reflète les opinions et politiques du ministère. Les mentions de marques de commerce ou de produits commerciaux ne signifient aucunement que leur utilisation est recommandée.

COMMENTAIRES DES LECTEURS

Veuillez adresser vos commentaires sur le contenu du présent rapport à la:

Section de l'Assainissement des eaux,
Direction de la protection de l'environnement,
Environnement Canada,
1179 de Bleury,
Montréal, Québec
H3B 3H9

On devra citer la publication comme suit:

Bombardier, M. 1995. Évaluation de la qualité des sédiments marins provenant de deux zones portuaires du Saint-Laurent. Section de l'Assainissement des eaux, Direction de la protection de l'environnement, Environnement Canada, 138 pages.

RÉSUMÉ

Le présent document présente les résultats d'une étude portant sur l'évaluation d'une batterie de 13 essais de toxicité sublétales et deux de toxicité létale effectués en 1993 et 1994 sur des sédiments marins du fleuve Saint-Laurent. Une approche de gestion de matrices sédimentaires contaminées, présentement en développement au Centre Saint-Laurent et basée sur l'intégration de six des essais sublétaux réalisés, est également présentée. Les résultats démontrent que les tests de toxicité conventionnels tels que le Microtox et l'essai de fertilisation chez les oursins blancs méritent d'être intégrés dans tout exercice de prise de décision en ce qui concerne les actions à prendre face à des déblais de dragage dont la qualité chimique est mise en cause. Les essais de mutagénicité, génotoxicité, ainsi que les tests indicateurs d'induction biochimique réalisés sur les extraits organiques des sédiments ont quant à eux fournis des résultats mitigés en raison de problèmes reliés à la méthode d'extraction des substances organiques et du niveau de développement relativement moins avancé de ces essais. Certains d'entre eux, dont le SOS Chromotest, le test de fluctuation et l'APA méritent d'être réévalués avec un plus grand nombre d'échantillons sédimentaires ainsi qu'une gamme de toxicité plus large. L'indice ECOTOX constitue un outil prometteur permettant de distinguer les aires sédimentaires sur la base de leur toxicité pour la faune benthique.

ABSTRACT

This document presents the results of a study on the evaluation of a battery of 13 sublethal and 2 lethal toxicity tests realized in 1993 and 1994 on marine sediments from the Saint-Lawrence river. A management approach, presently under development at the Saint-Lawrence Centre and based on the integration of six of these sublethal tests, is also presented. The results show that conventional bioassays such as the Microtox and the fertilization test on sea urchins should be considered in any decision making exercise concerned with the management measures regarding dredged materials suspected to be contaminated. The tests on mutagenicity and genotoxicity, as well as those measuring biochemical induction realized on the sediment organic extracts have on the other hand produced mitigated results. This was due to problems related with the extraction method and the relative early stage of development of most of these tests. However, tests such as the SOS Chromotest, the fluctuation assay and the APA (alkaline precipitation assay) should be evaluated with more sediment samples and a greater range of contamination levels. The ECOTOX index is a promising tool that allows one to distinguish between areas of contaminated sediments based on the toxicity results.

TABLE DES MATIÈRES

COLLABORATEURS	ii
REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iii
AVIS DE RÉVISION	iv
COMMENTAIRES DES LECTEURS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	v
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET DES FORMULES CHIMIQUES	xvi
GLOSSAIRE	xviii
SECTION I: INTRODUCTION	
1.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	1

SECTION II: CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE DES SÉDIMENTS ET
ÉVALUATION DE LEUR TOXICITÉ PAR LE BIAIS DE BIOESSAIS
CONVENTIONNELS

2.1	MATÉRIEL ET MÉTHODES	4
2.1.1	PLAN D'ÉCHANTILLONNAGE	4
2.1.1.1	Anse-à-Beaufils (Baie des Chaleurs)	4
2.1.1.2	Cap-aux-Meules	4
2.1.2	COLLECTE DES SÉDIMENTS ET DE L'EAU DE MER	5
2.1.3	IDENTIFICATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	9
2.1.4	PRÉPARATION ET UTILISATION DES FRACTIONS SÉDIMENTAIRES	9
2.1.5	MÉTHODES D'ANALYSE	10
2.1.5.1	Propriétés physiques et composantes inorganiques, non-métalliques	10
	<u>Granulométrie</u>	10
	<u>Humidité</u>	10
	<u>Solides volatils</u>	11
	<u>Azote total Kjeldahl, azote ammoniacal et phosphore total</u>	11
	<u>Sulfures totaux</u>	11
	<u>Carbone organique total (COT)</u>	11
2.1.5.2	Caractérisation chimique	11
	<u>Composés organiques: HAP - BPC - Chlorobenzènes - Pesticides</u>	11
	<u>Mercure</u>	12
	<u>Autres Métaux traces</u>	12
2.1.5.3	Tests de toxicité des sédiments	13
	<u>Essais Microtox®</u>	13
	<u>Essai de toxicité aiguë chez les amphipodes marins</u>	14
	<u>Essai sur la fécondation chez les oursins</u>	15
2.1.6	ASSURANCE DE QUALITÉ	15
2.1.7	TRAITEMENT DES DONNÉES ET CALCUL DES RÉSULTATS	15
2.1.7.1	Essais Microtox	15
2.1.7.2	Essai de survie des amphipodes	15

2.1.7.3	Essai de fécondation chez les oursins	16
2.1.7.4	Associations entre les bioessais	16
2.1.7.5	Comparaison des sites	17
2.1.7.6	Associations entre les variables chimiques et biologiques	17
2.2	RÉSULTATS	18
2.2.1	CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES ET COMPOSANTES INORGANIQUES NON-MÉTALLIQUES	18
2.2.2	ANALYSES CHIMIQUES	18
2.2.2.1	Composés organiques	18
	<u>Anse-à-Beaufils</u>	18
	<u>Cap-aux-Meules - Stations portuaires</u>	19
	<u>Cap-aux-Meules - Stations de référence</u>	20
2.2.2.2	Métaux	20
	<u>Anse-à-Beaufils</u>	20
	<u>Cap-aux-Meules</u>	20
2.2.3	BIOESSAIS	43
2.2.3.1	Contrôle de qualité	43
	<u>Produits toxiques de référence</u>	43
	<u>Sédiments de contrôle (Martinique Beach)</u>	43
2.2.3.2	Critères d'évaluation de la toxicité	43
2.2.3.3	Évaluation de la présence ou absence d'association entre les essais de toxicité	44
	<u>Essais Microtox</u>	44
	<u>Test de toxicité aiguë chez <i>A. virginiana</i></u>	49
	<u>Test de fécondation chez <i>L. pictus</i></u>	49
	<u>Association entre tous les paramètres de toxicité</u>	49
2.2.3.4	Classification des stations de dragage selon leur niveau de toxicité et de contamination	50

2.2.3.5	Association entre les paramètres chimiques et la toxicité des sédiments	56
2.2.3.6	Comparaison des résultats de toxicité : Anse-à-Beaufils - 1993 vs 1994	57
2.3	DISCUSSION	58
SECTION III: ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SÉDIMENTS PAR LE BIAIS DE BIOMARQUEURS AU NIVEAU MOLÉCULAIRE		
3.1	RAISONNEMENT POUR L'UTILISATION DE PARAMÈTRES BIOANALYTIQUES À DES NIVEAUX INFÉRIEURS D'ORGANISATION BIOLOGIQUE	66
3.1.1	Essais de génotoxicité	66
3.1.1.1	Mesure de l'induction du système SOS	67
	<u>SOS Chromotest</u>	67
	<u>Umu-test</u>	68
3.1.1.2	Bioessai basé sur la détection des mutations	68
	<u>Test de fluctuation</u>	68
3.1.1.3	Bioessais basés sur le bris de l'ADN	69
	<u>Précipitation alcaline de l'ADN</u>	69
3.1.1.4	Le Mutatox®: un autre test de mutagénicité	69
3.1.2	INDICATEURS BIOCHIMIQUES DE TOXICITÉ	70
3.1.2.1	Induction du cytochrome P-450 1A	70
3.1.2.2	Induction des métallothionéines	71
3.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	71
3.2.1	SOS CHROMOTEST	71
3.2.2	UMU-TEST	71
3.2.3	TEST DE FLUCTUATION	72
3.2.4	MUTATOX	72
3.2.5	TEST DE PRÉCIPITATION ALCALINE DE L'ADN	72

3.2.6	INDUCTION DES MÉTALLOTHIONÉINES	73
3.2.7	INDUCTION DU SYSTÈME OFM	73
3.2.8	ANALYSE DES RÉSULTATS	73
3.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION	74
3.3.1	TESTS DE GÉNOTOXICITÉ ET MUTAGÉNICITÉ	74
3.3.1.1	Comparaisons inter-sites	82
	<u>Site de l'Anse-à-Beaufils: aire de dragage vs aire d'immersion</u>	82
3.3.1.2	Cytotoxicité vs génotoxicité	82
	<u>Site de l'Anse-à-Beaufils: aire d'immersion</u>	82
	<u>Cap-aux-Meules: aire de dragage</u>	82
3.3.2	MARQUEURS BIOCHIMIQUES	83
3.3.3	ANALYSES DE CONCORDANCE ENTRE LES ANALYSES BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES	84

SECTION IV: ÉVALUATION DU POTENTIEL ÉCOTOXIQUE DES SÉDIMENTS MARINS VIA L'INDICE ECOTOX

4.1	CONTEXTE	88
4.2	PROBLÉMATIQUE ET STRATÉGIE D'ÉVALUATION ÉCOTOXICOLOGIQUE DES SÉDIMENTS MARINS	90
4.3	ASPECTS FONDAMENTAUX DE L'INDICE ECOTOX	90
4.3.1	FRACTIONS SÉDIMENTAIRES ANALYSÉES	91
4.3.2	SÉLECTION DES BIOESSAIS	95
4.3.3	UNIFORMISATION DES DONNÉES ANALYTIQUES	97
4.3.3.1	Transformation en UTs	97
4.3.3.2	Calcul du paramètre z	98
4.3.3.3	Expression de la toxicité en UTs / g sec	99
4.3.3.4	Détermination de la LD _{Det}	99

4.3.3.5	Définition des seuils et niveaux de toxicité absolue pour chacun des paramètres bioanalytiques	100
4.3.3.6	Détermination des Fac et des seuils de toxicité relative	101
4.4	CALCUL DE L'INDICE ECOTOX	103
4.5	ANALYSES STATISTIQUES	104
4.6	RÉSULTATS ET DISCUSSION	105
4.6.1	VUE D'ENSEMBLE	105
4.6.2	ÉVALUATION PAR SITE	110
4.6.2.1	Black Point	110
4.6.2.2	Anse-à-Beaufils	110
4.6.2.3	Cap-aux-Meules	110
4.6.3	ÉVALUATION PAR PHASE SÉDIMENTAIRE	115
4.6.3.1	Eau interstitielle	116
4.6.3.2	Fraction solide	116
4.6.3.3	Extrait organique	116
4.6.4	ÉVALUATION PAR NIVEAUX DE CONTAMINATION	117
4.6.5	ASSOCIATION ENTRE NIVEAUX DE CONTAMINATION ET INDICES ECOTOX	117
SECTION V: RECOMMANDATIONS, RÉSUMÉ ET CONCLUSION		
5.1	RECOMMANDATIONS	125
5.1.1	PLANIFICATION DU PROJET D'ÉTUDE	125
5.1.2	PROCÉDURES D'ÉCHANTILLONNAGE	125
5.1.3	CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	126
5.1.4	SÉDIMENTS DE RÉFÉRENCE	127
5.1.5	ÉTUDES COMPARATIVES INTER-LABORATOIRES	128
5.1.6	ANALYSES CHIMIQUES	128
5.1.7	PRÉPARATION DES EXTRAITS ORGANIQUES POUR LES TESTS DE TOXICITÉ	130
5.1.8	PARAMÈTRES BIOLOGIQUES	131

5.2	RÉSUMÉ ET CONCLUSION	133
-----	----------------------------	-----

SECTION VI: ANNEXES

SECTION VII: BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Stations échantillonnées à l'Ase-à-Beaufils.....	6
Figure 2.	Stations échantillonnées à Cap-aux-Meules.....	7a
Figure 3.	Aires de dragage de Cap-aux-Meules.....	7b
Figure 4.	Propriétés physiques et paramètres chimiques mesurés pour les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules.....	21
Figure 5.	Granulométrie et teneurs en carbone organique total et sulfures totaux des sédiments de Cap-aux-Meules.....	24
Figure 6.	Concentrations moyennes de HAP et de BPC dans les sédiments des aires de dragage de Cap-aux-Meules, telles que mesurées en 1992 et 1994.....	25
Figure 7.	Concentrations de HAP dans les sédiments du site de dragage (1994).....	26
Figure 8.	Concentrations de BPC dans les sédiments de Cap-aux-Meules.....	31
Figure 9.	Concentrations de pesticides organochlorés dans les sédiments du site de dragage.....	35
Figure 10.	Concentrations de métaux traces dans les sédiments de Cap-aux-Meules.....	39
Figure 11.	Concentrations moyennes de métaux traces dans les sédiments des aires de dragage de Cap-aux-Meules, telles que mesurées en 1992 et 1994.....	41
Figure 12.	Toxicité des extraits organiques des sédiments provenant de Cap-aux-Meules, exprimée en μg sédiment sec / mL eau de dilution.....	47
Figure 13.	Toxicité des extraits organiques des sédiments provenant de Cap-aux-Meules, exprimé en μL d'extraits / mL d'eau de dilution.....	48
Figure 14.	Résultats des essais de toxicité aiguë chez les amphipodes.....	51
Figure 15.	Résultats des essais sur la fécondation des oursins.....	52
Figure 16.	Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions discriminantes à partir des résultats Microtox.....	53
Figure 17.	Résultats des essais de cytotoxicité chez <i>V. fischeri</i> pour les quatre groupes de stations de Cap-aux-Meules.....	54
Figure 18.	Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions discriminantes à partir des résultats de chimie organique.....	55
Figure 19.	Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions discriminantes à partir des résultats de chimie inorganique.....	55

Figure 20.	Comparaison des résultats de cytotoxicité obtenus sur les échantillons de l'Anse-à-Beaufils en 1993 et 1994.....	58
Figure 21.	Sommaire des résultats d'analyses chimiques réalisées sur les sédiments de Cap-aux-Meules.....	63
Figure 22.	Sous-fractions sédimentaires considérées dans le calcul de l'indice.....	92
Figure 23.	Exposition des organismes benthiques aux contaminants présents à l'interface eau-sédiment.....	93
Figure 24.	Données 1993 et 1994 - toxicité cumulative des phases - Indice ECOTOX (T).....	106
Figure 25.	Données 1993 et 1994 - toxicité cumulative des phases - Indice ECOTOX (S).....	107
Figure 26.	Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions canoniques discriminantes à partir des valeurs ETF pour chacune des fractions sédimentaires considérées et de la Toximesure.....	108
Figure 27.	Matériaux de référence - toxicité cumulative des phases - Indice ECOTOX (S).....	111
Figure 28.	Black Point - toxicité cumulative des phases - Indice ECOTOX (S).....	112
Figure 29.	Anse-à-Beaufils - toxicité cumulative des phases - Indice ECOTOX (S).....	113
Figure 30.	Cap-aux-Meules - toxicité cumulative des phases - Indice ECOTOX (S).....	114
Figure 31.	Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions canoniques discriminantes à partir des ETF et Toximesures calculées pour les stations de Cap-aux-Meules.....	116
Figure 32.	Données 1993 et 1994 - Phase: eau interstitielle - Indice ECOTOX (S).....	118
Figure 33.	Données 1993 et 1994 - Phase: solide humide - Indice ECOTOX (S).....	119
Figure 34a.	Données 1993 et 1994 - Phase: extrait organique - Indice ECOTOX (T).....	120a
Figure 34b.	Données 1993 et 1994 - Extrait organique - Indice ECOTOX (S).....	120b
Figure 35.	Résultats de l'analyse à fonctions canoniques discriminantes sur les paramètres inorganiques et les indices ECOTOX calculés pour les sites à l'étude.....	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Localisation des stations échantillonnées à l'Anse-à-Beaufils.....	4
Tableau 2.	Localisation des stations échantillonnées à Cap-aux-Meules.....	8
Tableau 3.	Classes de toxicité proposées pour les résultats Microtox.....	17
Tableau 4.	Comparaison des résultats obtenus au laboratoire québécois pour les essais Microtox (eau interstitielle, extrait organique et phase solide) sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules.....	45
Tableau 5.	Concordance (% et n) entre les résultats Microtox (sur eau interstitielle et phase solide) du Québec et ceux de la Nouvelle-Écosse.....	49
Tableau 6.	Concordance (c) entre les résultats du Québec et de la Nouvelle-Québec.....	50
Tableau 7.	Résumé des données obtenues à partir des analyses chimiques et biologiques sur les échantillons du site de dragage.....	62
Tableau 8.	Comparaison des réponses qualitatives obtenues par le biais des essais de génotoxicité et mutagénicité avec les sédiments de Cap-aux-Meules.....	75
Tableau 9.	Facteur d'induction d'une réponse génotoxique (APA) ou biochimique (MT et OFM) par rapport aux témoins.....	77
Tableau 10.	Comparaison des réponses cytotoxiques qualitatives obtenues par le biais des essais de génotoxicité avec les sédiments de Cap-aux-Meules.....	81
Tableau 11.	Corrélation entre les réponses biologiques obtenues avec les cultures cellulaires de truites (<i>O. mykiss</i>) et les mesures chimiques des sédiments de Cap-aux-Meules.....	85
Tableau 12.	Bioessais utilisés en 1993 et 1994 pour l'évaluation écotoxicologique des sédiments marins.....	95
Tableau 13.	Bioessais réalisés sur les différentes fractions sédimentaires en 1993 et 1994 et considérés dans le calcul de l'indice ECOTOX.....	97
Tableau 14.	Seuils de toxicité déterminés pour chaque bioessai considéré.....	101
Tableau 15.	Seuils de toxicité relative (FAC) déterminés pour chaque bioessai considéré.....	102
Tableau 16.	Niveaux de toxicité relative calculés et retenus pour chaque phase sédimentaire considérée.....	104
Tableau 17.	Distances relatives entre chaque aire, telles que définies par l'analyse à fonction canonique discriminante.....	108

LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET DES FORMULES CHIMIQUES

A405	absorbance à 405 nm
A620	absorbance à 620 nm
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	argent
APA	précipitation alcaline de l'ADN
AVS	sulfures volatiles
BPC	biphényles polychlorés
°C	degré Celsius
CB	chlorobenzènes
Cd	cadmium
CI ₅₀	concentration inhibitrice 50%
CL ₅₀	concentration létale 50%
cm	centimètre
CMEO	concentration minimale avec effet observé
COT	carbone organique total
CSEO	concentration minimale sans effet observé
Cu	cuiivre
DCM	dichlorométhane
DMSO	diméthylsulfoxyde
EC	Environnement Canada
g	gramme
h	heure
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
H ₂ SO ₄	acide sulfurique
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hcl	acide chlorhydrique
Hg	mercure
HNO ₃	acide nitrique
KMNO ₄	permanganate de potassium
K ₂ S ₂ O ₈	persulfate de potassium

L	litre
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
MRC	matériaux de référence certifiés
MT	métallothionéine
NaCl	chlorure de sodium
ng	nanogramme
NH ₂ OH:HCl	hydroxylamine
% v/v	pourcentage volume sur volume
OC	pesticides organochlorés
OFM	oxygénases à fonctions multiples
Pb	plomb
QA	assurance de qualité
QC	contrôle de qualité
®	marque de commerce
rpm	rotations par minute
s	seconde
S9	fraction microsomale de foie de rat
µg	microgramme
µL	microlitre
UTs	unité de toxicité sublétales
Zn	zinc
<	plus petit que
≤	plus petit ou égal à
>	plus grand que
≥	plus grand ou égal à
±	plus ou moins

GLOSSAIRE

Acide déoxyribonucléique (ADN)	macromolécule composée de deux chaînes hélicoïdales (brins) qui s'enroulent l'un dans l'autre. Chaque chaîne est une succession de phosphates et de sucres désoxyriboses (5 carbones) auxquels sont attachés des bases aminées.
Adduit	association entre un composé toxique électrophile et des bases nucléophiles de l'ADN résultant en une altération de ces bases.
Aire d'immersion (aire d'essai)	région marine dans laquelle l'immersion d'une matrice contaminée est permise en accord avec les termes et conditions d'un permis valide d'immersion en mer.
Aire de dragage (aire d'essai)	région marine où une quantité de sédiments a été excavée.
Assurance de qualité	pratiques d'évaluation visant à assurer la qualité d'un produit final.
Benthos	portion du fond d'un cours d'eau (par exemple l'interface eau-sédiment), ou l'ensemble des organismes qui vivent dans cette portion.
Benthique	utilisé pour décrire les organismes qui vivent ou sont associés au benthos.
Blanc de méthode	échantillon ayant été soumis aux mêmes procédures que les échantillons de sédiments mais qui n'est pas contaminé. Dans cette étude, il est composé soit d'eau de dilution ou de solvant organique.
Contaminant (produit chimique)	agent indésirable ou substance chimique présent(e) dans les sédiments dans l'eau.

Contrôle de qualité	techniques et procédures utilisées pour évaluer la qualité des données obtenues.
Eau interstitielle	eau occupant les espaces entre les particules de sédiment, recueillie par centrifugation du sédiment humide. La quantité d'eau interstitielle est généralement exprimée en pourcentage de la masse du sédiment humide.
Eau d'essai (diluant)	eau de mer recouvrant la couche de sédiment dans les bains d'essai.
Élutriat	solution aqueuse obtenue suite à une série de manipulations incluant l'addition d'eau à une substance solide (par exemple sédiment, boues de forage ou de dragage), le mélange et la centrifugation, filtration ou décantation du surnageant.
Extrait organique	solution obtenue par extraction en Soxhlet, après ajout d'un solvant au sédiment dans le but d'en extraire les substances organiques.
Matériaux de référence certifiés	sédiment marin naturel utilisé à des fins de recherche et dont la composition chimique et les teneurs des différents contaminants sont certifiées par le Conseil Canadien de recherches Canada. Chaque standard (p.e. HS-1, HS-2, CS-1) est certifié pour une classe spécifique de contaminants.
Mutagénicité	changement dans la séquence des nucléotides d'un gène
Niveau d'organisation	aussi connu sous l'expression «niveau d'intégration biologique», allant du niveau moléculaire à celui des écosystèmes, voire même de la biosphère.
Phase solide	sédiment résultant de la centrifugation du sédiment entier.

Produit toxique	produit chimique étalon utilisé pour mesurer la sensibilité des organismes
de référence	soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. .
Sédiment de	échantillon, prélevé sur le terrain, de sédiment reconnu comme étant non-
référence	contaminé dont les propriétés (p. e. granulométrie, contenu organique total) sont très semblables à celles des échantillons soumis à l'essai, sauf en ce qui concerne la teneur en contaminants chimiques. Ce sédiment est généralement prélevé près de l'endroit où les échantillons soumis à l'essai ont été recueillis, mais à l'abri des sources de contamination.
Sédiment de contrôle	sédiment propre (essentiellement non-contaminé) prélevé sur le terrain, au même endroit que les organismes soumis à l'essai ou préparé artificiellement en laboratoire, et de composition physico-chimique connue. Ce sédiment ne doit pas contenir des concentrations de contaminants pouvant affecter les organismes soumis aux essais, ni d'organismes pouvant causer des interférences lors de la réalisation des bioessais. L'utilisation de sédiments de contrôle peut être utilisée pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison des conditions de base de l'essai (par exemple salinité, pH), pour évaluer l'état de santé des organismes soumis aux essais ou encore pour comparer la performance des laboratoires.
Sédiment entier	sédiment intact, utilisé pour l'exposition des amphipodes.
Sorption	décrit l'accumulation de substances dissoutes dans la phase aqueuse sur les particules, incluant les particules biologiques (Voice et Weber, 1983). Cette définition englobe l'adsorption, la formation d'un lien entre le soluté et la surface bi-dimensionnelle d'une particule, et l'absorption, la répartition d'un soluté à l'intérieur de la structure (tri-dimensionnel) de

la phase sorbante (Farrington et Westall, 1986).

SOS

gène SfiA responsable de la synthèse des enzymes d'autoréparation de l'ADN.

Unité Toxique (UT)

expression de la toxicité en valeur absolue. Elle est déterminée en divisant la valeur maximale de toxicité possible par la valeur de CI50 ou de CMEO obtenue. Elle tient compte du facteur de dilution utilisé.

SECTION I
- INTRODUCTION -

1.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le présent document a pour objectif principal de fournir des données additionnelles à celles colligées par Bureau *et coll.* (1995) sur la validation d'essais de toxicité de sédiments marins. Il vise de plus à recommander une série de biotests écologiquement pertinents, c'est-à-dire représentatifs des conditions dans le milieu, et convenables à l'évaluation des risques posés par les contaminants présents dans les sédiments. Pour ce faire, des analyses physiques, chimiques et biologiques ont été effectuées en 1994-95 sur des sédiments provenant de deux sites portuaires du Golfe Saint-Laurent, soit 1) Cap-aux-Meules [Îles-de-la-Madeleine, Québec]: site de dragage, reconnu contaminé selon une étude effectuée par la firme Hydrotech Inc. (1990) et 2) Anse-à-Beaufils [Baie des Chaleurs, Québec]: site d'immersion relativement non-contaminé.

La batterie de biotests utilisée dans la présente étude a été sélectionnée par les gestionnaires régionaux du programme d'immersion en mer, au cours de l'Atelier national sur le développement de directives sur le monitoring environnemental, tenu à Ottawa en février 1993. Dans la première partie de l'étude, la toxicité sublétales des sédiments a été mesurée par le biais 1) de la réduction de luminescence chez une souche bactérienne marine, *Vibrio fischeri*¹, avec trois fractions sédimentaires, soit l'eau interstitielle, l'extrait organique et la phase solide; 2) des taux de survie des amphipodes endofauniques marins, *Amphiporeia virginiana*, exposés au sédiment entier; et 3) des taux de fécondation des gamètes d'oursins blancs de Californie, *Lytechinus pictus* en présence d'eau interstitielle. La deuxième section porte sur ces tests biologiques ainsi que sur les analyses physiques et chimiques effectuées sur les sédiments à l'étude.

La Section III traite de l'évaluation de la toxicité des sédiments par le biais de sept micro-bioessais additionnels, la plupart étant présentement en cours de développement au laboratoire du Centre Saint-Laurent. Trois d'entre eux portent sur la génotoxicité, soit le SOS chromotest, le *Umu*-test et le test de précipitation alcaline de l'ADN (APA), deux sur la mutagénicité (test de fluctuation et Mutatox®) et enfin deux sur l'utilisation de biomarqueurs moléculaires (induction du cytochrome P-450 1A et des métallothionéines). Les indicateurs de toxicité utilisés sont des souches bactériennes pour le SOS chromotest ainsi que le test de fluctuation et des hépatocytes de truites (*Onchorhynchus mykiss*) pour les autres essais. Ces méthodes biologiques, originellement utilisées pour des échantillons aqueux, sont évaluées quant à leur capacité à mesurer la toxicité d'échantillons sédimentaires par le biais des extraits

¹ anciennement connue sous le nom *Photobacterium phosphoreum*.

organiques. Une brève description des principes sur lesquels ces approches sont basées est fournie dans cette partie du rapport.

Finalement, la Section IV présente une approche de gestion des sédiments contaminés, basée sur l'intégration des micro-bioessais et des fractions sédimentaires considérées dans la présente étude. Cette approche, l'indice ECOTOX, présentement en cours de développement au Centre Saint-Laurent, est issue du BEEP (Costan *et coll.*, 1993) pour l'évaluation du potentiel toxique des effluents industriels. Les principes fondamentaux de l'indice ECOTOX et son application dans la gestion des matrices sédimentaires sont exposés dans ce dernier chapitre.

Les principaux objectifs de l'étude se résument ainsi:

- ▶ Évaluer, à l'aide de l'essai Microtox®, l'écart de toxicité entre les sédiments:
 - a) de dragage de Cap-aux-Meules et immergés de l'Anse-à-Beaufils (données de 1994);
 - b) immergés et ceux de référence pour le site de l'Anse-à-Beaufils (données de 1994);
 - c) de dragage et ceux de référence pour le site de Cap-aux-Meules (données de 1994); et,
 - d) portuaires (données de 1993) et immergés (données de 1994) de l'Anse-à-Beaufils;
- ▶ Étudier la variabilité inter-laboratoire des résultats d'essais Microtox® obtenus pour les sédiments immergés de l'Anse-à-Beaufils et portuaires de Cap-aux-Meules;
- ▶ Évaluer les niveaux d'association entre les bioessais de toxicité présentés dans la deuxième section du document;
- ▶ Déterminer les niveaux d'association entre les niveaux de contamination des stations de Cap-aux-Meules² et les effets notés chez les organismes;
- ▶ Proposer une procédure normalisée pour les essais de SOS Chromotest sur l'extrait organique des sédiments;

¹ Dans le cas où une corrélation significative est détectée, l'intention des auteurs n'est pas de suggérer l'existence d'une relation absolue de cause à effet entre les paramètres chimiques et les effets biologiques observés. La manifestation d'un effet toxique jumelé à des concentrations de contaminants ne serait qu'une indication de la nature des contaminants ayant pu causé cet effet

- Comparer:
 - a) pour les sédiments de l'Anse-à-Beaufils
 - . la génotoxicité (SOS chromotest) des extraits provenant des sédiments portuaires (1993) de ceux provenant des sédiments immergés (1994);
 - . la cytotoxicité et la génotoxicité (SOS Chromotest) des extraits provenant des sédiments immergés (1994);
 - b) pour les sédiments de Cap-aux-Meules
 - . la cytotoxicité et la génotoxicité (SOS Chromotest) des extraits

Ces informations permettront ensuite de répondre aux questions suivantes:

- les bioessais proposés permettent-ils de discerner les sédiments toxiques qui nécessiteraient des mesures de correction ou d'atténuation?
- ces tests peuvent-ils être utilisés pour déterminer des critères pour l'évaluation de la qualité des matières destinées à des activités de dragage ou d'immersion en mer?
- dans le cas échéant, quels seraient ces critères?

SECTION II
CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE DES SÉDIMENTS ET
ÉVALUATION DE LEUR TOXICITÉ PAR LE BIAIS DE BIOESSAIS
CONVENTIONNELS

2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1.1 PLAN D'ÉCHANTILLONNAGE

2.1.1.1 Anse-à-Beaufils (Baie des Chaleurs)

Le site de l'Anse-à-Beaufils est localisé en Gaspésie, dans la Baie des Chaleurs. Une étude historique du site a permis de constater que d'importants travaux de dragage y sont pratiqués depuis quelques années pour l'entretien du port et des marinas; le volume moyen de matériaux dragués entre 1983 et 1991 était estimé à 4 205 m³ par année (EC, 1993) alors qu'en 1993 il était de 3 318 m³. Aucune activité industrielle n'a toutefois été répertoriée dans ce secteur.

L'identification des stations d'immersion utilisées en 1993 à l'extérieur du havre a guidé le processus de sélection des stations d'échantillonnage en 1994 pour le site de l'Anse-à-Beaufils. Ces stations ont été identifiées à l'aide d'un sonar à balayage latéral. Elles offrent potentiellement le pire scénario possible en termes de contamination pour ce site. Les échantillons de sédiments prélevés le 11-12 juillet 1994 proviennent de 12 stations (tableau 1): huit localisées dans l'aire d'immersion (AB31 à AB38), soit à environ 4 km du havre et quatre situées dans l'aire de référence sélectionnée (ABR39 à ABR-42), dans un rayon de 500-700 m de la zone de rejet (figure 1). Les stations de référence sont localisées dans le même secteur que celles de 1993. L'échantillon AB-34 a été divisé en deux réplcats (34 et 34-Dupl.).

Tableau 1. Localisation des stations échantillonnées à l'Anse-à-Beaufils.

Aire	Station	Latitude	Longitude
Immersion	31	48°26.63'	64°14.82'
	32	48°26.62'	64°14.81'
	33	48°26.78'	64°14.87'
	34	48°26.77'	64°14.83'
	35	48°26.83'	64°14.95'
	36	48°26.90'	64°14.80'
	37	48°26.88'	64°14.59'
	38	48°26.88'	64°14.63'
Référence	39	48°26.49'	64°14.39'
	40	48°26.57'	64°14.48'
	41	48°26.58'	64°14.48'
	42	48°26.61'	64°14.37'

2.1.1.2 Cap-aux-Meules

Le site de Cap-aux-Meules est situé dans l'archipel des Îles-de-la-Madeleine. Une étude entreprise par Lavalin Environnement en 1989 a identifié Cap-aux-Meules comme étant le seul site contaminé de l'archipel. Les sources potentielles de contamination dans ce secteur sont les rejets des eaux usées de l'usine de transformation de poisson et de la municipalité; on y retrouve également trois quais de pêche et trois ports de plaisance. Des photographies prises lors de l'échantillonnage sont présentées à l'annexe A.

Le plan d'échantillonnage a été préparé en considérant les résultats de caractérisation chimique des sédiments effectuée en 1992 (annexe B), ainsi que les aires de dragage du projet de confinement en quai proposé par Transports Canada (GCC) en 1994 et les aires de dragage potentiel considérées en 1992 (tableau 2). Les stations d'échantillonnage ont été réparties de façon à obtenir une couverture des aires de dragage proposées et à valider les gradients de concentrations obtenues lors de la caractérisation chimique des sédiments du havre effectuée en 1992.

Le havre a été divisé en six aires réparties, selon leur statut, en trois catégories (ou blocs) telles qu'indiquées au tableau 2 et à la figure 2. Le nombre de stations d'échantillonnage a été établi selon les directives d'Environnement Canada (Environnement Canada, en publ.) en fonction du volume de déblais de dragage anticipé pour chacune des aires et en considérant un minimum de trois stations pour chacune d'elles. Un total de 20 stations situées à l'intérieur du havre ont été échantillonnées de façon aléatoire; pour fins de contrôle de qualité, trois d'entre elles ont fait l'objet d'un triple échantillonnage (2, 5, 9). De plus, deux stations de référence, localisées dans une zone à l'extérieur du havre (figure 3) et considérées comme étant peu perturbées par des activités de pêche commerciale ou de dépôt, ont été échantillonnées; l'une d'elle a fait l'objet d'un triple échantillonnage (21).

2.1.2 COLLECTE DES SÉDIMENTS ET DE L'EAU DE MER

Une benne Shipek simple, manoeuvrée à l'aide d'un treuil hydraulique, a été utilisée pour la collecte des sédiments; la benne était rincée avec de l'eau de surface avant chaque prélèvement (annexe A).

La méthodologie utilisée pour la préparation des sédiments est présentée dans la section «Protocole d'échantillonnage» de Bureau *et coll.* (1995). L'eau de mer, utilisée pour effectuer les bioessais, a été recueillie en surface, aux stations de référence, et conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

Figure 1. Aires d'immersion (AB-5) et de référence de l'Anse-à-Beaufils, échantillonnées en 1994.

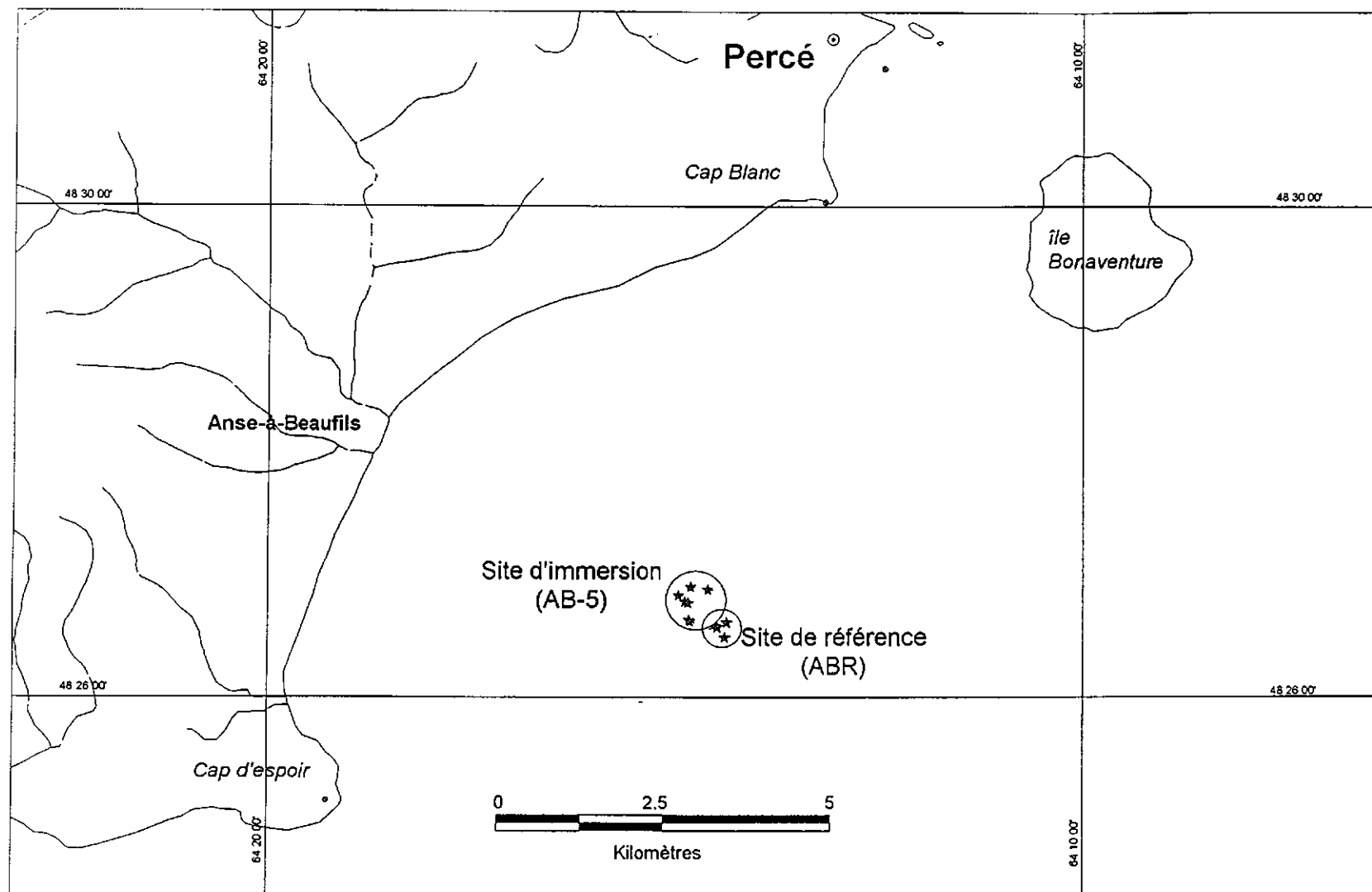


Figure 2. Répartition des stations sédimentaires du havre de Cap-aux-Meules.

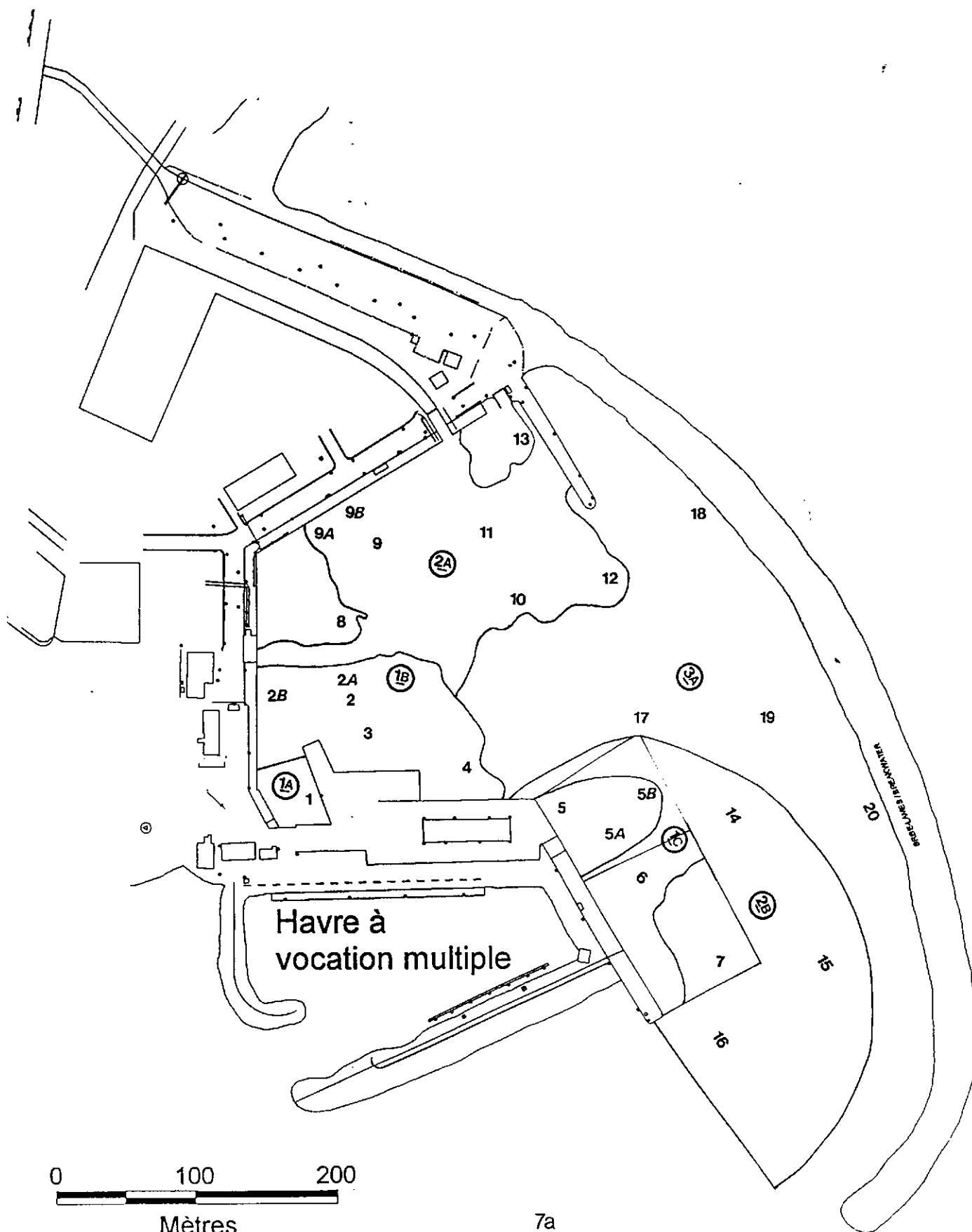


Figure 3. Aires d'immersion et de référence de Cap-aux-Meules.

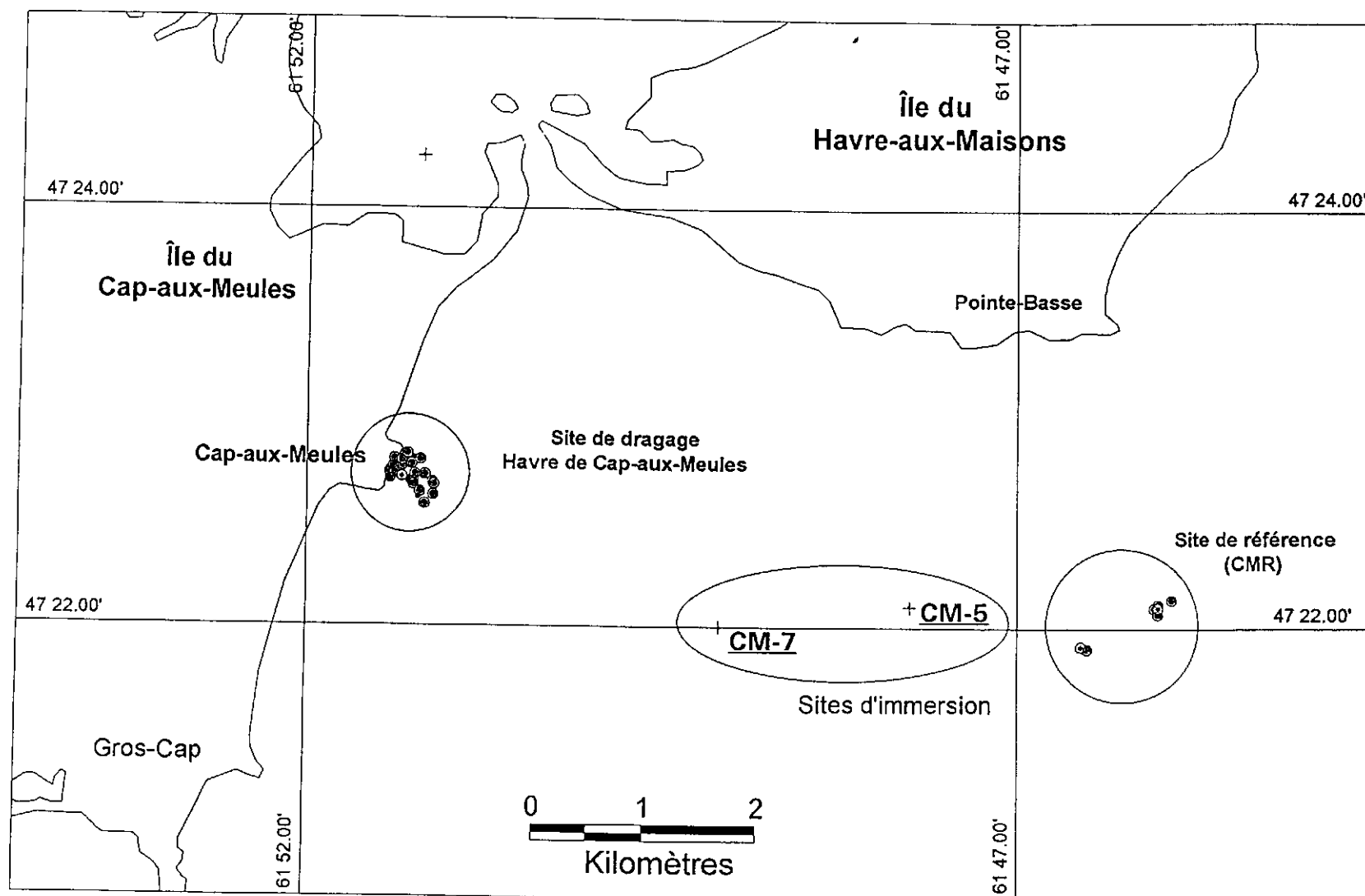


Tableau 2. Localisation des stations échantillonnées à Cap-aux-Meules.

Aire	Emplacement	Station	Latitude	Longitude
Aire visée par le projet de confinement en quai [1]	aire de confinement (1A)	1	47°37.84.33'	61°85.70.00'
		2	47°37.89.17'	61°85.67.17'
		2A	47°37.89.17'	61°85.67.17'
	face au quai en éperon (1B)	2B	47°37.89.50'	61°85.70.50'
		3	47°37.88.17'	61°85.64.33'
		4	47°37.85.33'	61°85.55.33'
		5	47°37.82.33'	61°85.44.67'
		5A	47°37.81.83'	61°85.44.00'
		5B	47°37.83.00'	61°85.41.83'
		6	47°37.79.00'	61°85.42.00'
		6/G	47°37.79.00'	61°85.42.00'
		7	47°37.73.33'	61°85.34.67'
		8	47°37.93.83'	61°85.66.17'
		9	47°37.99.17'	61°85.63.67'
		9A	47°37.99.83'	61°85.64.50'
		9B	47°37.99.83'	61°85.64.50'
		10	47°37.94.50'	61°85.54.33'
Aire de dragage éventuel [2]	des pêcheurs (2A)	11	47°37.98.50'	61°85.55.50'
		12	47°37.95.50'	61°85.44.00'
		13	47°38.04.00'	61°85.48.83'
		14	47°37.81.67'	61°85.19.83'
		15	47°37.79.33'	61°85.19.17'
		16	47°37.63.67'	61°85.29.17'
		17	47°37.87.50'	61°85.40.00'
		18	47°37.99.33'	61°85.33.67'
		19	47°37.87.17'	61°85.28.50'
		20	47°37.79.33'	61°85.18.33'
Aire non visée par les activités de dragage [3]	face à la rive occidentale du brise-lames (3A)	21	47°36.86.33'	61°76.66.67'
		21A	47°36.83.17'	61°76.71.50'
		21B	47°36.78.33'	61°76.67.17'
		22	47°36.52.50'	61°77.58.17'

2.1.3 IDENTIFICATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Toutes les informations relatives à la conservation et la préparation des sédiments sont fournies dans le document portant sur les analyses réalisées en 1993 (Bureau *et coll.*, 1995). Une description des contenants, de la quantité de sédiments et des méthodes de conservation utilisés pour chacune des analyses est fournie à l'annexe C.

2.1.4 PRÉPARATION ET UTILISATION DES FRACTIONS SÉDIMENTAIRES

Chaque échantillon a d'abord été homogénéisé manuellement avec une spatule enduite de téflon et réparti en six aliquotes de 50 g et 12 de 80 g (pour un poids total de 1 200 g environ), dans des tubes coniques de 50 mL (Falcon) préalablement lavés à l'acide nitrique (10% v/v) et rincés trois fois à l'eau purifiée (Eau de type 1 ASTM). Le lot de tubes de 50 g fut utilisé pour la réalisation des tests biologiques, alors que celui des 80 g fut destiné aux analyses chimiques.

L'eau interstitielle a été obtenue par centrifugation (centrifugeuse IEC, modèle Centra 7, rotor IEC 216) à vitesse moyenne (3 000 rpm, 1 700 g pendant 30 min.) des échantillons faisant partie du premier lot. Le surnageant résultant de cette procédure correspond à la fraction solide-humide (solide) du sédiment.

L'extrait organique fut quant à lui obtenu à partir du deuxième lot, comme suit: des échantillons de 50 g furent préparés et envoyés au laboratoire d'analyse externe, Novamann International (Côte de Liesse, Québec) pour la préparation des extraits organiques et la caractérisation chimique, organique. Chaque échantillon de 50 g a été séché avec du sulfate de sodium anhydre; pour respecter le ratio solvant (dichlorométhane)-quantité de sédiments, un certain nombre d'appareils Soxhlet ont été utilisés. Les extraits furent combinés, pour un total de 10 g. Ce volume a ensuite été ajusté à 10 mL. Trois aliquotes de l'extrait final ont été prélevées et placées dans des fioles. Deux blancs de méthode (blancs d'extraction) ont été préparés afin de déceler toute contamination pouvant provenir des réactifs. Une aliquote de 4 mL ainsi que les deux blancs ont été envoyées au laboratoire du Centre St-Laurent pour les analyses biologiques (Microtox et SOS Chromotest). L'extrait résiduel a été divisé en deux parties égales: une partie pour les analyses de BPC/CB/OC et l'autre, pour les HAP.

L'utilisation des trois fractions sédimentaires recueillies se définit comme suit:

- (a) Eau interstitielle: - détermination du pH, de la salinité, de l'azote total Kjeldahl, de l'azote ammoniacal, du phosphore total et des sulfures totaux

- réalisation du Microtox et du test de fertilisation des oursins
- (b) Fraction solide:
 - estimation du pourcentage d'humidité, de la granulométrie, du carbone organique total, des métaux lourds
 - extraction des substances organiques
 - réalisation du Microtox
- (c) Extrait organique:
 - mesure des concentrations de HAP, BPC, chlorobenzènes et pesticides
 - réalisation du Microtox

2.1.5 MÉTHODES D'ANALYSE

2.1.5.1 Propriétés physiques et composantes inorganiques, non-métalliques

Granulométrie

L'analyse granulométrique des sédiments a été effectuée selon la méthode de Duncan et LaHaie (1979) par l'équipe de l'Institut national de recherche sur les eaux (Burlington, Ontario). Chaque échantillon est divisé en aliquots de 5 à 8 g, puis homogénéisé et entraîné avec de l'eau à travers une série de tamis de différentes tailles. Chacune des portions retenues est ensuite séchée et pesée. Par la suite, la portion la plus fine (<63 µm) est analysée à l'aide d'un Sédigraphe.

Humidité

Afin de rapporter la teneur en contaminants et la toxicité d'un échantillon sur une base sèche, le pourcentage d'humidité de chacun a été déterminé selon la méthode proposée par Environnement Canada (1992). Deux pourcentages d'humidité furent calculés: totale et résiduelle. Le premier fut déterminé par la firme Novamann International (Côte de Liesse, Québec) par centrifugation du sédiment entier. Pour ce qui est du deuxième, il fut estimé par le laboratoire du Centre Saint-Laurent comme suit: des aliquotes d'environ 25 g de sédiment humide (recueilli après centrifugation du sédiment entier) sont placées individuellement dans des assiettes d'aluminium préalablement conditionnées et séchées à 100°C (±5°C) pendant 24 h; les assiettes sont ensuite transférées au dessiccateur pendant 2 h. Les poids humides et secs sont déterminés par gravimétrie.

Solides volatils

Cette analyse a été effectuée par l'Institut national de recherche sur les eaux selon le protocole de Clesceri *et coll.* (1989). Les échantillons de sédiments sont d'abord décantés, homogénéisés et séchés au four à 105°C. Les échantillons secs sont ensuite calcinés dans un four à moufle à 500°C pendant 2 h. Le pourcentage de solides volatils est déterminé par gravimétrie.

Azote total Kjeldahl, azote ammoniacal et phosphore total

Les protocoles suivis pour ces analyses sont les suivants: azote Kjeldahl total - méthodes 4500-Norg, B, C et 4500-NH₃ H (Standard Methods, 1992); azote ammoniacal - méthode NAQ07555 (Environnement Canada, 1979); phosphore total - méthode 4500-P E et F (Standard Methods, 1992). Ces derniers furent effectués par le laboratoire Technitrol Eco (Pointe-Claire, Québec).

Sulfures totaux

Les sulfures ont été mesurés selon la méthode avec le méthylène bleu (Standard Methods, Méthode 4500-S²) par le laboratoire Technitrol Eco.

Carbone organique total (COT)

La teneur en carbone organique total des sédiments³ est quantifiée à l'aide d'un Déterminateur de carbone LECO-12, à une température de 575°C pendant 250 s. Cette analyse a été effectuée par l'Institut national de recherche sur les eaux. Les concentrations sont exprimées en pourcentage de poids sec des sédiments.

2.1.5.2 Caractérisation chimique

Composés organiques: HAP - BPC - Chlorobenzènes - Pesticides

Ces analyses ont été effectuées par Novamann International sur les échantillons de Cap-aux-Meules. La teneur en substances organiques de deux matériaux de référence certifiés (MRC: HS-2 et HS-3) a été déterminée en duplicata. Les matériaux HS-2 sont certifiés pour l'analyse des BPC, alors que les matériaux HS-3 le sont pour l'analyse des HAP; tous proviennent de la zone portuaire de la Nouvelle-Écosse. Ces matériaux ont été fournis par le Programme de standards de chimie analytique marine du Conseil national de recherches du Canada. Les concentrations certifiées de HAP et BPC sont présentées à l'annexe D. Les résultats sont rapportés sur base de poids sec.

¹Les échantillons ont d'abord été séchés au four à 60 °C pendant un minimum de deux heures.

L'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), chlorobenzènes (CB) et congénères de BPC, ainsi que des pesticides organochlorés (OC) a été réalisée en suivant la méthodologie décrite dans Bureau *et coll.* (1995). Les résultats d'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques sont rapportés en deux groupes: les HAP à faible poids moléculaire (2 et 3 noyaux benzéniques) et les HAP à poids moléculaire élevé (plus de trois noyaux benzéniques).

Mercure

Les échantillons de sédiments sont d'abord digérés avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) et de l'acide nitrique (HNO_3) à une température de $90^\circ C$. Cette étape est suivie d'une oxydation avec du permanganate de potassium ($KMnO_4$) et du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$). À la toute fin, de l'hydroxylamine ($NH_2OH:HCl$) est ajouté pour neutraliser l'excès de $KMnO_4$ et de $K_2S_2O_8$. Le mercure ainsi obtenu est mis en solution sous forme organique (Hg^{2+}). Le mercure en solution est ensuite réduit en mercure élémentaire (Hg^0) par une solution de chlorure stanné et entraîné à l'état gazeux, par un barbotage d'argon dans une cellule traversée par un faisceau lumineux, correspondant à la raie majoritaire du mercure ($\lambda = 253.7\text{ nm}$). Les vapeurs de mercure ainsi entraînées sont détectées par absorption atomique.

Autres Métaux traces

L'extraction des métaux (Cu, Cd, Zn, Pb et As) est effectuée dans un premier temps par digestion acide avec de l'eau régale (trois parties d'acide hydrochlorique (HCl) et une partie d'acide nitrique (HNO_3)). Le mélange sédiment-acide est ensuite amené à faible ébullition sur une plaque chauffante. Une deuxième mise en ébullition suit l'ajout de HNO_3 . Pour terminer la digestion, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est ajouté au digesté et ce dernier ramené à faible ébullition. La fraction minérale (silicate et aluminicate) est ensuite extraite du digesté par filtration. Finalement, un volume de 50 mL d'eau purifiée est ajouté au filtrat. La détection instrumentale pour le Cu et le Zn est faite par absorption atomique à la flamme et le Pb, Cd, et l'As par absorption atomique au four au graphite.

Les concentrations de tous les métaux analysés ont été corrigées pour la fraction particulaire fine ($<63\text{ }\mu m$) des sédiments puisque cette dernière a tendance à réduire la biodisponibilité des éléments par sorption.

2.1.5.3 Tests de toxicité des sédiments

Trois bioessais (Microtox®, test de survie d'un amphipode marin et test de fécondation des oursins) ont été réalisés dans cette partie de l'étude.

Essais Microtox

Les essais Microtox ont été effectués sur trois fractions de sédiments provenant de Cap-aux Meules et de l'Anse-à-Beaufils. De plus, des essais ont été réalisés avec un toxique de référence, le sulfate de zinc, pour chaque nouveau lot de bactéries utilisé afin d'assurer la qualité des souches. Les périodes d'exposition de *V. fischeri* furent respectivement de 15, 5 et 5 min pour l'eau interstitielle, la phase solide et les extraits organiques. Ces temps d'exposition ont été choisis en fonction des types de contaminants potentiellement présents dans chacune des fractions sédimentaires. *V. fischeri* est plus sensible, après des périodes de temps relativement longues, à la présence de composés hydrosolubles tels que les métaux bivalents, alors que les substances liposolubles agissent plus rapidement sur la bactérie (Beckman, 1982).

Essai sur eau interstitielle (EI)

Les essais Microtox sur eau interstitielle ont été faits selon la méthode recommandée par Environnement Canada (1992). Certaines modifications apportées au protocole pour les tests effectués au laboratoire du Centre Saint-Laurent sont présentées à l'annexe B du rapport de 1993 (Bureau *et coll.*, 1995). Les résultats sont exprimés en % v/v (vol. eau interstitielle/vol. diluant).

Essai sur extraits organiques (EO)

La préparation des extraits pour la réalisation des essais s'est effectuée comme suit: le DCM utilisé pour conserver les extraits est complètement évaporé sous azote et remplacé par 2 mL de diméthylsulfoxyde de qualité spectrophotométrique (DMSO, Aldrich). Cette étape est essentielle puisque le DCM est reconnu comme une substance mutagène (Williams *et coll.*, 1982). Certains échantillons (CM-2B, CM-5B, CM-9A2, CMR-21B) ont nécessité un volume supérieur (3 ml) de DMSO, en raison de la présence d'un précipité dans la solution. Afin d'accélérer la dissolution des extraits, les échantillons sont placés dans un bain ultrasonique pendant 20 min., à 20°C. Le poids sec de chaque extrait est déterminé avant l'ajout du DMSO. Un blanc de méthode (blanc d'évaporation) est également préparé et soumis aux mêmes essais biologiques que les échantillons.

Les essais Microtox sur l'extrait organique ont été effectués selon le protocole de Microbics® (1992). Chaque échantillon est d'abord dilué à 2% v/v avec une solution saline (2% NaCl). Pour les échantillons de l'Anse-à-Beaufils, une série de huit à dix dilutions (1:2) supplémentaires a été effectuée en utilisant une solution à 2% NaCl et 2% DMSO; en ce qui concerne les échantillons de Cap-aux-Meules, présumément plus contaminés que ceux de l'Anse-à-Beaufils, la première concentration testée fut, selon le degré de toxicité, de 1% ou de 0.1% v/v. Pour ces extraits, de six à huit dilutions (1:2) en série ont été préparées. Ainsi, toutes les concentrations testées contenaient 1% DMSO. Les résultats sont exprimés en µl d'extrait / mL d'eau de dilution.

Essai sur phase solide (PS)

Les essais Microtox sur la phase solide des sédiments ont été effectués (en duplicata) selon le protocole proposé par la firme Microbics (1992), en utilisant de l'eau de mer comme eau de dilution. Certaines modifications apportées au protocole sont décrites à l'annexe C du rapport de 1993 (Bureau *et coll.*, 1995). Les résultats sont donnés en µg sédiment sec/mL diluant.

Essai de toxicité aiguë chez les amphipodes marins

Cet essai a été réalisé selon le protocole recommandé par Environnement Canada (1992). Les organismes soumis à l'essai (*Amphiporeia virginiana*) proviennent du site contrôle, Martinique Beach, en Nouvelle-Écosse. Ces derniers ont été prélevés environ une semaine après le prélèvement des sédiments.

La veille de l'essai, chaque échantillon est homogénéisé et des aliquotes de 175 mL sont déposées dans les récipients d'essai. L'eau d'essai (eau de mer) est ensuite ajoutée jusqu'à concurrence de 750 mL. Chaque récipient est aéré pendant la nuit précédant le début de l'essai. Enfin, vingt amphipodes sont distribués dans chacun des récipients et le volume est porté à 950 mL. Les organismes ont été exposés aux sédiments de dragage, d'immersion et de référence pendant une période de dix jours.

Les résultats suivants sont fournis pour tous les échantillons soumis à l'essai: le pourcentage moyen ($\pm$ écart-type) de survie au 10^e jours et le pourcentage moyen ($\pm$ écart-type) d'amphipodes retrouvés en surface.

Essai sur la fécondation chez les oursins

Cet essai de subléthalité a été réalisé selon la méthode recommandée par Environnement Canada (1992). Les organismes matures utilisés (*Lytechinus pictus*), qui proviennent d'un fournisseur localisé en Californie, ont été gardés dans des réservoirs au laboratoire de Dartmouth afin d'obtenir les gamètes nécessaires aux essais.

Les gamètes sont exposées à trois concentrations d'eau interstitielle. Au terme de l'exposition, les oeufs sont prélevés et le dénombrement d'oeufs fécondés est effectué. Le paramètre d'effet de l'essai est l'inhibition de la fécondation, évaluée par rapport à l'échantillon de contrôle.

2.1.6 ASSURANCE DE QUALITÉ

Afin d'obtenir des résultats d'analyse fiables et représentatifs, certains procédés d'assurance de la qualité, tels que la réalisation d'analyses de matériaux de référence, d'étalons et d'échantillons subdivisés (tel que AB-34), ainsi que la tenue de registres des procédures de contrôle de qualité, ont été effectués pour toutes les analyses faites dans le cadre de cette étude. De plus, la participation d'un laboratoire externe, l'Institut d'océanographie Bedford (Dartmouth, Nouvelle-Écosse), pour la réalisation d'essais Microtox sur l'eau interstitielle et la phase solide des sédiments a permis d'évaluer la variabilité inter-laboratoire.

2.1.7 TRAITEMENT DES DONNÉES ET CALCUL DES RÉSULTATS

2.1.7.1 Essais Microtox

Les résultats Microtox sur eau interstitielle et phase solide, provenant du laboratoire du Centre St-Laurent, sont calculés à partir d'une droite de régression simple, dans une feuille de travail élaborée sur fichier LOTUS. Ce fichier a été élaboré par les membres du laboratoire québécois. La CI50 (après 15 min pour l'eau interstitielle et 5 min pour la phase solide) a été calculée par prédiction inverse à partir de l'équation de régression. Les données Microtox du laboratoire de Dartmouth, ainsi que les résultats d'extraits organiques (CI50 - 5 min.), ont été calculés à partir du fichier informatique élaboré par la firme Microbics.

2.1.7.2 Essai de survie des amphipodes

Le test de Student (test *t*) a permis d'identifier les stations démontrant une toxicité significativement différente du sédiment de contrôle ($p=0.05$).

2.1.7.3 Essai de fécondation chez les oursins

Le taux de fécondation, déterminé pour chaque échantillon et ce, pour trois concentrations d'eau interstitielle (10%, 33% et 100%), a permis de calculer la concentration inhibitrice (CI_{25}) par rapport au sédiment de contrôle. Le test t ($p=0.05$) a été utilisé pour comparer les concentrations d'essai (sédiments d'essai) avec la concentration contrôle.

2.1.7.4 Associations entre les bioessais

Deux mesures d'association ont été déterminées pour les tests effectués sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules, soit le niveau de concordance et le niveau de corrélation. Ces deux mesures fournissent des informations complémentaires sur l'évaluation des niveaux d'association entre les bioessais. En bref, le test de concordance nous indique si deux essais donnés procurent la même information sur la toxicité des échantillons, soit qu'ils sont toxiques ou non pour les organismes concernés. Lorsque deux essais se révèlent concordants, le test de corrélation vérifie l'hypothèse que les stations, classées selon leur niveau de toxicité, obtiennent le même rang dans les deux tests.

La concordance a été évaluée de façon qualitative. Un code de toxicité a d'abord été attribué à chaque observation (il s'agit ici des échantillons de sédiments, aussi appelés stations); ces codes correspondent aux classes de toxicité identifiées au tableau 3. L'annexe E présente les codes obtenus pour chaque station, et ce, pour tous les essais de cytotoxicité. Ces codes sont utilisés pour fins de comparaison inter-stations seulement. L'analyse de concordance ne considère que la présence ou l'absence de toxicité comme critères. En d'autres termes, elle ne tient pas compte du niveau de toxicité (soit +, ++ ou +++) des échantillons mais seulement du fait que des effets toxiques ont été observés. Ainsi, les codes ++ et +++ sont considérés comme étant équivalents au code + pour cette analyse. Les codes attribués à un échantillon donné pour les différents bioessais auxquels il a été soumis ont été comparés. Le taux de concordance (c) fut calculé comme suit:

$$c = \frac{\text{somme des groupes de données en accord [soit + / + ou o / o]} \times 100}{\text{nombre total de stations}}$$

Une concordance parfaite (100%) était accordée lorsque tous les codes donnés à chacun des échantillons ont démontré la même tendance d'un test à l'autre, p. ex. le sédiment de dragage # 10.

En revanche, le niveau de corrélation entre les bioessais a été évalué à l'aide du test statistique non-paramétrique Spearman sur les données brutes. Les données ont *a priori* été transformées en log 10 pour accroître la normalité de leur distribution. Les analyses statistiques de corrélation ont été effectuées sur SAS (SAS Inst., 1987). Une corrélation parfaite entre deux bioessais ($r = 1$) était attribuée lorsque les observations, préalablement classifiées pour chaque bioessai, avaient obtenu un rang identique pour ces deux tests.

Tableau 3. Classes de toxicité proposées pour les résultats Microtox.

Fraction de sédiment analysée	Classes de toxicité	Niveau de toxicité	Code de toxicité
Phase solide	CI ₅₀ - 5 min. (mg sec ¹ /L)		
	> 74 000	non toxique	o
	> 3 700	toxicité marginale	+
	> 740	toxicité modérée	++
Eau interstitielle	< 740	toxicité élevée	+++
	CI ₅₀ - 15 min. (%v/v)		
	> 50	non toxique	o
	> 10	toxicité marginale	+
Extrait organique	> 1	toxicité modérée	++
	< 1	toxicité élevée	+++
	(CI ₅₀ - 5 min. (μL/mL)		
	> 10	non-toxique	o
	> 1	toxicité marginale	+
	> 0.1	toxicité modérée	++
	< 0.1	toxicité élevée	+++

La présence de concordance et de corrélation significative ($p < 0.001$) entre deux bioessais donnés suggérerait qu'un seul de ces tests serait suffisant pour évaluer la toxicité des échantillons. En contrepartie, l'absence d'association entre les bioessais à l'étude suggérerait que chacun apporte une information différente quant à la toxicité des sédiments et que par conséquent, une batterie comportant tous ces essais permettrait d'avoir une image plus complète de leur niveau de contamination.

2.1.7.5 Comparaison des sites

Le test *t* a été utilisé pour détecter des différences significatives entre la toxicité des sédiments de dragage, d'immersion et ceux de référence pour les deux sites à l'étude.

2.1.7.6 Associations entre les variables chimiques et biologiques

Nous avons tenté d'établir un lien entre des causes possibles (présence de contaminants déterminée par les analyses chimiques) et les effets observés (toxicité dans les bioessais) en utilisant le test de corrélation canonique (SAS, 1988) pour les résultats de Cap-aux-Meules. Étant donné le faible niveau de toxicité des sédiments de l'Anse-à-Beaufils et l'absence de données sur la chimie de ces échantillons (mis à part les teneurs en mercure), aucune analyse de corrélation n'a été effectuée pour ce site.

Une analyse à fonction canonique discriminante (SAS, 1988) a, de plus, été utilisée afin (1) d'identifier les variables biologiques ayant contribué le plus à la discrimination entre les aires sédimentaires de Cap-aux-Meules et (2) de classer ces aires selon leur niveau de toxicité. L'analyse à fonction canonique discriminante est une technique statistique qui produit des fonctions mathématiques permettant d'établir des différences entre les groupes définis *a priori*. Ces fonctions, appelées fonctions discriminantes (FDs), sont en fait des combinaisons de variables qui sont les plus responsables des différences observées entre les groupes. Les valeurs attribuées à ces FDs sont calculées pour chaque échantillon et sont utilisées pour classer les stations par groupes.

L'analyse n'a pas été réalisée pour les sédiments de l'Anse-à-Beaufils puisque leurs niveaux de toxicité sont très faibles et plus difficiles à discriminer les uns des autres. De plus, seuls les essais sur *V. fischeri* furent inclus dans l'analyse puisque les tests sur amphipodes et oursins n'ont été effectués qu'avec 12 échantillons. Or les résultats des tests statistiques sont, en général, fortement influencés par des données manquantes, particulièrement lorsque celles-ci sont réparties de façon non-uniforme dans la matrice de données. Les stations de Cap-aux-Meules ont d'abord été regroupées en quatre groupes, selon leur niveau de toxicité dans les essais Microtox. Ces groupes correspondent plus ou moins aux aires définies au tableau 2. Les résultats de la classification permettent de déterminer si les réponses observées pour une station donnée sont statistiquement plus apparentées à un autre groupe en termes d'effets biologiques. Les valeurs des fonctions discriminantes ont été calculées à partir des données biologiques transformées *a priori* en log (10) afin d'approcher une distribution normale.

2.2 RÉSULTATS

2.2.1 CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES ET COMPOSANTES INORGANIQUES NON-MÉTALLIQUES

Les caractéristiques physiques et composantes inorganiques non-métalliques des sédiments à l'étude sont présentées à l'annexe F. Mis à part le COT, les paramètres mesurés présentent des valeurs légèrement supérieures pour les échantillons de Cap-aux-Meules comparativement à l'Anse-à-Beaufils (figure 4). De plus, à l'exception du phosphore total, les sédiments de référence de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules présentent des teneurs relativement plus faibles que les sédiments portuaires ou immergés.

En ce qui concerne le pourcentage de COT des échantillons de Cap-aux-Meules, il semble légèrement augmenter à mesure que l'on se rapproche du havre (figure 5). Dans le cas des sulfures totaux, on remarque une nette augmentation de la concentration dans l'aire 2B, qui semble se maintenir dans les autres stations plus éloignées du port (aire 3). Enfin, le pourcentage de particules fines ($<63 \mu\text{m}$) est relativement faible dans les aires localisées près du havre, plus particulièrement dans les aires 1A et 1B.

La salinité de l'eau interstitielle varie entre 30 et 32 ppm pour les sédiments du site d'immersion, soit légèrement supérieure à celle des sédiments de Cap-aux-Meules (22 à 30 ppm), à l'exception de la station 2A qui démontre une salinité de 15 ppm seulement. L'eau de mer de surface ayant servi comme solution de dilution pour les bioessais et provenant des aires de référence a une salinité équivalente à la majorité des sédiments à l'étude, soit 30 ppm.

2.2.2 ANALYSES CHIMIQUES

2.2.2.1 Composés organiques

Les résultats des analyses de substances organiques effectuées sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules apparaissent à l'annexe G.

Anse-à-Beaufils

Seulement deux stations de l'Anse-à-Beaufils ont fait l'objet d'analyses chimiques en 1994, soit les stations de référence 39 et 41. Ces sédiments ont été choisis parce qu'ils ont eu des effets toxiques sur les organismes testés. Les analyses chimiques pourraient donc nous aider à tenter d'expliquer les causes de cette toxicité.

En ce qui concerne les HAP, toutes les concentrations mesurées sont inférieures aux limites de détection. Cependant, un cyclodiène organochloré, l'endrine, ainsi que des BPC, absents des stations de référence en 1993 (Bureau *et coll.*, 1995), sont présents à de faibles concentrations en 1994, dans les deux stations de référence analysées.

Cap-aux-Meules - Stations portuaires

Les analyses révèlent que les échantillons de Cap-aux-Meules sont contaminés avec des HAP, BPC et pesticides organochlorés. L'annexe H présente les concentrations des deux premiers groupes de contaminants telles qu'obtenues en 1992 et en 1994 pour les mêmes aires d'étude; il s'agit toutefois de stations différentes. Quant aux pesticides organochlorés et chlorobenzènes, ils n'ont pas été analysés en 1992.

HAP

Les teneurs en HAP pour 1994 sont légèrement supérieures à celles de 1992 pour la station localisée dans l'aire 1A (figure 6a et b); l'inverse est noté pour l'aire 1B (aire de dragage au quai en éperon). Ainsi, la station 1 de l'aire 1A est fortement contaminée par des substances carcinogènes ou mutagènes connues, soit le benzo(a)pyrène, le dibenzo(a,h)anthracène et le benzo(a)anthracène (annexe G); les teneurs dépassent les SEN (seuils d'effet néfaste) définis pour ces composés par Environnement Canada (1992). Les niveaux de contamination des autres aires de dragage proposées sont relativement faibles et ne semblent pas avoir augmenté de 1992 à 1994 (figure 6a et b).

Les résultats de 1994 (figures 7a et b) démontrent que les plus fortes concentrations de HAP sont retrouvées dans les sédiments provenant de la station 1, remettant par conséquent en question le choix de cette zone comme aire de confinement. Les stations 2, 2A, 2B et 3 ont également des teneurs importantes de HAP. Toutefois, aucune d'entre elles ne présente des concentrations supérieures aux critères de qualité établis pour l'immersion en mer (Environnement Canada, 1990).

BPC

En ce qui concerne les BPC, l'ensemble des aires examinées révèlent des teneurs inférieures en 1994 (figure 6c). En tout, dix des congénères analysés et un Arochlor (1254) ont été détectés dans les échantillons en 1994 (figure 8a et b). La station 9A présente les concentrations les plus fortes de BPC; ceci est confirmé par la teneur élevée en Arochlor 1254 (4 µg/g) qui dépasse le critère de qualité pour l'immersion en mer (Environnement Canada, 1992). En somme, sept des 27 stations portuaires présentent des concentrations

d'Arochlor 1254 supérieures à ce critère; il s'agit de stations localisées principalement dans l'aire 2A (face au quai des pêcheurs).

Pesticides

Des 20 organochlorés analysés, 11 d'entre eux présentent des teneurs supérieures aux limites de détection (figure 9). Entre autres, on distingue des concentrations importantes de composés cyclodiéniqes tels que le chlordane, le dieldrine et l'heptachlore pour la majorité des stations localisées dans les aires visées par le projet de confinement en quai (1A, 1B et 1C; soit les stations 1 à 7 incl.). De plus, quatre métabolites du DDT ont été détectés dans les échantillons; de ces composés, le p,p-DDE semble présent dans la majorité des stations et plus particulièrement à la station 1. Enfin, dans le cas du lindane, un isomère du BHC, la station 9A est celle où la teneur est la plus élevée.

Cap-aux-Meules - Stations de référence

Pour ce qui est des stations de référence, les teneurs en HAP de faible poids moléculaire, BPC et pesticides organochlorés sont très faibles, voir nulle pour la plupart des stations (annexe G); par ailleurs, aucun HAP de poids moléculaire élevé n'a été détecté dans ces échantillons.

2.2.2.2 Métaux

Les résultats bruts des analyses de métaux lourds pour les sites de dragage et d'immersion sont présentés à l'annexe G. Les concentrations de métaux corrigées pour la fraction particulaire fine ($< 63 \mu\text{m}$) des sédiments sont également présentées dans cette annexe.

Anse-à-Beaufils

Seul le mercure a été analysé pour les stations de l'Anse-à-Beaufils. Toutes les concentrations mesurées sont inférieures au critère réglementant l'immersion des matériaux de dragage en mer ($0.2 \mu\text{g/g}$; Environnement Canada, 1992).

Cap-aux-Meules

Pour le site de Cap-aux-Meules, trois des métaux lourds analysés en 1994 sont présents à des concentrations qui dépassent les critères d'Environnement Canada (1992) pour l'immersion en mer. Il s'agit du cuivre ($28 \mu\text{g/g}$), du plomb ($42 \mu\text{g/g}$) et du zinc ($150 \mu\text{g/g}$). Entre autres, les stations 2 et 5B révèlent, respectivement, des concentrations de cuivre et de zinc de près de 10 fois supérieures aux critères de qualité. D'une manière

générale, les niveaux de contamination semblent diminuer en 1994 à mesure que l'on s'éloigne du havre (figure 10). Ceci est particulièrement vrai pour le cuivre, le cadmium et le zinc. En revanche, les sédiments de référence présentent des concentrations de métaux de cinq à dix fois inférieures à celles retrouvées dans les sédiments portuaires.

Si on compare les résultats de 1992 avec ceux de 1994 (figure 11), les aires étudiées semblent démontrer des niveaux de contamination supérieurs pour la dernière année.

Figure 4. Propriétés physiques et paramètres chimiques mesurés pour les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type.

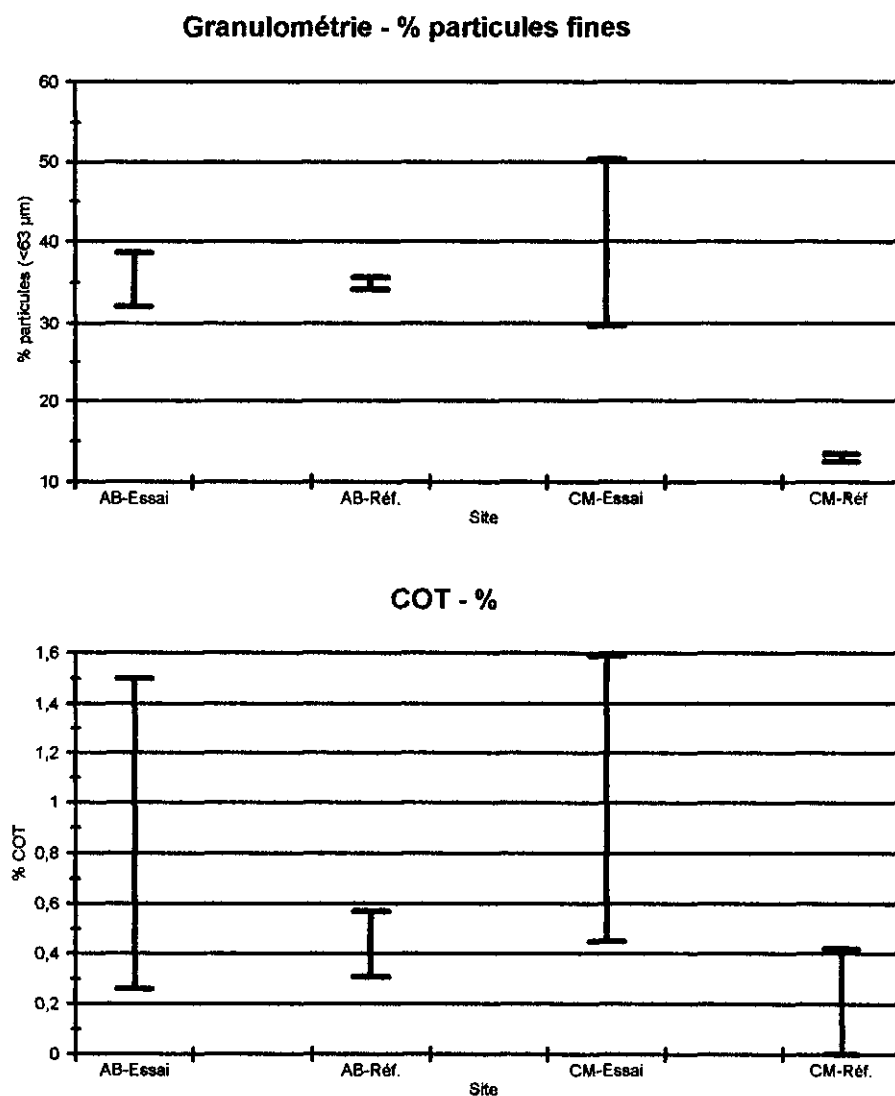


Figure 4 (suite).

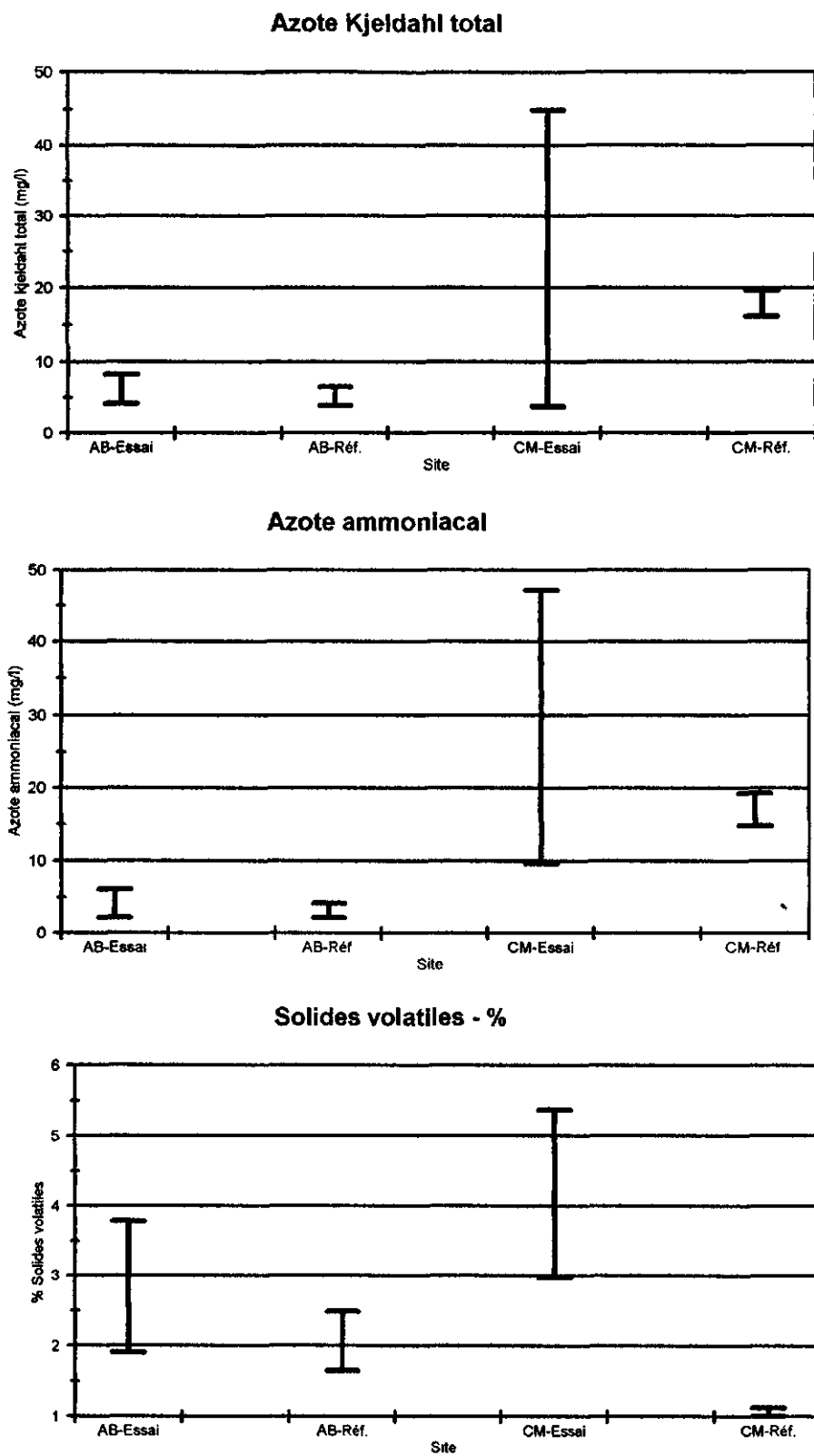


Figure 4 (suite).

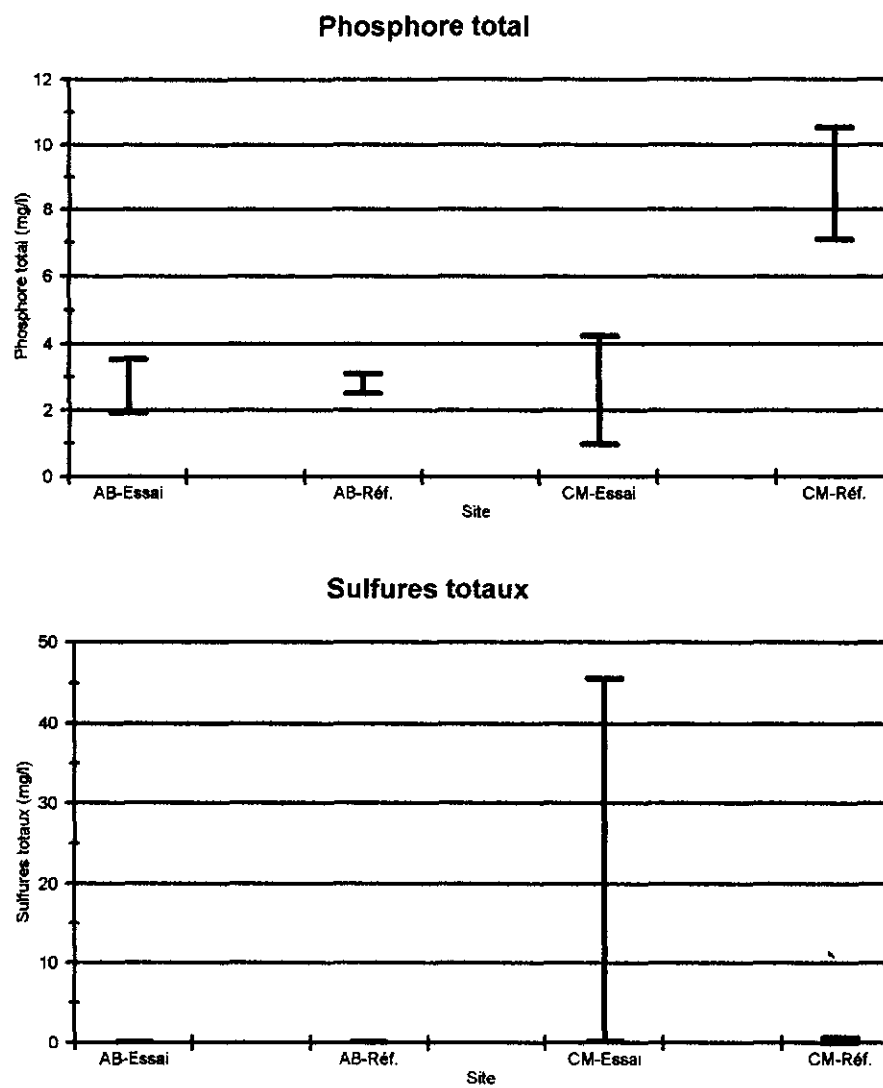


Figure 5. Granulométrie et teneurs en carbone organique total et sulfures totaux des sédiments de Cap-aux-Meules (données de 1994).

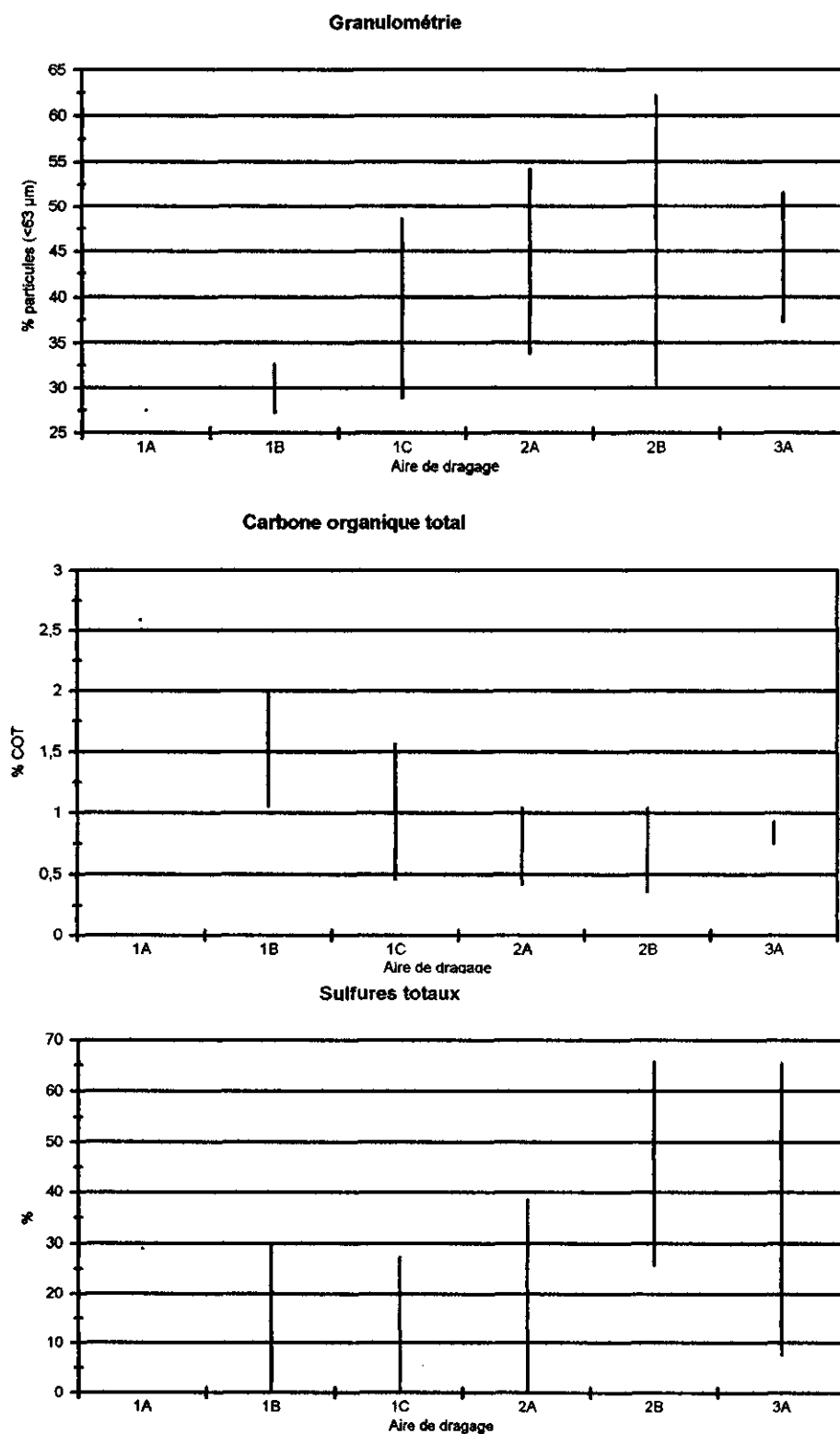
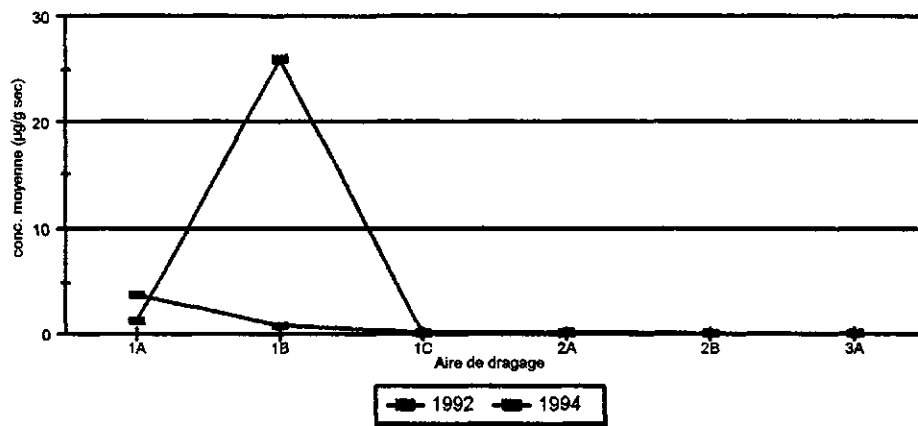
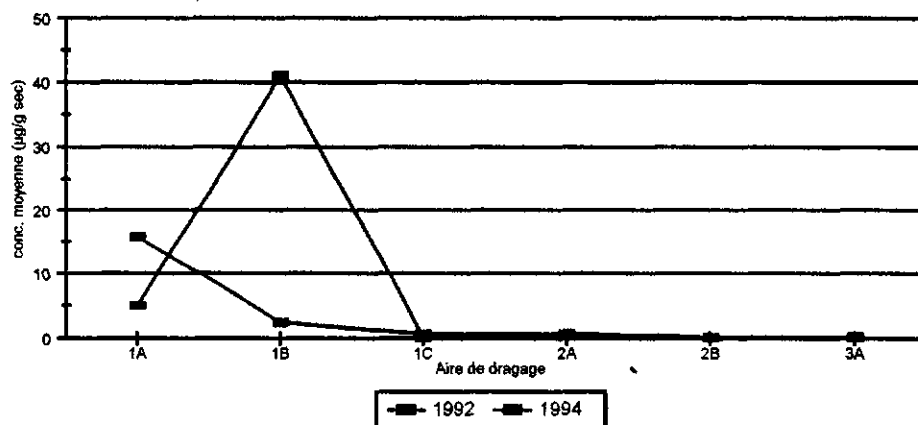


Figure 6. Concentrations moyennes de HAP et de BPC dans les sédiments des aires de dragage de Cap-aux-Meules, telles que mesurées en 1992 et en 1994,

a) HAP de faible poids moléculaire



b) HAP de poids moléculaire élevé



c) BPC totaux

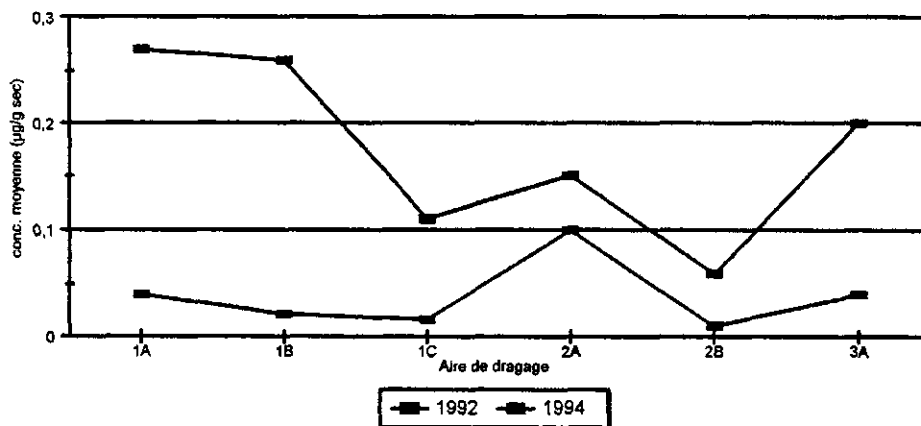


Figure 7. Concentrations de HAP dans les sédiments du site de dragage (données de 1994).

a) HAP de faible poids moléculaire

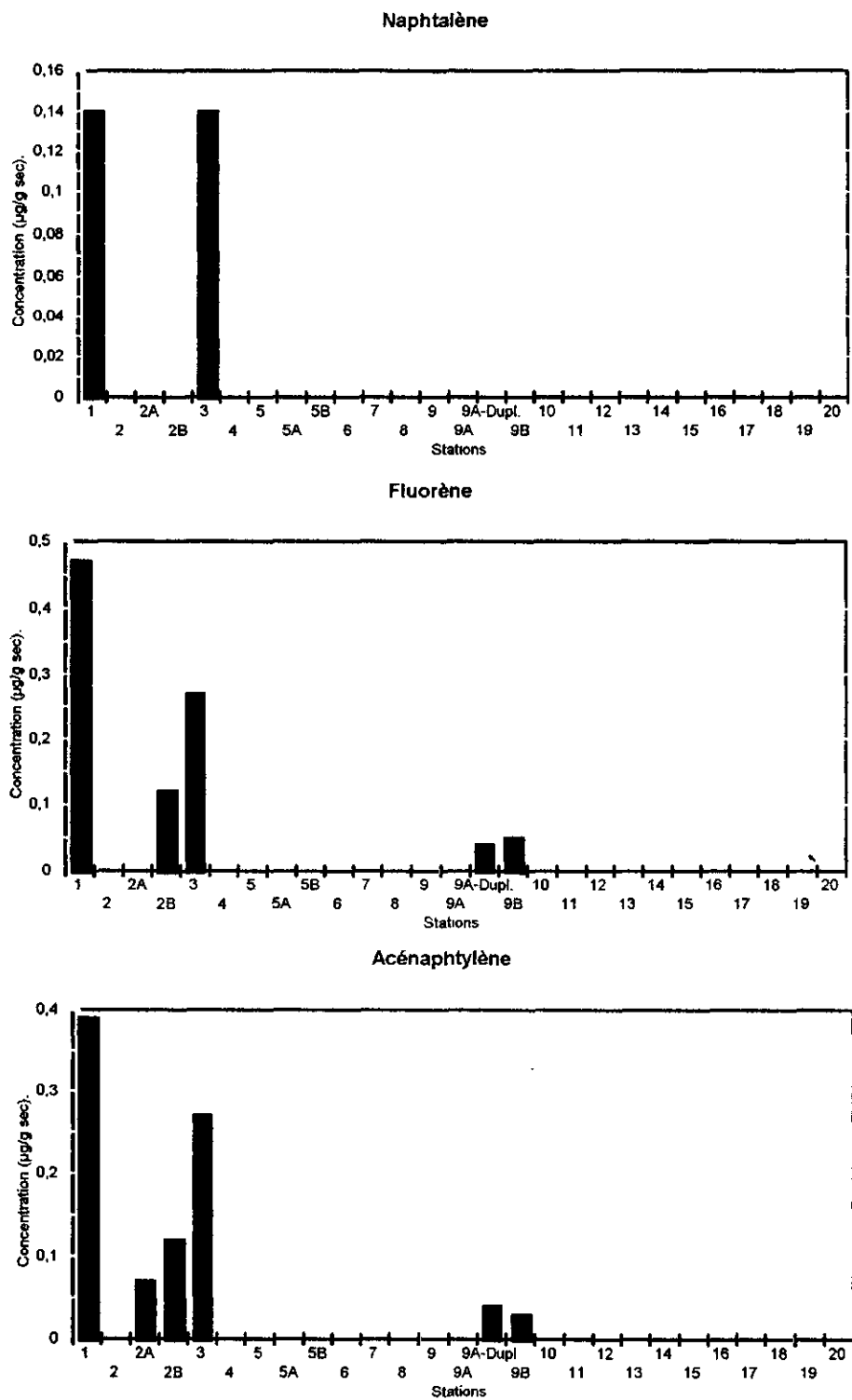
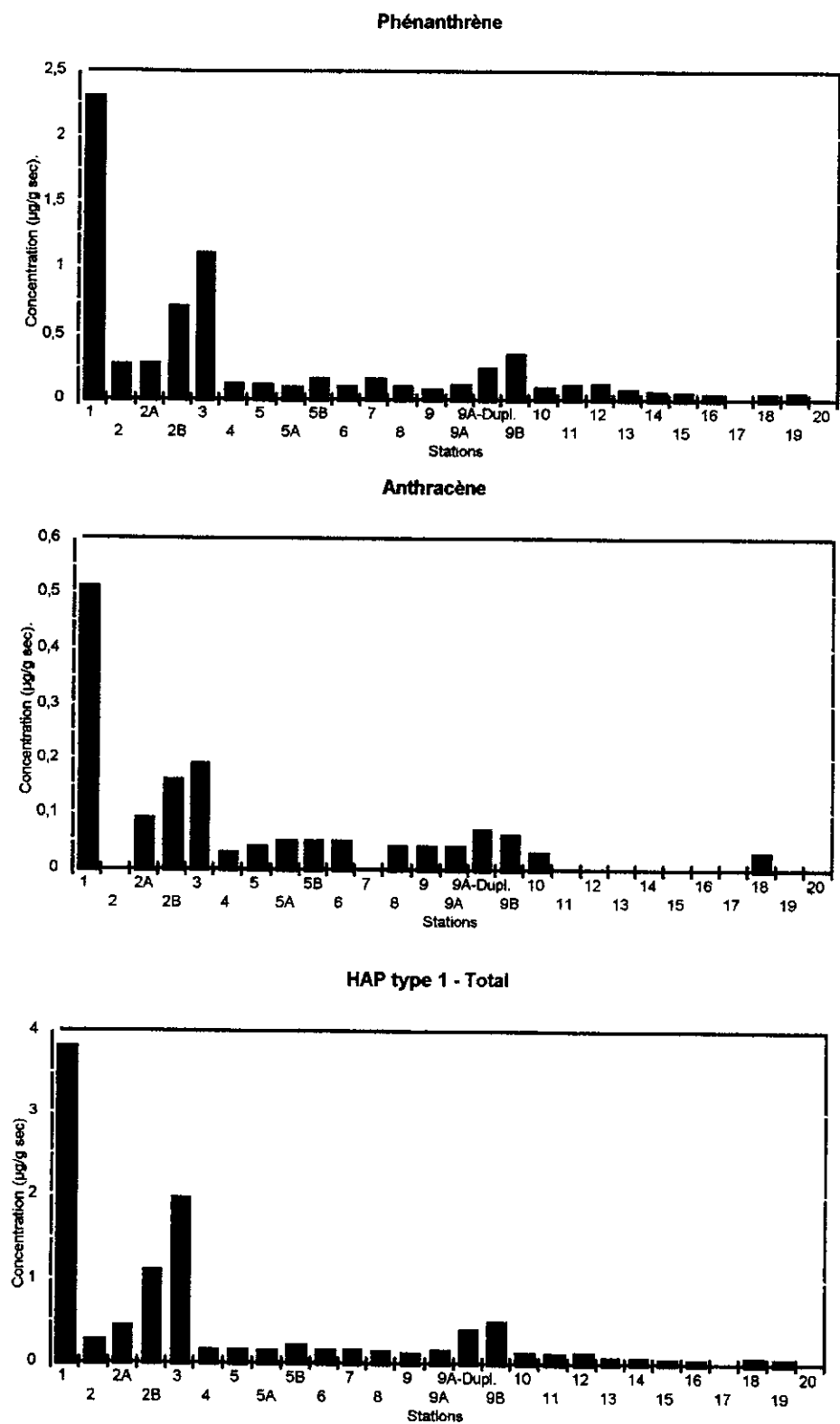
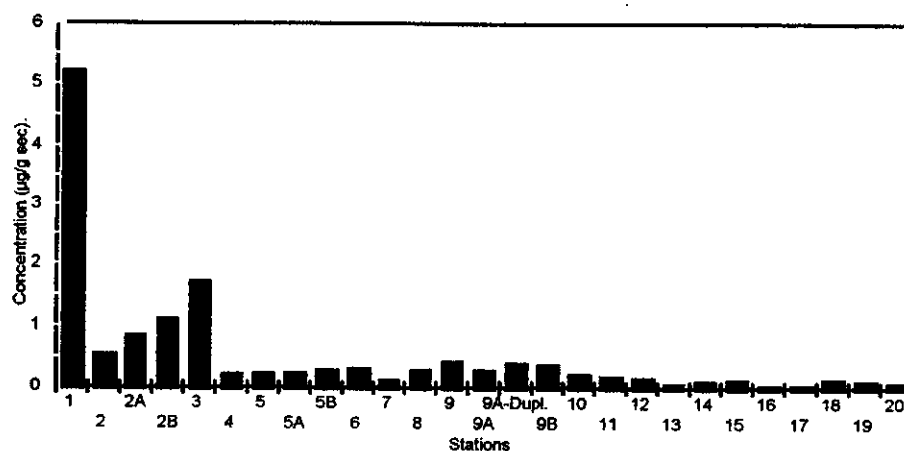


Figure 7a (suite).

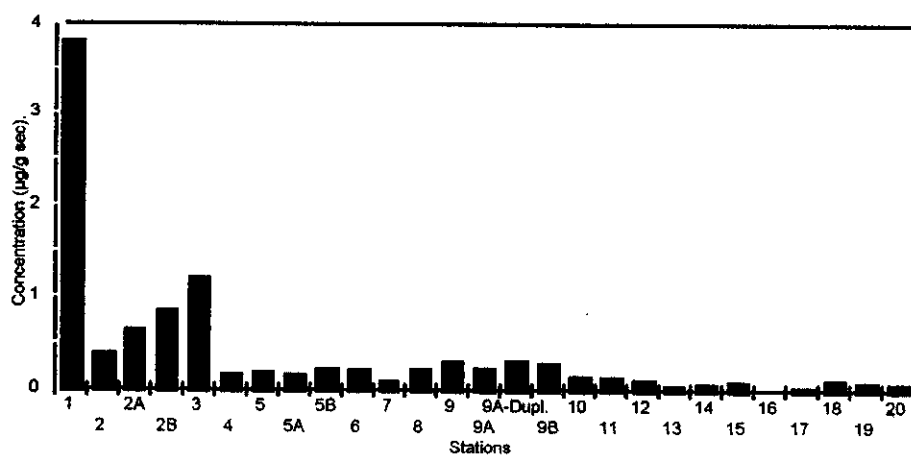


b) HAP de poids moléculaire élevé

Fluoranthène



Pyrène



Benzo(a)anthracène

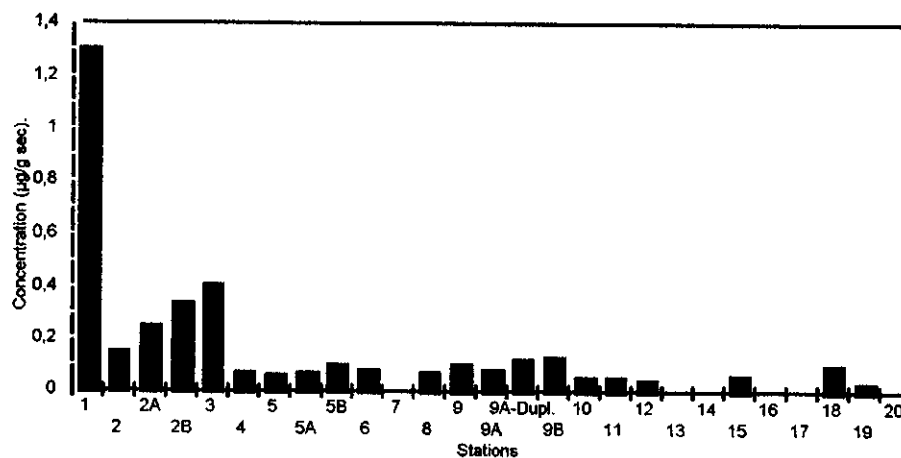


Figure 7b (suite).

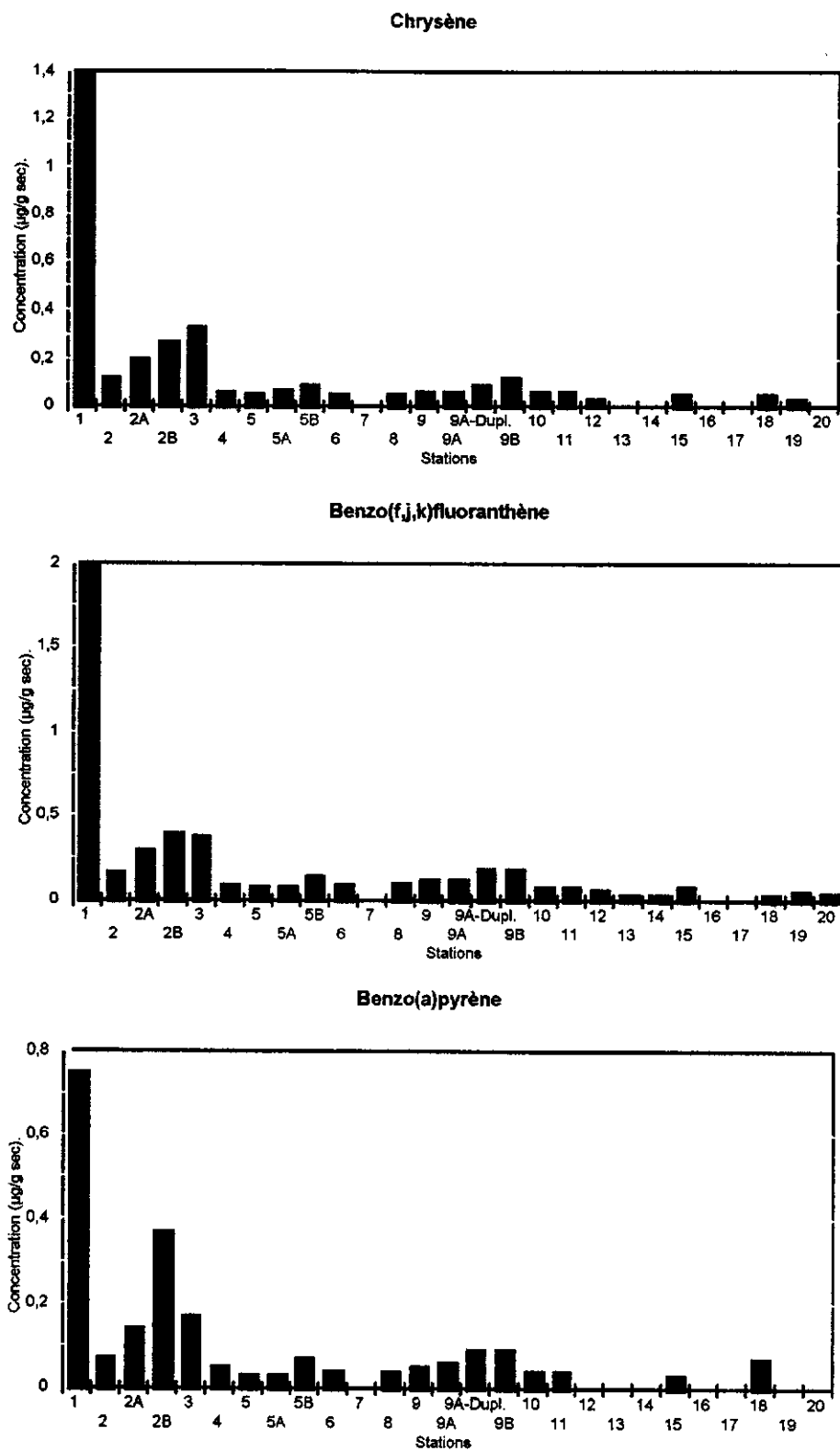


Figure 7b (suite).

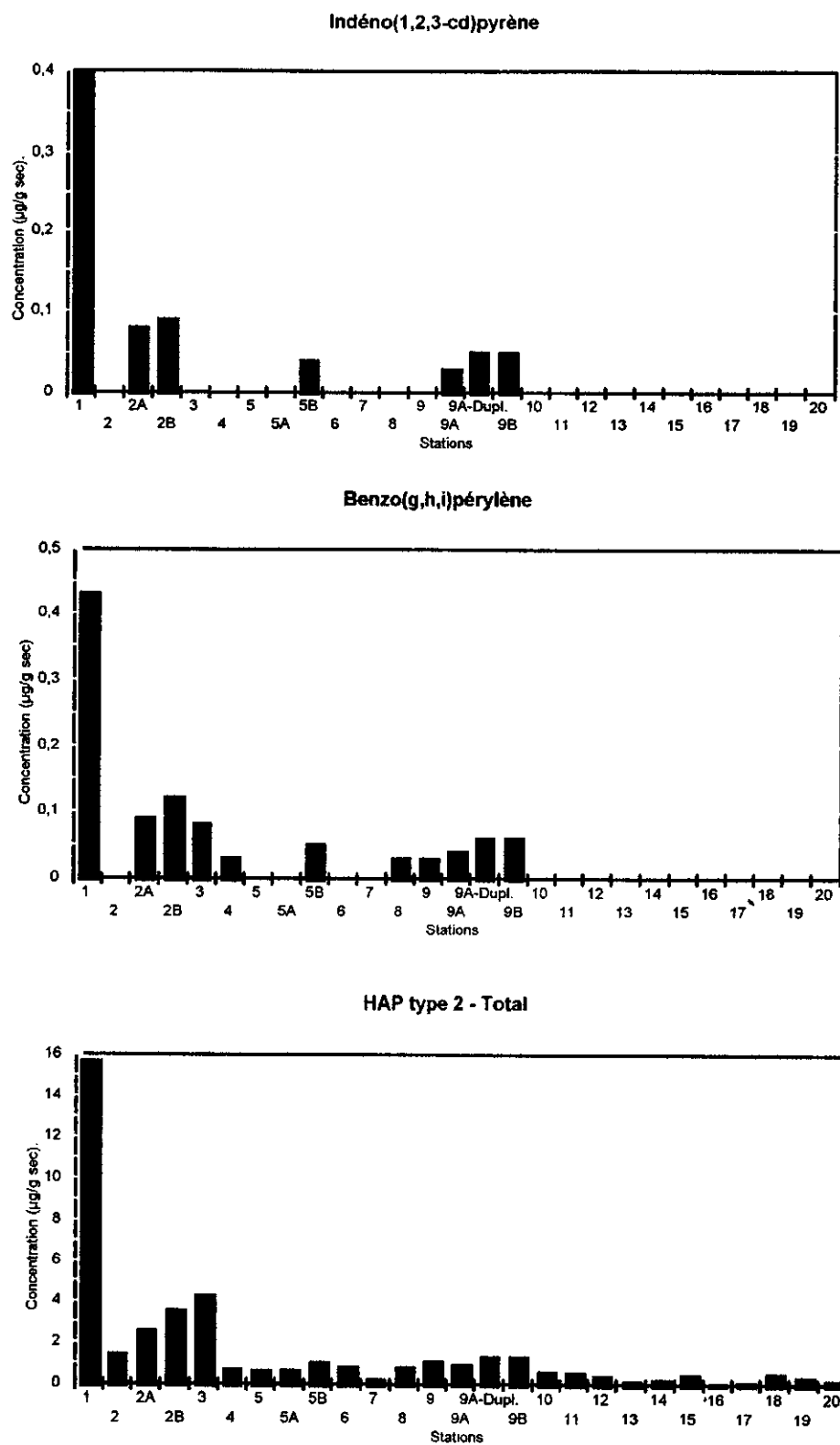


Figure 8. Concentrations de BPC dans les sédiments de Cap-aux-Meules (données de 1994).

a) Congénères

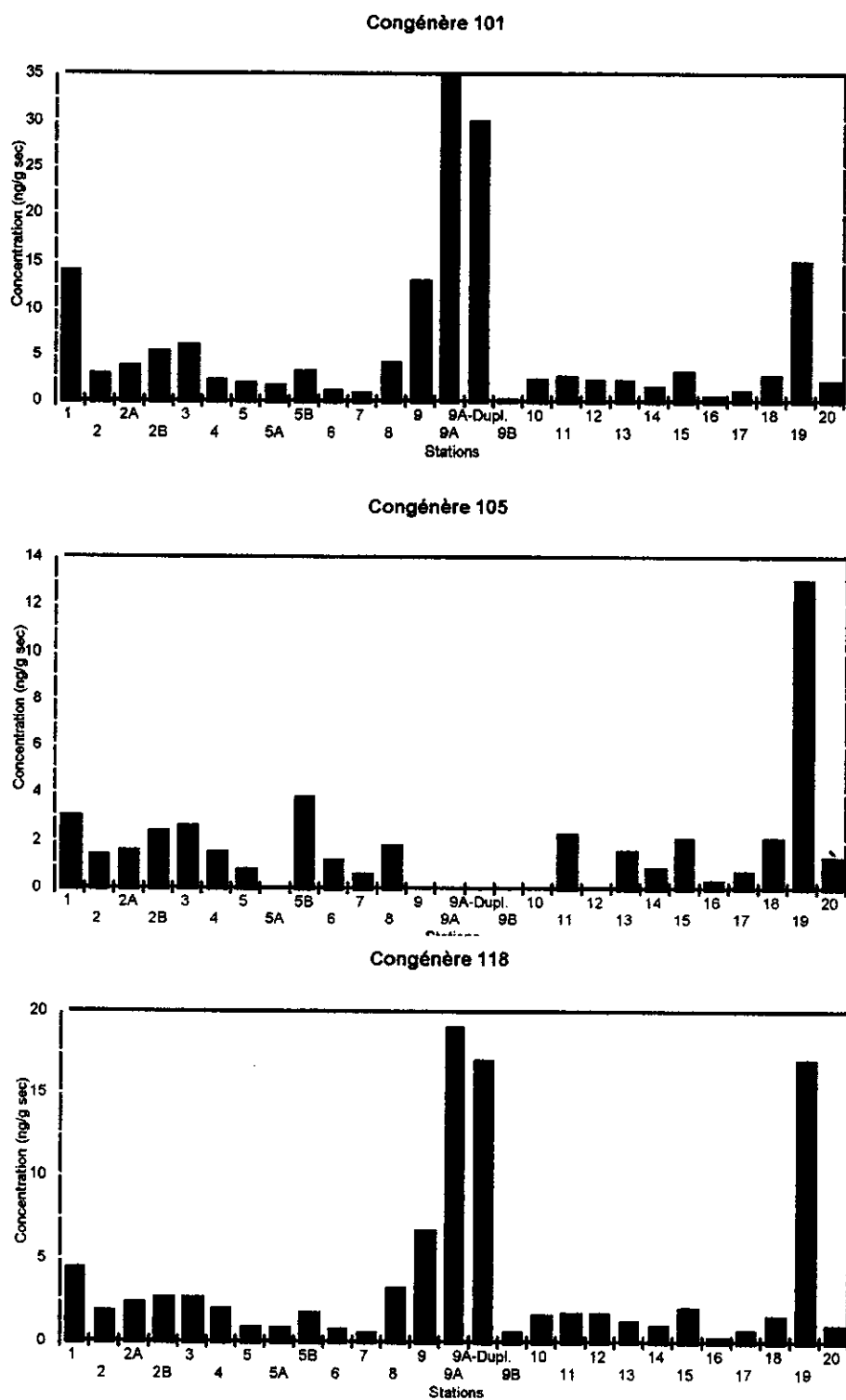


Figure 8 (suite).

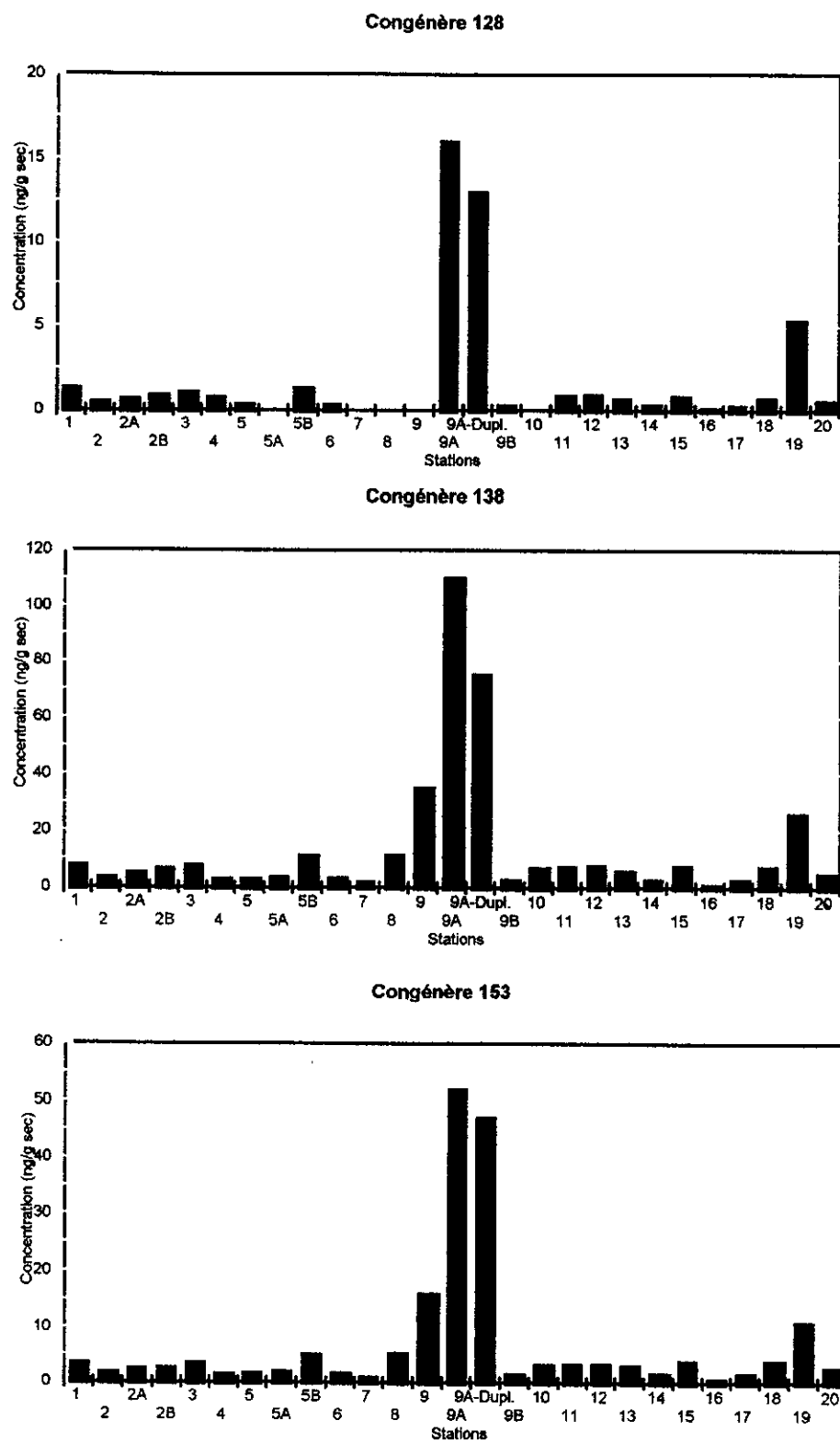


Figure 8 (suite).

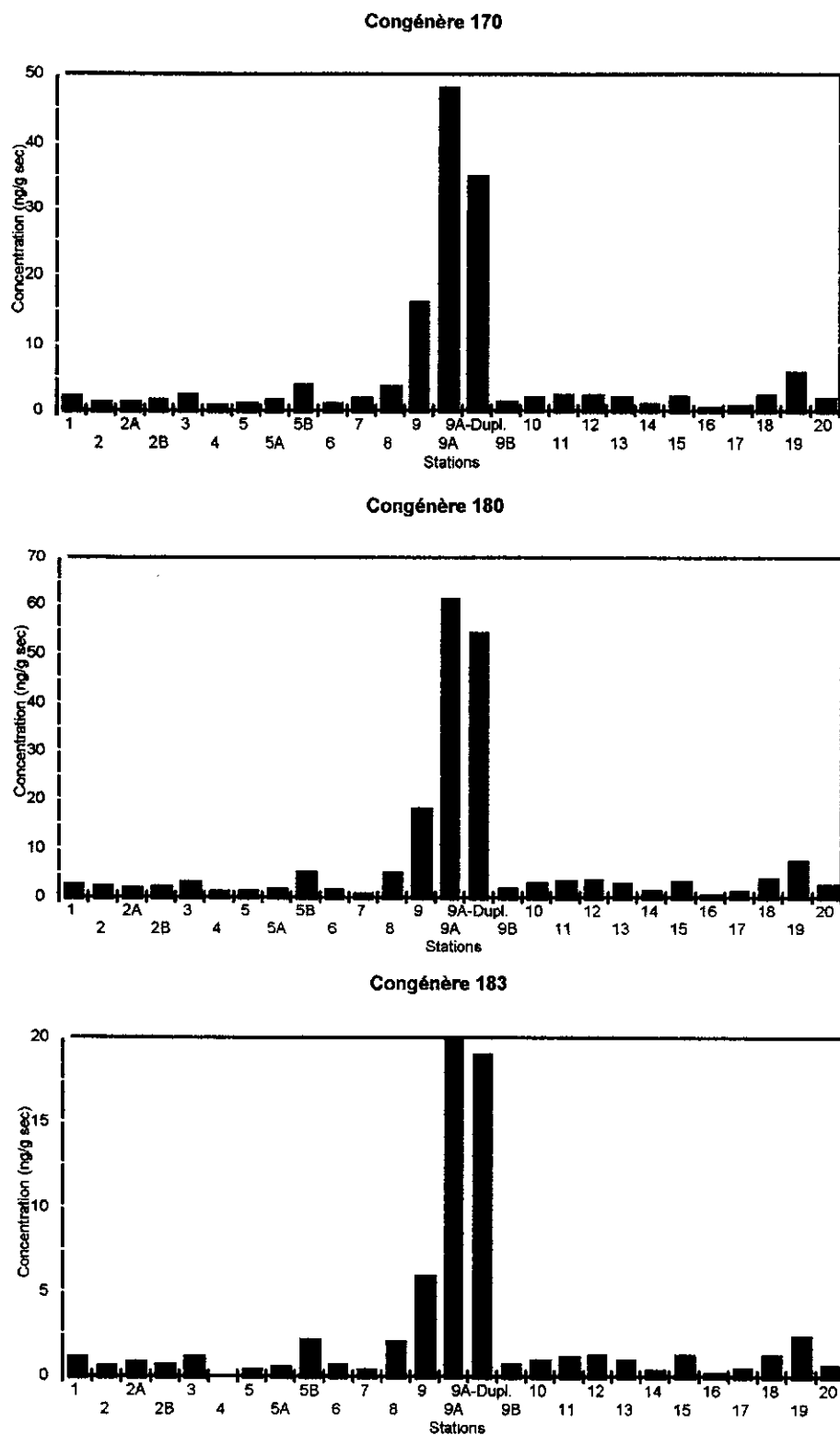


Figure 8 (suite).

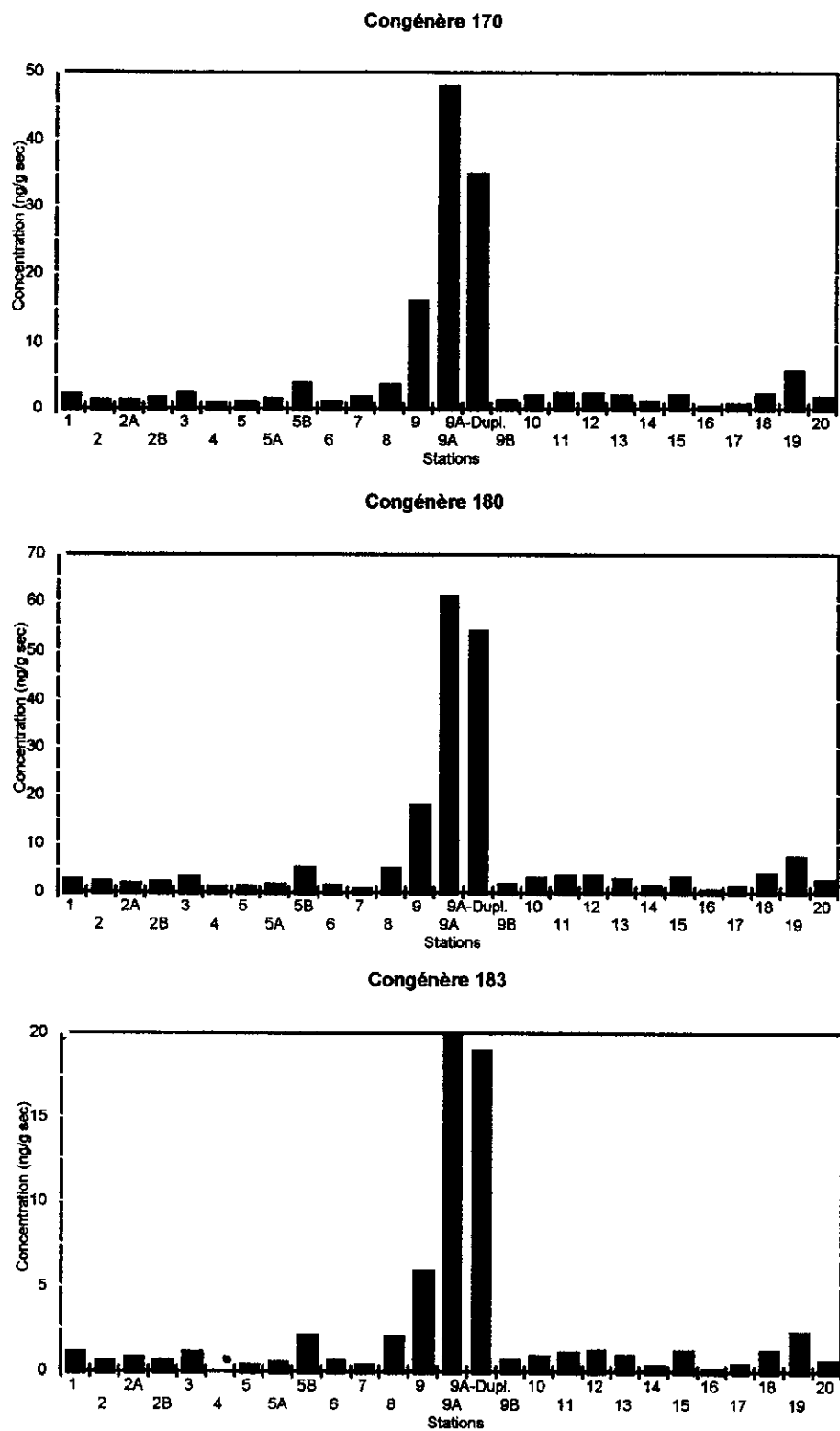
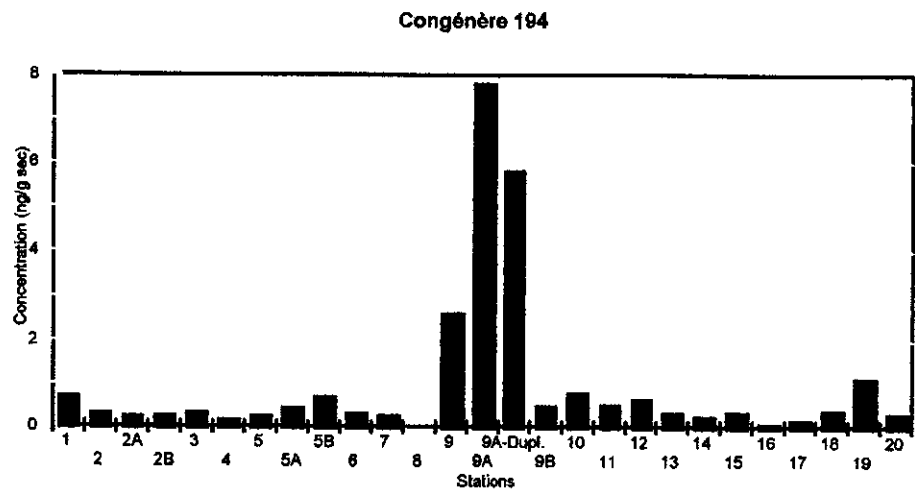


Figure 8 (suite).



b) Arochlors

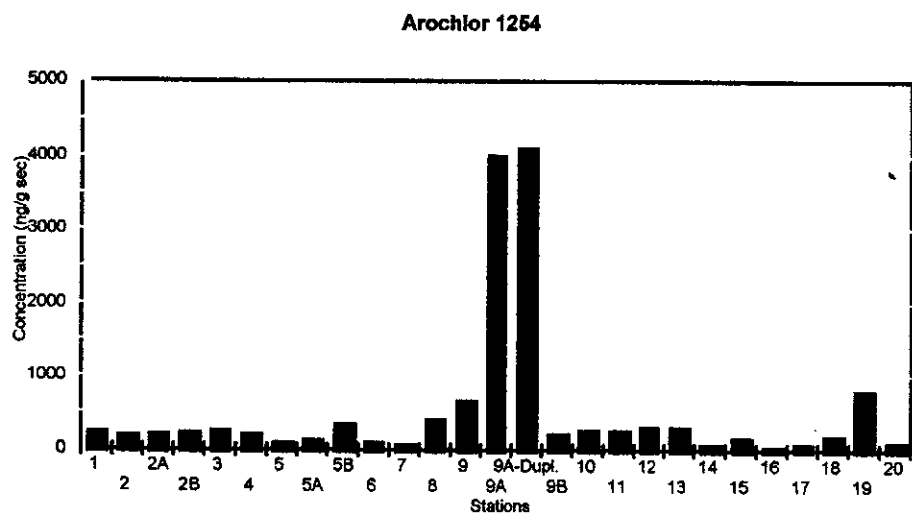


Figure 9. Concentrations de pesticides organochlorés dans les sédiments du site de dragage (données de 1994).

a) HCH

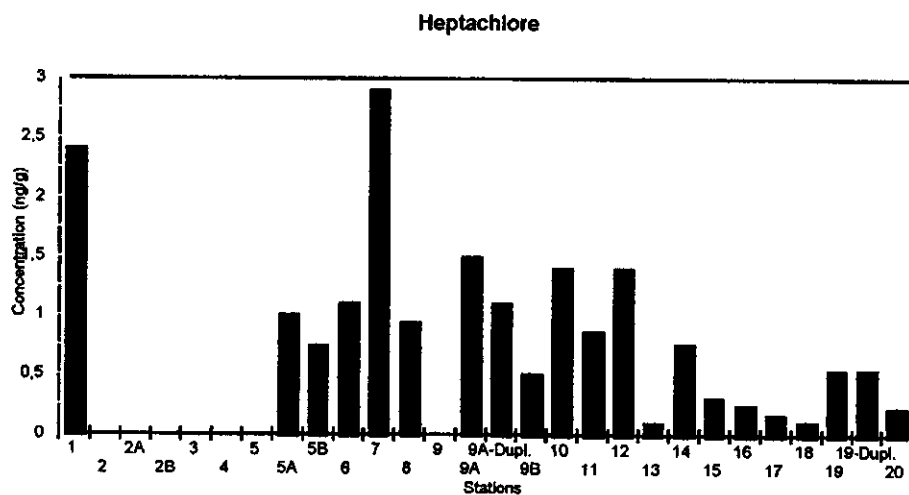
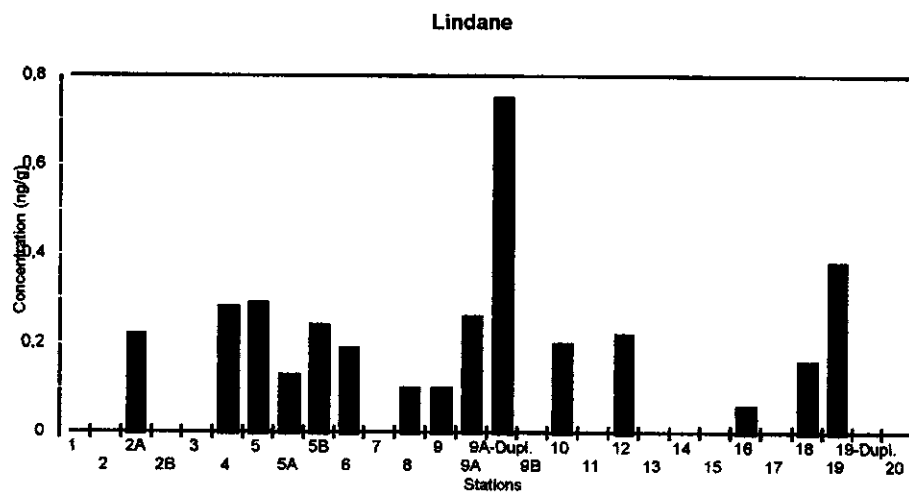
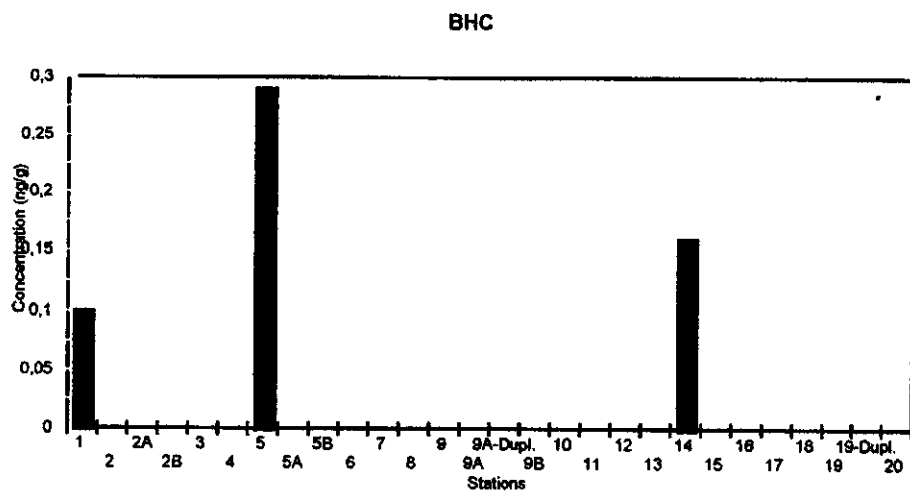


Figure 9 (suite).

b) Composés cyclodiéniques

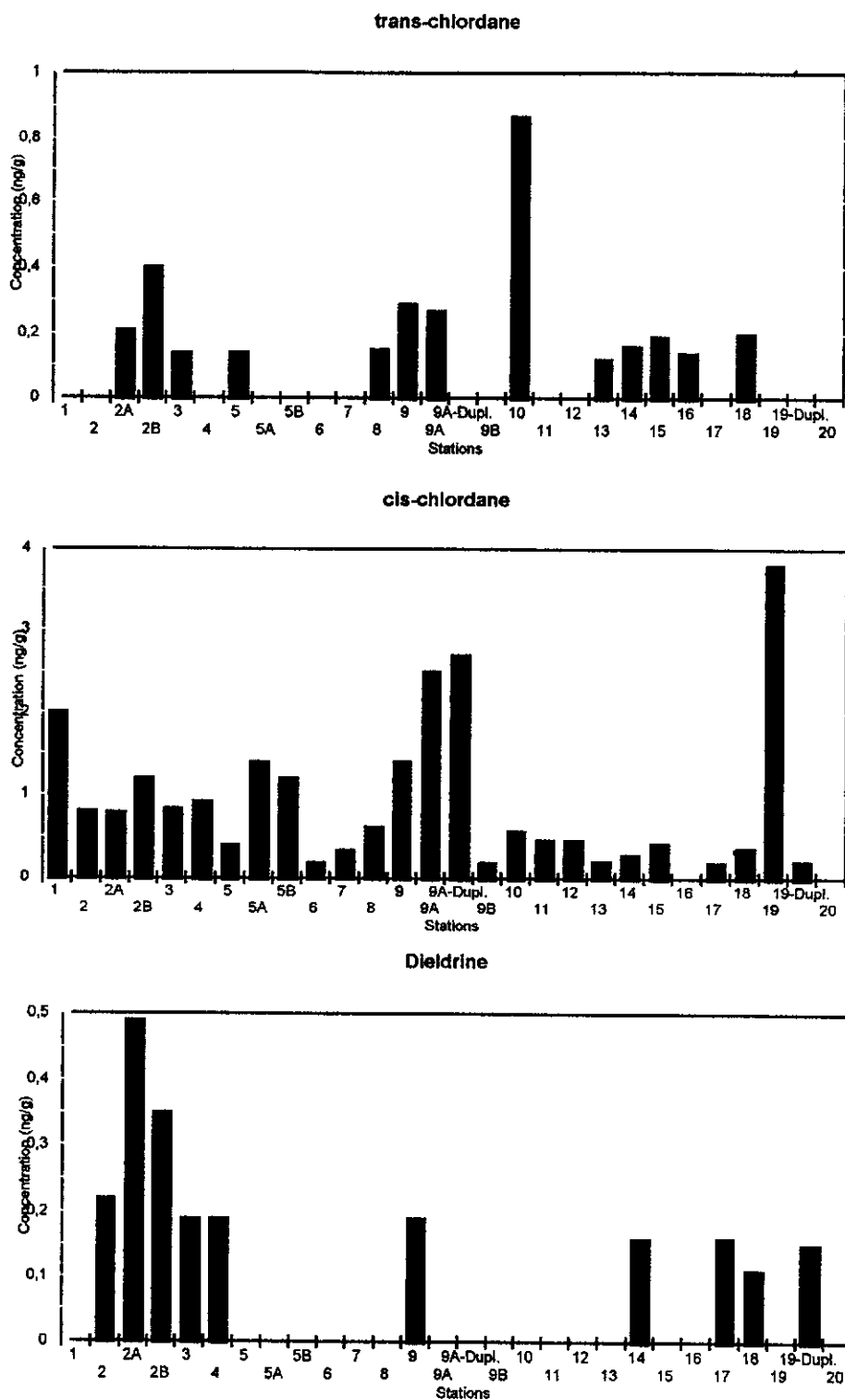


Figure 9 (suite).

c) Dérivés de DDT

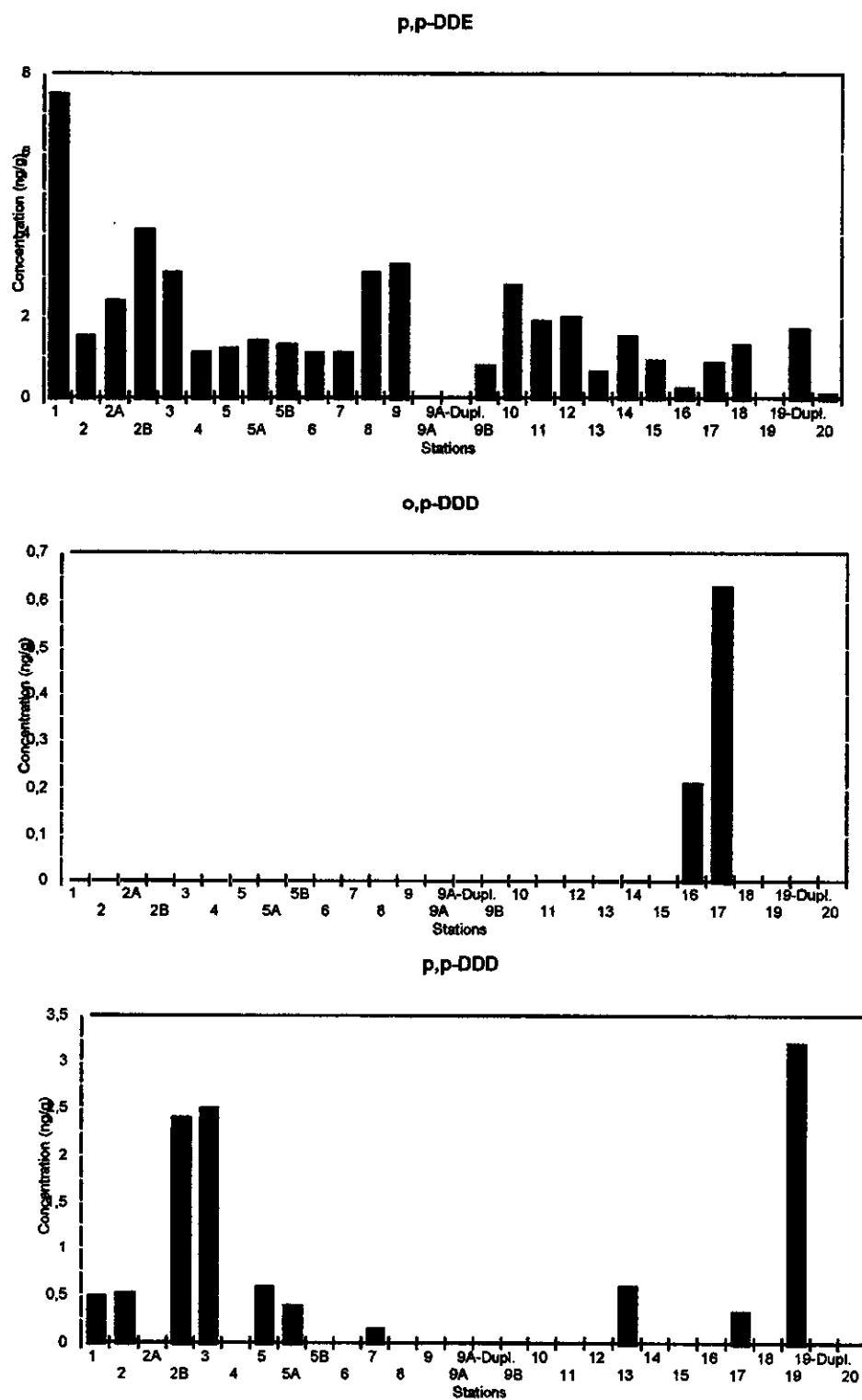
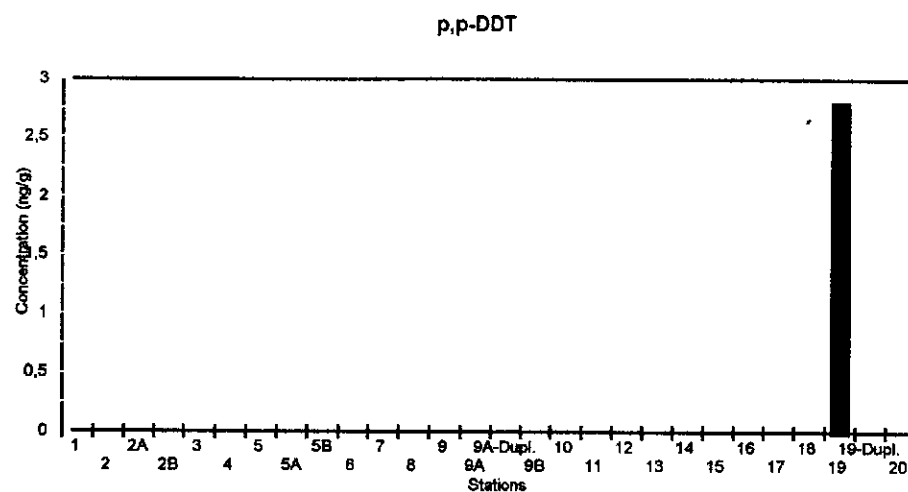


Figure 9 (suite).



d) Autres

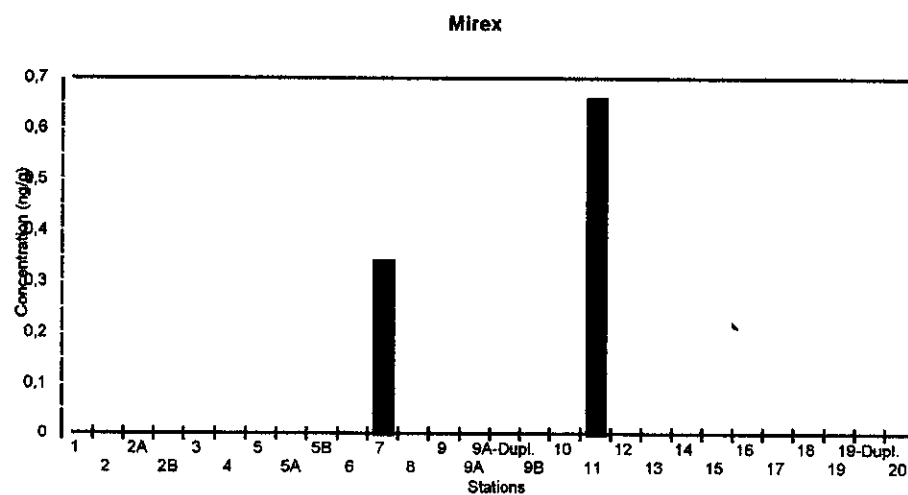


Figure 10. Concentrations de métaux traces dans les sédiments de Cap-aux-Meules (données 1994).

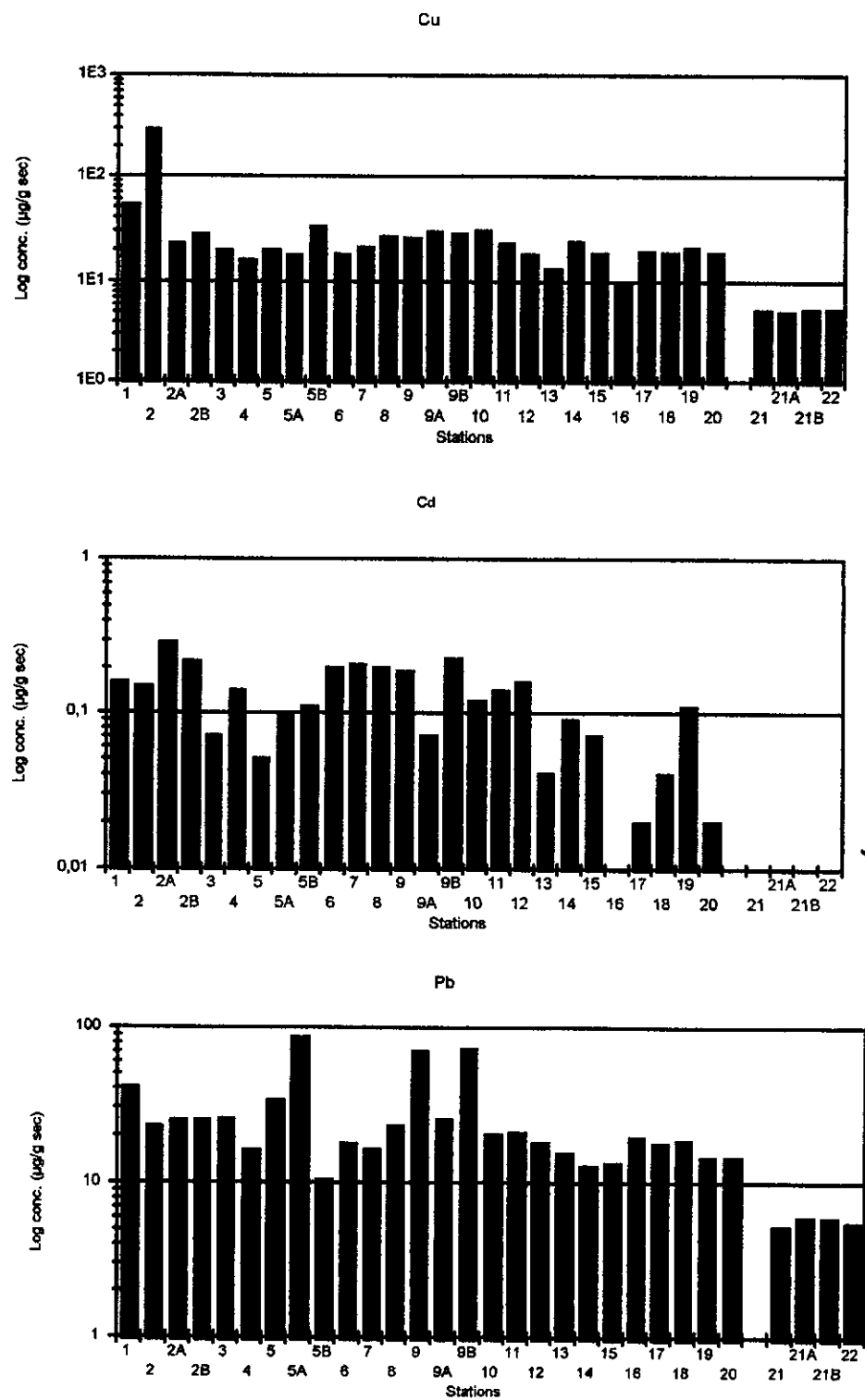


Figure 10 (suite).

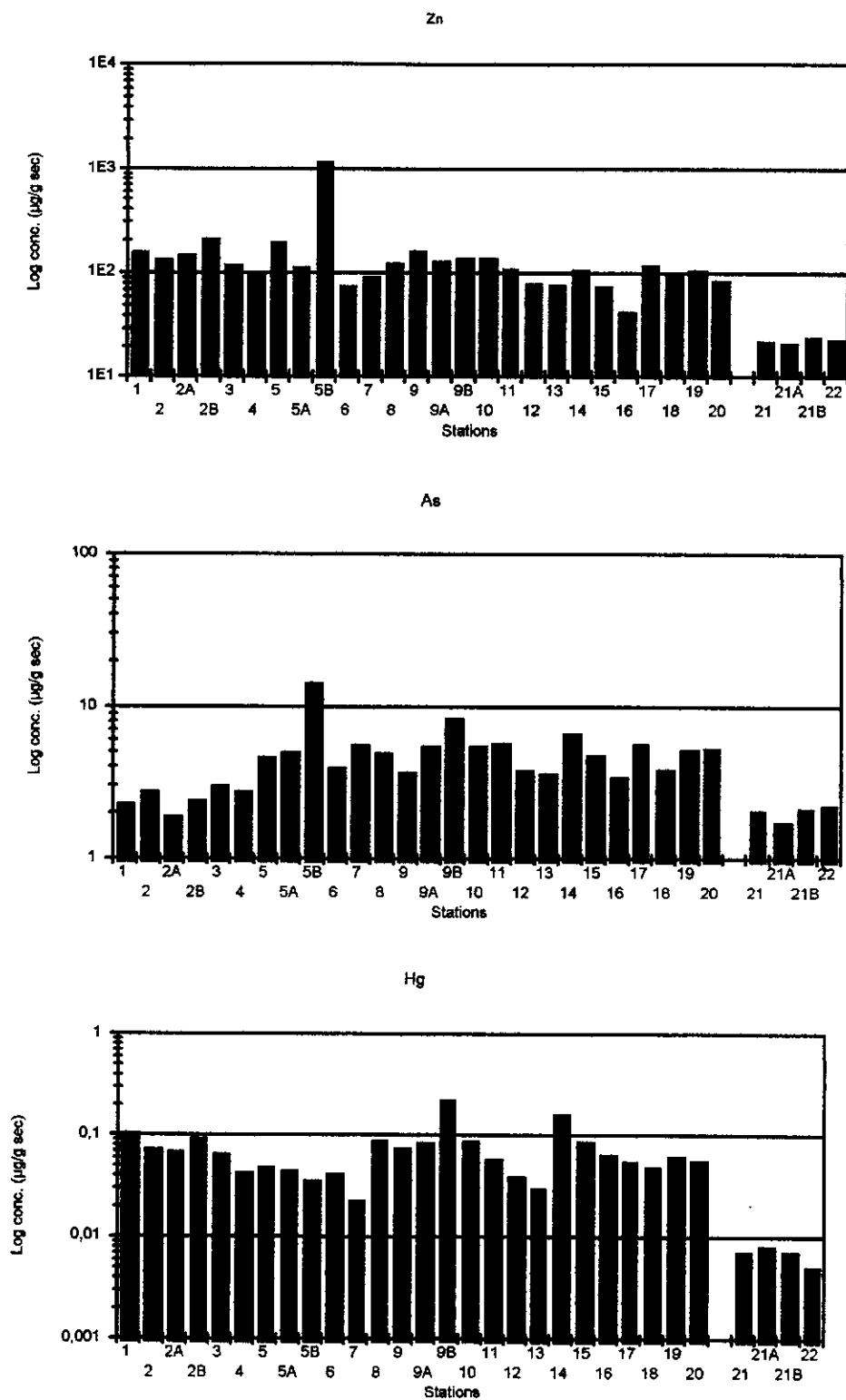


Figure 11. Concentrations moyennes de métaux traces dans les sédiments des aires de dragage de Cap-aux-Meules, telles que mesurées en 1992 et en 1994.

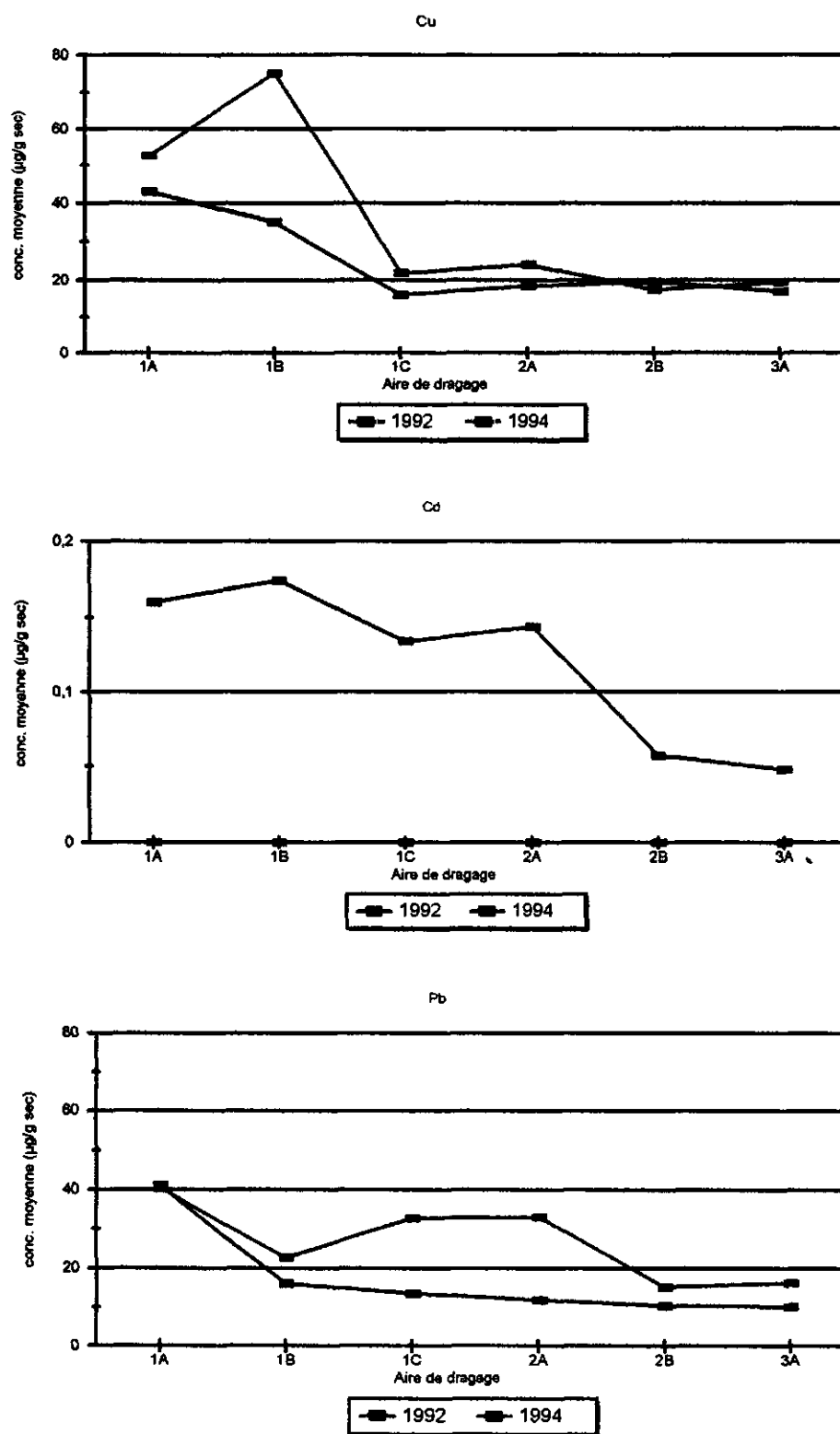
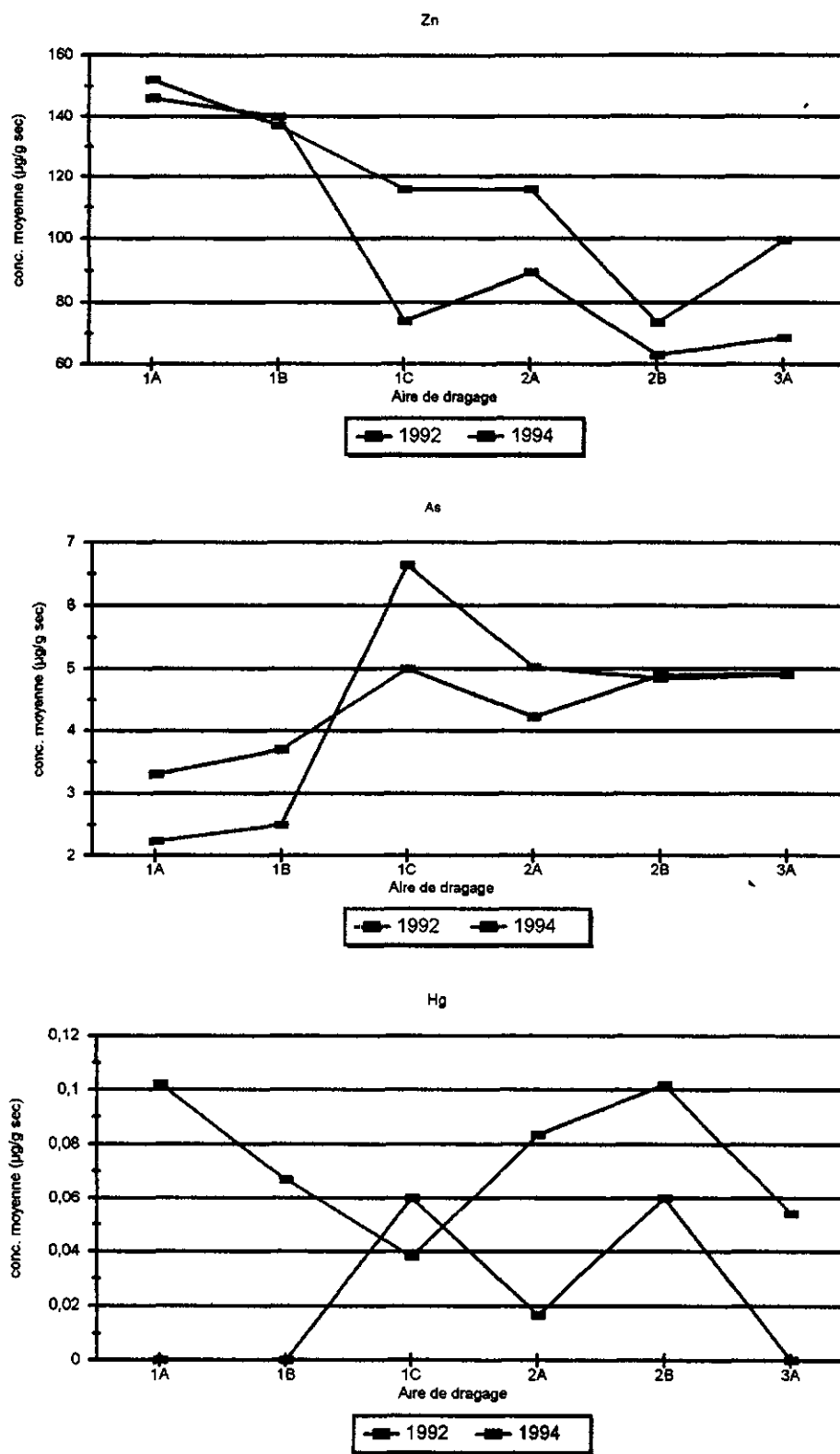


Figure 11 (suite).



2.2.3 BIOESSAIS

Tous les résultats des essais biologiques effectués aux laboratoires du Centre Saint-Laurent (Québec) et de Dartmouth (Nouvelle-Écosse) sont présentés à l'annexe I. Ces bioessais permettent d'évaluer les effets toxiques de quatre phases sédimentaires différentes (sédiment entier, phase solide, eau interstitielle et extrait organique) sur des organismes benthiques.

2.2.3.1 Contrôle de qualité

Produits toxiques de référence

Les résultats obtenus avec les toxiques de référence se résument comme suit. En ce qui concerne les essais Microtox, toutes les valeurs CI_{50-15} min oscillent entre les limites d'avertissement déterminées au laboratoire Saint-Laurent, soit 0.47 et 1.01 mg Zn^{++}/L ; ces dernières sont basées sur plus de 25 essais réalisés sur une période de deux ans. Quant aux essais de toxicité chez les amphipodes, la CL_{50} après 96 h est estimée à 1.05 mg Cd/L pour les échantillons de l'Anse-à-Beaufils et à 1.71 mg Cd/L pour ceux de Cap-aux-Meules; ces valeurs correspondent à la moyenne historique pour ce test, telle qu'établie au laboratoire de Dartmouth (2.29 ± 1.37 mg Cd/L).

En revanche, les CI_{50} évaluées avec le toxique de référence lors de l'essai avec les oursins sont de 127 μg Cu/L (pour les sédiments du site d'immersion) et 107 μg Cu/L (pour les sédiments du site de dragage). Ces valeurs correspondent également à la moyenne historique établie au laboratoire de Dartmouth ($CI_{50} = 103 \pm 62$ μg Cu/L). Les bornes de contrôle pour ces deux derniers essais n'ont pas encore été fixées par l'équipe de ce laboratoire.

Sédiments de contrôle (Martinique Beach)

Ces sédiments n'ont été analysés qu'avec les amphipodes et oursins. Ces essais sont valides puisqu'ils ont permis d'obtenir des courbes dose-réponses logiques et les taux de survie et de fécondation dépassent 80% et 50%, respectivement.

2.2.3.2 Critères d'évaluation de la toxicité

Les critères utilisés pour évaluer la toxicité des sédiments lors des tests Microtox sur eau interstitielle et phase solide proviennent du Laboratoire du Centre Saint-Laurent. Ces critères, apparaissant au tableau 3, sont basés sur les résultats de tests réalisés sur près de 100 échantillons de sédiments dans ce laboratoire. Pour ce qui est

des tests effectués sur les extraits organiques, les critères de toxicité sont basés sur les résultats obtenus au cours de la présente étude; puisqu'aucun des blancs de méthode (extraction et évaporation) utilisés ne s'est révélé toxique à la plus forte concentration testée (1% DMSO), on peut affirmer que la toxicité observée dans les échantillons de sédiments est causée par des propriétés physico-chimiques inhérentes aux sédiments en question. Dans le cas des essais (1) de survie chez les amphipodes et (2) de fécondation chez les oursins de mer, les critères sont les suivants: les sédiments sont toxiques si (1) le paramètre d'effet (taux de survie) est au moins 20% inférieur et statistiquement différent des sédiments de contrôle et (2) le paramètre d'effet (taux de fertilisation) est au moins 25% inférieur et statistiquement différent des sédiments de contrôle (K.-L. Doe, comm. pers.).

2.2.3.3 Évaluation de la présence ou absence d'association entre les essais de toxicité

Une évaluation qualitative de la concordance (c) entre les essais effectués sur les échantillons des deux sites à l'étude est présentée aux tableaux 4, 5 et 6. Les codes de toxicité des échantillons obtenus pour chaque organisme testé (*V. fischeri*, *A. virginiana* et *L. pictus*), apparaissent à l'annexe E. Les échantillons non-toxiques sont identifiés par le code o, alors que ceux qui sont marginalement toxiques ont le code x. Quant aux sédiments modérément toxiques, ils se distinguent par le code xx, et finalement xxx est attribué aux échantillons de toxicité élevée. Les résultats des analyses statistiques de corrélation sont fournis ci-bas. Les résultats des tests statistiques de corrélation sont également présentés pour les cas où une concordance dépassant 50% fut obtenue entre les essais.

Tel qu'indiqué à la section 2.1.7.4, l'analyse de concordance ne considère que l'absence ou la présence de toxicité comme critères, i.e. qu'elle ne tient pas compte du niveau de toxicité pour les échantillons qui ont révélé des effets, que ce soit à un niveau marginal, modéré ou élevé (tableau 3).

Essais Microtox

Association entre les tests du Centre St-Laurent

Le tableau 4 indique les pourcentages de concordance obtenus entre les résultats Microtox des trois fractions sédimentaires analysées au laboratoire du Centre Saint-Laurent. Une comparaison des données obtenues avec les sédiments du site d'immersion révèle l'absence total d'accord entre les fractions (c = 0 %). En d'autres termes, aucun échantillon ne s'est révélé toxique, ou non-toxique, dans l'ensemble des trois fractions. En fait, l'inhibition de bioluminescence n'est observée qu'avec les extraits organiques et la phase solide, et ce pour tous

les échantillons ($c = 100\%$). Il n'y a toutefois pas de corrélation entre les deux fractions pour ce site ($p > 0.05$). Ce paramètre bioanalytique ne permet pas de faire une distinction significative entre les échantillons du site d'immersion et ceux de référence, tel qu'indiqué par les résultats du test t ($p > 0.05$).

Tableau 4. Comparaison des résultats obtenus, au laboratoire québécois, pour les trois essais Microtox (eau interstitielle, extrait organique et phase solide) sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules.

Site et type de sédiment	Concordance (c) (%) (n)			
	EO - EI	EO - PS	EI - PS	EO - EI - PS
Anse-à-Beaufils				
sédiments d'immersion	0 (8)	100 (8)	0 (8)	0 (8)
sédiments de référence	50 (4)	50 (4)	0 (4)	0 (4)
Cap-aux-Meules				
sédiments portuaires	58 (24)	100 (24)	54 (26)	58 (24)
sédiments de référence	50 (2)	100 (2)	50 (2)	50 (2)

Quant aux stations du site de dragage, près de 60% des échantillons démontrent des effets toxiques dans toutes les fractions analysées. Ce pourcentage est notable compte tenu des voies d'exposition différentes associées aux différentes phases sédimentaires. Il n'y a toutefois pas de corrélation entre les fractions ($r_{(EI-EO)} = 0.13$, $r_{(EI-PS)} = 0.15$, $r_{(EO-PS)} = 0.38$; $p > 0.05$); en d'autres termes, lorsque les stations sont classées selon leur niveau de toxicité, elles n'obtiennent pas le même rang dans les trois fractions. Quant aux autres échantillons, la majorité (90%) révèle une toxicité modérée de la phase solide et élevée pour les extraits organiques (annexe E). Selon les résultats statistiques obtenus avec le test t , seuls les essais réalisés sur phases solide et organique des sédiments permettent d'établir une distinction significative entre les échantillons portuaires et ceux de référence ($p < 0.05$). Ceci signifie que les sédiments portuaires de Cap-aux-Meules sont significativement plus toxiques que ceux de référence pour *V. fischeri*.

La faible toxicité de l'eau interstitielle pour la majorité des échantillons est probablement due à la présence de particules qui agissent comme capteurs de contaminants organiques et inorganiques, plus particulièrement de particules fines ($< 63 \mu m$) qui ont une capacité de complexation supérieure aux particules plus larges (Marquenie, 1985). De plus, l'adsorption des composés organiques aux particules fines d'un sédiment est

amplifiée en raison de leurs propriétés hydrophobes et de leur faible solubilité dans l'eau saline (Means, 1985). Par conséquent, l'essai Microtox sur eau interstitielle tend à sous-estimer la toxicité des sédiments marins aux organismes benthiques.

Le pourcentage important de concordance noté entre les fractions solides et organiques des sédiments de Cap-aux-Meules suggèrent, qu'en présence de matrices contaminées, les essais Microtox réalisés sur ces deux phases fournissent plus d'information sur la toxicité que les tests effectués sur l'eau interstitielle. De plus, la fraction organique des sédiments permet d'établir des distinctions entre les stations en ce qui concerne leur potentiel écotoxique (figures 12 et 13). À ce égard, il importe de noter que l'expression de la CI_{50} pour cette fraction, que ce soit en μL d'extrait / mL diluant ou en μg sédiment sec / mL diluant, n'affecte en rien l'interprétation des résultats de toxicité. Par conséquent, l'expression en $\mu\text{L}/\text{mL}$ sera utilisée ultérieurement dans ce document pour fins de simplification. La forte toxicité des extraits organiques, telle que démontrée dans la présente étude, n'est pas inusitée puisqu'elle a été rapportée par d'autres auteurs (Schiewe *et coll.*, 1985).

Quant aux niveaux de toxicité appréciables des sédiments de référence de Cap-aux-Meules, ils sont probablement dus à la présence de composés tels que le COT. Ainsi, un sédiment faible en matière organique démontre généralement une faible capacité d'adsorption ou d'absorption des contaminants hydrophobes et par conséquent, augmente leur biodisponibilité dans la phase aqueuse (Stumm, 1992).

Association entre les laboratoires

Si on compare les résultats obtenus avec l'eau interstitielle et la phase solide des sédiments de l'Anse-Beaufils (tableau 5), ils concordent parfaitement, i.e. que les deux équipes ont noté une absence de toxicité dans le premier cas et une toxicité dans le deuxième pour l'ensemble des échantillons. En ce qui concerne Cap-aux-Meules, les résultats provenant des deux laboratoires concordent à près de 50% pour l'eau interstitielle et 100% pour la phase solide. Par ailleurs, un nombre significatif de stations obtiennent le même rang de toxicité en phase solide, aux deux laboratoires, et ce pour les deux sites (site de dragage: $r = 0.90$, site d'immersion: $r = 0.72$,; $p < 0.05$); ce n'est toutefois pas le cas avec l'eau interstitielle ($p > 0.05$).

Figure 12. Toxicité des extraits organiques des sédiments provenant de Cap-aux-Meules, exprimée en μg sédiment sec/mL eau d'essai.

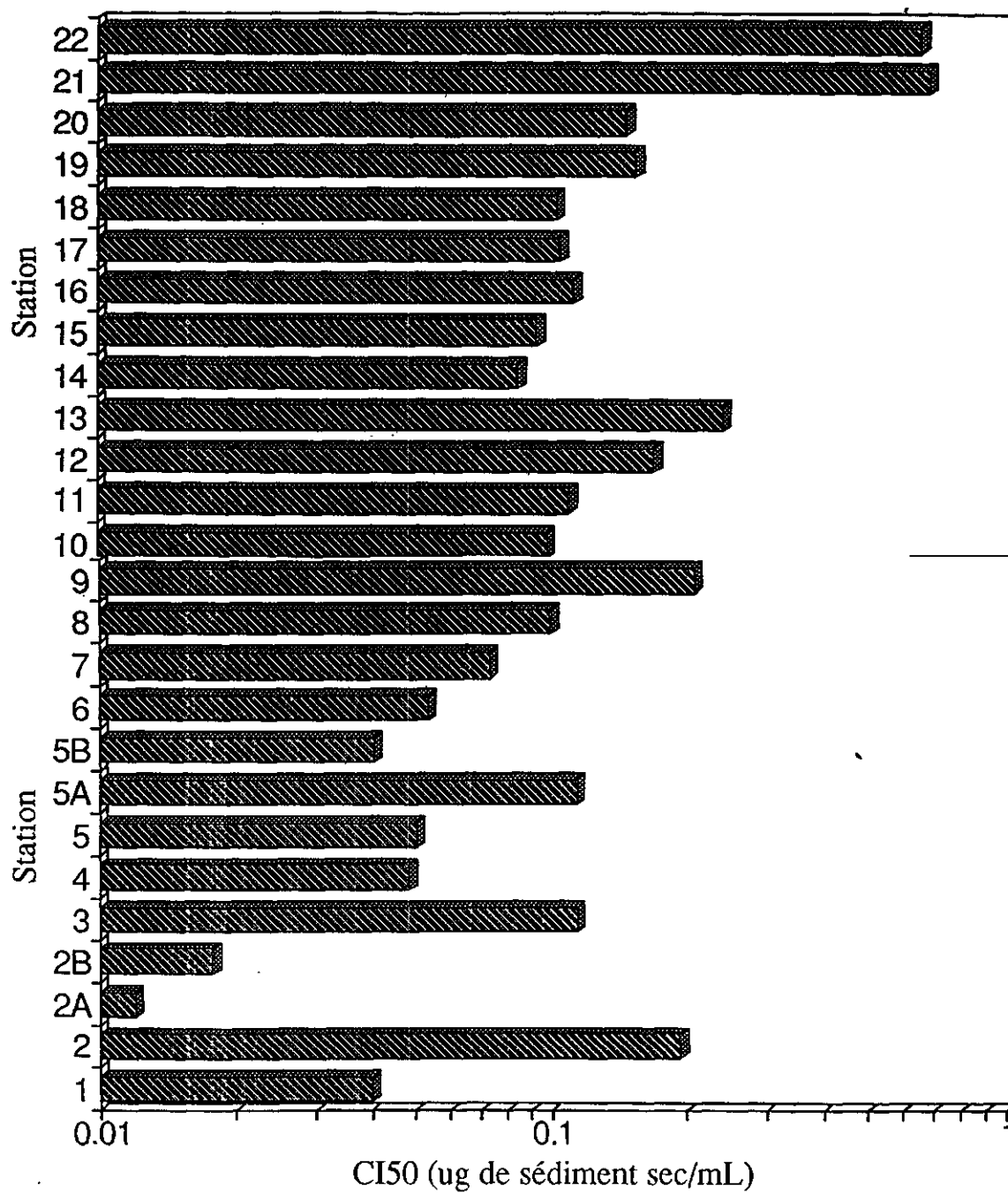


Figure 13. Toxicité des extraits organiques des sédiments provenant de Cap-aux-Meules, exprimée en μL d'extraits/mL eau d'essai.

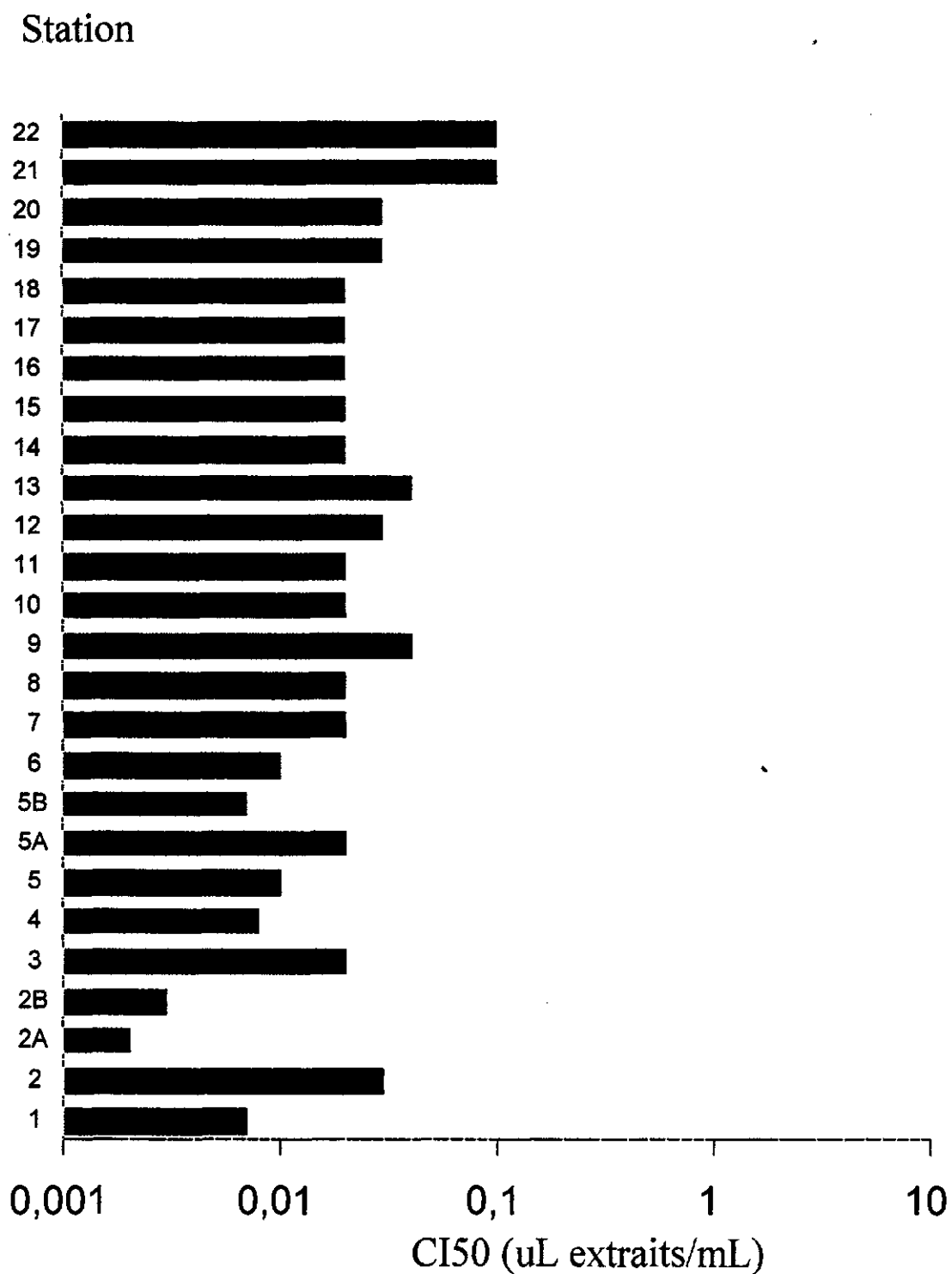


Tableau 5. Concordance (% et n) entre les résultats Microtox (sur eau interstitielle et phase solide) du Québec et ceux de Nouvelle-Écosse.

Fraction de sédiments analysée	Concordance (c) (%) (n)
	Québec -Nouvelle-Écosse
Eau interstitielle	
Anse-à-Beaufils	100 (9)
Cap-aux-Meules	58 (12)
Phase solide	
Anse-à-Beaufils	100 (9)
Cap-aux-Meules	92 (12)

Test de toxicité aiguë chez *A. virginiana*

A l'exception de l'échantillon 10 du site de dragage, aucun des sédiments de dragage, d'immersion et de référence ne s'est révélé toxique pour ces organismes ($p > 0.05$; figure 14 a,b). Par conséquent, cet essai ne semble pas adéquat pour distinguer les niveaux de contamination des sédiments à l'étude.

Test de fécondation chez *L. pictus*

Les résultats obtenus avec les oursins blancs sont présentés à la figure 15. A l'exception d'un échantillon de référence (21) de Cap-aux-Meules, tous les sédiments analysés ont causé une inhibition significative ($p < 0.05$) de fertilité chez les oursins à la plus forte concentration d'eau interstitielle (100%); la forte sensibilité de ces organismes à cette concentration ne nous permet donc pas de distinguer les secteurs présumés contaminés de ceux qui ne le sont pas. Cependant, lorsqu'on utilise une concentration d'eau interstitielle plus faible (p.ex. 10%), il est possible d'identifier les échantillons toxiques. Les sédiments 4, 7 et 10 du site de dragage sont significativement plus toxiques que ceux de contrôle (Martinique Beach). Toutefois, comme pour l'essai sur amphipodes, les résultats du test *t* indiquent que ce test ne permet pas de distinguer les sites selon leur niveau de toxicité ($p > 0.05$).

Association entre tous les paramètres de toxicité

Les résultats présentés dans les sections précédentes nous permettent de supposer que des bioessais différents réalisés sur les mêmes échantillons de sédiments peuvent *a fortiori* donner des résultats dissimilaires. Le tableau 6 présente les niveaux de concordance entre les réponses écotoxiques observées chez *V. fischeri*, *L. pictus* et *A. virginiana*. Un faible niveau de concordance ($c = 33\%$) est noté entre les résultats de tous les essais

réalisés au laboratoire de Dartmouth (Microtox sur l'eau interstitielle et la phase solide, survie des amphipodes et fécondation des oursins), et ce pour les deux sites à l'étude. La même situation est observée lorsque les résultats des tests réalisés au Québec sont comparés avec ceux obtenus chez les amphipodes et oursins au laboratoire de la Nouvelle-Écosse. Enfin, lorsque l'ensemble des essais réalisés sont considérés, le pourcentage de concordance est presque nul (site de dragage) ou nul (site d'immersion). Un seul échantillon provenant de Cap-aux-Meules a révélé des effets toxiques dans tous les essais auquel il a été soumis; il s'agit de la station 10 (annexe E).

Tableau 6. Concordance (c) entre les résultats de Québec et de Nouvelle-Écosse.

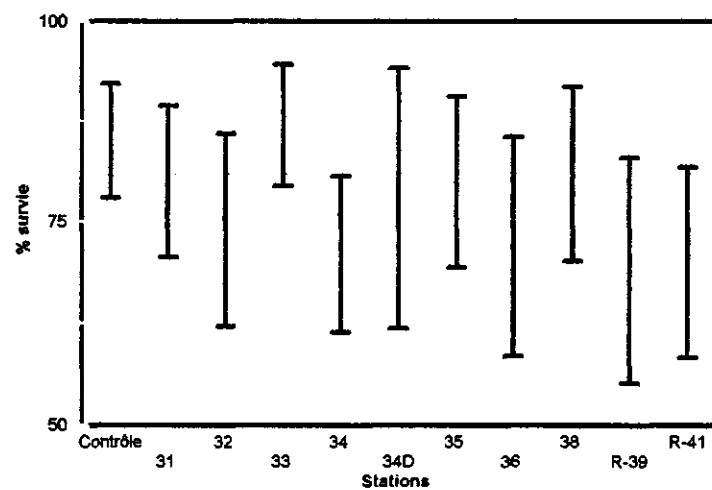
Site	Concordance (%) (n)		
	Tests réalisés en N.É.	Tests Microtox réalisés au Québec - Amphipode - Oursin (N.-É.)	Tests réalisés en N.É. - Tests réalisés au Québec
Anse-à-Beaufils	33 (9)	33 (9)	0 (9)
Cap-aux-Meules	16 (12)	0 (12)	8 (12)

2.2.3.4 Classification des stations de dragage selon leur niveau de toxicité et de contamination

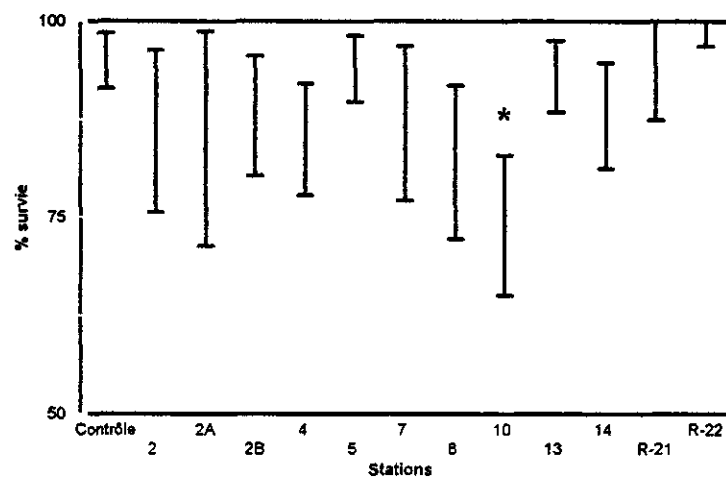
Une analyse à fonction canonique discriminante a été effectuée en utilisant, en premier lieu, trois variables biologiques de prédiction en ce qui concerne l'appartenance à quatre groupes. Tel qu'indiqué en section 2.1.7.6, ces fonctions ne correspondent pas aux variables biologiques utilisées (essais de toxicité). Elles représentent plutôt différentes combinaisons de paramètres biologiques de façon à permettre la plus forte discrimination possible entre les stations. Les variables traitées dans l'analyse sont l'inhibition de bioluminescence (CI_{50}) chez *V. fischeri* lorsqu'exposée (a) à l'eau interstitielle, (b) à l'extrait organique et (c) à la phase solide des sédiments. Les stations ont été groupées en quatre aires principales correspondant à celles présentées au tableau 2, soit: [1] aire visée par le projet de confinement en quai; [2] aire de dragage éventuel; [3] aire non-visée par les activités de dragage; et [4] aire de référence. Un total de 26 observations a été utilisé pour l'analyse. Les essais sur oursins et amphipodes n'ont pas été considérés puisqu'il y avait plusieurs données manquantes pour ces tests.

Figure 14. Résultats¹ des essais de toxicité aiguë chez les amphipodes.

a. Anse-à-Beaufils



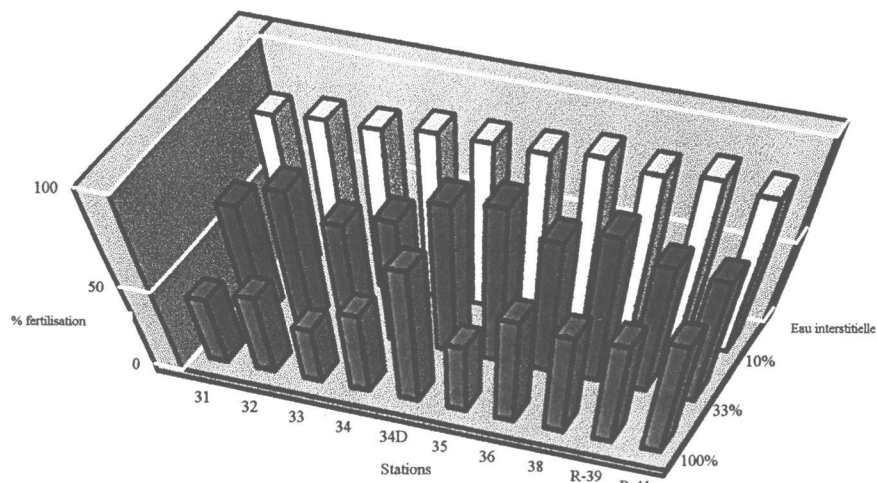
b. Cap-aux-Meules



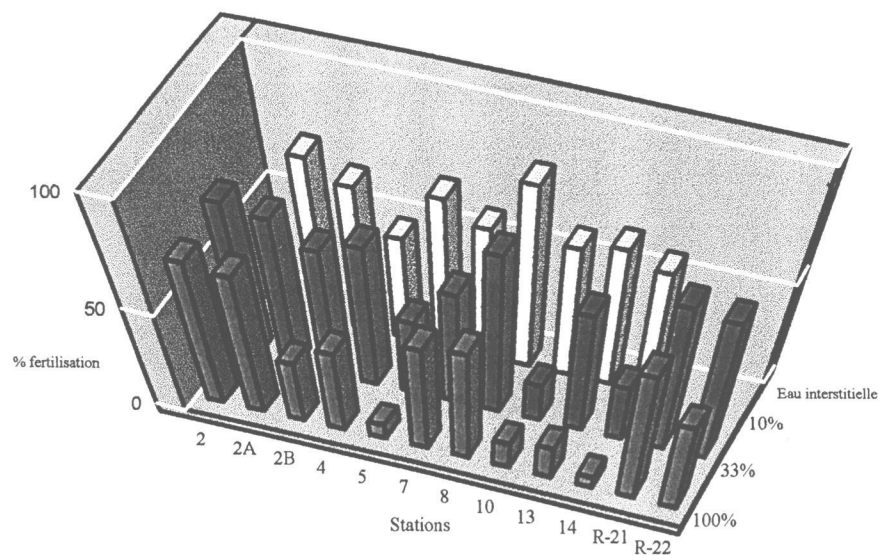
¹ les bandes indiquent les bornes suivantes: moyenne $\pm$ écart-type.

Figure 15. Résultats¹ des essais sur la fécondation des oursins.

a. Anse-à-Beaufils



b. Cap-aux-Meules



¹ Les bandes représentent les pourcentages de fertilisation obtenus avec les différentes concentrations d'eau interstitielle testées.

Les trois fonctions résultant de l'analyse statistique semblent expliquer les différences existant entre les groupes de stations en ce qui concerne leur toxicité pour *V. fischeri* ($p < 0.001$; Wilk's lambda = 0.244). La fonction principale (CAN 1), qui contribue à 98% de la variation entre les aires, sépare nettement le site de référence des stations d'essai, tel qu'indiqué à la figure 16. Ceci est particulièrement vrai pour l'aire de confinement [1] où la distance relative mesurée (d^2) entre cette dernière et l'aire de référence [4] est la plus élevée, soit 29.7. En fait, cette distance semble diminuer graduellement à mesure que l'on s'éloigne de l'aire de confinement ($d^2_{2,4} = 19.0$; $d^2_{3,4} = 16.3$). Les essais sur extrait organique et la phase solide semblent principalement responsables de la discrimination notée entre ces groupes de stations. Ainsi, la première fonction est fortement corrélée aux résultats obtenus avec ces deux phases sédimentaires ($r = 0.82$, $r = 0.56$, respectivement). Les résultats de toxicité pour ces deux fractions, plus particulièrement pour l'extrait organique, semblent indiquer que la toxicité diminue légèrement à mesure que l'on s'éloigne du havre (figure 17). La distance entre les aires 2 et 3 est très petite ($d^2 = 0.2$), tel que démontré à la figure 16, ce qui signifie que les variables utilisées distinguent difficilement ces aires.

Figure 16. Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions discriminantes à partir des résultats Microtox. Les symboles représentent les aires identifiées ci-haut. Chaque observation représente une station.

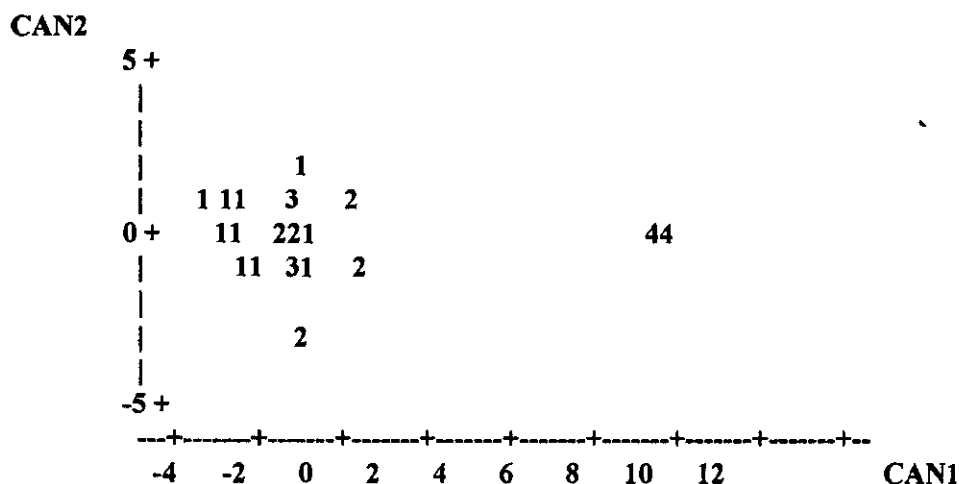
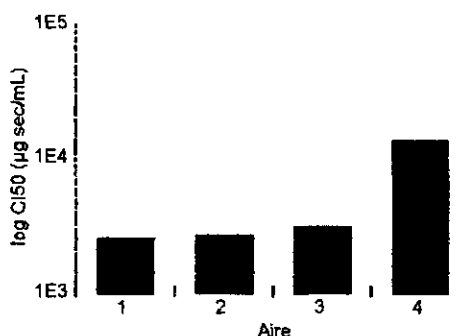
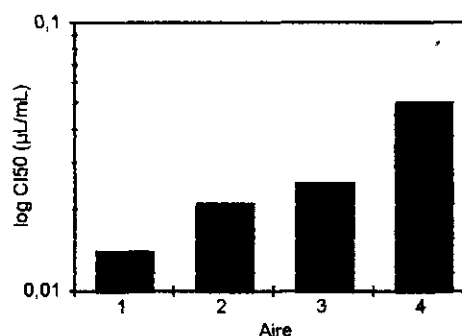


Figure 17. Résultats des essais de cytotoxicité chez *V. fischeri* pour les quatre groupes de stations de Cap-aux-Meules. Chaque barre représente la CI_{50} logarithmique moyenne de chaque aire.

a) phase solide



b) extrait organique



Les fonctions discriminantes déterminées par l'analyse nous permettent également de reclassifier certaines stations selon l'aire où elles devraient appartenir en tenant compte de leur toxicité chez *V. fischeri*. Par exemple, les stations 2, 2A, 3 et 5A, localisées dans l'aire 1 correspondent plutôt à des stations que l'on retrouverait dans l'aire 2. Quant aux échantillons provenant de l'aire 2, un seul présente un niveau de toxicité correspondant plutôt à ce que l'on retrouve dans les sédiments de l'aire 3; il s'agit de la station 15. En somme, 64% des stations localisées dans l'aire 1 sont reclassifiées comme tel sur la base des fonctions discriminantes; pour les aires 2, 3 et 4, ces pourcentages sont de 27, 100 et 100%, respectivement.

L'analyse à fonction canonique discriminante a également été utilisée pour tenter de discerner les stations selon leur niveau de contamination. Des tests statistiques distincts ont été réalisés pour les données de chimie organique et de métaux lourds. Sept variables de chimie organique et six de chimie inorganique ont fait l'objet de l'analyse, soit: BPC totaux, HAP1, HAP2, HCB, HCH, cyclodiènes organochlorés, dérivés de DDT, cuivre, cadmium, plomb, zinc, arsenic et mercure total. L'analyse a été effectuée en considérant la nouvelle reclassification géographique des stations, tel que décrit antérieurement. Les résultats de chimie ont également été transformés en logarithmes afin de respecter l'hypothèse d'une distribution normale.

L'analyse a permis d'identifier quatre variables de chimie organique permettant de discriminer certaines aires sédimentaires; il s'agit des BPC totaux, des HAP1, des HAP2, et des dérivés de DDT ($p < 0.005$; Wilk's lambda = 0.095). Les distances mesurées entre les différentes aires suggèrent que la distinction la plus importante est établie entre les sédiments portuaires (aires 1, 2 et 3) et ceux de référence (aire 4) (figure 18). Ceci est en accord avec les résultats de l'analyse effectuée pour les bioessais. Cependant, une comparaison des figures 17

et 18 indique qu'il est plus difficile de distinguer les sédiments contaminés les uns des autres sur la base de la contamination organique que des bioessais.

Cinq des six métaux lourds visés (soit tous sauf l'arsenic), lorsque combinés, ont été identifiés comme principalement responsables des distinctions observées entre les aires sédimentaires. Tel que noté lors de l'analyse de discrimination à partir des composés organiques et des bioessais, la distinction la plus importante est établie entre les sédiments portuaires et ceux de référence (figure 19). Il est toutefois impossible de distinguer entre les sédiments portuaires les uns des autres sur la base des teneurs en métaux lourds.

Figure 18. Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions discriminantes à partir des résultats de chimie organique. Les symboles représentent les aires pré-identifiées.

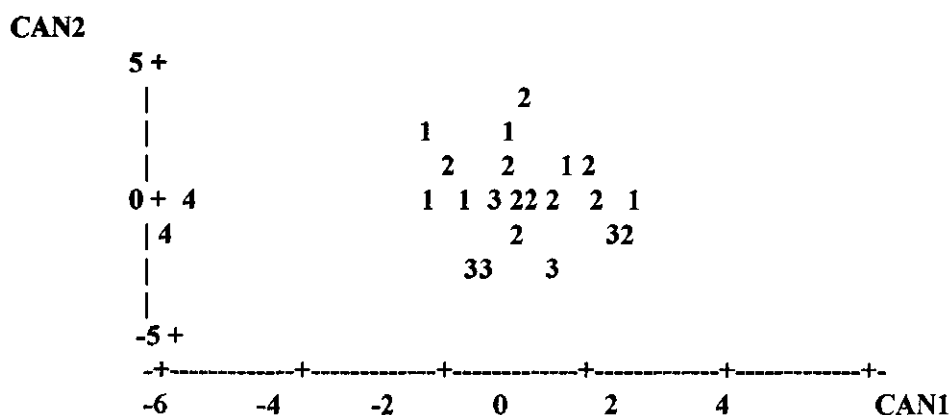
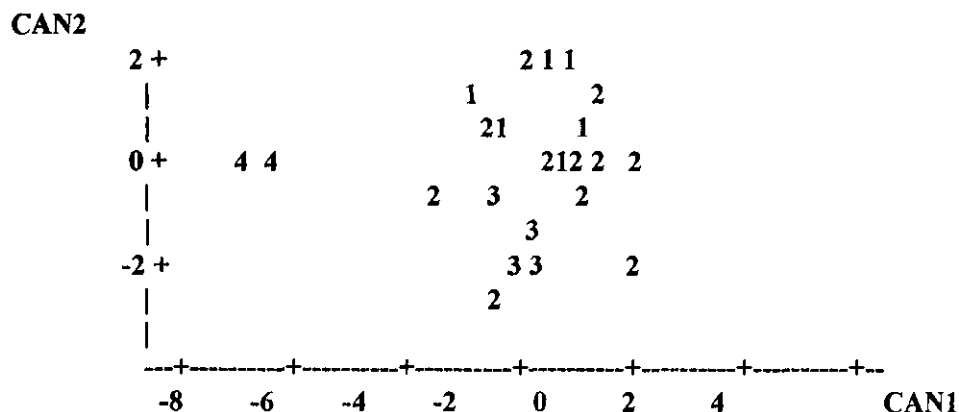


Figure 19. Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions discriminantes à partir des résultats de chimie inorganique. Les symboles représentent les aires pré-identifiées.



2.2.3.5 Association entre les paramètres chimiques et la toxicité des sédiments

Une analyse de corrélation canonique a été effectuée entre les données biologiques (essais Microtox, oursins et amphipodes) et les paramètres chimiques (contaminants organiques, métaux lourds et composantes organiques et inorganiques). Les paramètres inclus dans l'analyse sont les suivants: BPC, HAP, HCB, HCH, cyclodiènes chlorés, dérivés de DDT, Cd, Cu, Pb, Zn, As, Hg, carbone organique total, solides volatiles, azote ammoniacal, azote Kjeldahl total, phosphore total et sulfures totaux.

Afin d'accroître la linéarité de la relation entre les variables et la normalité de leur distribution, des transformations logarithmiques ont été appliquées à chacune d'elles. Les résultats statistiques semblent démontrer l'existence d'une corrélation négative entre les concentrations de HAP de poids moléculaire élevé et la cytotoxicité (a) de la phase solide ($r = -0.51$) et (b) de l'extrait organique ($r = -0.47$) chez *V. fischeri*. Une association similaire a également été rapportée par certains auteurs (Schiewe *et coll.*, 1985; Giesy *et coll.*, 1988; Tay *et coll.*, 1992). Les valeurs négatives des coefficients de corrélation (r) signifient que des concentrations inhibitrices relativement faibles (forte toxicité) sont corrélées avec des teneurs élevées en HAP. Ceci semble supporter l'hypothèse d'une relation de causalité.

Les BPC, quant à eux, semblent nullement ou peu associés aux résultats de toxicité obtenus avec ces fractions sédimentaires ($r = 0.13$ extrait; $r = -0.26$ solide). De façon similaire, aucune corrélation n'est observée entre les teneurs en pesticides organochlorés et la cytotoxicité des sédiments chez la bactérie luminescente.

En ce qui concerne les métaux lourds, l'analyse de corrélations a été effectuée en utilisant les deux types de données cumulées, soit les concentrations mesurées et celles corrigées en fonction de la granulométrie des sédiments. Ces deux approches fournissent des résultats très similaires dans la majorité des cas. Ainsi, les concentrations non-corrigées et corrigées pour le mercure semblent fortement corrélées avec la cytotoxicité de la phase solide ($r = -0.80$ et $r = -0.75$, respectivement) et légèrement avec l'eau interstitielle ($r = -0.56$ et $r = -0.49$, respectivement). Une association notable est également observée entre le zinc et le paramètre d'effet pour les extraits organiques ($r_{c, n-corr.} = -0.67$; $r_{c, corr.} = -0.64$), le zinc et la phase solide ($r_{c, n-corr.} = -0.66$; $r_{c, corr.} = -0.69$) et finalement le plomb et la phase solide ($r_{c, n-corr.} = -0.60$; $r_{c, corr.} = -0.63$). Par conséquent, contrairement à ce que certains auteurs ont rapporté (Tay *et coll.*, 1992; Giesy *et coll.*, 1988; Thompson *et coll.*, 1980), *V. fischeri* semble être relativement sensible aux métaux lourds présents dans les sédiments. Mis à part le mercure, aucune association n'est notée entre la toxicité de l'eau interstitielle et les niveaux de contamination métallique mesurés.

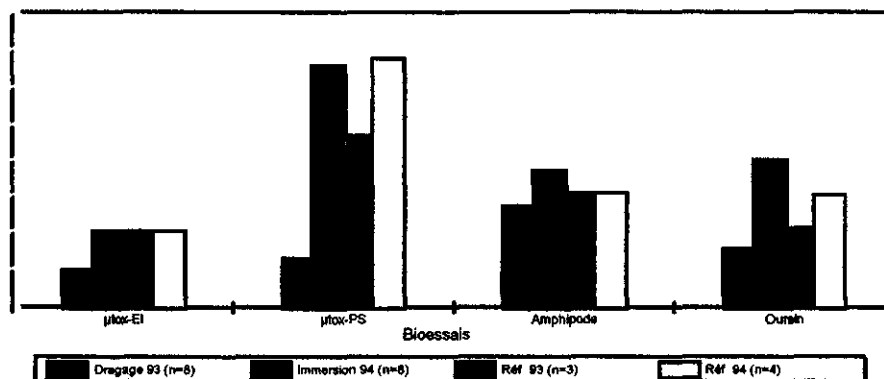
Un accord important semble exister entre les teneurs en carbone organique et les résultats de toxicité Microtox obtenus pour les extraits organiques ($r=-0.87$). Par conséquent, la toxicité des échantillons de Cap-aux-Meules chez *V. fischeri*, telle que mesurée par le biais de la fraction organique, est très probablement due à la présence de HAP et de carbone organique dans les sédiments. Les effets toxiques de l'eau interstitielle semblent, quant à eux, en partie reliés aux teneurs en sulfures totaux des sédiments, comme le démontre le coefficient de corrélation obtenu entre les deux paramètres ($r_{\text{ElvsSulfures}} = -0.6$). À titre d'illustration, les échantillons 11, 13, 16 et 19, qui ont révélé des concentrations de sulfures totaux supérieures aux autres stations (annexe F), démontrent également une toxicité plus forte pour l'eau interstitielle (annexe I). Ce paramètre chimique ne semble toutefois pas avoir causé d'effets néfastes chez *V. fischeri* dans le cas de l'échantillon 15, bien qu'il s'y trouvait en concentration équivalente aux sédiments pré-cités (soit environ 50 mg/L).

Bien qu'un faible nombre d'échantillons aient été soumis aux essais avec oursins, l'analyse statistique relève une certaine concordance entre l'inhibition de la fertilisation chez la première espèce et les concentrations d'azote ammoniacal détectées dans les sédiments ($r=-0.83$). Par exemple, l'échantillon provenant de la station 10 a démontré la plus forte toxicité chez *L. pictus* (annexe I) et la teneur en azote ammoniacal la plus élevée parmi l'ensemble des stations du site de dragage (annexe F). À l'inverse, la station de référence 21, comportant la plus faible concentration d'azote ammoniacal, a démontré une toxicité nulle lors de cet essai. Il est possible que la présence d'azote ammoniacal en quantité importante dans le sédiment 10 ait contribué à la toxicité notée chez *A. virginiana* puisque cet échantillon est le seul à avoir causé une réduction du taux de fertilisation chez cet organisme benthique.

2.2.3.6 Comparaison des résultats de toxicité : Anse-à-Beaufils - 1993 vs 1994

Les résultats des analyses biologiques effectuées sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils en 1993 et en 1994 sont présentés à la figure 20. Bien que les échantillons proviennent de stations différentes d'une année à l'autre, les concentrations inhibitrices (dans le cas du Microtox et de l'essai sur les oursins) ou létales (pour les amphipodes) sont inférieures en 1993, indiquant que ces sédiments sont plus toxiques que ceux analysés en 1994. Cette différence n'est toutefois significative ($p < 0.05$) que pour les essais Microtox. Dans le cas des sédiments de référence, qui selon les coordonnées proviennent du même secteur (coordonnées du centroïde - 1993: 64°14.14' ouest, 48°26.68' nord; 1994: 64°14.43 ouest, 48°26.56 nord), aucune différence significative ($p > 0.05$) n'est signalée entre les données de 1993 et celles de 1994 pour les essais réalisés.

Figure 20. Comparaison des résultats de cytotoxicité obtenus sur les échantillons de l'Anse-à-Beaufils en 1993 et en 1994.



2.3 DISCUSSION

La série de tests réalisés pour l'évaluation de la qualité des sédiments marins, dont il est question dans le présent chapitre, est fondée sur les connaissances actuelles dans le domaine de l'écotoxicologie. Il est donc important de reconnaître qu'à mesure que progressera la recherche, seront découverts de meilleurs essais, de nouveaux organismes expérimentaux et d'autres paramètres d'effet. Ces derniers devront être considérés quant à leur utilité et leur rentabilité dans un tel exercice d'évaluation.

Il est très difficile, à partir des résultats présentés aux pages précédentes, de fournir des recommandations précises quant aux bioessais conventionnels offrant un potentiel important pour l'évaluation de la toxicité de sédiments marins. Un potentiel important est en fait une mesure relative qui varie d'une étude à l'autre et qui, comme mentionné ci-dessus, change à mesure que de nouvelles méthodes sont développées. Par ailleurs, le choix d'un bioessai peut se révéler une tâche difficile si on considère (1) qu'une multitude d'espèces peuvent être utilisées, (2) que la durée de l'essai auquel l'organisme est soumis peut varier considérablement et affecter les résultats de l'essai et (3) que l'exposition peut être fonction de la phase sédimentaire utilisée (sédiment entier, phase solide, extrait organique ou eau interstitielle). Dans ce chapitre, trois espèces indicatrices d'effet sublétaux ont été évaluées, soit *V. fischeri*, *A. virginiana* et *L. pictus*.

En fait, les deux principales considérations à examiner avant de prendre une décision sur le choix des bioessais à utiliser dans le cadre du Programme d'immersion en mer sont: (1) les objectifs de l'étude et (2) la normalisation de la méthode et l'assurance de la qualité.

L'objectif principal de cette étude était de proposer une série de bioessais permettant d'évaluer la contamination relative des sédiments marins du Saint-Laurent et de définir des critères pour l'évaluation de la qualité de ces matériaux. En ce qui concerne les approches utilisées, elles font toutes parties d'une série de méthodes recommandées par Environnement Canada (mis à part le Microtox sur l'extrait) pour mesurer et évaluer les effets biologiques de substances chimiques. De plus, chacune comporte une série de procédures de contrôle de qualité qui permettent de suivre la qualité des organismes, des résultats et d'assurer la réplicabilité et répétabilité des essais.

Avant de procéder à une discussion détaillée des résultats, il est approprié de mentionner les contraintes importantes de l'étude. Tout d'abord, les analyses chimiques n'ont pas été effectuées pour toutes les stations. À l'exception de deux échantillons de référence de l'Anse-à-Beaufils (39 et 41), seuls les sédiments provenant de Cap-aux-Meules ont fait l'objet de telles analyses. Par ailleurs, la comparaison inter-laboratoire des résultats de toxicité ne portait que sur un nombre limité d'échantillons (10 pour le site d'immersion et 12 pour le site de dragage), que sur un essai biologique (Microtox) et que sur deux laboratoires.

Une lacune notable provient de la perte des substances volatiles durant les procédures d'extraction des composés organiques des sédiments et d'échange de solvants. Le DCM dans lequel les extraits étaient conservés a été évaporé et changé pour le DMSO. Cette étape a pu occasionner la perte d'hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaire (tels que le naphtalène et l'anthracène), généralement très volatiles. Les pourcentages de récupération obtenus avec les ajouts dosés confirment ces pertes qui peuvent parfois être supérieures à 50%. De plus, les propriétés du DCM peuvent limiter ses capacités à récupérer les hydrocarbures aromatiques de poids moléculaires élevés des échantillons.

Enfin, il est possible que le temps écoulé entre les analyses, dépassant parfois quelques mois, ait affecté les résultats. Ce phénomène a entre autres été observé par Dave et Nilsson (1994). Ces auteurs ont noté une réduction de l'ordre de 50% de la toxicité des sédiments lorsque conservés à 4°C pendant plus de six mois. Par ailleurs, la toxicité et la géochimie de sédiments contaminés provenant du port de Hamilton ont subi des changements après une période d'entreposage de plus d'une semaine (Brouwer et al., 1990). De façon générale, il est recommandé de commencer les essais dans un délai de deux semaines (Chapman, 1988; ASTM 1991a, 1991b) et, de préférence, d'une semaine après le prélèvement des échantillons. Dans des directives provisoires d'Environnement Canada (1990b, c), on a prévu une durée de stockage maximale admissible de six semaines pour la mesure de la toxicité d'échantillons de sédiments, compte tenu des difficultés pratiques inhérentes à

un délai plus court.

Les concentrations de métaux analysés et les critères de qualité des sédiments pour les métaux sont généralement exprimés sur base de poids sec. D'autres procédures de normalisation pour ces éléments consistent à utiliser les teneurs en sulfures d'hydrogène volatils, en fer et en carbone organique. Cette dernière approche constitue la base de la théorie de partition environnementale en conditions d'équilibre occasionnellement utilisée pour les métaux (Pavlou, 1987). Enfin, une autre approche consiste à normaliser en fonction de la granulométrie. Selon plusieurs auteurs (Baudo et al., 1990; Adams 1987; Neff, 1984), cette dernière est plus appropriée pour les métaux puisque la présence de particules fines contribue de façon significative à la sorption et par conséquent, tend à réduire la biodisponibilité des éléments toxiques. Pour cette raison, nous avons utilisé les résultats des analyses granulométriques pour normaliser les concentrations de métaux lourds dans les sédiments de Cap-aux-Meules. Cette transformation des données a légèrement augmenté l'importance des métaux dans tous les échantillons.

L'ensemble des éléments analysés ont été détectés dans les échantillons de Cap-aux-Meules, soit le cuivre, le cadmium, le plomb, le zinc, l'arsenic et le mercure. En général, les concentrations mesurées sont relativement faibles et ne dépassent pas les critères de qualité pour l'immersion de matières draguées en mer, à l'exception des stations de dragage 2 et 5B pour le cuivre et le zinc, respectivement.

Les résultats des analyses ont également signalé la présence de plusieurs substances organiques dans les sédiments de Cap-aux-Meules. Les stations localisées dans l'aire 1A se caractérisent par des concentrations de HAP importantes qui dépassent les critères de qualité d'Environnement Canada.

Les résultats de la présente étude démontrent que les sédiments de Cap-aux-Meules sont légèrement plus toxiques que ceux de l'Anse-à-Beaufils pour tous les organismes testés. En effet, les sédiments du site d'immersion ont démontré des effets toxiques sur deux espèces, comparativement à trois pour ceux du site de dragage. De plus, la toxicité des sédiments du premier groupe d'échantillons n'a été observée qu'avec deux phases sédimentaires, soit l'extrait organique et la phase solide. En revanche, toutes les fractions analysées dans le cas de Cap-aux-Meules se sont révélées toxiques pour les organismes soumis aux essais. Il est toutefois impossible de faire des comparaisons similaires au niveau des analyses chimiques puisque le site de dragage n'a pas fait l'objet d'une telle caractérisation (à l'exception de deux stations de référence).

La non-concordance notée entre la majorité des essais conventionnels traités dans ce chapitre suggèrent que les organismes étudiés diffèrent quant à leur sensibilité aux sédiments marins contaminés. Dans une certaine mesure, les résultats nous démontrent que *V. fischeri* est plus sensible à la toxicité des sédiments marins que les deux autres organismes testés. Cette variation au niveau de la sensibilité est également observée chez cet organisme lorsqu'exposé à différentes phases sédimentaires. Ainsi le degré de sensibilité de *V. fischeri* semble diminuer de la façon suivante: extrait organique et phase solide > eau interstitielle. Des résultats similaires sont rapportés par True et Heyward (1990) et Tay *et coll.* (1992). Les premiers auteurs attribuent ces différences au partage des contaminants entre les différentes fractions. En fait, puisque l'eau interstitielle contient principalement des composés chimiques solubles dans l'eau, la toxicité de cette phase indique essentiellement la toxicité des contaminants hydrophiles présents. Selon Tay *et coll.* (1992), un essai réalisé sur l'extrait organique démontre la présence (ou l'absence) d'agents adsorbés aux particules de sédiments; cependant, étant donné que le solvant utilisé agit de façon sélective sur les contaminants, i.e. qu'il n'extrait que les substances organiques hydrophobes, non-volatiles, il faut interpréter les résultats avec prudence. L'essai Microtox en phase solide permet, quant à lui, de déceler la présence d'une vaste gamme de substances toxiques, qu'elles soient solubles ou insolubles dans l'eau et d'origine organique ou inorganique. En somme, la détection de concentrations élevées de composés chimiques dans des échantillons de sédiments marins ne suffit pas pour affirmer que cette contamination causera des effets toxiques sur les organismes benthiques. La biodisponibilité des contaminants dépend de la position trophique d'un organisme et la toxicité dépend de la sensibilité de ces organismes aux agents présents sous forme libre dans l'eau interstitielle ou adsorbés aux particules (Swartz *et coll.*, 1986). Par conséquent, les résultats obtenus appuient l'affirmation suivante, émise par plusieurs auteurs: une batterie de biessais intégrant différentes voies d'exposition et divers niveaux trophiques donne généralement une image plus complète de la contamination du milieu que chacun des tests effectué de façon individuelle (USEPA, 1991; Giesy et Hoke, 1989; Munawar *et coll.*, 1989; IJC, 1988).

Lorsque les données de toutes les stations sont colligées pour les sites portuaires et de référence de Cap-aux-Meules, les valeurs moyennes obtenues lors des analyses chimiques et biologiques indiquent que les sédiments portuaires sont considérablement plus contaminés que ceux de référence, si on se base sur les valeurs moyennes obtenues (tableau 7). La seule exception provient des essais Microtox réalisés avec l'eau interstitielle où il ne semble y avoir aucune différence entre les deux groupes de stations.

La correspondance observée entre ces deux types de mesure suggère, à première vue, qu'un seul type d'analyse serait suffisant pour déterminer le niveau de contamination d'un sédiment donné. Cette correspondance n'est

toutefois pas aussi évidente si on considère chacune des stations, ou même les aires, de façon individuelle. Par exemple, la station 2A caractérisée par des concentrations de pesticides organochlorés relativement élevées, a révélé des effets toxiques modérés chez *V. fischeri* mais aucun effet chez *A. virginiana* et *L. pictus*. En revanche, une station adjacente (4), pratiquement non-contaminée, a causé une réduction importante de la fertilisation chez les oursins. Par ailleurs, la station 1, fortement contaminée par des composés organiques, ne démontre aucune toxicité lors des essais Microtox sur l'eau interstitielle; les phases solide et organique sont néanmoins modérément toxiques pour la souche bactérienne. De plus, la station 9 qui renferme des teneurs élevées en BPC et Pb démontre une toxicité modérée chez *V. fischeri* en phases solide et organique mais aucun effet toxique en phase interstitielle. À titre de comparaison, la station 16 qui n'est pratiquement pas contaminée, révèle une toxicité de la phase interstitielle chez cet organisme bactérien, supérieure à tous les autres échantillons testés en 1994.

Tableau 7. Résumé des données obtenues à partir des analyses chimiques et biologiques sur les échantillons du site de dragage*.

Type d'analyses		Stations portuaires	Stations de référence
Chimiques			
métaux lourds ($\mu\text{g/g sec}$)		218.47	35.82
PCB (ng/g sec)		475.62	17.32
HAP ($\mu\text{g/g sec}$)		1.87	0.06
CB ($\mu\text{g/g sec}$)		0.19	ND**
pesticides org. ($\mu\text{g/g sec}$)		4.33	ND
Biologiques			
Microtox - EI	CI_{50} - 15 min (%v/v)	32.3	31
Microtox - EO	CI_{50} - 15 min	0.02	0.1
Microtox - PS	CI_{50} - 5 min (mg)	2.6	13
Amphipodes	taux de survie (%)	86.2	96.5
Oursins	taux de fécondation	44.7	89.8

* Les résultats représentent, dans le cas des analyses chimiques, les concentrations totales moyennes pour chaque catégorie de stations (calculés à partir des valeurs apparaissant à l'annexe G) et les concentrations moyennes pour chaque groupe de stations en ce qui a trait aux analyses biologiques (valeurs apparaissant à l'annexe I).

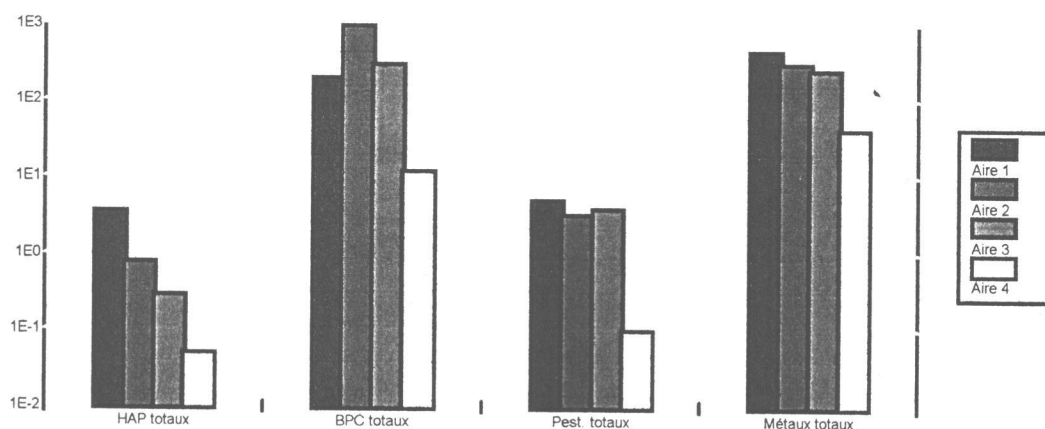
** non-déecté

Si on considère les aires de dragage proposées par Environnement Canada (1992), une légère diminution de la toxicité des fractions solide et organique fut observée chez *V. fischeri* à mesure que l'on s'éloigne du havre (figure 17). Cette tendance est également notée dans les niveaux de contamination par les HAP et les métaux

lourds (concentrations totales) mais ne correspond pas à ce que l'on observe pour les BPC et les pesticides organochlorés (figure 21).

En somme les résultats démontrent que les caractérisations chimiques procurent uniquement des mesures de contamination des sédiments et la réalisation en concert d'analyses biologiques est essentiel pour évaluer leur potentiel toxique sur la faune benthique. Les données de chimie, lorsque présentées sous forme de valeurs moyennes pour l'ensemble des stations (tableau 7), semblent à première vue suffisantes pour prédire les effets biologiques chez les organismes benthiques. Cependant, lorsque les stations sont considérées de façon individuelle, la correspondance entre les deux types de mesures n'est pas aussi évidente. Ceci est possiblement dû à trois facteurs: (1) la gamme restreinte de substances chimiques quantifiées en comparaison à ce qui est possiblement présent dans les sédiments, (2) les interactions multiples entre les contaminants, ainsi que (3) l'impossibilité actuelle de déterminer avec certitude la biodisponibilité des contaminants sorbés aux sédiments. Il est également important, lorsqu'on interprète des résultats d'analyses biologiques, de prendre en considération le fait que la toxicité observée peut être causée par des effets synergiques, additifs ou antagonistes des contaminants, ou encore par d'autres contaminants non-analysés.

Figure 21. Sommaire des résultats d'analyses chimiques réalisées sur les sédiments de Cap-aux-Meules. Les résultats sont présentés sous la forme de concentrations totales moyennes¹ des composés pour chacune des aires considérées.



¹ Dans le cas des métaux lourds, les valeurs utilisées sont les concentrations corrigées pour la fraction fine des sédiments (< 63 µm).

modérément contaminées de celles qui ne le sont pas. Il serait probablement plus adéquat pour identifier les échantillons fortement contaminés. De plus, les tests effectués sur les trois autres fractions sédimentaires ont donné des résultats parfois très différents les uns des autres pour un même échantillon. Les phases solide et organique sont, en général, plus toxiques que l'eau interstitielle. Il est possible que, tel que stipulé par certains auteurs (Greene *et coll.*, 1992; Benton *et coll.*, 1995), la plus forte toxicité de la fraction solide soit causée par (1) la perte d'un certain nombre de bactéries qui adhèrent aux particules en suspension, (2) la plus grande biodisponibilité des contaminants adsorbés aux particules pour les bactéries adhérentes à ces mêmes particules et (3) l'interférence optique causée par les particules en suspension.

De plus, les résultats démontrent que l'importance relative des différentes fractions sédimentaires (eau interstitielle, extrait organique, phase solide et sédiment entier) comme sources de contaminants varie considérablement, dépendamment de l'organisme ou des types de composés chimiques, ou encore en raison de certaines limitations associées aux méthodes analytiques. Par conséquent, il semble que chacune de ces fractions représente, sous différentes conditions, une source importante de contamination pour les organismes benthiques. Nous suggérons donc, dans le cadre du Programme d'immersion en mer, de considérer l'ensemble de ces phases pour l'élaboration d'une batterie de bioessais marins.

SECTION III

ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SÉDIMENTS PAR LE BIAIS DE BIOMARQUEURS AU NIVEAU MOLÉCULAIRE

3.1 RAISONNEMENT POUR L'UTILISATION DE PARAMÈTRES BIOANALYTIQUES À DES NIVEAUX INFÉRIEURS D'ORGANISATION BIOLOGIQUE

Depuis environ une décennie, la recherche dans le domaine de l'évaluation de la toxicité par le biais de mesures d'activités au niveau moléculaire a rapidement évolué (Wedemeyer et McLeay, 1981; Goldstein, 1981). Le principe de base de tous ces essais est que l'ensemble des réponses biologiques observées chez les organismes exposés à des sources de contaminants sont précédées par des changements chimiques survenant à des niveaux d'organisation inférieurs tels que des altérations dans les fonctions enzymatiques, les membranes cellulaires ou le matériel génétique (Thomas, 1990). En d'autres termes, les réponses moléculaires sont les premiers indicateurs d'exposition à un agent stressant qui peuvent être détectés chez un organisme (Stegeman et coll., 1989). Ils offrent généralement plusieurs avantages que les essais conventionnels de toxicité aigue et chronique ne procurent pas. À titre d'exemple, ils permettent un temps de réponse très rapide et requièrent généralement peu d'espace et d'équipements (Blaise et coll., 1988).

L'unité de recherche en écotoxicologie du Centre Saint-Laurent travaille présentement à la mise au point d'un certain nombre de bioessais permettant de mesurer différentes formes de toxicité (génotoxicité, mutagénicité, etc.) des sédiments au niveau moléculaire. Sept de ces approches sont présentées dans les paragraphes qui suivent. Il importe de noter que la réalisation des essais décrits dans le présent chapitre implique, *a priori*, une évaluation de la viabilité cellulaire. Cette mesure permet de corriger les résultats de toxicité en fonction du nombre de cellules viables, soumises à l'essai. En d'autres termes, la toxicité n'est mesurée que chez les cellules qui ont survécu.

3.1.1 ESSAIS DE GÉNOTOXICITÉ

Les dommages à l'ADN sont des indices prometteurs pour évaluer les propriétés génotoxiques des contaminants (Kohn, 1983). Une interaction avec l'ADN se manifeste principalement par des altérations structurales de la molécule qui prennent la forme d'adduits, de bris au niveau du brin, ou de modification chimique des bases (Shugart et coll., 1989). À cet égard, les bioessais sont de plus en plus utilisés et s'avèrent être des outils essentiels pour la détection d'activités génotoxiques (Blaise et coll., 1988). Ces tests correspondent généralement à l'une des trois approches suivantes: (1) détection de l'expression de gènes spécifiques, par exemple le mécanisme de réparation directe chez les bactéries soit le système SOS; (2) détection des mutations dans le génome des organismes exposés; et (3) mesure directe des lésions de l'ADN. Les trois approches sont considérées dans le cadre de la présente étude.

Selon nos connaissances, il n'existe actuellement aucun biotest standardisé permettant de mesurer le potentiel génotoxique des sédiments. Les travaux de développement entrepris par le Centre Saint-Laurent consistent principalement à adapter des tests de génotoxicité et de mutagénicité connus, présentement utilisés pour l'analyse d'échantillons aqueux (effluents industriels) ou de substances pures en isolation, à des matrices sédimentaires. Le présent chapitre porte sur cinq de ces essais, soit le SOS Chromotest, le *Umu*-test, le test de fluctuation, la précipitation alcaline de l'ADN (l'APA) et le Mutatox®. L'application de ces essais sur des sédiments a donc été effectuée à titre exploratoire pour déterminer leur potentiel comme outils de dépistage d'agents génotoxiques dans les sédiments.

3.1.1.1 Mesure de l'induction du système SOS

Le Centre Saint-Laurent travaille actuellement sur l'adaptation de deux essais colorimétriques, présentement utilisés pour mesurer directement l'induction du système SOS causée par des substances pures en isolation ou des effluents industriels, à des échantillons sédimentaires. Il s'agit du SOS Chromotest et du test *Umu* qui utilisent des souches bactériennes ayant subi des modifications génétiques au préalable.

SOS Chromotest

Tel que décrit en annexe J, ce test est utilisé pour détecter la présence d'agents génotoxiques provoquant des lésions de l'ADN chez *E. coli* PQ37. En bref, chez cette bactérie, le gène *lacZ* codant la β -galactosidase (β -gal) et le gène *sulA* ont été fusionnés par manipulation génétique (Quillardet et Hofnung, 1985). Le gène *sulA* appartient au système SOS, un mécanisme de réparation fautive de l'ADN (Walker, 1987). Lorsque l'ADN bactérien est agressé par un produit chimique génotoxique, le gène *sulA* est activé et, par conséquent, induit la synthèse de l'enzyme β -gal. Puisque la région *lacZ* normale a été retirée du génome bactérien, la production de β -gal résulte de lésions au niveau de l'ADN.

Ce test procure plusieurs avantages à l'utilisateur: 1) la survie de la souche soumise au test n'est pas requise; 2) les résultats sont obtenus dans la même journée; et 3) l'utilisation de microplaques permet d'analyser plusieurs échantillons à la fois dans un espace restreint. Cependant, comme d'autres bioessais, un problème réside dans l'interprétation des résultats du SOS chromotest. Une façon de pallier à cette incertitude est d'effectuer un ou quelques autres essai(s) qui permettront de confirmer ou d'infirmer ces résultats. Dans le cas présent, nous avons utilisé trois essais, soit le *Umu*-test, le test de fluctuation et le Mutatox®. Ces derniers sont décrits aux paragraphes suivants.

Umu-test

Tout comme le SOS Chromotest, le *Umu*-test sert à dépister les substances qui déclenchent le mécanisme de réparation SOS suite à un endommagement par celles-ci de l'ADN. Toutefois, ces deux essais ne permettent pas de déterminer précisément de quelle lésion il s'agit. La souche *Salmonella typhimurium* TA1535, l'une des souches du test d'Ames dans laquelle on a introduit le plasmide psk1002 (Oda et coll., 1985), est utilisée dans le test *Umu*. Ce plasmide porte une fusion des gènes *umuC* et *lacZ*. Le gène *umuC* fait partie du système de réparation SOS et est plus intimement lié à la réparation de l'ADN que le gène *sulA* du SOS Chromotest. Le gène *lacZ* est, tel que sus-mentionné, responsable de la synthèse de la β -gal, enzyme qui, dans une souche sauvage, est induite lorsque le lactose est la seule source de carbone disponible. Lorsqu'une molécule chimique provoque une lésion à l'ADN de l'un des plasmides portés par la souche TA1535/psk1002, le système SOS est déclenché, entraînant par le fait même l'activation de la fusion *umuC-lacZ* et la synthèse de la β -gal.

3.1.1.2 Bioessai basé sur la détection des mutations

Test de fluctuation

Certaines substances chimiques sont reconnues comme étant impliquées dans l'étiologie de tumeurs observées chez les organismes soumis à une contamination industrielle ou urbaine (Mix, 1986). Deux essais, basés sur l'utilisation de souches *Salmonella*, sont présentement utilisés pour déterminer la présence de substances mutagènes dans les échantillons. Il s'agit du test d'Ames et du test de fluctuation. Seul ce dernier test est considéré dans la présente étude.

Originellement développé par Green *et coll.* (1976), le test de fluctuation a par la suite été optimisé par différents chercheurs dont Gathehouse et Delow (1979), Hubbard *et coll.* (1984) ainsi que Venitt *et coll.* (1984). En bref, les souches *Salmonella* utilisées portent une mutation dans l'un des gènes responsables de la synthèse d'un acide aminé essentiel, l'histidine. Cette mutation rend ces souches incapables de fabriquer l'histidine. En présence d'un contaminant ayant des propriétés mutagènes, ces souches retrouvent leurs séquences de bases de type sauvage suite à une mutation causée par réversion, les rendant ainsi aptes à synthétiser l'histidine.

3.1.1.3 Bioessais basés sur le bris de l'ADN

Précipitation alcaline de l'ADN

Le métabolisme *in vitro* des contaminants, tel qu'exploré par le biais des tests présentés antérieurement, est un sujet complexe et controversé puisqu'il implique que l'on fournit les systèmes d'activation métabolique (S9) aux organismes soumis à l'essai. Certains auteurs stipulent que ces systèmes microsomiques ne fournissent qu'une approximation des événements se produisant *in vivo* (Le Curieux *et coll.*, 1993; Hollaender, 1987). D'autres organismes, tels que les poissons possèdent des systèmes intrinsèques d'activation métabolique. Par souci de se rapprocher des situations réelles, les recherches en écotoxicologie ont conduit au développement d'essais sur des organismes supérieurs aquatiques possédant leur propre système de biotransformation.

La précipitation alcaline de l'ADN est une technique analytique très sensible utilisée pour détecter et quantifier les bris au niveau du brin d'ADN causés par la présence de composés carcinogènes. Comparativement aux approches précitées qui sont basées sur des systèmes bactériens, la méthode APA utilise des hépatocytes de truites (*O. mykiss*) comme cultures cellulaires soumises à l'essai.

La méthode APA offre des avantages importants comparativement à d'autres approches semblables couramment utilisées pour quantifier les lésions de l'ADN (par exemple l'essai de déroulement de l'ADN alcalin). Ainsi, le test de précipitation alcaline permet d'obtenir des résultats rapidement et à un coût réduit, en plus de permettre l'analyse de plusieurs échantillons à la fois.

3.1.1.4 Le Mutatox®: un autre test de mutagénicité

Le test Mutatox®, développé par la firme Microbics Corp., utilise un mutant sombre de *V. fischeri* (M169) (Ulitzur *et coll.*, 1980; Ulitzur et Weiser, 1981; Ulitzur *et coll.*, 1981). Ce test mesure la capacité de divers agents génotoxiques à restaurer l'activité bioluminescente de la bactérie par induction de mutations. Bien que le Mutatox® offre plusieurs avantages (i.e. procédures relativement simples, test sensible permettant de détecter un grand nombre de contaminants génotoxiques), les mécanismes impliqués dans la restauration de la photoluminescence demeurent indéterminés (Venitt *et coll.*, 1986). Certains auteurs ont toutefois proposé six processus pouvant déclencher l'émission de lumière chez *V. fischeri* M169 (Adar *et coll.*, 1992; Ulitzur et Kuhn, 1988). Ces derniers sont présentés à l'annexe L.

3.1.2 INDICATEURS BIOCHIMIQUES DE TOXICITÉ

Les phénomènes de biotransformation et d'excrétion de composés chimiques sont couramment examinés pour indiquer une exposition à des xénobiotiques (Hamilton et Mehrle, 1986; Payne *et coll.*, 1987). Dans le cadre de la présente étude, deux indicateurs biochimiques sont utilisés pour évaluer la toxicité des sédiments. Il s'agit tout d'abord de l'induction du système OFM (oxydase à fonctions multiples), important dans la transformation de substances organiques chez le poisson telles que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Jimenez et Stegeman, 1990). La deuxième approche est basée sur l'induction d'une protéine de faible poids moléculaire, la métallothionéine (MT), qui témoigne d'une exposition à des métaux lourds tels que le mercure, le cuivre, le cadmium, et le zinc. Au laboratoire du Centre Saint-Laurent, ces essais sont réalisés sur des hépatocytes de truites.

Les essais pour la mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de cultures cellulaires de poissons offrent beaucoup de potentiel pour les raisons suivantes: (1) plusieurs auteurs ont démontré que les tissus hépatiques de poissons abondent en enzymes métaboliques, particulièrement celles du cytochrome P-450, ainsi qu'en MT; (2) ces essais permettent de dépister la présence d'agents chimiques inducteurs de mécanismes biochimiques tels que la biotransformation, chélation, etc.; (3) ils requièrent peu d'espace et fournissent des résultats très rapidement, soit généralement en quelques heures (Thomas, 1990); (4) certains de ces processus biochimiques, p. e. l'induction des MT et OFM, sont spécifiques à certains types de stress environnementaux et la magnitude de la réponse est souvent reliée à la dose (Thomas *et coll.*, 1987).

3.1.2.1 Induction du cytochrome P-450 1A

Le cytochrome P-450 (ou simplement le P-450) réfère à une famille d'enzymes impliquées dans la biotransformation des composés organiques (pour une revue consulter Ortiz et Montellano, 1986). Les réactions catalysées par ces protéines sont généralement du type oxydase à fonctions multiples ou monooxygénase. La toxicité des substances organiques peut être grandement modifiée suite à une transformation au niveau de la structure des molécules. En modifiant la structure chimique, les enzymes du P-450 peuvent rendre un composé non-toxique, ou encore augmenter sa toxicité de façon considérable. La présence des différentes protéines P-450 permet de déterminer le type de réactions qui se produit au niveau des cellules. Dans ce sens la mesure de l'induction du P-450 permet de déterminer le type de contaminant organique auquel l'organisme a été exposé. Des cultures cellulaires (hépatocytes) de truites sont utilisées pour déterminer l'induction du système OFM. Notre mesure se limite toutefois à la famille P-450 1A.

3.1.2.2 Induction des métallothionéines

Les métallothionéines représentent une famille de protéines cytosoliques ayant une affinité particulière avec certains métaux lourds. Bien que ces protéines aient été identifiées dans bon nombre de tissus et d'espèces animales (Kägi, 1993) et qu'elles aient été largement étudiées, leur fonction biologique fait toujours l'objet de maintes discussions (Cherian et Chan, 1993). Elles semblent toutefois jouer un rôle très important dans la régulation et la détoxification des métaux (Cherian et Nordberg, 1983). La détermination des niveaux de MT dans le foie de poisson, le principal organe où se produit l'induction, constitue un indice prometteur d'exposition à des composés métalliques présents dans les sédiments.

3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour tous les biotests dont il est question dans la présente section, l'extrait organique du sédiment constitue la fraction sédimentaire soumise à l'essai.

3.2.1 SOS CHROMOTEST

Le protocole expérimental détaillé du SOS Chromotest est fourni à l'Annexe J. Les méthodes utilisées sont essentiellement tirées d'un protocole interne d'analyse d'échantillons aqueux intitulé *Test de génotoxicité avec la bactérie Escherichia coli PQ37 (SOS Chromotest^{MC})*, Protocole pour échantillons aqueux, version 1.2, mars 1993. Certaines modifications ont été apportées au protocole afin de pouvoir analyser des extraits organiques de sédiments, préalablement dissous dans du DMSO. Les modifications portent principalement sur les méthodes de dilution des échantillons et sur la disposition des échantillons dans la microplaque (annexe J - Figures 1 et 2).

3.2.2 UMU-TEST

La souche *S. typhimurium* TA1535/psK1002 a été gracieusement offerte par Audrey M'Daniels de la USEPA. Le test *Umu* a été réalisé en apportant quelques modifications au protocole du SOS Chromotest. Comme pour le SOS Chromotest, la viabilité cellulaire fut mesurée par turbidité à 600 nm après l'incubation de deux heures. La phosphatase alcaline est utilisée comme indicateur de viabilité. Le 2-nitrophényl- β -D-galactoside (ONPG) a été substitué au X-gal comme substrat de la β -gal. L'hydrolyse de l'ONPG donne un produit de couleur jaune dont l'intensité est lue à 405 nm. Afin de corriger pour l'interférence due à la couleur, des blancs de dilution pour chacun des extraits furent intégrés aux essais. L'ensemble des autres étapes, y compris le traitement des données et l'interprétation des résultats, sont demeurées fidèles au protocole du SOS Chromotest.

3.2.3 TEST DE FLUCTUATION

Le protocole expérimental suivi a été développé par le laboratoire du Centre Saint-Laurent (*Protocole - Test de fluctuation*, Mai 1993). Les détails sont fournis à l'annexe K. Le test de fluctuation est réalisé en milieu liquide dont le pH de départ est ajusté à 7.2. L'échantillon à tester est ajouté au milieu nutritif renfermant du glucose, une quantité minimale d'histidine ainsi qu'un indicateur de pH, le bromocrésol pourpre. Les bactéries (souches *Salmonella*), issues d'une culture nocturne, sont ajoutées au milieu d'essai, puis des portions de 200 µL sont réparties dans des microplaques de 96 puits. Les microplaques sont incubées durant cinq jours à 37°C. Lorsque l'histidine est épuisée, seules les bactéries ayant subi une mutation parviennent à se diviser. Cette division cellulaire provoque l'acidification du milieu d'essai qui passe du pourpre au jaune. Au terme de la période d'incubation, les puits positifs, c'est-à-dire les puits jaunes, partiellement jaunes et/ou turbides, sont comptés. Une activité mutagène est confirmée lorsque le nombre de puits positifs dans une concentration donnée est significativement supérieure à celui observé dans le témoin négatif (Gilbert, 1980). En raison du faible volume d'extrait organique, un seul réplicat par échantillon a été analysé, comparativement à trois pour les échantillons témoins.

3.2.4 MUTATOX®

Le test Mutatox, développé par la firme Microbics Corp., est une version commerciale du test de bioluminescence (BLT) décrit par Ulitzur (1986). La firme Microbics Corp. fournit les cultures bactériennes lyophilisées, le milieu d'essai modifié ainsi que le protocole expérimental (*Mutatox® manual*, version 2.20, 1993). La plus forte concentration d'extraits organiques de sédiments testée est de 10 µL d'extrait / mL de diluant (annexe L).

3.2.5 TEST DE PRÉCIPITATION ALCALINE DE L'ADN

Le test APA est un essai *in vivo* de génotoxicité qui est basé sur l'utilisation d'hépatocytes de truites (*O. mykiss*). Le protocole expérimental du test est décrit en détail dans Gagné *et coll.* (1995; voir annexe M). En résumé, les hépatocytes de truites sont exposés pendant 24 h à 15°C à une série de concentrations d'extraits organiques. Par la suite, les cellules sont recueillies par centrifugation et les tests de viabilité cellulaire et de génotoxicité sont réalisés. Les analyses sont effectuées par cytométrie en flux dans le cas de la viabilité et par fluorométrie pour l'APA.

3.2.6 INDUCTION DES MÉTALLOTHIONÉINES

Les niveaux de métallothionéine dans les hépatocytes de truites ont été déterminés par la méthode de saturation à l'argent, développée par Scheuhammer et Cherian (1986) et modifiée par Gagné et coll. (1990; voir annexe M) au laboratoire du Centre Saint-Laurent. En bref, les tissus hépatiques sont homogénéisés et centrifugés à 4°C pendant 20 min (10 000g). Une aliquote de 200 µL de la fraction S₁₀ recueillie est dénaturée par la chaleur pendant 3 min, puis centrifugée (2 min, 10 000g) afin de retirer les protéines coagulées. Un sous-échantillon de 50 µL du surnageant est ensuite saturé avec 50 µL d'une solution Ag⁺ (20 mg / L) dans un tampon glycine (500 mM, pH 8.5) et incubé pendant 5 min à la température ambiante. L'excès d'argent est retiré par précipitation avec une solution d'hémoglobine (2%). L'argent total dans l'échantillon est quantifié par absorption atomique sur four au graphite. Les niveaux de MT sont déterminés en supposant que 17 mol d'argent complexe avec 1 mol de MT (Scheuhammer et Cherian, 1986).

3.2.7 INDUCTION DU SYSTÈME OFM

La méthodologie suivie a été développée par Gagné et Blaise (1995). La cytométrie en flux est utilisée pour mesurer l'activité OFM dans les hépatocytes de truites, exposés *à priori* à une série de concentrations d'extraits organiques de sédiments marins.

3.2.8 ANALYSE DES RÉSULTATS

Avant de procéder aux analyses statistiques décrites ci-après, les données biologiques et chimiques ont été transformées en logarithme (log10) afin de respecter l'hypothèse de normalité de la distribution. Une analyse de corrélation avec le test Spearman (SAS, 1987) a été effectuée afin de déterminer des corrélations possibles entre les essais de génotoxicité et les biomarqueurs (MT et OFM) utilisés pour les sédiments de Cap-aux-Meules. Un seul test de génotoxicité, soit l'APA, a été utilisé pour cette analyse, et ce, pour les raisons suivantes: (1) très peu d'échantillons se sont révélés toxiques lors des essais sur organismes bactériens; et (2) il y avait trop de données manquantes pour les tests *Umu* et Mutatox®. De plus, aucune analyse statistique n'a été faite pour le site de l'Anse-à-Beaufils puisque seul le test SOS Chromotest a été réalisé sur ces échantillons.

Le test de corrélation canonique (SAS, 1988) fut utilisé afin d'évaluer l'existence d'un lien entre des causes possibles (niveaux de contamination organique et inorganique, carbone organique total et solides volatiles) et les effets génotoxiques (test APA) et/ou biochimiques (MT et OFM) observés avec les sédiments de Cap-aux-Meules. L'analyse à fonction discriminante (SAS, 1988) a ensuite permis de vérifier l'existence d'une

discrimination entre les aires de dragage proposées (1, 2, 3) et l'aire de référence (4) sur la base du test APA et des essais avec biomarqueurs (MT et OFM).

3.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des tests de génotoxicité et mutagénicité bactérienne, ainsi que les mesures de l'APA et des activités biochimiques (MT et OFM) pour les sédiments du site de dragage sont présentés à l'annexe N. Les valeurs précédées du signe « > » indiquent l'absence de génotoxicité ou mutagénicité pour l'échantillon en question. En ce qui a trait au site d'immersion, seul le SOS-Chromotest a été réalisé étant donné la très faible toxicité des sédiments; les données recueillies pour ces stations apparaissent à l'annexe O. Un nombre limité d'échantillons a fait l'objet d'analyse avec *Umu* et Mutatox® puisque ces tests nécessitent des coûts de réalisation importants et dans le deuxième cas, des périodes d'incubation relativement longues.

Les quatre souches bactériennes utilisées permettent de mesurer deux paramètres d'effet. *E. coli*, *V. fischeri* M169 et *Salmonella typhimurium* TA1535 sont utilisées pour déceler des lésions à l'ADN via une induction du système SOS, alors que la souche *Salmonella* TA100 est conçue pour la détection d'activités mutagéniques. Bien qu'il y ait des différences importantes entre les réponses biologiques mesurées, un lien existe entre les mécanismes impliqués (Hofnung et Quillardet, 1986). Par conséquent, une bonne corrélation peut être escomptée entre les différents bioessais. Il importe toutefois de noter que les essais réalisés dans cette deuxième partie de l'étude ne sont pas encore au point. Il est donc possible que certains facteurs reliés aux méthodologies employées aient modifié les résultats. Par exemple, tel que mentionné à la section 2.4.6, des problèmes de dissolution des extraits organiques dans le solvant utilisé ont été rencontrés. En effet, la majorité des échantillons ont démontré une présence importante de particules en suspension ou en déposition. Il est possible que ces particules aient causé certaines interférences lors des analyses biologiques.

3.3.1 TESTS DE GÉNOTOXICITÉ ET MUTAGÉNICITÉ

L'évaluation qualitative des réponses biologiques obtenues pour les stations de Cap-aux-Meules apparaissent au tableau 8. Les signes «+» indiquent une réponse positive, alors que les signes «-» signifient l'absence de substances délétères pour l'ADN. Dans l'ensemble, le potentiel génotoxique et mutagénique des extraits organiques est relativement faible (24%). La majorité des réponses positives ont été obtenues en présence de la fraction S9, indiquant que les agents génotoxiques présents dans les extraits manifestent leur activité de façon indirecte sur les organismes testés. En d'autres termes, ces composés requièrent une activation métabolique pour provoquer des modifications génétiques.

Tableau 8. Comparaison des réponses qualitatives obtenues par le biais des essais de génotoxicité et mutagénicité avec les sédiments de Cap-aux-Meules.

Échantillon	Génotoxicité et Mutagénicité								Activité		
	SOS		Umu		Fluctuation		Mutatox®		APA	MT	MFO
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9			
Blanc 1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Blanc 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoin									+	+	+
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
2			-	+	-	-			+	+	+
2A									-	+	-
2B	-	-							+	+	+
3	-	-	-	+	-	+			+	+	+
4	-	+	-	-	-	-			+	-	+
5			-	+	-	-			-	-	+
5A							-	-	-	-	+
5B	-	-							+	-	+
6	-	-	-	-	-	+			-	-	-
7	-	-	+	-	-	-			+	-	-
8	-	-					-	-	+	+	+
9					-	-			-	+	-
9A									+	-	-
9A-dupl.	-	-							-	-	-
9B									-	-	+
10	-	-			-	-			+	+	-
11	-	-			-	-			+	-	+
12	-	-			-	-			-	-	-
13	-	-			-	-			-	-	+
14	-	-			-	-			+	-	+
15	-	-			-	-	-	-	+	-	-
16	-	-			-	-			+	+	-
17	-	-			-	-			+	+	+
18	-	-			-	-			-	-	-
19	-	-			-	-			-	+	+
20	-	-			-	-			-	+	-
21					-	-			-	+	-
21A									-	-	+
21A-dupl1									+	+	+
21A-dupl2									-	-	-
21B	-	-							-	+	-
22	-	-			-	-			-	-	-
HS2-1	-	-			-	+	-	-	+	-	+
HS2-2	-	-							+	+	-
HS3-1	-	+			+	+	-	-	+	+	+
HS3-2	-	+							+	-	+

* Résultat équivoque, tout près de la limite significative

Aucune réponse positive n'a été obtenue avec les blancs et le témoin dans les essais bactériens. L'APA a cependant indiqué une activité génotoxique notable pour deux de ces blancs. Ceci nous permet donc de conclure que le solvant utilisé pour la conservation des extraits organiques (DMSO) est probablement

responsable des effets néfastes observés sur l'ADN des hépatocytes de truites. Afin d'évaluer de façon adéquate le potentiel génotoxique des sédiments à l'étude par le biais du test APA, les résultats ont été transformés en facteurs d'induction (FI) de la façon suivante (tableau 9):

$$FI = \frac{CMEO_{Ténon}}{CMEO_{Traité}^1}$$

Les valeurs supérieures ou égales à 1 (≥ 1) indiquent une augmentation appréciable de la précipitation alcaline, alors que celles qui sont inférieures à 1 (≤ 1) désignent l'absence de génotoxicité pour l'échantillon en question. Selon cette approche, 19% des sédiments de dragage comportent des substances pouvant causer des changements génétiques chez *O. mykiss*; il s'agit des stations 2, 5B, 8, 14 et 16. De plus, un sédiment de référence (station 21A-dupl.1) s'est également révélé positif; ce résultat est toutefois équivoque puisqu'un seul des trois tests APA réalisés sur cet extrait a causé une réponse génotoxique. Il est possible qu'il y ait eu un problème au niveau des manipulations pour cet échantillon puisque les CMEO pour tous les essais réalisés (test APA, MT et OFM) étaient relativement faibles (0.02 µL/mL), comparativement aux deux autres répliqués (21A et 21A-dupl.2).

Si nous ne considérons que les essais réalisés sur organismes bactériens, un pourcentage encore plus faible de réponses positives a été obtenu (9%). Ce résultat est étonnant puisque les concentrations de substances reconnues comme inductrices du système SOS et/ou mutagènes dans les sédiments n'étaient pas négligeables (annexe G). En fait, dans une étude réalisée sur des sédiments dulcicoles, Langevin et coll. (1992) ont rapporté des activités génotoxiques à des concentrations de HAP et BPC généralement inférieures à celles mesurées dans la présente étude.

Bien qu'on ne puisse faire de comparaisons directes entre les deux études, il est possible que la génotoxicité des sédiments de Cap-aux-Meules ait été sous-évaluée et ce, pour les raisons suivantes: (1) des interactions entre les différents contaminants présents dans les mélanges complexes ont pu considérablement altérer les relations entre les réponses biologiques et les profils chimiques; (2) des processus de volatilisation, d'oxydation ou de biodégradation ont pu se produire *in situ*, durant les procédures d'extraction organique, ou encore pendant l'entreposage ou les analyses. Ces processus auraient causé une perte ou une réduction de la toxicité des contaminants (McCarthy et Black, 1988; Tessier et Campbell, 1987); et (3) la complexation des substances génotoxiques aux particules en suspension présentes dans les extraits organiques. La présence de

¹ Traité = échantillon sédimentaire

ces particules serait imputable à la faible dissolution des matières organiques dans le solvant sélectionné (DMSO, 100% v/v).

Tableau 9. Facteur d'induction d'une réponse génotoxique (APA) ou biochimique (MT et OFM) par rapport aux témoins[†].

Échantillon	APA	MT	OFM
1	1	1	100
2	100	1	10
2A	1	100	1
2B	10	100	10
3	10	1	10
4	1	1	1000
5	1	1	100
5A	1	1	10
5B	1000	1	100
6	1	1	1
7	1	1	1
8	1000	1	1000
9	1	10	1
9A	10	1	1
9A-dupl.	1	1	1
9B	1	1	100
10	10	1	1
11	10	1	10
12	1	1	1
13	1	1	100
14	1000	1	1000
15	10	1	1
16	1000	1000	1
17	10	100	10
18	1	1	1
19	1	100	10
20	1	100	1
21	1	10	1
21A	1	1	10
21A-dupl.1	100	100	100
21A-dupl.2	1		1
21B	1	100	1
22	1	1	1
HS2-1	1	1	10
HS2-2	0	100	
HS3-1	1000	10	10
HS3-2	10	1	100

[†] Témoin d'évaporation, contenant du DMSO 1% v/v.

Les tests de génotoxicité et mutagénicité ont permis d'établir une nette distinction entre la station 1 et les autres stations de dragage. En fait, cet échantillon s'est révélé positif dans tous les essais bactériens (tableau 8). Ces résultats suggèrent la présence d'agents génotoxiques et mutagéniques, absents des autres extraits testés, ou à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans les autres échantillons. Il est possible que ces agents soient «naturels», c'est-à-dire qu'ils proviennent de la décomposition de certaines plantes qui produisent de telles substances afin de se protéger des parasites et prédateurs. Néanmoins, les réponses obtenues pour l'extrait de la station 1 semblent être en accord avec la concentration de HAP totaux mesurée pour cet échantillon (annexe N). En effet, la teneur en HAP totaux était de trois à 100 fois supérieure à celles retrouvées dans les autres échantillons. Une activité génotoxique importante a également été notée pour l'échantillon 3. De façon similaire à la station de confinement proposée (1), la station 3 comportait des concentrations de HAP relativement élevées, si on les compare à celles des autres stations.

Les réponses biologiques obtenues chez les deux souches *Salmonella* utilisées concordaient pour environ 50% des stations. Mises à part quelques exceptions (stations 1 et 4), l'ensemble des échantillons d'essai identifiés comme positifs dans les tests de fluctuation et *Umu* étaient négatifs avec le SOS Chromotest et le Mutatox®. En somme, les souches *Salmonella* ont démontré une sensibilité aux substances génotoxiques, légèrement supérieure à *E. coli*. Des résultats similaires ont été rapportés par certains auteurs (Legault et coll., 1994; McDaniel et coll., 1990). Les discordances observées entre les tests sur bactéries peuvent être attribuables à: (1) des différences, entre les souches bactériennes, au niveau du métabolisme des composés chimiques et de la robustesse du marqueur *rfA*; (2) la méthode utilisée pour évaluer la toxicité générale, par exemple le dosage de la phosphatase alcaline (absorbance à 405 nm) dans le SOS Chromotest et la turbidité (absorbance à 600 nm) dans le test *Umu*; (3) des différences dans la préparation et/ou la manipulation des concentrations de S9 et de solvants; (4) des différences au niveau du temps d'incubation (p. e. 2 h pour les essais SOS Chromotest et *Umu*, comparativement à 24 h et 5 jours pour le Mutatox® et le test de fluctuation, respectivement) (Legault et coll., 1994); et (5) différences dans l'interprétation des résultats. La faible association entre les essais bactériens peut également être due à la nature des substances présentes dans les extraits. Dans ce cas, les discordances observées entre les essais signifieraient que les essais sont complémentaires au niveau de l'information qu'ils procurent à l'utilisateur. Par exemple, certains composés peuvent causer une induction du système SOS (tests SOS Chromotest et *Umu*), sans toutefois démontrer de mutagénicité (test de fluctuation). Les extraits provenant des stations 2, 4, 5 et 7 semblent avoir démontré ce phénomène (tableau 8). Puisque l'inhibition de la synthèse de l'ADN est suffisante pour causer une induction du système SOS, les substances qui ne peuvent interagir directement avec l'ADN mais qui peuvent inhiber sa

synthèse en agissant sur les enzymes impliquées dans son métabolisme sont susceptibles d'induire une réponse SOS. Par conséquent, aucun dommage à l'ADN ne serait détecté et les tests de mutagenicité tels que le test de fluctuation seraient négatifs. Le phénanthrène est un exemple d'une telle substance (Quillardet et Hofnung, 1993). Dans la même optique, deux essais utilisés pour mesurer l'induction du système SOS peuvent également fournir des informations différentes. À titre d'illustration, le test *Umu* semble mieux adapté que le SOS Chromotest pour la détection de génotoxines nécessitant une activation métabolique (McDaniels et coll., 1990). Les résultats de la présente étude semblent appuyer cette affirmation; en effet, 80% des réponses positives obtenues lors des essais *Umu* l'étaient en présence de S9 uniquement.

Les résultats sur la génotoxicité des sédiments marins suggèrent que le test APA est le plus sensible des essais réalisés, suivi du test de fluctuation, du *Umu*-test, du SOS Chromotest et enfin du Mutatox®. La sensibilité apparemment plus importante du test de précipitation alcaline, par rapport aux essais sur bactéries, est fort probablement attribuable à deux principaux facteurs: (1) l'efficacité moindre du système d'activation métabolique (microsomes de rat, S9) utilisés dans les essais bactériens, et (2) la plus grande diversité des types de métabolisation qui ont lieu dans le test APA (biotransformation par le tissu hépatique des truites). En fait, tel que reconnu par un certain nombre d'auteurs, les systèmes d'activation métabolique généralement utilisés dans les essais *in vitro* ne permettent jamais de reproduire parfaitement la vaste diversité et la durée de la métabolisation qui survient dans les tissus ou dans les organismes entiers (Le Curieux *et coll.*, 1993; Hollaender, 1987).

Par ailleurs, des facteurs reliés aux procédures de laboratoire peuvent également être responsables de la plus forte sensibilité du test APA comparativement aux autres tests dans la présente étude. Entre autres, les échantillons ont été analysés en triplicats dans l'APA, alors que dans le test de fluctuation, un seul réplicat par échantillon fut analysé. Ensuite, les concentrations testées dans ce dernier test (0.16 à 2.5 $\mu\text{L} / \text{mL}$) furent basées sur les résultats de toxicité lors du Microtox avec les extraits organiques. Ces concentrations correspondent plus ou moins avec celles utilisées lors de l'APA (0.002 à 2 $\mu\text{L} / \text{mL}$), bien que l'exposition s'effectue à des niveaux d'intégrité biologique différents: dans le premier cas il s'agit d'un organisme bactérien entier (*Salmonella*) dépourvu d'un système métabolique de biotransformation, alors que dans le deuxième il s'agit de cellules hépatiques qui sont pourvues d'un tel système. Par conséquent, les concentrations minimales testées sont plus susceptibles d'avoir un effet dans le test APA, compte tenu de l'exposition directe des cellules cibles provoquée dans cet essai. Enfin, les seuils de toxicité sont déterminés différemment dans ces deux essais étant donné les conditions d'analyses différentes. Dans le cas du test de fluctuation, les tests de viabilité

cellulaire et de mutagénicité se font dans le même bain d'essai. Ceci comporte un désavantage notable puisque lorsqu'un extrait se révèle toxique mais non mutagène, la CMEO est fixée à une valeur plus grande que la concentration sans effet observé (CSEO) pour la viabilité cellulaire. Par conséquent, il est difficile d'évaluer adéquatement le potentiel mutagénique d'un extrait lorsque le test de viabilité cellulaire se révèle positif à une faible concentration testée. En revanche, dans l'APA, les tests de viabilité cellulaire et de génotoxicité se font dans deux bains d'essai différents. De cette façon, la cytotoxicité ne peut masquer la détection d'activités génotoxiques. Le seuil de toxicité se calcule comme suit dans l'APA:

$$ST = (CMEO \times CSEO)^{1/2}$$

Nonobstant ces facteurs importants, le test de fluctuation offre un potentiel important pour évaluer le potentiel mutagénique des sédiments contaminés. Certains auteurs, notamment Legault et coll. (1993), ont démontré la plus forte sensibilité de ce test comparativement au SOS Chromotest et Mutatox dans le cas de substances pures en isolation. Certains ajustements à la méthode sont toutefois requis afin de pouvoir l'utiliser sur des échantillons de sédiments. Il est évident qu'aucun test ne permet d'évaluer tous les types de dommages possibles causés par les contaminants (Hollaender, 1987). Ceci est particulièrement pertinent lorsqu'il s'agit de mélanges complexes, tels que retrouvés dans le milieu. Il s'avère donc avantageux d'utiliser une gamme d'essais, et non pas un seul, pour évaluer le potentiel génotoxique et mutagénique des mélanges complexes sur une variété d'organismes aquatiques.

Enfin, en ce qui concerne le potentiel cytotoxique des sédiments, certains phénomènes intéressants ont été notés (tableau 10). Aucune réponse positive n'a été détectée chez *V. fischeri* (Mutatox®). Il est probable que les concentrations d'extraits organiques testées n'étaient pas suffisamment élevées pour causer une réponse biologique.

En fait, le choix des concentrations fut basé sur les résultats Microtox obtenus avec la fraction organique des sédiments. La plus forte concentration analysée était de 0,4 µL d'extrait / mL de milieu d'essai, comparativement à 2,5 µL/mL pour le test de fluctuation et à 10 µL/mL pour le SOS Chromotest et le *Umu*-test.

Tableau 10. Comparaison des réponses cytotoxiques qualitatives obtenues par le biais des essais de génotoxicité avec les sédiments de Cap-aux-Meules.

Échantillon	Cytotoxicité							
	SOS		Umu		Fluctuation		Mutator®	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Blanc 1	-	+	-	-	-	-	-	-
Blanc 2	-	+	-	-	-	-	-	-
Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+	-	-	-
2			+	+	+	-		
2A								
2B	+	+						
3	+	+	+	+	+	-		
4	+	+	+	+	+	-		
5			+	+	+	-		
5A							-	-
5B	+	+						
6	+	+	+	+	+	-		
7	+	+	+	+	+	-		
8	+	+					-	-
9					+	-		
9A								
9A-dupl.	+	+						
9B								
10	+	+			+	-		
11	+	+			+	-		
12	+	+			+	-		
13	+	+			+	-		
14	+	+			+	-		
15	+	+			+	-	-	-
16	+	+			+	-		
17	+	+			+	-		
18	+	+			+	-		
19	+	+			+	-		
20	+	+			+	-		
21					-	-		
21A								
21A-dupl1								
21A-dupl2								
21B	+	-						
22	+	-			+	-		
HS2-1	+				+	-	-	-
HS2-2	+							
HS3-1	+	-			+	-	-	-
HS3-2	+	-						

* Résultat équivoque, tout près de la limite significative

En revanche, la majorité des extraits provenant des stations portuaires se sont révélés (cyto)toxiques pour *E. coli* et les souches *Salmonella*, en absence de S9. Ce test semble donc aussi approprié que le Microtox pour détecter des effets cytotoxiques sur des organismes bactériens. L'activation métabolique des substances

présentes dans les échantillons a causé une réduction de la (cyto)toxicité pour l'ensemble des souches bactériennes testées (annexe M). Ceci est possiblement attribuable à des processus de détoxification ou à la complexation de certaines substances toxiques (fort probablement des métaux) aux protéines du S9 (Legault *et coll.*, 1995). Cette réduction était particulièrement notable avec la souche *Salmonella* TA100. Des différences, entre les souches, au niveau des mécanismes de réponse biologique face aux lésions de l'ADN peuvent expliquer ce phénomène. En fait, la souche TA100 se différencie de la souche TA135 (utilisée dans le *Umu*-test) ainsi que des autres bactéries utilisées par la présence d'un plasmide (pKM101) qui augmente la résistance à la (cyto)toxicité de plusieurs mutagènes, aux dépens d'une sensibilité accrue à la mutagénèse (Kenyon, 1983).

3.3.1.1 Comparaisons inter-sites

Site de l'Anse-à-Beaufils: aire de dragage vs aire d'immersion

Comparativement aux stations échantillonnées à l'intérieur du port en 1993 (Bureau *et coll.*, 1995), les sédiments provenant de l'aire d'immersion AB-5 n'ont révélé aucune génotoxicité en 1994, bien qu'un seul test n'a été réalisé (SOS Chromotest). Les effets génotoxiques les plus importants en 1993 ont été notés avec les stations 2 et 6 (et son réplicat, l'échantillon 11) de l'aire de dragage.

3.3.1.2 Cytotoxicité vs génotoxicité

Site de l'Anse-à-Beaufils: aire d'immersion

De façon générale, les analyses biologiques réalisées dans la présente étude suggèrent que les sédiments immergés à l'Anse-à-Beaufils ne sont ni cytotoxiques (section 2), ni génotoxiques pour la faune endobenthique. En fait, les seuls effets toxiques observés résultaient d'une exposition bactérienne (test Microtox) à des concentrations très élevées de contaminants (extrait organique), non-représentatives des concentrations retrouvées dans le milieu.

Cap-aux-Meules: aire de dragage

Bien que certains sédiments de Cap-aux-Meules ont causé des effets cytotoxiques importants chez *V. fischeri* (section 2), un très faible pourcentage (9%) ont révélé des effets génotoxiques sur des organismes bactériens. Les stations de l'aire de confinement (1) semblent principalement responsables de la toxicité observée dans ces essais.

3.3.2 MARQUEURS BIOCHIMIQUES

Tel que le démontrent les résultats qualitatifs (tableau 9), l'exposition des cultures cellulaires aux extraits organiques des sédiments a causé une induction des OFM dans près de 50% des cas (17 échantillons sur 35). Des inductions importantes ont été obtenues avec des échantillons provenant de deux des trois aires de dragage proposées, soit les Aires 1 (station 1) et 2 (stations 8 et 14). En revanche, les sédiments de l'Aire 3 (loin du havre, comparativement aux aires 1 et 2) et du site de référence (mis à part l'échantillon 21A-dupl.1) n'ont causé aucune réponse inquiétante ($< 0.2 \mu\text{L/mL}$) en ce qui concerne ce système enzymatique (annexe O).

L'existence d'une association possible entre les résultats des tests APA et OFM fut suspectée et évaluée pour la raison suivante: plusieurs hydrocarbures polycycliques aromatiques tels que le benzo(a)pyrène, détecté dans certains échantillons du site de dragage, requièrent une oxidation métabolique par le cytochrome P450-A1 pour exercer une action génotoxique ou cytotoxique. Dans certains cas, cette activation transforme les composés en électrophiles qui peuvent former des complexes avec des protéines, particulièrement l'ADN (Gagné et Blaise, 1995). Il est donc possible que cette complexation cause des lésions génétiques chez l'organisme exposé.

Le taux de concordance entre l'essai APA et l'induction des OFM fut calculé comme suit:

$$c = \frac{\text{somme des paires de données en accord, soit } +/+ \text{ ou } -/-}{\text{nombre total de paires}} \times 100$$

Un faible pourcentage ($c=30\%$) des échantillons qui se sont révélés positifs lors du test APA ont également causé une réponse au niveau des OFM.

En ce qui concerne les MT, des résultats surprenants ont été obtenus. L'exposition des cellules hépatiques de poissons aux extraits organiques des sédiments a causé une induction des MT dans 31% (10 échantillons sur 32) des cas, suggérant la présence de composés métalliques dans les extraits. La majorité de ces inductions furent observées avec les sédiments de l'aire 3, soit les stations allant de 17 à 20 (tableau 9). Tel que mentionné à la section 3.1.2, il est reconnu que les MT sont principalement induites par des métaux traces comme le mercure, le cadmium et le zinc. Or, en raison des propriétés inhérentes au solvant utilisé pour l'extraction des substances organiques, les extraits ne devraient pas contenir de métaux lourds, du moins sous forme d'ions libres. Cependant, il est possible que l'induction des MT observée soit attribuable à la présence de composés organométalliques, tels que les organoétains, dans la fraction organique des sédiments à l'étude. Les composés organoétains, tels que le tributyltin (TBT) et le triphenyltin (TPT), non-manufacturés au Canada mais

largement utilisés comme agents biocides dans les peintures, sont parfois retrouvés en quantités importantes dans les sédiments (Dowson *et coll.*, 1993; Becker et Bringezu, 1992). Ces composés se dégradent généralement très lentement dans les systèmes aquatiques, s'accumulent dans les organismes et les sédiments et peuvent causer des effets toxiques à des concentrations aussi faibles que quelques ng/L (Becker et Bringezu, 1992). Une analyse chimique des extraits organiques, telle que recommandée à la section 2.4.6, aurait permis de confirmer/infirmier la présence de complexes métalliques dans cette fraction sédimentaire. À notre connaissance, aucune étude n'a évalué les effets que pourraient avoir les organoétains sur les MT. Les effets mutagéniques de ces composés (Hamasaki *et coll.*, 1993), ainsi que leur action sur les systèmes enzymatiques hépatiques des truites (*O. mykiss*), par exemple le cytochrome P-450 sont toutefois connus (Fent et Bucheli, 1994).

3.3.3 ANALYSES DE CONCORDANCE ENTRE LES ANALYSES BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES

Les données de viabilité cellulaire obtenues par le biais du test APA semblent fortement corrélées ($r = 0.85$) avec les résultats du test sur les MT. En revanche, la corrélation entre ce premier paramètre et les deux autres mesures obtenues sur cultures cellulaires, soit la précipitation alcaline de l'ADN (génotoxicité) et l'induction des OFM, est relativement plus faible ($r = 0.49$ dans les cas de l'APA et $r = 0.48$ pour les OFM). Ceci laisse supposer que la cytotoxicité observée est due à la présence de composés organométalliques dans les extraits. L'absence de corrélation canonique entre les mesures biologiques (viabilité cellulaire, APA, OFM et MT) et la plupart des données chimiques (HAP, BPC et pesticides) appuie cette affirmation (Tableau 11). La situation est toutefois différente dans le cas des chlorobenzènes détectés dans les extraits; ainsi, les concentrations mesurées sont fortement corrélées avec les CMEO pour l'induction des OFM ($r = -0.63$; Tableau 11). La valeur négative du coefficient r indique que des CMEO d'extraits organiques relativement faibles (dénnotant une toxicité importante) sont corrélées avec des teneurs élevées en chlorobenzène. Toutefois, à notre connaissance, le potentiel d'induction des OFM par des chlorobenzènes n'est pas connu.

L'analyse à fonction discriminante effectuée à partir des essais réalisés sur cultures cellulaires de truites n'a établi aucune distinction (1) entre les aires de dragages proposées par Environnement Canada (soit 1,2 et 3 - voir Tableau 2), et (2) entre ces dernières et la zone de référence ($p > 0.1$; Wilks' Lambda=0.50). Par conséquent, bien que ces mesures biologiques aient démontré un taux de réponses positives supérieur aux tests de génotoxicité sur organismes bactériens (SOS Chromotest, Mutatox®, Umu et test de fluctuation), démontrant ainsi la plus grande sensibilité des cellules hépatiques de truites à la présence de contaminants, ils ne permettent pas de distinguer des aires sédimentaires de niveaux de contamination différents. Cependant,

il est possible que des sédiments caractérisés par des niveaux de contamination supérieurs à ceux de Cap-aux-Meules se distinguent plus facilement de matrices faiblement contaminées sur la base de ces tests.

Tableau 11. Corrélations entre les réponses biologiques obtenues avec les cultures cellulaires de truites (*O. mykiss*) et les mesures chimiques des sédiments de Cap-aux-Meules.

Paramètres chimiques/biologiques	Viabilité cellulaire	APA	OFM	MT
HAP - type 1	-0.01	0.14	-0.25	0.01
HAP - type 2	0.05	0.22	-0.21	0.08
HAP totaux	0.04	0.2	-0.21	0.05
BPC totaux	0.42	0.2	0.21	0.27
CB ¹	-0.21	-0.1	-0.63	-0.03
Pesticides	0.11	0.17	-0.1	-0.11

¹ Chlorobenzènes

En résumé, il est impossible, à la lumière des résultats obtenus sur le potentiel génotoxique et biochimique des sédiments marins, de tirer des conclusions irrévocables sur l'applicabilité des essais considérés ici pour l'évaluation de la toxicité de sédiments marins. Tel que mentionné au début du présent chapitre, certains de ces tests, par exemple l'APA, l'induction des MT et l'induction des OFM, sont encore au stade de développement au Laboratoire du Centre Saint-Laurent. De plus, les protocoles des essais de génotoxicité et de mutagénicité tels que le SOS Chromotest et le test de fluctuation ne sont pas encore adaptés à des échantillons sédimentaires. Aucune étude, à notre connaissance n'a porté sur la répétabilité de ces tests lorsqu'effectués sur des extraits organiques de sédiments. Ils mériteraient donc de faire l'objet de telles évaluations avant d'être considérés dans une approche de gestion de sédiments contaminés. En fait, les problèmes rencontrés lors de la réalisation de ces essais étaient principalement attribuables à la matrice utilisée, soit la fraction organique des sédiments. Par conséquent, la méthode d'extraction des substances organiques, essentielle pour la réalisation de ces tests biologiques, demande certaines modifications afin de conserver, dans la limite du possible, la composition physico-chimique «originale» des échantillons.

SECTION IV

ÉVALUATION DU POTENTIEL ÉCOTOXIQUE DES SÉDIMENTS MARINS VIA L'INDICE ECOTOX

4.1 CONTEXTE

Le programme d'Immersion en mer d'Environnement Canada, tel que mentionné dans la première partie du rapport, a pour but d'assister les promoteurs et gestionnaires responsables de la réalisation ou de l'évaluation des projets de dragage dans le Saint-Laurent. La batterie de bioessais et l'approche pour l'établissement de critères de qualité proposées dans le présent document s'inscrivent dans cette démarche en offrant aux intervenants et organismes impliqués une base cohérente et scientifiquement défendable pour la prise de décision face à l'utilisation de déblais de dragage contaminés.

Jusqu'à présent, les critères de qualité des sédiments utilisés pour cette prise de décision au Canada sont basés sur (1) les concentrations chimiques de contaminants mesurées pour différents sites et (2) des données sur la coexistence de l'endofaune benthique (EC et MEF, 1992). Ainsi, selon cette approche, lorsque la concentration de toutes les substances prioritaires (exprimées en poids sec) se situe au premier niveau (SSE) ou en-dessous de celui-ci, l'environnement est jugé sécuritaire pour les organismes benthiques et exempt de pollution. Lorsque la concentration de ces substances se situe à égalité ou en-dessous du niveau 2 (SEM), les sédiments peuvent avoir des effets toxiques minimaux sur la faune benthique. En dernier lieu, lorsque la concentration d'un contaminant trouvé dans les sédiments excède le seuil d'effets mineurs (SEM), des effets toxiques significatifs sur les organismes benthiques sont appréhendés. La réalisation de biotests standardisés est alors requise.

Bien qu'elle offre une certaine base scientifique pour la prise de décision et qu'elle soit économiquement avantageuse, cette approche comporte toutefois des limitations importantes. Entre autres, l'évaluation de la toxicité des sédiments ne tient compte que d'une portion des substances potentiellement présentes dans la matrice et considère chacun de ces composés de façon individuelle. En d'autres termes, l'évaluation ne porte pas sur la toxicité du sédiment dans son ensemble et par conséquent, ne considère pas les interactions potentielles entre les composés chimiques présents et entre ces derniers et le sédiment (Chapman et coll., 1987). De plus, une variété de propriétés physico-chimiques des sédiments marins et des agents chimiques peuvent influencer la biodisponibilité des agents chimiques. Pensons notamment à la granulométrie et à la teneur en carbone organique du sédiment, deux aspects qui ont été abordés dans la deuxième section du présent document. En revanche, une vaste gamme de réactions chimiques, biotiques ou abiotiques, peuvent survenir et modifier la structure d'un composé ainsi que les associations entre les contaminants et les différentes phases sédimentaires. Une révision de ces réactions est fournie entre autres par Brown et Neff (1993). Enfin, les analyses biologiques ne sont considérées qu'en dernier recours, c'est-à-dire lorsque les

concentrations chimiques dépassent le SEM.

Une autre méthode utilisée notamment aux États-Unis pour évaluer le potentiel toxique des sédiments marins est l'approche tripartite (constituée de trois niveaux d'investigation), recommandée par l'Agence Américaine de Protection Environnementale (U.S.E.P.A. and Department of the Army, 1991). Cette méthode s'appuie sur les correspondances entre trois types de mesure: l'analyse chimique des sédiments, les essais de toxicité et les effets biologiques *in situ* (structure des communautés benthiques) (Chapman, 1989). Un désavantage majeur de cette approche est que les différents types d'analyses ne sont pas faits concurremment mais plutôt dans un ordre prédéterminé. De plus, la réalisation de bioessais n'est pas jugée nécessaire dans tous les cas. Ainsi, lorsque l'information chimique est jugée suffisante pour la prise de décision, aucune analyse supplémentaire n'est requise. Or, tel que discuté au paragraphe précédent, les facteurs physico-chimiques et biologiques pouvant potentiellement altérer la biodisponibilité des ces composés et par conséquent, la toxicité du sédiment, ne sont pas considérés.

Compte tenu des limitations inhérentes aux approches existantes, l'équipe du laboratoire du Centre Saint-Laurent travaille présentement au développement d'un indice d'effets écotoxiques des sédiments, l'indice ECOTOX, qui permet d'intégrer les différents effets biologiques mesurés dans une valeur unique. Cet outil de gestion des sédiments découle du BEEP (Barème d'effets écotoxiques potentiels), également développé par l'équipe du Centre Saint-Laurent pour comparer le potentiel toxique des effluents industriels. À l'encontre des approches citées aux paragraphes précédents, l'indice ECOTOX se base uniquement sur les essais biologiques. Ceci ne signifie pas, toutefois, l'exclusion des données chimiques de l'analyse. Au contraire, l'information que procure les analyses chimiques est jugée complémentaire à celle fournie par les bioessais et sert à appuyer les résultats biologiques obtenus ou à déterminer les causes probables des effets observés. Pour ce faire, nous recommandons la réalisation des analyses chimiques de façon concurrente avec les bioessais afin de minimiser les écarts entre les deux types de données.

La présente section expose les grandes lignes de l'approche proposée. Elle débute par une brève discussion des raisons ayant conduit au développement de l'indice et de la stratégie utilisée pour l'évaluation écotoxicologique des sédiments à l'étude. Dans un deuxième temps, une révision des aspects fondamentaux (phases sédimentaires, types de bioessais, niveaux de toxicité, organismes cibles, paramètres d'effet, unités de mesure) et des calculs mathématiques sur lesquels repose l'indice est fournie. Enfin, les auteurs démontrent l'application de cet outil pour l'établissement de niveaux de référence pouvant faciliter la prise de décision

quant aux activités de dragage ou d'immersion de sédiments marins. L'ensemble des données recueillies en 1993 et en 1994 est utilisé pour le calcul de l'indice ECOTOX.

4.2 PROBLÉMATIQUE ET STRATÉGIE D'ÉVALUATION ÉCOTOXICOLOGIQUE DES SÉDIMENTS MARINS

Un certain nombre de questions sont soulevées lors de l'évaluation ou de la comparaison du potentiel toxique d'échantillons sédimentaires. Par exemple, quel test et quel phase sédimentaire devrait-on considérer? Comment peut-on comparer la toxicité de deux sédiments donnés lorsque des effets sont observés à des niveaux d'organisation biologique différents (organisme entier, cellulaire, génétique et biochimique), à des niveaux trophiques différents (décomposeurs, producteurs, consommateurs), ou encore, dans des fractions sédimentaires différentes (eau interstitielle, phase solide, extraits organiques)? Est-ce qu'un sédiment exerçant une toxicité élevée à un seul niveau trophique devrait être considéré comme moins inquiétant qu'un autre démontrant une légère toxicité mais à plusieurs niveaux? Devrait-on accorder autant d'importance aux effets mesurés au niveau moléculaire (par exemple génotoxicité et induction de protéines) qu'à ceux détectés au niveau cellulaire ou de l'organisme entier? Et enfin, comment comparer des résultats qui sont exprimés sous différentes formes (ppm, $\mu\text{L} / \text{mL}$, % v/v)? Il est évident que ces questions nécessitent le développement d'une approche empirique jumelé à un jugement de valeur pour permettre l'établissement de critères de qualité et la prise de décision. L'indice ECOTOX permet de répondre à l'ensemble de ces questions en intégrant les données biologiques par phase sédimentaire d'intérêt dans une seule valeur. Cet indice peut alors être utilisé pour établir différents niveaux d'effets (toxicité nulle, marginale, modérée et élevée) ou encore pour comparer deux sédiments ou deux fractions sédimentaires différentes.

La stratégie utilisée pour évaluer le potentiel écotoxicologique des sédiments marins comporte cinq étapes principales: (1) la sélection des compartiments ou fractions sédimentaires d'intérêt; (2) la sélection des bioessais; (3) l'uniformisation des données bioanalytiques; (4) la détermination de niveaux de toxicité relatifs; et (5) l'intégration des données par compartiment (ou phase) dans l'indice ECOTOX. Ces étapes sont décrites dans les sections qui suivent.

4.3 ASPECTS FONDAMENTAUX DE L'INDICE ECOTOX

L'indice repose essentiellement sur l'utilisation de biotests pour évaluer la toxicité potentielle d'un mélange complexe de produits chimiques présents dans un sédiment donné. Les bioessais permettent d'intégrer l'ensemble des phénomènes physico-chimiques et biologiques (additivité, synergisme ou antagonisme entre

les contaminants, interactions entre le sédiment et les composés chimiques) qui influencent la biodisponibilité et par conséquent, la toxicité d'un sédiment.

4.3.1 FRACTIONS SÉDIMENTAIRES ANALYSÉES

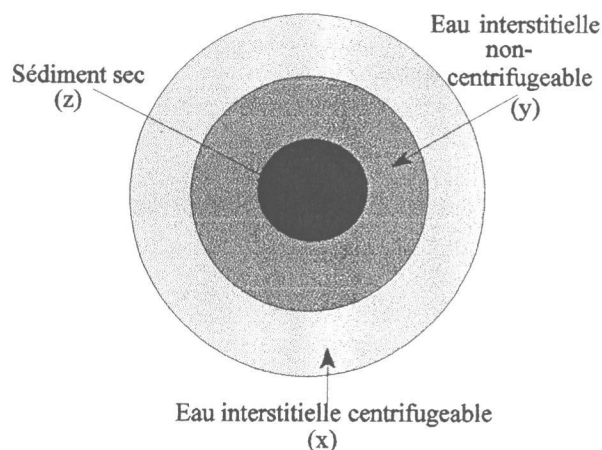
L'un des points les plus importants à considérer lors de l'évaluation de la toxicité d'un sédiment est sans aucun doute le choix des phases sédimentaires à analyser. Dans le cadre de la présente approche, un sédiment type est considéré comme une matrice hétérogène composée de trois phases, séparables par certains procédés physiques et/ou chimiques. Ces phases sont: (1) l'eau interstitielle, (2) la fraction solide-humide (ci-après dénommée solide) et (3) la fraction organique (extraits organiques). La centrifugation du sédiment entier permet de séparer les deux premières fractions comme suit: le surnageant qui constitue la phase aqueuse (eau interstitielle centrifugeable ou variable x) et le sousnageant qui correspond à la fraction solide du sédiment. Il est donc approprié d'affirmer que ces deux phases sont complémentaires et qu'ils fournissent des informations différentes en ce qui a trait au potentiel toxique des sédiments. Il est possible que les extraits organiques, qui proviennent également du sédiment entier, fournissent peu d'informations supplémentaires aux deux phases sus-dénommées; la fraction organique est toutefois considérée comme une phase distincte pour les besoins de simplicité de l'analyse. Certains auteurs considèrent également l'élutriat comme une quatrième fraction sédimentaire (p. e. Burton, 1991), mais celle-ci n'est pas utilisée dans la présente étude.

Après extraction de l'eau interstitielle, la dessiccation (pendant 24h à $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) de la fraction solide du sédiment permet également d'obtenir deux sous-fractions, soit le sédiment sec (variable z) et l'eau résiduelle (eau interstitielle non-centrifugeable ou variable y) (figure 22). Le poids de ces sous-fractions est utilisé dans le calcul de l'indice ECOTOX (voir section 4.3).

Bien que la toxicité de certains types de contaminants puisse être détectée par plus d'une phase (p. e. des agents hydrophobes adsorbés aux particules pourraient se retrouver autant dans la fraction solide que dans les extraits), chaque fraction de sédiment est spécifique à certaines classes de contaminants (figure 23). Par conséquent, les résultats des essais réalisés sur les différentes fractions peuvent être, en partie, considérés comme complémentaires les uns aux autres. Ces phases représentent, de plus, différentes voies d'exposition possibles pour les organismes benthiques, soit (1) contact ou ingestion d'eau interstitielle, (2) contact ou ingestion de particules sédimentaires (organique et inorganique). Les contributions relatives de chacune d'elles à la bioaccumulation des contaminants sont peu connues mais semblent dépendre du type de sédiment, du groupe de produits chimiques concerné et de l'organisme étudié. Quant à la fraction organique, l'exposition

à diverses concentrations d'extrait organique lors d'essais de toxicité est de beaucoup supérieure à celle présumée en conditions naturelles. De plus, la procédure d'extraction utilisée dans la présente étude est spécifique aux composés organiques neutres et non-ioniques (tels que les hydrocarbures aromatiques et chlorés). Par conséquent, il est peu probable que l'utilisation des extraits représente fidèlement la composition chimique du sédiment analysé et les voies d'exposition réelles. Néanmoins, ils permettent d'évaluer spécifiquement la présence (ou l'absence) de telles substances dans les échantillons, ainsi que les effets possibles sur les organismes benthiques.

Figure 22. Sous-fractions sédimentaires considérées dans le calcul de l'indice.

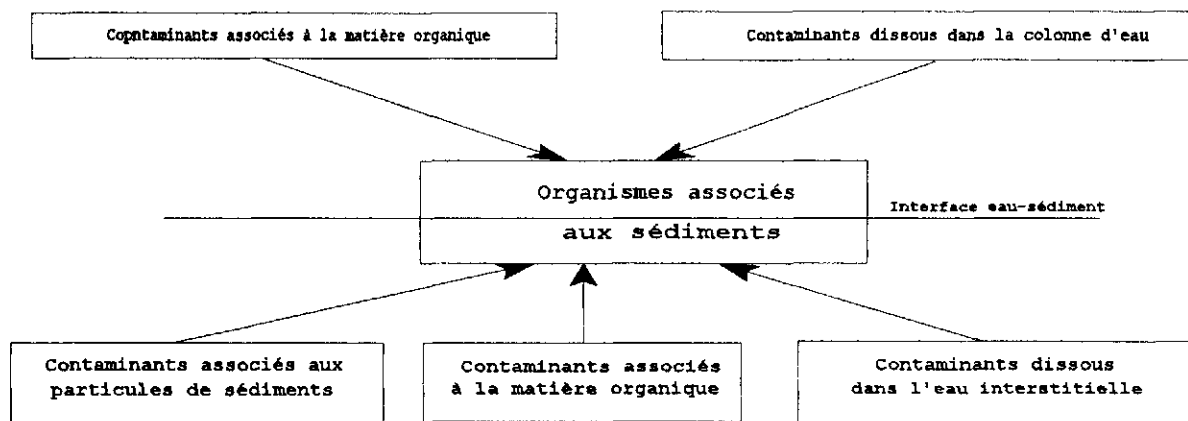


En ce qui concerne la composition chimique de la matrice sédimentaire, une vaste gamme d'agents chimiques peut être détectée dans les échantillons. Ceux-ci incluent les métaux lourds, les composés organométalliques ainsi que les substances organiques non-polaires et polaires. Les paragraphes suivants tentent de déterminer la distribution possible de ces classes de contaminants dans les trois phases sédimentaires analysées, en se basant sur les propriétés physico-chimiques des composés.

Dans le cas des métaux lourds, une fraction importante des composés présents dans les sédiments est fortement sorbée aux particules. Les analyses d'extraction séquentielle ont été largement utilisées pour déterminer la distribution des métaux lourds dans les différentes phases sédimentaires. De façon générale, de trois à six fractions sont définies dans ces analyses, notamment les carbonates, les métaux associés à la fraction organique et les formes oxydées. Les associations dominantes varient selon les métaux. Par exemple le cuivre et le mercure ont une affinité importante pour la sorption aux phases organiques des sédiments oxydés, alors que l'arsenic, le cadmium, le plomb et le zinc sont préférentiellement sorbés aux oxydes de fer et de

manganèse (Brown et Neff, 1993). Les métaux lourds peuvent également se retrouver dans l'eau interstitielle, sous forme d'ions libres ou associés à des ligands organiques ou inorganiques (Jenne et Zachara, 1984).

Figure 23. Exposition des organismes benthiques aux contaminants présents à l'interface eau-sédiment.



Il existe très peu d'informations sur le comportement des organométalliques tels que les organoétains dans le milieu aquatique et les données disponibles concernent essentiellement les triorganoétains (TBT). Les sédiments semblent jouer un rôle important dans le stockage du TBT et ce produit a une affinité particulière pour les vases, les argiles et les sables. La forme chimique du TBT en eau de mer est encore mal connue mais certains auteurs estiment que trois formes sont généralement en équilibre, soit les chlorures, les hydroxydes et les carbonates (Laughlin *et coll.*, 1986). Dans l'eau de mer, le TBT se trouverait essentiellement à l'état dissous, les quantités adsorbées aux particules augmentant en fonction de la salinité. La présence de groupements organiques sur un élément organique a pour conséquence d'accroître le caractère lipophile de la molécule.

La solubilité d'un composé organique dans un milieu polaire tel que l'eau de mer est, en grande partie, déterminée par la capacité du produit à interagir de façon électrochimique avec l'eau par la formation de liens hydrogène ou par des interactions ion-dipole (Olsen *et coll.*, 1982). Les composés organiques non-polaires neutres, tels que les HAP, BPC et pesticides organochlorés, de par leur faible affinité pour la phase aqueuse,

ont généralement une forte affinité pour les particules ou la surface des sédiments (Olsen et coll., 1982). Ils ont également une forte affinité pour les phases organiques faiblement solubles dans l'eau. Par conséquent, ces composés tendent à se répartir et à sorber aux phases organiques disponibles, par exemple les tissus biologiques, le revêtement organique des particules sédimentaires ou encore les particules organiques (substances humiques et détritiques organiques) (Karickhoff et coll., 1979).

Les composés organiques non-polaires et ioniques, par exemple les phénols, amines et acides carboxyliques sont principalement hydrophobes, mais possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels ionisables. Ces composés n'ont pas été analysés dans le cadre de la présente étude mais ceci n'exclut pas la possibilité qu'ils soient présents dans les sédiments. La répartition de ces substances dans un échantillon sédimentaire est très difficile à déterminer puisqu'elle dépend de l'état ionique du composé qui à son tour, dépend du pH du milieu ambiant (Brown et Neff, 1993).

Certains composés organiques polaires et ioniques, tels que les surfactants retrouvés dans les détergents, portent une charge positive ou négative permanente en plus de la portion hydrophobe de la molécule. À de faibles concentrations en milieu aqueux, les polymères tendent à sorber très fortement et de façon irréversible aux particules sédimentaires (Podoll *et coll.*, 1987). Cette sorption irréversible est due, en grande partie, à un phénomène d'adsorption multi-segmentaire. En d'autres termes, plusieurs segments de la molécule forment des liens avec la surface sorbante. Dès que ces segments sont adsorbés, il est statistiquement improbable que tous les segments se désorbent de façon simultanée, causant la libération du polymère en solution. Tout comme les composés non-polaires, la présence de ces contaminants dans les sédiments n'a pas été évaluée.

À la lumière de ces informations, il est possible d'avancer que (1) les tests sur l'eau interstitielle nous indiquent la présence ou l'absence de certaines formes de métaux lourds et de substances hydrophiles susceptibles de se diffuser dans la colonne d'eau ; (2) la phase solide est applicable principalement aux substances ayant une capacité d'adsorption pour les sédiments; ceci inclut potentiellement l'ensemble des classes définies ci-dessus; et (3) les extraits organiques renferment des composés hydrophobes, non-volatiles (en raison de l'évaporation du DCM), (ab)adsorbés aux sédiments, tels que les substances organiques non-polaires (hydrocarbures aromatiques ou chlorés) et les dérivés organiques de métaux (composés organométalliques).

4.3.2 SÉLECTION DES BIOESSAIS

Treize essais de toxicité sublétales et deux de toxicité létale ont été réalisés dans le cadre de cette étude (tableau 12). Ces tests couvrent une variété d'organismes et mesurent une gamme de paramètres d'effets. Les organismes soumis aux essais représentent différentes catégories taxinomiques, allant des bactéries aux poissons, ainsi que divers groupes trophiques, soit des décomposeurs aux omnivores.

Tableau 12. Bioessais utilisés en 1993 et 1994 pour l'évaluation écotoxicologique des sédiments marins.

Organisme	Espèce	Niveau trophique	Essai	Niveau de toxicité	Paramètre d'effet	Paramètre de mesure	Unité de mesure	Année
Bactérie	<i>Vibrio fischeri</i>	décomposeur	Microtox	sublétales aiguës	inhibition de luminescence	CI ₅₀	% v/v, ppm, µL/mL	93-94
Bactérie	<i>V. fischeri</i> M169	décomposeur	Mutatox	sublétales chroniques	génétoxicité et cytotoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	94
Bactérie	<i>Escherichia coli</i>	décomposeur	Toxi-Chromotest	sublétales chroniques	induction biochimique	CMEQ, CSEO	% v/v	93
Bactérie	<i>E. coli</i> PQ37	décomposeur	SOS Chromotest	sublétales chroniques	génétoxicité et cytotoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93-94
Bactérie	<i>Salmonella typhimurium</i>	décomposeur	test Umu	sublétales chroniques	génétoxicité et cytotoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	94
Bactérie	<i>S. typhimurium</i> TA100	décomposeur	test de fluctuation	sublétales chroniques	mutagénicité et cytotoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	94
Oursin	<i>Lytechinus pictus</i>	herbivore	essai de fertilisation	sublétales chroniques	inhibition de la fécondation	CMEQ, CSE O, CI ₂₅	%	93-94
Amphipode	<i>Rhepoxynius abronius</i>	omnivore	essai de survie	léthales aiguës	mortalité	CL ₅₀	%	93
Amphipode	<i>Amphiporeia virginiana</i>	omnivore	essai de survie	léthales aiguës	mortalité	CL ₅₀	%	93-94
Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	omnivore	APA	sublétales chroniques	génétoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93-94
Poisson	<i>O. mykiss</i>	omnivore	NTA	sublétales chroniques	génétoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93
Poisson	<i>O. mykiss</i>	omnivore	viabilité cellulaire	sublétales chroniques	cytotoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93-94
Poisson	<i>O. mykiss</i>	omnivore	rhodamine 123	sublétales chroniques	cytotoxicité	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93
Poisson	<i>O. mykiss</i>	omnivore	OFM	sublétales chroniques	induction biochimique	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93-94
Poisson	<i>O. mykiss</i>	omnivore	MT	sublétales chroniques	induction biochimique	CMEQ, CSEO	µL/0.2 mL	93-94

Le but visé ici par l'utilisation d'une batterie de tests comportant plusieurs catégories d'organismes n'est pas de comparer les réponses observées entre ces catégories mais plutôt d'augmenter potentiellement les chances de détecter des effets toxiques. Ceci est dû au fait que chaque groupe taxinomique démontre une vulnérabilité particulière à certains types de contaminants. Il importe de mentionner à nouveau qu'aucune espèce végétale n'a été analysée au cours de la présente étude. Bien que les plantes aient un contact limité avec les sédiments, il serait important de les inclure dans l'évaluation écotoxicologique de telles matrices puisqu'elles représentent un élément essentiel de cet écosystème. De plus, elles diffèrent grandement des espèces animales au niveau

de leur métabolisme et sensibilité aux produits chimiques.

Le type d'effet mesuré, plus particulièrement le niveau d'organisation qu'il représente, est un autre aspect important d'une batterie de tests biologiques. Dans le cas présent, il varie du niveau biochimique (enzymatique), par exemple les tests d'induction de la MT et des OFM, au niveau de l'organisme, tel que représenté par les essais de survie (amphipodes) et de fertilisation (oursins). En revanche, les essais Microtox et Toxi-Chromotest (utilisé en 1993 seulement) fournissent des informations au niveau cellulaire, alors que le SOS Chromotest, le Mutatox, le test *Umu*, l'essai de fluctuation et l'APA portent sur l'aspect génétique de l'organisme. Le principe important, tel qu'énoncé par différents auteurs, est que le déplacement vers des niveaux inférieurs d'organisation biologique permet de découvrir les causes ou les mécanismes du phénomène observé par exemple au niveau de l'organisme entier, alors qu'une ascension vers des niveaux supérieurs aide à découvrir les conséquences d'un phénomène observé à un niveau inférieur (p. e., au niveau génétique).

Afin de couvrir le plus d'échelons d'organisation biologique possibles, nous avons conservé l'ensemble des essais présentés au tableau 12, à l'exception du SOS Chromotest (génotoxicité), du Mutatox, du test *Umu* et du test de fluctuation. Ces derniers n'ont pas été considérés dans l'analyse en raison de l'absence d'effets observés et du faible nombre d'échantillons de sédiments analysés. En somme, un essai de toxicité fut réalisé sur le sédiment en entier, deux sur l'eau interstitielle, deux (seulement un en 1994) sur la fraction solide et cinq sur les extraits organiques (tableau 13).

Par ailleurs, comme mentionné en troisième section du présent rapport, les essais sur hépatocytes de truites sont présentement en stade de développement au laboratoire du Centre Saint-Laurent, soit les tests de viabilité cellulaire et d'intégrité mitochondriale, l'APA, le NTA, ainsi que les essais biochimiques (MT et OFM). De plus, l'effet mesuré chez les amphipodes offre peu d'information pertinente à l'évaluation écotoxicologique des sédiments à l'étude puisque les tests sont effectués à une seule dose, soit 100% du sédiment entier. Pour cette raison, l'indice est calculé de deux façons, tel que décrit ultérieurement: (1) T (total): intégration de l'ensemble des onze essais apparaissant au tableau 13 et (2) S (simplifié): exclusion des sept essais sus-mentionnés.

Tableau 13. Bioessais réalisés sur les différentes fractions sédimentaires en 1993 et 1994 et considérés dans le calcul de l'indice ECOTOX.

Tests biologiques	Eau interstitielle	Fraction solide	Extraits organiques
Oursin	x		
Microtox	x	x	x
Toxi-Chromotest*		x	
SOS Chromotest (cytotoxicité)			x
Intégrité mitochondriale			x
Viabilité cellulaire			x
Intégrité mitochondriale*			x
APA			x
NTA			x
OFM			x
MT**			x
* réalisé en 1993 seulement ** réalisé en 1994 seulement			

4.3.3 UNIFORMISATION DES DONNÉES ANALYTIQUES

Tel que démontré au tableau 12, les unités de mesure utilisés pour chacun des essais varient considérablement. L'un des principes fondamentaux de l'approche proposée est de simplifier l'ensemble des données biologiques de façon à faciliter l'interprétation et la prise de décision. Cet exercice s'effectue en six étapes principales:

- (a) détermination de la valeur correspondant à 100% v/v (ou p/v) pour chacun des paramètres de mesure et transformation des données en unités toxiques sublétaux (UTs) par bain d'essai;
- (b) calcul de la masse de poids sec de sédiment (z) associé au bain d'essai;
- (c) expression des données en termes de UTs / g sec;
- (d) détermination des limites de détection (LDet) de chacun des bioessais en UTs / g sédiment sec;
- (e) établissement des seuils et niveaux de toxicité absolue pour chacun des bioessais; et
- (f) estimation des facteurs d'accroissement de toxicité par rapport aux limites de détection (Fac) ainsi que des seuils et niveaux de toxicité relative pour l'indice ECOTOX-S.

4.3.3.1 Transformation en UTs

Le concept des unités toxiques est très utilisé en écotoxicologie pour l'expression de la toxicité en valeur absolue. Elle est déterminée en divisant la valeur de 100% v/v (ou p/v) par la concentration correspondant au

paramètre de mesure mesuré. Le 100% v/v ou p/v est déterminé différemment, dépendamment des unités de mesure utilisés:

- (a) dans le cas où les résultats de toxicité sont déjà exprimés en % (tel que le Microtox sur eau interstitielle, le test d'oursins et le Toxi-chromotest), le 100%v/v (p/v) prend la valeur de 100;
- (b) dans le cas où les résultats de toxicité sont exprimés en ppm (comme le Microtox sur phase solide), le 100% p/v équivaut à 1×10^6 ; et
- (c) enfin, lorsque les résultats sont exprimés en $\mu\text{L} / \text{mL}$, deux solutions se présentent: (1) transformer les résultats en % et les traiter comme au point (a), ou (2) considérer le 100% v/v comme étant équivalent au volume maximal du bain d'essai. Dans la présente étude, nous avons opté pour la deuxième solution. Ainsi, dans le cas du Microtox sur extraits organiques le 100% prend la valeur de 1 (volume = 1 mL), alors que pour les tests en microplaques (essais décrits dans la Section III), il est équivaut à 0.2 (volume = 0.2 mL).

Par exemple, dans le cas des tests Microtox, le calcul des UTs se fait comme suit:

Eau interstitielle:	$UTs = 100 / CI_{50} (\%v/v)$
Extraits organiques	$UTs = 1 / CI_{50} (\mu\text{L} / \text{mL})$
Phase solide	$UTs = 1 \times 10^6 / CI_{50} (\text{ppm})$

4.3.3.2 Calcul du paramètre z

La deuxième étape consiste à déterminer la masse de sédiment sec (z) associée au bain d'essai. Les résultats de cette transformation apparaissent à l'annexe Q. La variable z est évaluée à partir des pourcentages d'humidité totale (équivalent au volume total d'eau interstitielle recueillie par centrifugation) et résiduelle (équivalent à la différence entre le poids de sédiment humide avant et après dessiccation) de chacun des échantillons (annexe R). Les formules mathématiques utilisées pour arriver à ce calcul sont les suivantes:

(1)	$w = \frac{100 - b}{b}$	où:	a =	% humidité totale
			b =	% humidité résiduelle
			w =	constante
			y =	poids d'eau interstitielle non-centrifugeable
(2)	$y = \frac{100 - a}{aw + a - 100}$		z =	masse (g) de sédiment sec associé à 1 g d'eau interstitielle centrifugeable(x)
(3)	$z = wy$			

Notamment dans le cas de l'échantillon SJ1 provenant de Black Point (analysé en 1993), les pourcentages d'humidité totale -a- et résiduelle -b- sont de 37.2 et 22.7%, respectivement (annexe R); la masse de sédiment sec associée à 1g d'eau interstitielle centrifugeable -x- est donc de 3.34g (puisque $w = 3.41$ et $y = 0.98$).

En ce qui concerne les essais réalisés sur extrait organique, une autre variable -c- doit être utilisée afin de tenir compte du facteur de dilution utilisé. Cette variable représente la masse de sédiment entier associée au volume de diluant utilisé, soit 0.2 mL. Tel qu'indiqué à la formule 4, le calcul du c se base en partie sur le poids de sédiment utilisé pour l'extraction; en 1993, il était de 20 g, comparativement à 50 g en 1994.

$$(4) \quad c = \frac{m \cdot v_2}{v_1} \quad \text{où:} \quad \begin{array}{ll} m = & \text{poids de sédiment entier utilisé} \\ v_1 = & \text{volume de diluant utilisé} \\ v_2 = & \text{volume du bain d'essai} \end{array}$$

Il en résulte que la masse de sédiment entier associée à 0.2 mL de diluant est de 0.4 g [soit $(20 \text{ g} \cdot 0.2 \text{ mL}) / 10 \text{ mL}$] pour les échantillons analysés en 1993 et de 1 g [soit $(50 \text{ g} \cdot 0.2 \text{ mL}) / 10 \text{ mL}$] pour ceux testés en 1994. Le poids de sédiment sec (z) associé à la valeur c est ensuite calculé en utilisant le rapport z/p^1 , où p représente le poids de l'ensemble des sous-fractions sédimentaires utilisées pour obtenir l'extrait.

4.3.3.3 Expression de la toxicité en UTs / g sec

La toxicité des échantillons de sédiments se calcule comme ceci:

$$(5) \quad \text{Toxicité} = \frac{\text{UTs / bain d'essai}}{z/p \cdot (v_2 \text{ ou } c^1)}$$

4.3.3.4 Détermination de la LDet

Les troisième et quatrième étapes du processus d'uniformisation permettent, quant à elles, de réduire les écarts entre les données récoltées à l'aide de chacun des bioessais. L'estimation de la LDet se base sur la détermination des valeurs moyennes de $y - \bar{y}$ et $z - \bar{z}$ - obtenues en 1993 ($n = 20$) et en 1994 ($n=43$); ces moyennes sont de 0.9 et 2.5 g, respectivement, pour la première année et de 1.1 et 3.2, respectivement, pour

¹ Le poids total (g) de sédiment associé au banc d'essai (p) correspond à l'ensemble ou à certaines des fractions x , y et z définies précédemment. Le rapport z/p est utilisé afin de rapporter tous les résultats en termes de poids sec. Par exemple, dans le cas des essais réalisés sur l'eau interstitielle, la fraction sédimentaire utilisée correspond à la variable x . Or, tel que démontré à l'Annexe r, x fut attribué une valeur standard de 1 afin de pouvoir déterminer la valeur z correspondante. Par conséquent, pour les essais Microtox sur eau interstitielle et le test sur oursins, la variable p équivaut à 1. Pour les essais réalisés sur la phase solide, la fraction sédimentaire utilisée correspond au sous-nageant obtenu après centrifugation (soit $y + z$). Dans le cas des tests sur extraits organiques, le sédiment entier fut utilisé; par conséquent, $p = x + y + z$.

¹ Pour les tests sur eau interstitielle et phase solide le volume du bain d'essai est utilisé pour le calcul, alors que pour les extraits organiques, il importe de calculer la valeur du paramètre c . Dans le cas des essais Microtox, le volume du bain d'essai (v_2) est toujours de 1 mL. Pour le test sur oursin, il est de 10 mL.

la deuxième année [voir annexe R]. L'évaluation de la toxicité (UTs) minimale possible -LDet²- pour chacun des bioessais s'effectue en utilisant la formule 6. Tel qu'indiqué, la détermination des UTs se base sur la concentration maximale possible du paramètre de mesure utilisé:

$$(6) \quad \text{LDet} = \frac{100\%}{(\text{CMEQ ou CI50 max}) \cdot (z / p) \cdot (v_2 \text{ ou } c)}$$

Des exemples de calculs sont fournis à l'annexe S.

4.3.3.5 Définition des seuils et niveaux de toxicité absolue pour chacun des paramètres bioanalytiques

Dès lors que le niveau minimal de toxicité (UT/g sec) est déterminé pour chacun des tests concernés, il est possible de relativiser la toxicité des échantillons en établissant un certain nombre de niveaux. Tout comme pour l'analyse des résultats de toxicité bruts (voir tableau 3), quatre niveaux de toxicité sont fixés dans la présente approche, soit nulle, marginale, modérée et élevée. Ces niveaux sont délimités par l'établissement de trois seuils de toxicité, soit nulle, marginale et élevée.

Lorsque la valeur du paramètre de mesure pour un échantillon donné correspond à la LDet, la toxicité du sédiment en question est considérée nulle pour l'organisme concerné. Ceci est le cas notamment pour l'ensemble des sédiments de Black Point soumis au Microtox sur eau interstitielle (Bureau et coll., 1995).

Lorsque la valeur du paramètre de mesure pour un échantillon donné se situe au-delà de la limite de détection et en-deçà ou au seuil de toxicité marginal, la toxicité du sédiment en question est considérée comme marginale pour l'organisme concerné.

Lorsque la valeur du paramètre de mesure pour un échantillon donné se situe entre les seuils de toxicité marginal et élevé, la toxicité du sédiment en question est considérée comme marginale pour l'organisme concerné.

Enfin, lorsque la valeur du paramètre de mesure pour un échantillon donné est égale ou dépasse le seuil de toxicité élevé, la toxicité du sédiment en question est considérée comme élevée pour l'organisme concerné.

³ Étant donné que les paramètres de mesure utilisés originellement (CL₅₀, CMEQ) démontrent une relation inverse avec les UTs, la toxicité minimale possible, lorsqu'exprimée en UT, équivaut à la valeur maximale du paramètre de mesure utilisé (CL₅₀, CMEQ).

Pour ce qui est des trois seuils de toxicité (nulle, marginale et élevée), ils sont d'abord exprimés selon les unités de mesure utilisés pour chaque test (annexe U) puis transformés en UTs / g sec comme suit:

$$\begin{aligned}
 (7) \quad \text{Nulle (STn)} &= \text{voir formule 6} \\
 (8) \quad \text{Marginale (STm)} &= \frac{(100 / \text{seuil marginal}^1 \text{ en } \%)}{z / p \cdot (v_2 \text{ ou } c)} \\
 (9) \quad \text{Élevé (Sté)} &= \frac{(100 / \text{seuil modéré}^1)}{z / p \cdot (v_2 \text{ ou } c)}
 \end{aligned}$$

Les résultats de ces calculs sont présentés au tableau 14.

Tableau 14. Seuils de toxicité (exprimés en UT/g sédiment sec) déterminés pour chaque bioessai considéré.

Fraction sédimentaire	Essais / Seuils de Toxicité (ST)	Nulle (STn)	Marginale (STm)	Élevée (STé)
Eau interstitielle	Fertilisation des oursins	<0.04	0.31	3.13
	Microtox	<0.4	3.1	31.3
Phase solide	Microtox	<14	134	1340
	Toxi-Chromotest	<14	13.4	1340
Extrait organique	Microtox	<200	1656	16560
	SOS (cytotoxicité -S9 et +S9)	<250	1656	16560
	Viabilité des hépatocytes	<2500	16563	165630
	Intégrité mitochondriale (Rh123)	<2500	16563	165630
	APA	<2500	16563	165630
	NTA	<2500	16563	165630
	MT	<2500	16563	165630
	OFM	<2500	16563	165630

4.3.3.6 Détermination des Fac et des seuils de toxicité relative

En dernier lieu, pour chacun des bioessais, les seuils de toxicité nulle, marginale et élevée sont rapportés en Fac par rapport au niveau de toxicité nulle:

$$\begin{aligned}
 (10) \quad \text{Fac - nulle} &= \text{STn} / \text{STn} = 1 \\
 (11) \quad \text{Fac - marginale} &= \text{STm} / \text{STn}
 \end{aligned}$$

¹ Voir annexe U pour les seuils de toxicité nulle, marginal et élevée (exprimés en % v/v, ppm, ou µL/mL) pour chacun des essais

$$(12) \quad \text{Fac - élevée} = \text{STé} / \text{STn}$$

Par exemple, dans le cas de l'essai de fertilisation des oursins, le Fac-marginal est de 8 (0.31 / 0.04), alors que le Fac-élevé est de 78 (3.13 / 0.04). Le tableau 15 indique les seuils de toxicité, en termes de Fac, pour chacun des bioessais inclus dans l'indice ECOTOX. Ainsi, en termes relatifs, un Fac situé entre 1 et 8 représenterait, pour le test sur oursins, une toxicité marginale, alors qu'un Fac situé entre 8 et 78 pourrait être considéré dans la gamme de toxicité modérée. En revanche, un Fac supérieur ou égal à ($\geq$) 78 pour le même essai représenterait un potentiel toxique élevé pour l'organisme concerné.

Tableau 15. Seuils de toxicité relative (Fac) déterminés pour chaque bioessai considéré.

Fraction sédimentaire	Essais / Seuils de Toxicité (ST)	Nulle (STn)	Marginale (STm)	Élevée (STé)
Eau interstitielle	Fertilisation des oursins	1	8	78
	Microtox	1	8	78
Phase solide	Microtox (phase solide)	1	10	96
	Toxi-Chromotest	1	10 ¹	96
Extrait organique	Microtox	1	8	83
	SOS (cytotoxicité -S9 et +S9)	1	7	66
	Viabilité des hépatocytes	1	7	66
	Intégrité mitochondriale (Rh123)	1	7	66
	APA	1	7	66
	NTA	1	7	66
	MT	1	7	66
	OFM	1	7	66

Il est facile de constater que les résultats apparaissant à l'annexe Q varient grandement entre les échantillons à l'intérieur d'un même essai. L'essai Microtox sur extraits organiques (1994), par exemple, donne des valeurs variant de 14 à 1980 UT/g sédiment sec. En contrepartie, lorsque ces données sont exprimées par rapport au seuil mesurable du critère d'effet (Fac), elles varient entre 1 et 846 (annexe U), réduisant ainsi l'écart de moitié et uniformisant l'expression des résultats entre les divers paramètres de mesure.

¹ Dans le cas du Toxi-Chromotest, les Fac -modéré et -élevé ont été multipliés par un facteur de 10 afin d'obtenir une marge plus grande entre les différents niveaux.

4.4 CALCUL DE L'INDICE ECOTOX

À partir des données récoltées en 1993 et 1994 sur l'évaluation écotoxique des sédiments marins, un indice de toxicité intégrant l'ensemble des phases sédimentaires est estimé. L'indice ECOTOX ou la Toximesure se calcule sur la base de l'empreinte toxique fractionnelle (*ETF*) ou le produit de la toxicité moyenne de chacun des bioessais utilisés pour une fraction sédimentaire donnée par le coefficient *n* exprimant l'effet plurispécifique de la toxicité. Le calcul du coefficient *n* suit celui utilisé dans la formule BEEP pour les effluents industriels. La Toximesure est en fait la somme des *ETF* pour chacun des échantillons. Deux types d'indices ECOTOX ont été calculé afin de tenir compte du niveau de développement des essais réalisés et par conséquent, de la justesse des résultats:

- (a) IE-T Indice intégrant l'ensemble des 11 essais présentés au tableau 13; et
- (b) IE-S Indice simplifié intégrant le test sur oursins, le Microtox (sur les trois phases sédimentaires), le Toxi-Chromotest et le SOS Chromotest (test de viabilité cellulaire sans le S9).

Le tableau présenté en annexe U fournit les données nécessaires pour calculer les indices. Les formules suivantes sont utilisées:

$$(13) \quad ETF_i = \frac{x_1 + x_2 + x_j}{j} \cdot n \quad \text{où:} \quad \begin{array}{ll} i = & \text{phase sédimentaire} \\ j = & \text{nombre de tests réalisés} \\ n = & \text{effet plurispécifique de la toxicité} \\ x = & \text{résultat du test exprimé en Fac} \\ n = & \text{nombre de tests s'étant révélés toxiques} \end{array}$$

$$(14) \quad n = \frac{n \cdot 10}{N} \cdot \frac{a}{N} \quad \begin{array}{ll} N = & \text{nombre de biotests réalisés} \\ a = & \text{somme des Fac pour la phase considérée} \end{array}$$

$$(15) \quad \text{Toximesure}_k = \sum (ETF_i) \quad k = \text{échantillon}$$

L'annexe V expose les Toximesures calculées pour chacun des sédiments à l'étude.

À partir de ces calculs, quatre niveaux de toxicité relative (exprimés en termes de *ETF*) sont déterminés pour chacune des fractions sédimentaires analysées (tableau 16). Cependant, afin de simplifier l'analyse, nous avons

opté pour un seuil de toxicité arbitraire¹, unique pour l'ensemble des phases sédimentaires analysées. Ainsi, une toxicité marginale correspondrait à un ETF situé entre 1 et 90, une toxicité modérée serait située dans l'intervalle de 90 à 900 et une toxicité élevée serait supérieure à 900.

Tableau 16. Niveaux de toxicité relative calculés et retenus pour chaque phase sédimentaire considérée. Ces niveaux sont exprimés en ETF.

Fraction sédimentaire	EMPREINTE TOXIQUE ^{sédimentaire} calculés			
	Nulle (STn)	Marginale (STm)	Modérée (STr)	Élevée (STé)
Eau interstitielle	0	1 - 77	78 - 780	≥ 781
Phase solide	0	1 - 95	96 - 959	≥ 960
Extraits organiques	0	1 - 68	69 - 685	≥ 686
Niveaux de toxicité retenus	0	1 - 90	91 - 900	≥ 900

4.5 ANALYSES STATISTIQUES

Des analyses à fonction canonique discriminante ont été réalisées afin de déterminer si, sur la base des ETF et de la Toximesure calculées, il est possible d'établir des distinctions entre les différents sites, ou groupes de stations, à l'étude. Ces sites sont: (a) Black Point, (b) aire de dragage de l'Anse-à-Beaufils, (c) Cap-aux-Meules, (d) aire d'immersion de l'Anse-à-Beaufils, et (e) site de référence. Le site de référence intègre en fait l'ensemble des aires de référence analysées; ces dernières sont traitées ensemble afin de faciliter l'analyse et d'augmenter le nombre d'observations pour ce groupe de stations.

De plus, des tests de corrélation Spearman ont été faits pour déterminer l'existence d'associations entre les paramètres d'analyse chimique (organique et inorganique) et les indices ECOTOX. Sept paramètres de chimie organique et six de chimie inorganique ont fait l'objet de l'analyse: carbone organique total, arochlor 1254, chlorobenzènes totaux, HAP de type 1, HAP de type 2, HAP totaux, pesticides totaux, cuivre, cadmium, plomb, zinc, arsenic, et mercure total.

Enfin, dans le but de déterminer si l'indice ECOTOX mène aux mêmes conclusions que les données de toxicité brutes en ce qui concerne la distinction entre les stations d'un même site, l'analyse à fonction canonique discriminante fut effectuée sur les ETF et Toximesures calculées pour les sédiments de Cap-aux-Meules et

¹ Ces niveaux ne sont utilisés qu'à des fins de comparaison et seront sujets à des modifications lorsque plus de données seront disponibles. Tel qu'indiqué au début de la présente section, l'approche décrite ici est présentement en phase de développement au Centre saint-Laurent; il importe donc de l'utiliser avec réserve

Figure 24 - DONNÉES 1993 et 1994
TOXICITÉ CUMULATIVE DES PHASES
INDICE ÉCOTOX (T)

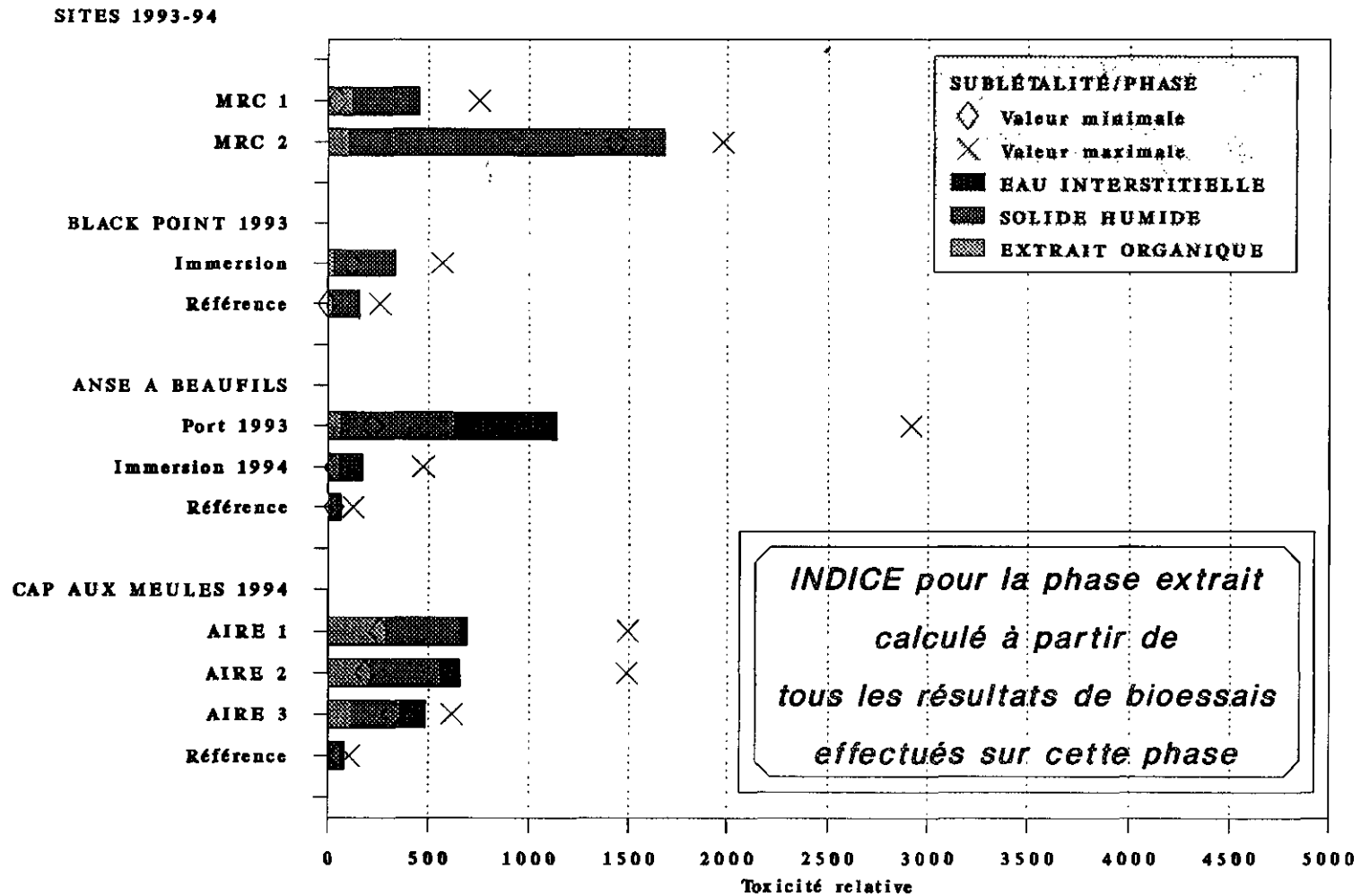
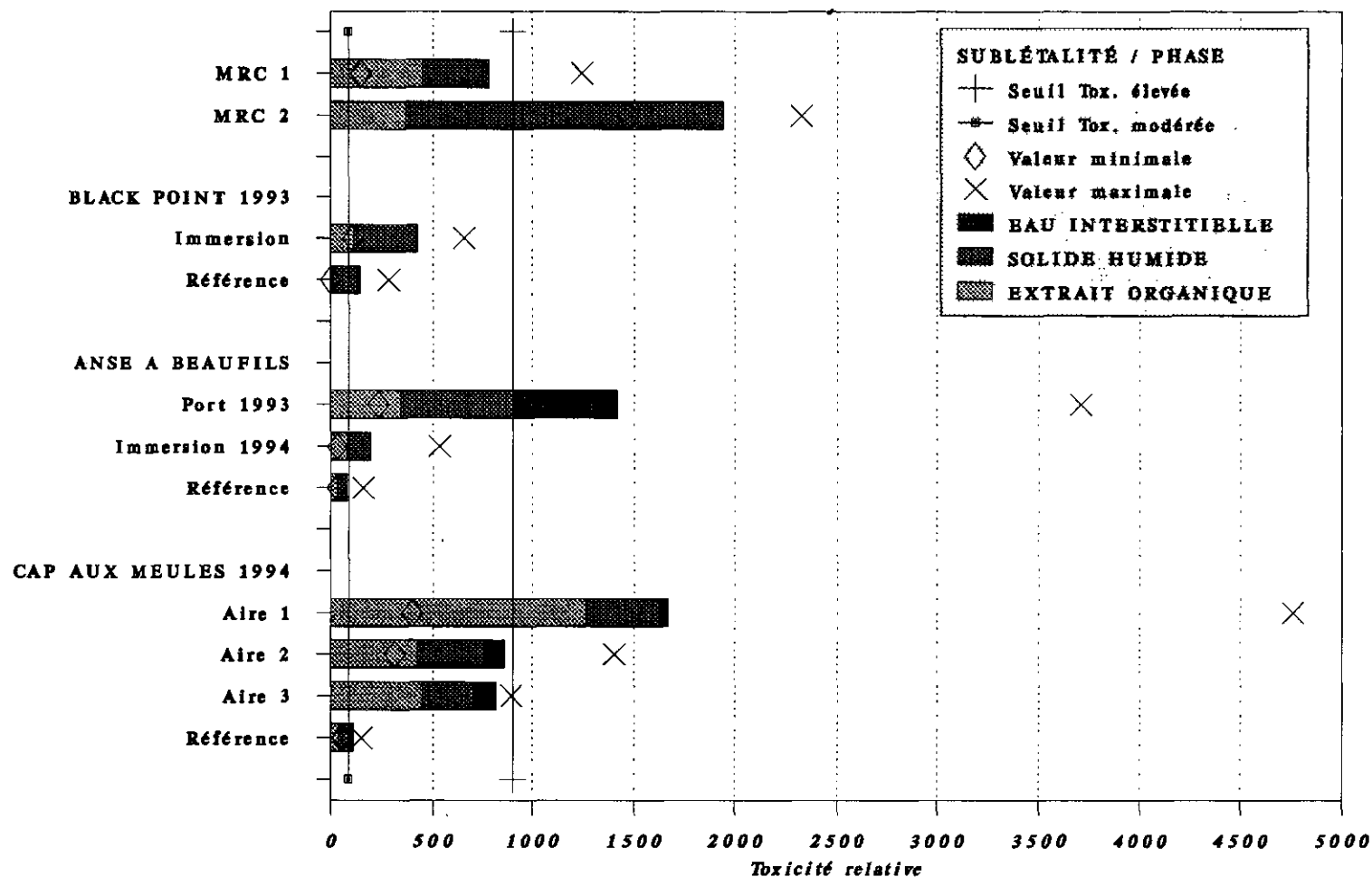


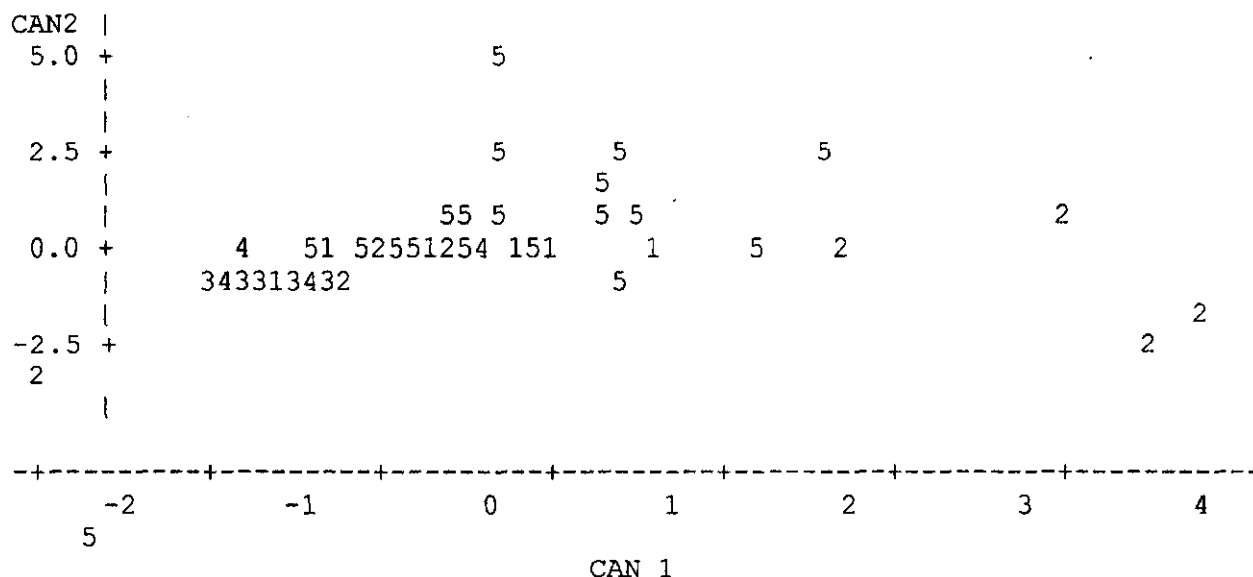
Figure 25 - DONNÉES 1993 et 1994
TOXICITÉ CUMULATIVE DES PHASES
INDICE ÉCOTOX (S)

SITES 1993-94



TOXICITÉ: 90 à 900 modérée; >900 élevée

Figure 26. Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions canoniques discriminantes à partir des valeurs ETF pour chacune des fractions sédimentaires considérées et de la Toximesure. Les symboles représentent les aires identifiées ci-dessous.



Légende des symboles

- | | | |
|--------------------------------|---|------------------------------|
| 1 - Black Point | 2 - Anse-à-Beaufils, dragage | 3- Cap-aux-Meules, immersion |
| 4 - Anse-à-Beaufils, immersion | 5 - Aires de référence (Black Point, Anse-à-Beaufils, Cap-aux-Meules) | |

Tableau 17. Distances relatives (d^2) entre chaque aire, telles que définies par l'analyse à fonction canonique discriminante.

De l'Aire*	1	2	3	4	5
1	-	6	2	1	1
2	6	-	11	10	6
3	2	11	-	0	3
4	1	10	0	-	3
5	1	6	3	3	-

* Voir légende de la figure 26 pour identification des aires.

Les essais réalisés sur la phase solide et l'eau interstitielle sont principalement responsables de cette distinction, comme le démontrent les coefficients de corrélation élevés obtenus entre la fonction CAN1 et les valeurs ETF pour ces deux fractions sédimentaires ($r = 0.95$, $r = 0.70$, phase solide et eau interstitielle respectivement). La fonction principale est également fortement corrélée avec la Toximesure ($r = 0.90$). Par conséquent, la Toximesure semble être une variable adéquate pour différencier la majorité des stations étudiées.

La deuxième fonction (CAN2), principalement attribuable aux ETF obtenus pour les extraits organiques ($r = 0.87$), explique quant à elle 25% de la variation entre les aires sédimentaire. Cette fonction permet de distinguer clairement les stations de référence des autres stations à l'étude (figure 26). En ce qui concerne les stations de Cap-aux-Meules, leur position à proximité de l'origine à la figure 26 semble indiquer que les deux fonctions (CAN1 et CAN2), et par conséquent les trois fractions sédimentaires, sont nécessaires pour les distinguer des autres groupes, particulièrement des aires de référence et de l'aire de dragage de l'Anse-à-Beaufils.

Les fonctions nous permettent également de déterminer si, sur la base des ETF et Toximesures obtenues, les stations correspondent bien à l'aire à laquelle elles appartiennent. Ceci est rendu possible grâce à une procédure de reclassification des stations selon l'aire représentative de leur niveau de toxicité. Par exemple, après reclassification, 83% des stations de Black Point sont reclassifiées dans ce groupe, suggérant que la majorité de ces stations démontrent une toxicité similaire et différente de celles provenant des autres aires. En revanche, ce pourcentage est de 75% pour l'aire de dragage de l'Anse-à-Beaufils, indiquant également le niveau de toxicité particulier de ces stations. Quant aux stations de Cap-aux-Meules, 61% des stations sont reclassifiées dans cette aire après analyse et le 39% résiduel est reclassifié dans l'aire d'immersion de l'Anse-à-Beaufils, suggérant une similitude dans la toxicité de ces deux groupes de stations.

Enfin pour les MRC, il semble y avoir discordance entre les résultats de 1993 et 1994 (figure 27). Ces sédiments démontrent une toxicité supérieure en 1994, bien qu'ils proviennent des mêmes échantillons de départ. Comme il sera démontré au point 4.5.3, ce désaccord est particulièrement évident pour la phase organique. Les deux facteurs suivants peuvent en être la cause: (a) l'eau de dilution utilisée, soit l'eau de mer en 1993 et une solution de NaCl 3.5% en 1994 et/ou (b) le poids initial de sédiment entier ayant servi à l'extraction des substances organiques, soit 20 g en 1993 et 50 g en 1994.

En résumé, ces résultats indiquent que la Toximesure constitue un outil efficace permettant de distinguer différentes aires sédimentaires sur la base de données de toxicité. Les trois fractions utilisées permettent également de discerner les aires selon leur niveau de toxicité mais ce, de façon différente. Ainsi, l'eau interstitielle et la fraction solide permettent de discriminer les aires ayant démontré une toxicité élevée (dans ce cas-ci il s'agit de l'aire de dragage de l'Anse-à-Beaufils) des autres groupes de stations. En revanche, la fraction organique permet de mettre en évidence les aires faiblement contaminées (dans ce cas-ci il s'agit des

sédiments de référence) des autres ayant démontré une toxicité plus élevée. Par conséquent, les trois phases sédimentaires sont essentielles pour détecter des différences inter-stations.

La disparité notée entre les informations fournies par l'extrait organique et celles provenant de l'eau interstitielle et la fraction solide, est probablement due au fait que les tests sur l'extrait n'ont pas été réalisés pour toutes les aires à l'étude. En fait, le Microtox n'a été fait que sur les échantillons analysés en 1994, soit ceux provenant des aires d'immersion de l'Anse-à-Beaufils et de dragage Cap-aux-Meules, en plus des aires de référence associées à ces sites. En ce qui concerne le SOS Chromotest (test de viabilité cellulaire sans le S9), il n'a pas été réalisé sur les sédiments situés à l'intérieur du port de l'Anse-à-Beaufils.

4.6.2 ÉVALUATION PAR SITE

Afin d'identifier les stations responsables des écarts notés entre les sites au point précédent, chaque aire ou site est considéré (e) de façon individuelle. Les figures 28 à 30 illustrent les ETF et Toximesures calculées pour chacune des stations sédimentaires provenant des sites à l'étude. Les données ayant servi à la production des ces graphiques sont présentées à l'annexe V.

4.6.2.1 Black Point

Les sédiments de Black Point ont démontré les plus faibles niveaux de toxicité, après les aires de référence, au cours de la présente étude. La Toximesure pour ces stations varie entre 0 et 568 (figure 28), ce qui est inférieur au seuil de toxicité élevé défini par l'approche de l'indice ECOTOX.

4.6.2.2 Anse-à-Beaufils

Tel qu'indiqué précédemment, l'aire de dragage démontre une toxicité nettement supérieure à celle de l'aire d'immersion (figure 29). À titre d'illustration, les sédiments d'essai de l'aire située à l'intérieur du port démontre une toximesure moyenne de 1417, comparativement à 200 pour l'aire AB-5. Si on ne considère que les stations provenant de l'aire de dragage, certaines d'entre elles se démarquent nettement des autres. C'est le cas par exemple de la station 6 qui a démontré une toxicité élevée chez les *L. pictus* et *V. fischeri* lorsqu'exposés à l'eau interstitielle. Il est possible que la forte teneur en azote (ammoniacal et total Kjeldahl) de cette station soit responsable de cette distinction (voir données de Bureau et coll., 1995).

4.6.2.3 Cap-aux-Meules

À l'exception des stations de référence, la majorité des stations de Cap-aux-Meules, et plus particulièrement

**Figure 27 - MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE
TOXICITÉ CUMULATIVE DES PHASES
INDICE ÉCOTOX (S)**

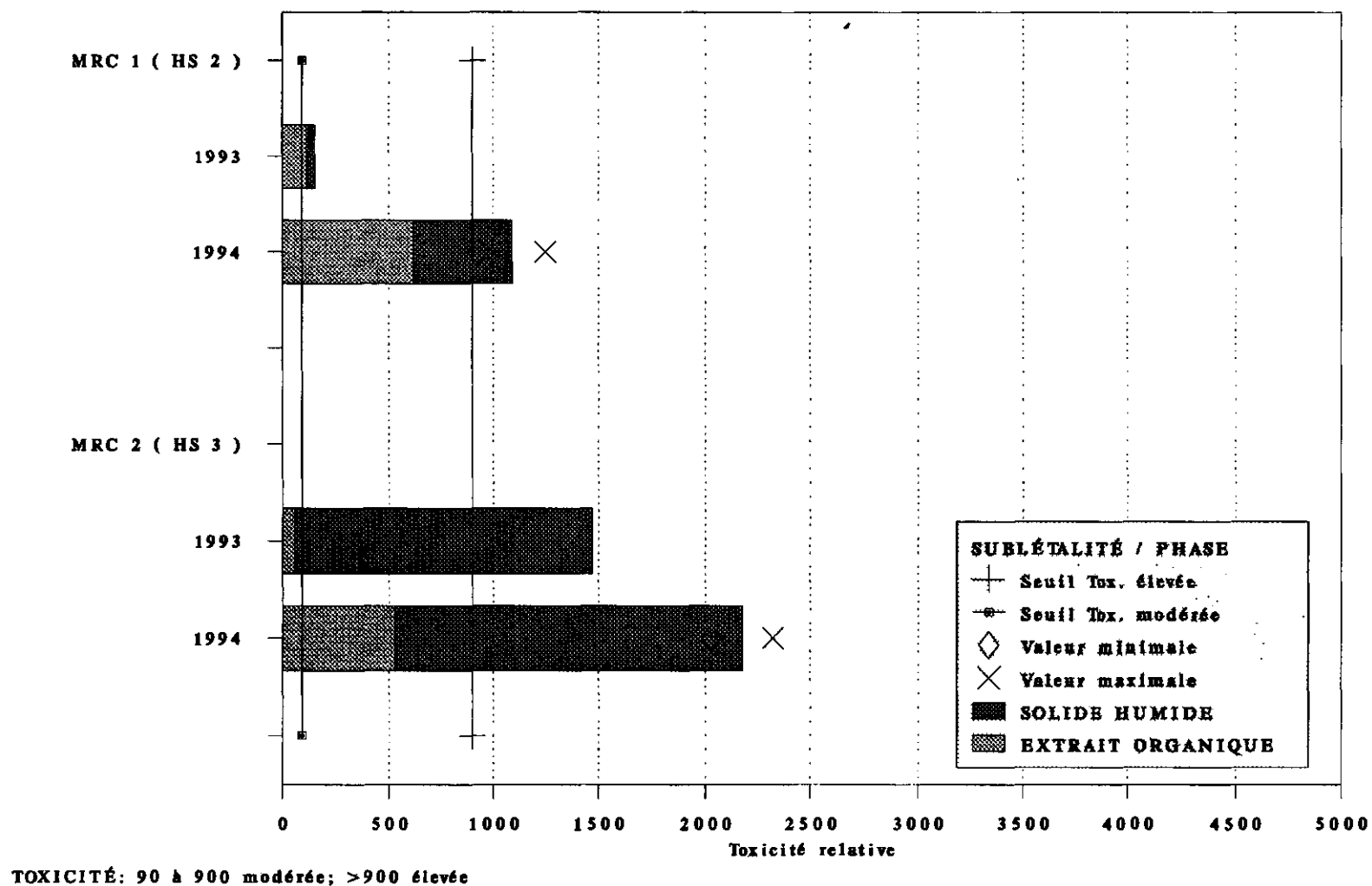
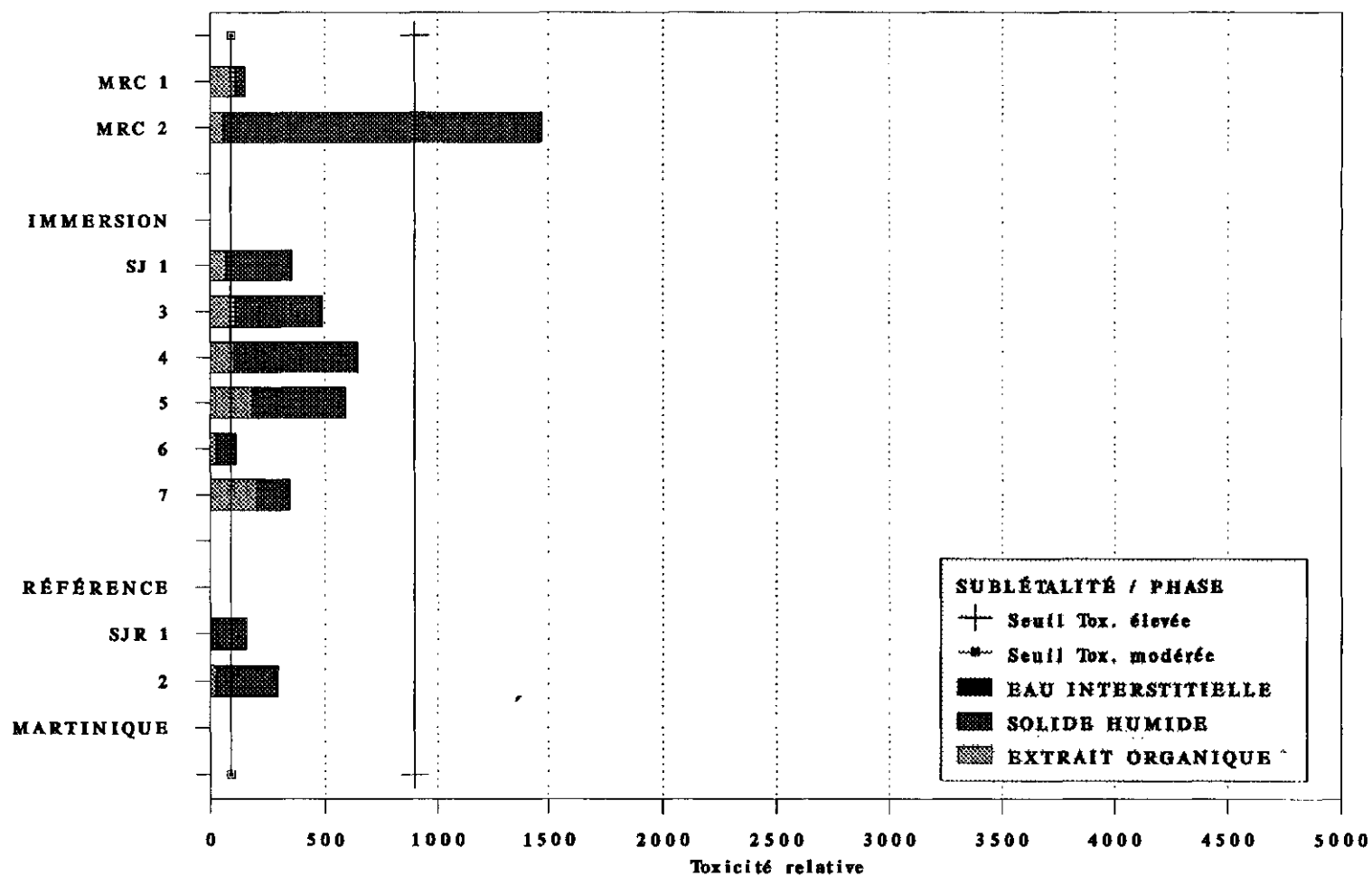


Figure 28 - BLACK POINT
TOXICITÉ CUMULATIVE DES PHASES
INDICE ÉCOTOX (S)

SITES 1993



TOXICITÉ: 90 à 900 modérée; >900 élevée

Figure 29 - ANSE A BEAUFILS
TOXICITÉ CUMULATIVE DES PHASES
INDICE ÉCOTOX (S)

SITES 1993-94

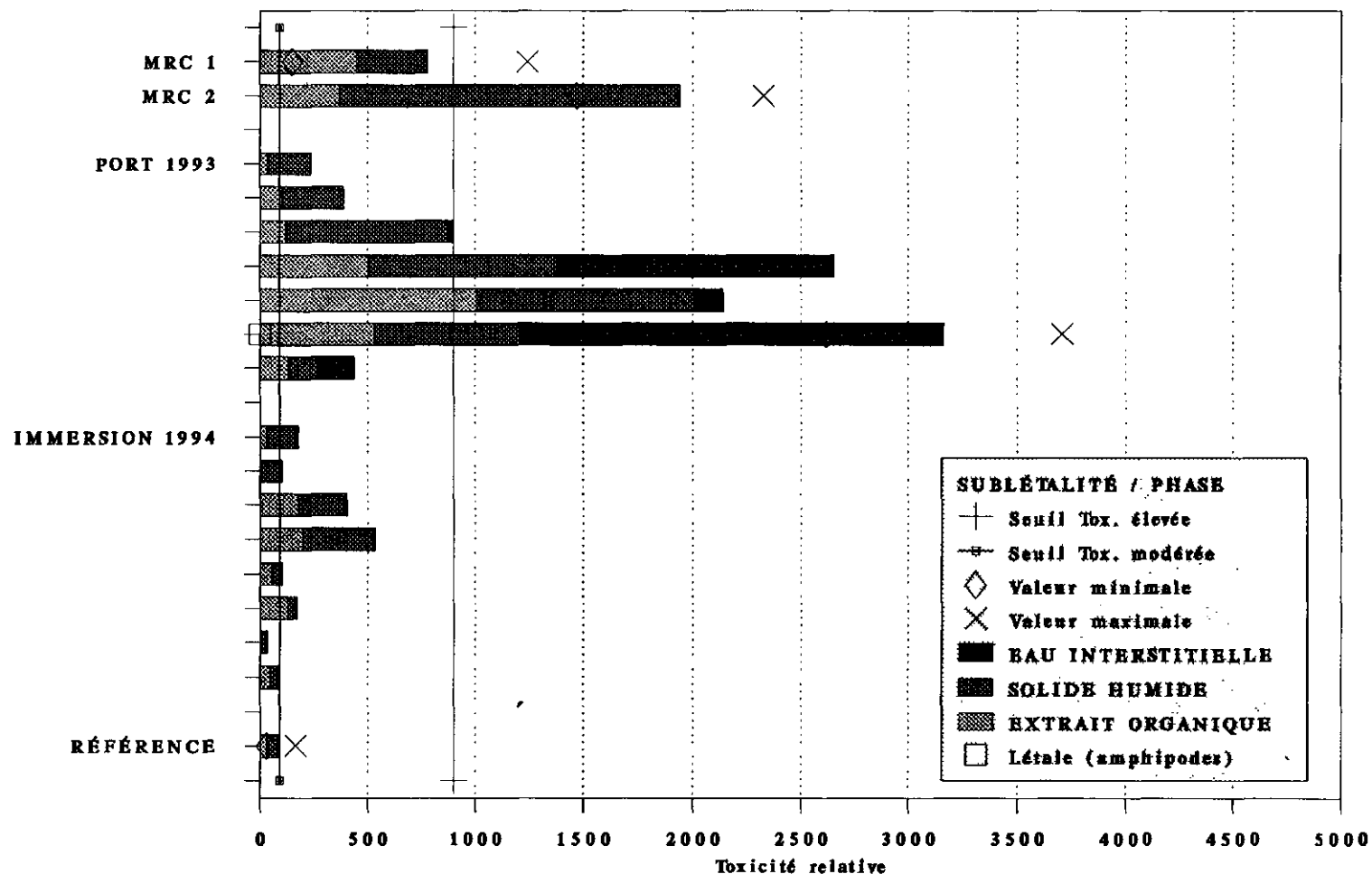
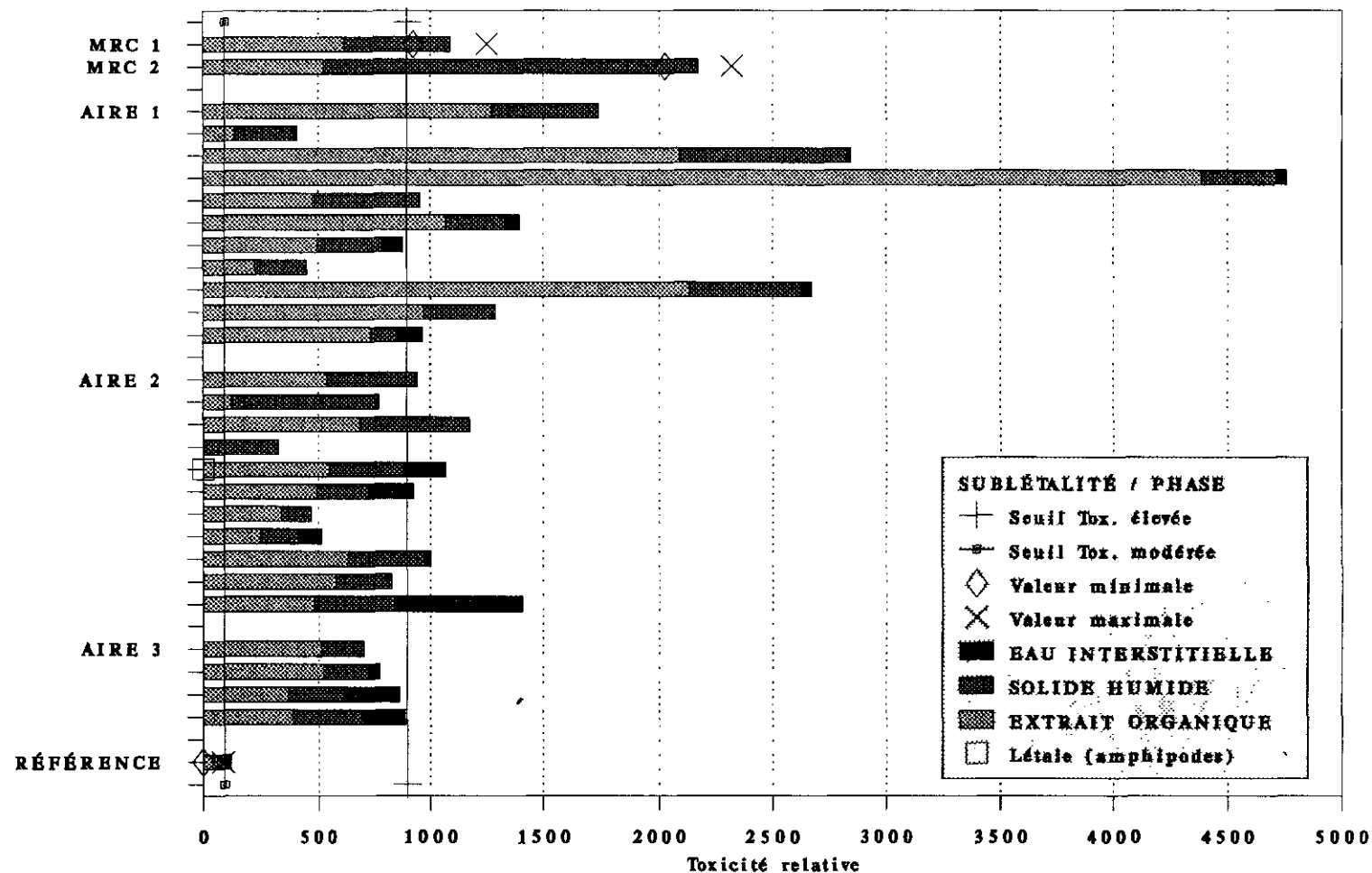


Figure 30 - CAP AUX MEULES
TOXICITÉ CUMULATIVE DES PHASES
INDICE ÉCOTOX (S)

SITES 1994



TOXICITÉ: 90 à 900 modérée; >900 élevée

celles de l'Aire 1, ont démontré une Toximesure élevée (≥ 900), telle que définie par l'indice ECOTOX (figure 30). Tel qu'indiqué précédemment, les extraits organiques semblent principalement responsables de cette forte toxicité.

L'analyse à fonction canonique discriminante a été utilisée pour confirmer l'existence de différences significatives entre les aires de Cap-aux-Meules et identifier la nature de ces différences. Par opposition à l'analyse statistique effectuée à la section 2.2.3.4, qui portait sur les résultats bruts des tests Microtox pour ce site (sur les trois phases sédimentaires), l'analyse exposée ici porte sur les ETF et Toximesures calculées (IE-S) à partir de l'ensemble des bioessais réalisés sur les trois fractions. Le groupement des stations est identique à celui présenté à la section 2.2.3.4, soit: [1] aire visée par le projet de confinement en quai; [2] aire de dragage éventuel; [3] aire non-visée par les activités de dragage; et [4] aire de référence.

La fonction canonique principale résultant de l'analyse semblent expliquer les écarts entre les quatre groupes de stations en ce qui concerne leur niveau de toxicité tel qu'exprimé en ETF et en Toximesure ($p < 0.05$; Wilk's Lambda = 0.39). Cette fonction, CAN1, explique 58% de la variation inter-groupes et, comme c'était le cas pour l'analyse sur les données brutes (voir section 2.2.3.4), elle sépare nettement les stations de références des stations de dragage (figure 31). De plus, l'analyse appuie l'affirmation émise précédemment concernant l'aire de confinement (Aire 1). Les tests réalisés sur la phase solide sont principalement responsables de cet écart; la forte corrélation entre les ETF calculés pour cette phase et la fonction CAN1 ($r = 0.93$, $p < 0.001$) supporte cette affirmation. La Toximesure et les ETF pour l'extrait organique viennent en deuxième position avec des coefficients de corrélation avec la fonction principale de 0.76 et 0.67 ($p < 0.05$), respectivement. En revanche, les tests sur eau interstitielle ne permettent pas dans le cas de Cap-aux-Meules d'établir des distinctions entre les groupes de stations ($r = 0.06$, $p > 0.05$).

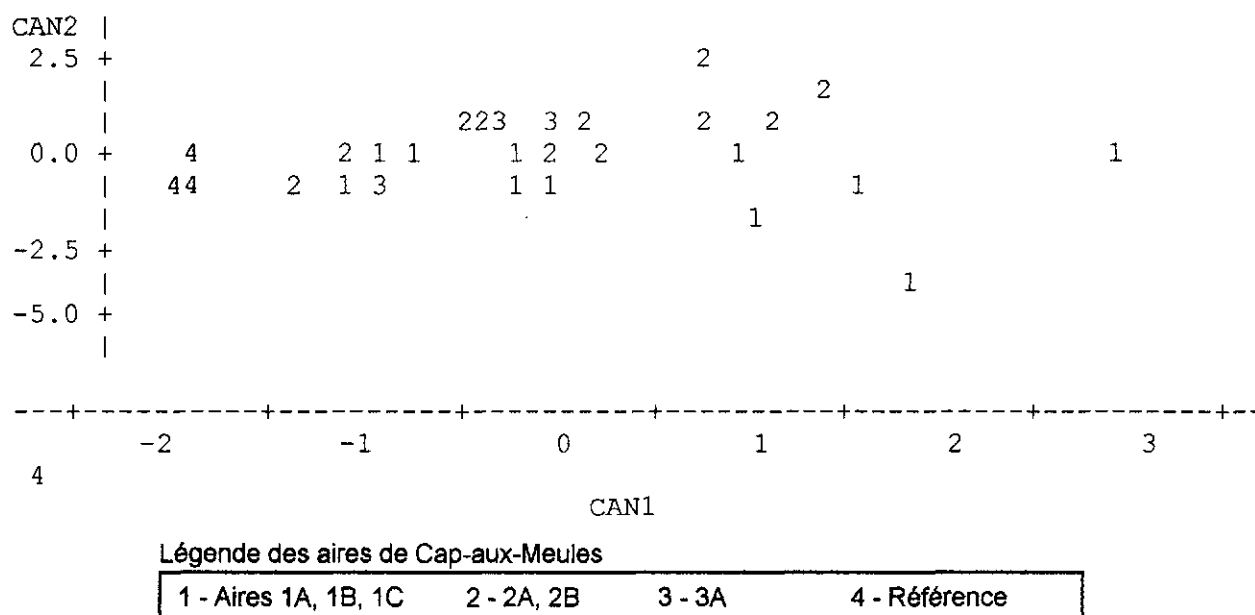
4.6.3 ÉVALUATION PAR PHASE SÉDIMENTAIRE

Afin de compléter l'analyse basée sur l'utilisation de l'indice ECOTOX, une évaluation de chaque site par phase sédimentaire a été effectuée. Les conclusions de cette évaluation correspondent à celles tirées aux points 4.6.1 et 4.6.2. Les figures 32, 33 et 34 exposent les résultats de l'analyse pour les phases sédimentaires suivantes: eau interstitielle, fraction solide et extrait organique, respectivement. Les données concernant les matériaux de référence certifiés (HS-2 et HS-3) n'apparaissent pas à la figure 32 puisqu'aucune analyse n'a pu être effectuée sur l'eau interstitielle de ces sédiments.

4.6.3.1 Eau interstitielle

Mis à part les stations situées à l'intérieur du port de l'Anse-à-Beaufils, aucune aire sédimentaire ne dépasse le seuil de toxicité élevée établi au point 4.4, soit 900 (figure 32). Certains sédiments provenant de l'Aire 2 de Cap-aux-Meules démontrent toutefois une toxicité s'approchant de ce seuil; selon l'annexe V, il s'agirait de la station 16 (ETF = 563).

Figure 31. Représentation graphique des résultats de l'analyse à fonctions canoniques discriminantes à partir des ETF et Toximesures calculées pour les stations de Cap-aux-Meules.



4.6.3.2 Fraction solide

Selon les résultats présentés à la figure 33, aucune aire d'essai ne dépasse le seuil de toxicité élevé. Une station localisée à l'intérieur du port de l'Anse-à-Beaufils démontre néanmoins une toxicité non-négligeable, supérieure à 900; il s'agit du sédiment AB-5 (ETF = 996). Les tests réalisés sur cette phase permettent de discerner la toxicité élevée des MRC, comparativement à celle des sédiments de dragage ou d'immersion.

4.6.3.3 Extrait organique

En ce qui concerne l'extrait organique, deux graphiques sont présentés: (a) indice ECOTOX total, IE-T, qui inclut l'ensemble des essais réalisés sur cette phase; et (b) indice ECOTOX simplifié, IE-S, qui n'inclut que deux tests pour cette phase, soit le SOS Chromotest (viabilité sans le S9) et le Microtox. Lorsque l'ensemble des tests sont considérés (figure 34a), il est très difficile de distinguer les niveaux de toxicité entre les sites ou

les aires étudiées. Ils sont tous inférieurs ou légèrement supérieurs au seuil de toxicité marginal (90). La station 2B située dans l'Aire 1 de Cap-aux-Meules dépasse toutefois le seuil de toxicité élevée (900).

Parcontre, si seulement les résultats du SOS Chromotest (viabilité -S9) et Microtox sont inclus dans l'analyse, les différences entre les sites sont plus évidentes (figure 34b). Certains sédiments de l'aire 1 de Cap-aux-Meules semblent même être plus toxiques que les MRC. Quant aux aires 2 et 3 du site de dragage, elles se comparent aux sédiments de référence certifiés.

En somme, il semble que la portée de la phase organique est réduite lorsque les tests de génotoxicité et ceux en développement au laboratoire du Centre Saint-Laurent sont considérés. Dans la plupart des cas ces tests n'ont pas réussi à détecter des effets. Le IE-S semble donc plus approprié pour établir des distinctions entre les aires sédimentaires à l'étude sur la base de leur toxicité.

4.6.4 ÉVALUATION PAR NIVEAUX DE CONTAMINATION

L'analyse basée sur les données de chimie organique indique que les 5 sites identifiées au point 4.5 diffèrent significativement les unes des autres sur la base des teneurs en composés organiques (Wilk's Lambda = 0.31, $p < 0.001$). Deux paramètres chimiques sont principalement responsables des écarts notés entre les sites: le carbone organique total et les pesticides totaux. Ces composés démontrent une corrélation significative avec la fonction principale CAN1 ($r = 0.66$ et $r = 0.35$, respectivement; $p < 0.01$). L'aire de dragage de l'Anse-à-Beaufils diffère significativement du site de Black Point et des sites de référence sur la base des ces paramètres.

En ce qui a trait aux paramètres de chimie inorganique, il semble également y avoir des distinctions significatives entre les sites, notamment entre Cap-aux-Meules et (a) Black Point et (b) l'aire située à l'intérieur du port de l'Anse-à-Beaufils (Wilk's Lambda = 0.11, $p < 0.0001$); ces écarts sont mis en évidence à la figure 35. Les teneurs en arsenic, plomb et cadmium sont responsables des différences observées ($p < 0.01$).

4.6.5 ASSOCIATION ENTRE NIVEAUX DE CONTAMINATION ET INDICES ECOTOX

Une analyse de corrélation avec le test non-paramétrique Spearman a été effectuée pour déterminer l'existence ou l'absence d'association entre les paramètres de toxicité (ETF pour chaque phase et Toximesure) et les paramètres de chimie organique et inorganique. Les paramètres de chimie sont les mêmes que ceux utilisés à la section 4.6.4.

Figure 32 - DONNÉES 1993 et 1994
PHASE - EAU INTERSTITIELLE
INDICE ÉCOTOX (S)

SITES 1993-94

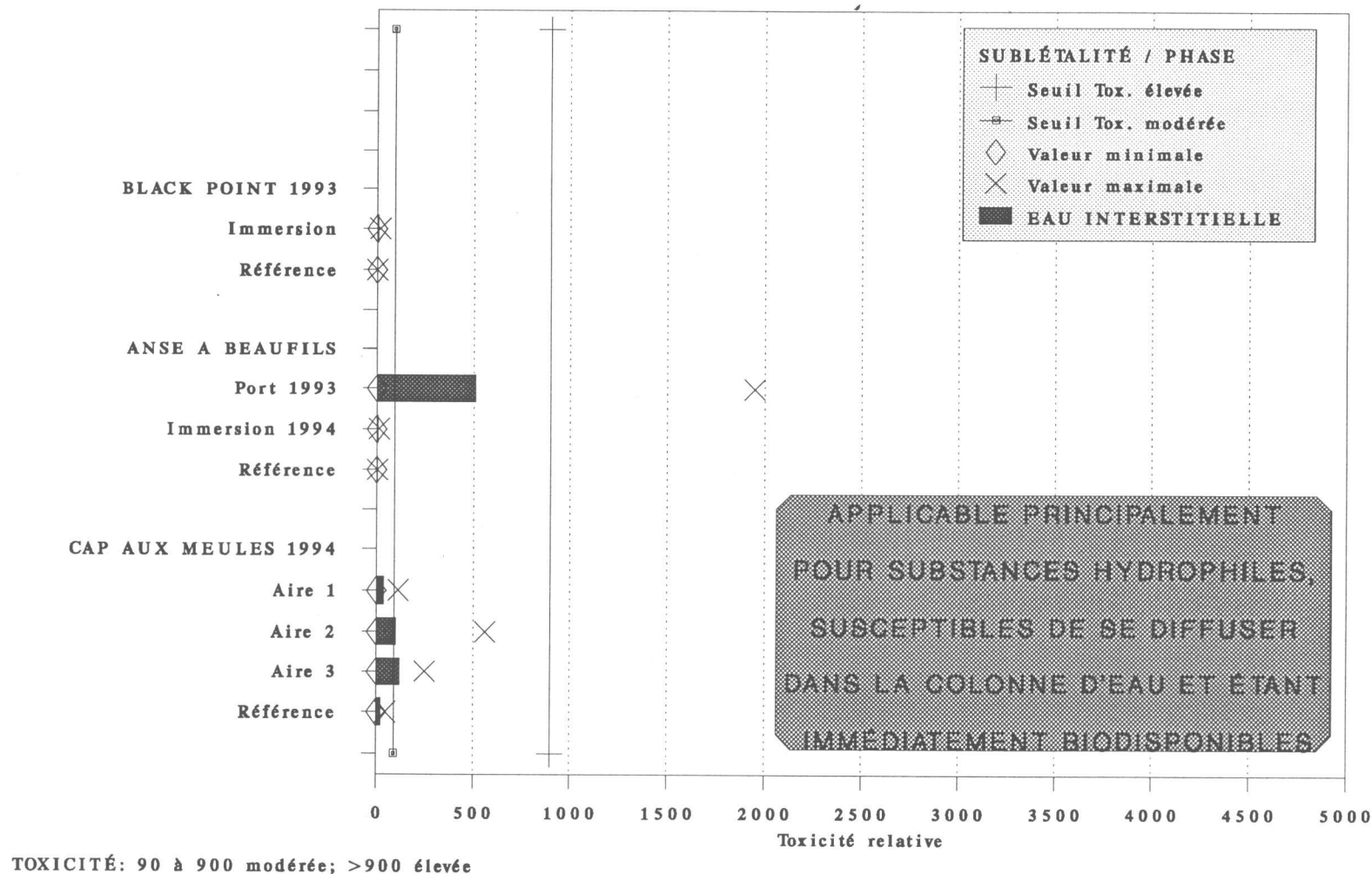


Figure 33 - DONNÉES 1993 et 1994
PHASE - SOLIDE HUMIDE
INDICE ÉCOTOX (S)

SITES 1993-94

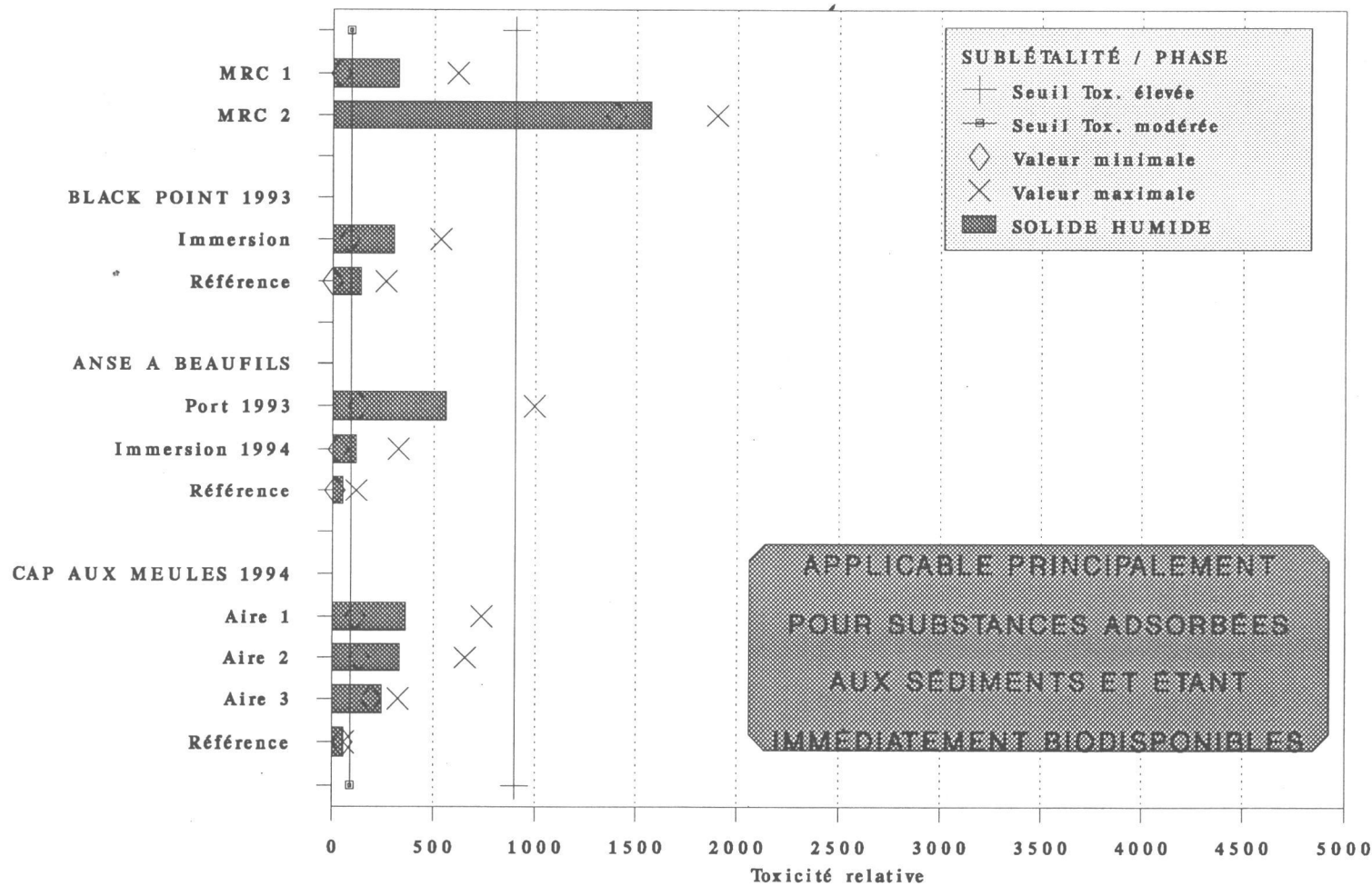


Figure 34a - DONNÉES 1993 et 1994
PHASE - EXTRAIT ORGANIQUE
INDICE ÉCOTOX (T)

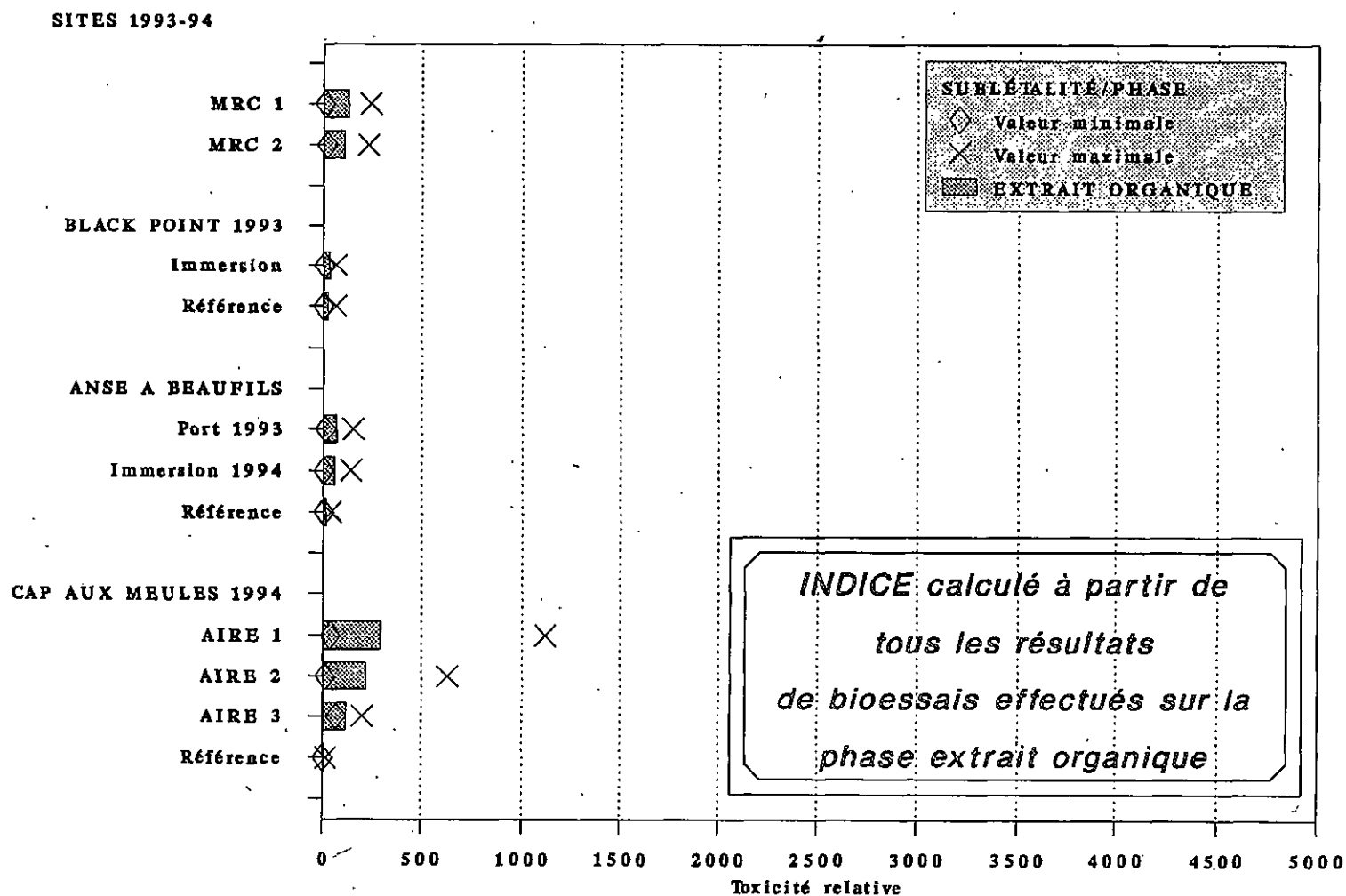


Figure 34b - DONNÉES 1993 et 1994
PHASE - EXTRAIT ORGANIQUE
INDICE ÉCOTOX (S)

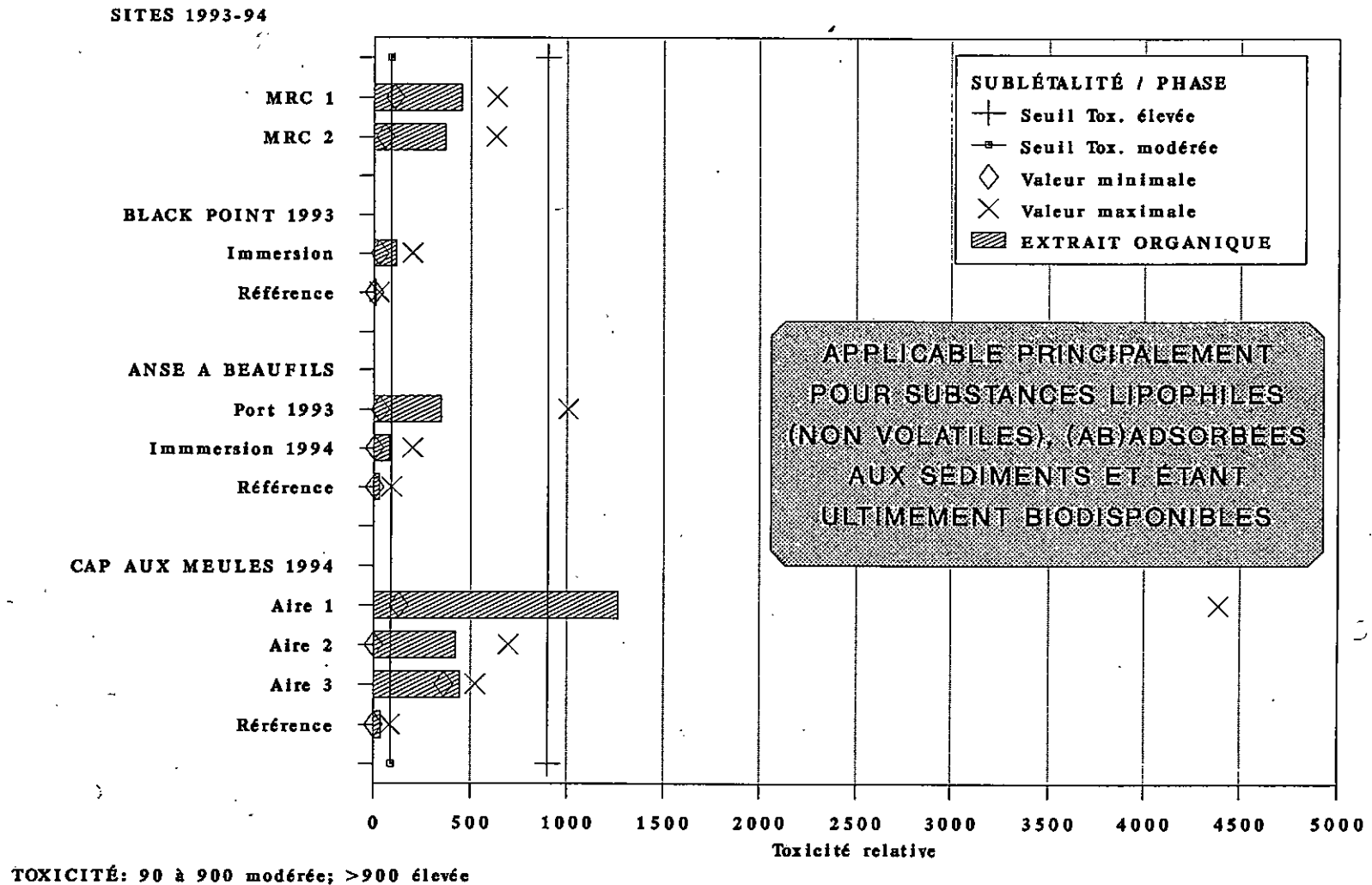
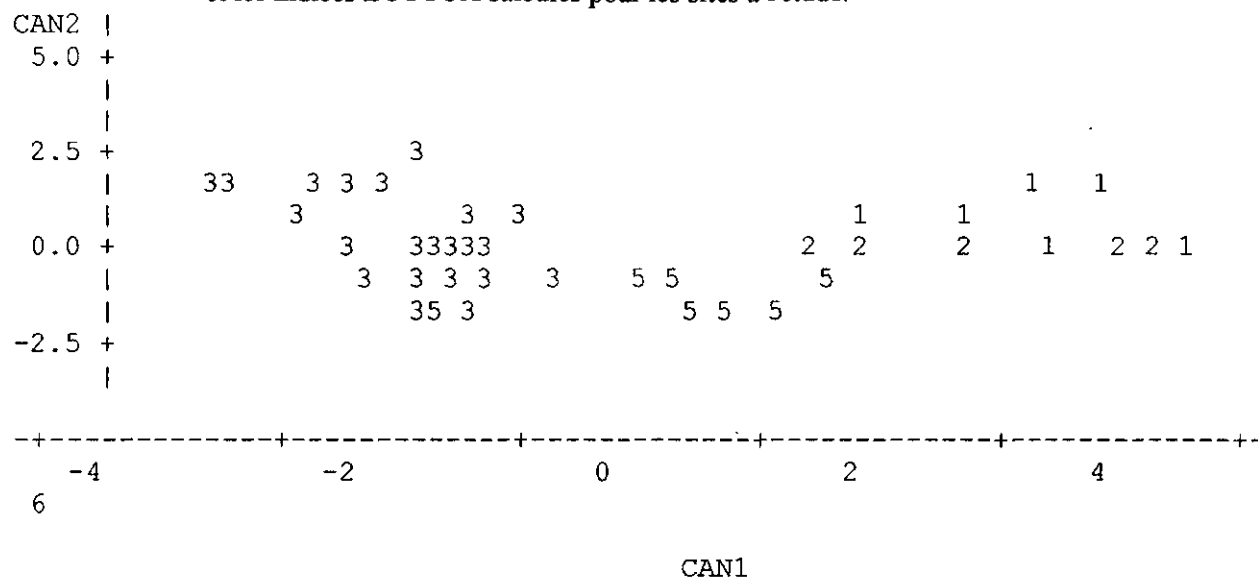


Figure 35. Résultats de l'analyse à fonctions canoniques discriminantes sur les paramètres inorganiques et les indices ECOTOX calculés pour les sites à l'étude.



Légende des symboles

1 - Black Point	2 - Anse-à-Beaufils, dragage	3 - Cap-aux-Meules, immersion
4 - Anse-à-Beaufils, immersion	5 - Aires de référence (Black Point, Anse-à-Beaufils, Cap-aux-Meules)	

Il ne semble exister aucune corrélation entre les teneurs en composés organiques et les ETF calculés pour l'eau interstitielle ($p > 0.01$). En revanche, les ETF sur phase solide et l'extrait, ainsi que la Toximesure sont fortement corrélés avec les données sur le carbone organique total ($r = 0.56$, $r = 0.48$, et $r = 0.64$, respectivement; $p < 0.0005$). Les ETF pour l'extrait sont, de plus, fortement associés aux concentrations en arochlor 1254 ($r = 0.53$; $p < 0.0005$), en HAP de poids moléculaire élevé ($r = 0.49$; $p < 0.0005$) et en HAP totaux ($r = 0.45$; $p < 0.0005$).

En ce qui concerne les métaux lourds, une seule association significative est notée; il s'agit du zinc. Ce métal est fortement corrélé avec la Toximesure et les ETF pour les extraits organiques ($r = 0.51$ et $r = 0.58$, respectivement; $p < 0.0005$). L'association entre un métal et la fraction organique est théoriquement contradictoire puisque la méthode d'extraction organique utilisée est présumément spécifique à certaines classes de composés organiques seulement. Cependant, la présence de particules en suspension dans les extraits et les résultats des tests de corrélation laissent croire que certains composés organométalliques contenant entre autres du zinc soient également extraits avec des solvants organiques tels que le DCM.

En résumé, ces résultats de corrélation semblent appuyer les conclusions tirées avec les analyses à fonctions canoniques discriminantes effectuées sur les paramètres de chimie organique et les indices ECOTOX (voir 4.6.4). Ainsi, les teneurs en carbone organique total sont principalement responsables des écarts de toxicité observés entre les aires et leur toxicité semble plutôt associée avec les fractions solides et organiques des sédiments. Il ne faut toutefois pas négliger le fait que d'autres classes de composés chimiques, p. e. les HAP, arochlor et pesticides, fortement associés à la fraction organique, peuvent également être responsables des différences observées dans les niveaux de toxicité, bien que leur importance soit moindre que celle du COT.

Dans le cas des métaux lourds, bien qu'il y ait une association importante entre les teneurs de zinc et la toxicité des extraits organiques, ce paramètre chimique n'a pas permis de détecter des différences de toxicité entre les sites étudiés comme c'était le cas avec l'arsenic, le plomb et le cadmium. Nonobstant le fait les concentrations des ces derniers n'ont pas été déterminées dans l'eau interstitielle et la fraction solide, il est fort probable qu'ils soient surtout associés à ces phases puisque les écarts de toxicité (selon les indices ECOTOX) entre les sites étaient plus importants pour celles-ci que pour l'extrait.

En conclusion, un indice biologique tel que la Toximesure, qui intègre les données de toxicité pour l'ensemble des trois phases sédimentaires et pour l'ensemble des contaminants présents, semble être un outil adéquat pour détecter des différences entre les sites. En revanche, une caractérisation chimique, qui considère chacune des classes de composés de façon individuelle, ne peut traiter l'ensemble des interactions possibles entre ces substances et celles non-analysées, et par conséquent peut conduire à de fausses conclusions en ce qui concerne les effets possibles de la contamination. Ces deux approches sont toutefois complémentaires puisqu'elles fournissent des informations différentes à l'analyste. L'indice ECOTOX permet de comparer les aires sédimentaires selon leur niveau de toxicité et par conséquent, d'établir un ordre de priorité en ce qui concerne la gestion des matrices contaminées. Dans le cas présent, il s'agit en premier lieu de l'aire de dragage de l'Anse-à-Beaufils et, en deuxième lieu, du site de Cap-aux-Meules, particulièrement de l'aire de confinement [1]. La seconde approche permet quant à elle d'identifier les groupes de substances potentiellement responsables des effets observés et par conséquent, de déterminer les sources possibles de contamination dans le but de les limiter le plus possible. Il importe donc de considérer ces deux approches dans tout exercice d'évaluation de la toxicité et de gestion de matrices sédimentaires contaminées.

SECTION V

RECOMMANDATIONS, RÉSUMÉ ET CONCLUSION

5.1 RECOMMANDATIONS

L'évaluation de la qualité des sédiments marins nous a permis d'identifier certaines lacunes associées aux procédures d'échantillonnage et d'analyses chimiques et biologiques utilisées. Des recommandations sont émises à ces égards dans les paragraphes qui suivent. L'utilisation d'autres approches biologiques est également conseillé pour évaluer la toxicité des sédiments à des niveaux d'organisation inférieurs.

5.1.1 PLANIFICATION DU PROJET D'ÉTUDE

L'un des critères essentiels au bon déroulement d'un projet de recherche tel que celui-ci porte sur une l'organisation et la planification de tous les aspects qui constituent l'étude en question. La stipulation des objectifs de recherche, est probablement l'aspect le plus important et le premier à être considéré par le gestionnaire du projet. Ces objectifs doivent être énoncés de façon claire et précise et révisés par un groupe d'expert afin de vérifier leur pertinence dans le cadre des besoins identifiés *a priori*. De plus, la formulation et la nature de ces objectifs ne doivent pas changer en cours de route. Il est également important que les méthodes suggérées pour répondre à ces objectifs soient clairement identifiées en tenant compte des budgets alloué, du personnel disponible et du temps requis pour réaliser les analyses.

RECOMMANDATION 1 Énoncer les objectifs de façon claire et précise dans le cadre de discussions regroupant l'ensemble des personnes impliquées directement ou indirectement dans le projet, ainsi que des experts travaillant sur des projets similaires. L'étude devrait être coordonnée par une seule personne et le déroulement de l'étude devrait être suivi de très près.

5.1.2 PROCÉDURES D'ÉCHANTILLONNAGE

Dans les méthodes expérimentales proposées par Environnement Canada 1992f, 1992g, 1992h), les auteurs n'ont pas abordé le problème de la collecte des échantillons. Ils réfèrent toutefois le lecteur à un document d'orientation sur le prélèvement, la manutention, le transport, le stockage et la manipulation des sédiments en vue de leur caractérisation chimique et d'essais de toxicité (Environnement Canada, en prép.). Ce document fournit des informations sur un programme d'échantillonnage, les différentes méthodes utilisées, ainsi que sur les types de contenants, mais aucun détail sur des procédures normalisées de collecte des échantillons. La normalisation des méthodes de collecte augmentera la valeur comparative des résultats expérimentaux.

- RECOMMANDATION 2 Préparation de procédures normalisées servant de guides pour la collecte, le stockage et la manipulation des sédiments expérimentaux. Le personnel responsable de l'échantillonnage devrait être familier avec ces procédures avant d'arriver sur le terrain.
- RECOMMANDATION 3 Préparation d'une procédure normalisée de collecte d'échantillons d'eau de surface.
- RECOMMANDATION 4 Sauvegarde de toutes les informations relatives aux procédures effectuées sur le terrain (localisation des stations, technique d'échantillonnage, manipulations des échantillons, entreposage) dans un registre. Toutes les circonstances pouvant potentiellement affecter l'état des échantillons devraient être documentées.

5.1.3 CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Certains auteurs ont stipulé l'hypothèse et démontré que le temps de conservation des sédiments peut influencer leur toxicité. Entre autres, Malueg *et coll.* (1986) ont démontré que la toxicité de sédiments d'eau douce dosés avec du cadmium était relativement élevée pour *Daphnia magna* durant la première semaine mais qu'elle variait considérablement dans les semaines suivantes. Becker et Ginn (1990) ont rapporté une diminution de la toxicité de sédiments marins après quatre semaines chez *V. fischeri* et après 11 semaines chez une espèce d'amphipodes. En 1995, ces mêmes auteurs (Becker et Ginn, 1995) stipulaient que les effets de la durée de conservation de sédiments sont plus importants dans les cas où les niveaux de toxicité sont de faibles à intermédiaires que lorsque les niveaux sont élevés.

Les mécanismes responsables des changements de toxicité des sédiments avec des périodes de storage prolongées semblent complexes et spécifiques aux types de sédiments et de produits chimiques considérés (Becker et Ginn, 1995). Par exemple, Ho et Quinn (1993) ont évalué les effets de la durée de conservation sur des extraits organiques de sédiments et ont noté une réduction de la toxicité des extraits de sédiments entiers lors d'essais Microtox après 12 semaines. Toutefois, la fraction non-polaire, contenant des BPC et des hydrocarbures non-polaires n'a pas révélé de changements après 30 semaines de stockage. La fraction polaire, renfermant principalement des HAP était moins toxique après deux semaines puis est revenue à son niveau de toxicité original après trois semaines. Enfin, la troisième fraction, contenant des cétones et

des HAP hétérocycliques, a démontré les variations les plus importantes. Par ailleurs, Watson et coll. (1985) ont rapporté des changements importants dans la composition chimique de l'eau interstitielle (par exemple cations majeurs, phosphates, matières dissoutes, etc.) après une période d'entreposage de 9 semaines environ, à 5°C.

Dans la présente étude les délais étaient de trois à cinq mois pour les analyses physico-chimiques, de cinq à sept mois pour les analyses chimiques et de deux à cinq mois pour les tests de toxicité.

RECOMMANDATION 5 Réduction au minimum du lapse de temps s'écoulant entre la collecte des échantillons et l'exécution des analyses. Tel que mentionné dans la section précédente, il serait préférable de ne pas dépasser le délais de six semaines recommandé par Environnement Canada pour les tests biologiques (1990b, 1990c). Selon le «Guide de caractérisation des sédiments», publié par Environnement Canada (1992a), le délai entre le prélèvement de l'échantillon et son analyse granulométrique ne doit pas excéder deux semaines. Dans le cas des solides volatils, cette période ne doit pas dépasser une semaine. Pour l'azote total Kjeldahl et le phosphore total, les analyses doivent être effectuées dans les 24 heures qui suivent le prélèvement. Enfin, pour les métaux lourds, les substances organiques et le COT, ce délai ne doit pas excéder six mois.

5.1.4 SÉDIMENTS DE RÉFÉRENCE

Deux types de sédiments de référence ont été utilisés dans la présente étude. L'un (MRC - matériaux de référence certifiés), provenant de sites portuaires contaminés, caractérisés pour leurs teneurs en composés organiques et l'autre (sédiments de référence) provenant de zones relativement propres (non contaminées, localisées à proximité des sites à l'étude. L'avantage du premier est que l'on connaît exactement les concentrations de substances organiques présentes dans la matrice sédimentaire. On ne connaît cependant pas l'historique de ces matériaux et il est possible qu'il contiennent d'autres substances chimiques ou composés pouvant inhiber le développement ou la survie des organismes soumis aux essais. En revanche, l'avantage du second est qu'il possède des caractéristiques physico-chimiques similaires aux sédiments de dragage ou d'immersion mais on ne connaît pas avec certitude la nature des substances chimiques qu'il peut contenir.

La préparation d'un sédiment artificiel permettrait de pallier aux désavantages de ces deux types de sédiments puisque l'on pourrait définir et contrôler sa composition chimique. De plus, il serait possible de modifier ses propriétés physiques de façon à ce qu'il corresponde aux sédiments à l'étude.

RECOMMANDATION 6 Développement de sédiment(s) artificiel(s) pour les tests de toxicité.

5.1.5 ÉTUDES COMPARATIVES INTER-LABORATOIRES

Les études inter-laboratoires sont généralement effectuées afin de déterminer la variabilité statistique (précision) entre ces laboratoires. ASTM (1992) fournit une méthode standard pour la réalisation de telles études. Dans le cadre de la présente étude, seulement un essai, le Microtox, a été soumis à une comparaison inter-laboratoire et ce, seulement avec deux laboratoires. De plus, l'essai sur les échantillons de Cap-aux-Meules n'a pas été réalisé en même temps par les deux équipes. Au laboratoire de Dartmouth, l'essai a été réalisé en septembre 1994 alors qu'au Québec, les analyses ont eu lieu de juillet à la mi-novembre de la même année.

RECOMMANDATION 7 Coordination au niveau de la réalisation des bioessais sur un échantillon donné pour tous les laboratoires et implication de plus de deux laboratoires dans l'évaluation.

5.1.6 ANALYSES CHIMIQUES

Il est largement reconnu que le transport, la distribution et la biodisponibilité des métaux lourds dans les systèmes aquatiques dépendent de la forme chimique de l'élément qui, à son tour, est contrôlée par les caractéristiques physicochimiques et biologiques de l'écosystème. Par exemple, les composantes solides d'un sédiment (particules en suspension ou en déposition, matière organique, etc.) influencent la distribution de ces éléments par des phénomènes de sorption/désorption et des réactions de dissolution/précipitation. Par conséquent, l'identification de chacune des différentes formes élémentaires est plus appropriée que la détermination de la concentration totale des métaux lourds dans l'échantillon lorsque le but de l'analyse est d'évaluer les impacts de ces composés sur la faune aquatique. Cependant, les procédures d'échantillonnage, de transport et d'analyse, ainsi que la manipulation des échantillons peuvent modifier la forme chimique des éléments. Il faut donc s'assurer que la nature des métaux ne change pas entre le moment de l'échantillonnage et de l'analyse des sédiments. Il n'existe présentement aucune méthodologie permettant la préservation de la distribution originale des métaux dans un échantillon donné,

d'où l'importance d'être conscient des facteurs pouvant modifier les résultats d'analyse (Batley, 1989).

L'une des méthodes présentement utilisée pour déterminer les formes chimiques des métaux lourds est l'extraction séquentielle qui consiste à soumettre l'échantillon à une série de réactifs ayant des propriétés chimiques différentes et permettant d'extraire les formes associées aux substrats spécifiques (Tessier *et coll.*, 1978; Welte *et coll.*, 1983). Par exemple, l'acide acétique est utilisé pour attaquer et dissoudre les carbonates.

RECOMMANDATION 8 Examiner les avantages que procurerait l'extraction séquentielle des métaux dans l'évaluation de la qualité des sédiments dans le cadre du Programme d'immersion en mer.

Selon maints auteurs, la biodisponibilité des métaux lourds dans les sédiments dépend principalement de la concentration d'ions libres dans l'eau interstitielle (Di Toro *et coll.*, 1990; Allen, 1993). Il serait donc intéressant de déterminer les teneurs en métaux lourds dans cette fraction et de les comparer avec les résultats de toxicité.

RECOMMANDATION 9 Détermination de la teneur en métaux lourds à partir de la fraction extractible (eau interstitielle) et du sédiment entier.

De plus, il semble que lorsque les échantillons sédimentaires sont exposés à l'air, les métaux adsorbés à la matière organique ou aux sulfures volatils présents dans les sédiments, peuvent se répartir dans la phase aqueuse et exercer leur toxicité (Zhuang *et coll.*, 1994).

RECOMMANDATION 10 Réduire le plus possible le contact des sédiments avec l'air.

Sulfures

La majeure partie de la matière organique présente dans les sédiments anoxiques est oxydée par des bactéries qui utilisent les ions sulfates comme source d'électrons. Un des sous-produits de cette décomposition est la formation de sulfure d'hydrogène (H_2S). Cette forme de sulfure est la plus communément retrouvée dans les sédiments. Lors du dosage, il faut faire attention à ne pas favoriser l'oxydation et la volatilisation des sulfures volatils.

RECOMMANDATION 11 Afin de préserver l'échantillon pour la détermination des sulfures totaux, il faut verser la solution d'acétate de zinc dans le tube avant d'ajouter l'échantillon d'eau interstitielle.

5.1.7 PRÉPARATION DES EXTRAITS ORGANIQUES POUR LES TESTS DE TOXICITÉ

Parce que certains bioessais requièrent de très petits volumes d'échantillons (par exemple les essais de génotoxicité) et que les teneurs en substances chimiques sont généralement très faibles dans les échantillons, une étape de concentration est parfois nécessaire pour l'analyse. Les procédures de concentration sont basées sur les contaminants de type organique et incluent entre autres l'extraction Soxhlet proposée par le USEPA (1985). Cette méthode, développée pour les échantillons aqueux, repose sur l'utilisation de solvants organiques ultrapurs tels que le dichlorométhane (DCM). De polarité moyenne, le DCM permet d'extraire une vaste gamme de substances organiques; c'est pourquoi nous l'avons utilisé dans la présente étude. Cependant, il n'existe présentement aucune méthode d'extraction organique adaptée à des échantillons de sédiments.

RECOMMANDATION 12 Standardisation des procédures d'extraction incluant le mode de préservation, délais d'analyse, solvants à utiliser. il serait également intéressant d'examiner la possibilité et les avantages que représenterait une extraction de type séquentielle pour les substances organiques de façon à recueillir une classe de produits spécifique. Ceci nous permettrait de tester chacune des fractions organiques désirées pour leurs effets toxiques sur les organismes aquatiques. Cette procédure comporte toutefois certaines limitations puisqu'elle ne permet pas de considérer les différentes réactions entre les contaminants.

Il est possible que du soufre et des lipides présents dans les échantillons de sédiments, particulièrement dans ceux provenant de zones de pêche commerciale, causent certaines interférences lors des analyses. Dans la présente étude, les extraits ont été appliqués à une colonne de Florisil 60-100 (désactivé à 2%) dans le but de réduire la teneur de ces substances avant de procéder aux analyses chimiques; mais cette procédure n'a pas été utilisée pour les fractions destinées aux tests biologiques.

Recommandation 13 Passage des extraits sur colonne de Florisil avant de procéder aux tests

biologiques.

Recommandation 14 Caractérisation chimique des extraits organiques pour déterminer les concentrations de substances chimiques ainsi que la présence de certains composés organométalliques.

5.1.8 PARAMÈTRES BIOLOGIQUES

L'une des questions importantes à survenir dans tout processus d'évaluation de la toxicité d'un sédiment est la phase appropriée à utiliser. Ces phases sont catégorisées comme suit: extractible (composés organiques), aqueuse (eau interstitielle) et solide (sédiment après extraction de l'eau interstitielle), et sédiment entier. Ces phases, lorsque considérées dans un bioessai donné, comportent toutes des forces et des faiblesses qui justifient leur intégration dans tout processus d'évaluation de la qualité des sédiments (Burton, 1991). Plusieurs études ont comparé les différentes fractions en utilisant des tests différents ou le même bioessai et chacune des phases s'est révélée, dans certaines conditions données, la plus appropriée (Ankley *et coll.*, 1991; Harkey *et coll.*, 1994; Knezovich *et coll.*, 1987). En fait, la multitude de variables physicochimiques et biologiques rend difficile l'obtention d'un accord unanime entre les auteurs quant à la toxicité relative des différentes phases sédimentaires (Burton, 1991). Il importe donc qu'elles soient toutes considérées dans un processus d'évaluation de la qualité des matériaux dragués. De plus, afin d'obtenir un diagnostique le plus juste possible, un minimum de deux espèces, reconnues comme étant sensibles et appropriées pour une phase particulière, devraient être utilisées pour chacune de ces fractions. Par exemple, dans la présente étude, un seul essai a été réalisé avec la phase solide, soit le Microtox. Un autre essai, utilisant un organisme de niveau trophique différent de celui des bactéries, devrait être intégré dans l'évaluation.

RECOMMANDATION 15 Évaluation d'autres essais portant sur la phase solide dans le cadre du Programme d'immersion en mer.

Des problèmes de sensibilité de certains tests décrits dans la section III du présent document sont principalement dus à l'absence de procédures normalisées pour la plupart de ces tests lorsqu'il s'agit de sédiments. Par exemple, les concentrations d'extrait organique testées dans cette étude étaient basées sur les résultats de toxicité obtenus avec le Microtox sur cette phase sédimentaire. Par conséquent, les concentrations maximales testées variaient d'un échantillon à l'autre. L'absence d'effet génotoxique ou

mutagénique de certains échantillons est possiblement due au fait que les concentrations testées n'étaient pas suffisamment élevées.

RECOMMANDATION 16 Poursuivre les projets de recherche portant sur l'adaptation de tests de génotoxicité et de mutagénicité tels que le SOS Chromotest, le test de fluctuation et l'APA à des échantillons de sédiments. Évaluer la réplicabilité de ces essais avec un grand nombre d'échantillons, ainsi qu'une vaste gamme de niveaux de contamination.

Mis à part les tests de subléthalité considérés dans cette deuxième section, ainsi que les essais de génotoxicité décrits dans la section qui suit, des tests de bioaccumulation seraient également appropriés pour évaluer la toxicité des sédiments marins. La bioaccumulation réfère à l'accumulation des contaminants dans les tissus des organismes par différentes voies incluant la respiration, l'ingestion, ou le contact direct avec les sédiments et/ou l'eau contaminé(s). Ce type de bioessai permettrait de prédire l'existence d'une relation de causalité entre la présence d'un organisme dans un secteur contaminé et l'élévation de la teneur en contaminants dans ses tissus, comparativement à d'autres individus de la même espèce retrouvés dans des zones non-contaminées.

Les essais de bioaccumulation sont basés sur l'analyse de tissus biologiques après une période d'exposition de 10 ou 28 jours. Une durée d'exposition de 10 jours est préférable lorsque les contaminants d'intérêt sont les métaux, alors que les composés organiques ou organométalliques requièrent une période de 28 jours (Lee *et coll.*, 1989). Un document préparé par Lee *et coll.* (1989) traite entre autres des différentes méthodes recommandées par le USEPA pour l'évaluation de la bioaccumulation par les organismes benthiques.

RECOMMANDATION 17 Intégration de tests de bioaccumulation dans la batterie de bioessais sur les sédiments.

Bien que les algues planctoniques représentent la base de la chaîne alimentaire aquatique et qu'elles soient particulièrement sensibles à certaines classes de produits chimiques telles que les herbicides (Thomas *et coll.*, 1986), relativement très peu de bioessais de sédiments sont basés sur l'utilisation de ces organismes.

RECOMMANDATION 18 Développement ou adaptation d'un essai de toxicité de sédiments marins sur des algues planctoniques.

5.2 RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Le choix des biotests réalisés dans le cadre de la présente étude fut basé sur les connaissances actuelles dans le domaine de l'écotoxicologie. Il importe donc de reconnaître qu'à mesure que progressera la recherche dans ce domaine, d'autres paramètres bioanalytiques devront être considérés quant à leur potentiel pour évaluer le potentiel toxique de sédiments marins contaminés. Tel que décrit dans la première section du présent document, le but principal de l'étude consistait à proposer une série de bioessais permettant d'évaluer la toxicité d'une gamme de matrices sédimentaires et de comparer les sites selon leur niveau de toxicité. L'étude visait, de plus, à recommander une approche de gestion pour les matrices sédimentaires contaminées, en intégrant une batterie de paramètres bioanalytiques offrant un potentiel important pour une telle évaluation écotoxicologique.

Pour ce faire, trois sites sédimentaires ont été considérés dans l'analyse: (1) Anse-à-Beaufils (Gaspésie, Québec), où trois aires furent échantillonnées en 1993 et 1994 (aire de dragage à l'intérieur du port ainsi que les aires d'immersion et de référence localisées à l'extérieur de celui-ci); (2) Black Point (Nouveau Brunswick), où deux aires furent analysées en 1993 (aires de dragage et de référence); et enfin (3) Cap-aux-Meules (Îles-de-la-Madeleine, Québec), où deux aires furent évaluées en 1994 (aire de dragage à l'intérieur du port et aire de référence à l'extérieur de celui-ci).

Ces sites, à l'exception de l'aire d'immersion de l'Anse-à-Beaufils où aucune analyse chimique n'a été effectuée (à l'exception du mercure et de quelques analyses sur des sédiments de référence), comportent une vaste gamme de composés chimiques, incluant les HAP, BPC, pesticides organochlorés et métaux lourds. Des concentrations importantes de ces substances, dépassant parfois les critères de qualité d'Environnement Canada, furent détectés dans certains échantillons. Par exemple, dans le cas de Cap-aux-Meules, les teneurs en benzo(a)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène et benzo(a)anthracène dépassent les SEN (seuils d'effets néfastes) dans la station 1 de l'aire de confinement. Cette aire comporte également des concentrations importantes de pesticides organochlorés, bien qu'elles soient inférieures aux critères de qualité d'Environnement Canada. De plus, quatre stations de l'aire 2 (face au quai des pêcheurs) dépassent le critère de qualité pour l'Arochlor 1254; il s'agit des stations 8, 9, 9a et 13. Enfin, trois des métaux lourds analysés, soit le cuivre, le plomb et le zinc, sont présents à des concentrations supérieures aux critères dans

certaines stations de l'aire de confinement proposée pour ce site.

Les analyses biologiques ont démontré que des effets biologiques importants chez les organismes benthiques peuvent résulter d'une exposition aux sédiments à l'étude. Différents niveaux de toxicité ont été observés à divers niveaux trophiques, notamment chez deux espèces d'amphipodes (*A. virginiana* et *R. abronius*), l'oursin blanc (*L. pictus*), plusieurs espèces bactériennes (*V. fischeri*, *E. coli*, *S. typhimurium*) et une espèce de poisson (*O. mykiss*). Les effets ont, de plus, été notés à divers niveaux d'organisation biologique, allant du niveau moléculaire, p.e. les tests d'inductions biochimiques (section 3), à l'organisme entier, soit des effets reliés à la reproduction et à la survie (section 2).

Afin de répondre aux objectifs exposés ci-dessus, une série d'évaluations furent effectuées à partir des résultats d'analyse. Les points suivants résument les résultats de ces évaluations:

A. Évaluation des niveaux d'association entre;

(i) les fractions sédimentaires:

- Les données de toxicité obtenues avec les phases solide et organique des sédiments lors de l'essai Microtox concordent à 100%, c'est-à-dire que les deux phases ont démontré des réponses similaires (soit la présence de toxicité ou l'absence d'effet) pour l'ensemble des échantillons. Toutefois, il n'y a aucune corrélation significative entre ces fractions; en d'autres termes, lorsque les données sont classées par ordre croissant de toxicité, elles n'obtiennent pas le même rang pour les deux phases.
- Le degré de sensibilité de *V. fischeri* aux sédiments à l'étude diminue comme suit: extrait organique et phase solide > eau interstitielle.

(ii) les bioessais conventionnels (section 2):

- Lorsque tous les essais conventionnels réalisés (Microtox, survie des amphipodes, fertilisation des oursins) sont intégrés dans l'évaluation, le taux de concordance est très faible (33%), indiquant que des effets différents sont notés dans les trois essais pour le même échantillon.
- *V. fischeri* a démontré une sensibilité plus importante à la toxicité des sédiments marins que *A.*

virginiana et *L. pictus*.

(iii) les bioessais conventionnels vs tests de génotoxicité (section 3):

- ▶ En ce qui concerne l'aire d'immersion de l'Anse-à-Beaufils, aucune station ne s'est révélée non-toxique lors du SOS Chromotest, le seul test de génotoxicité réalisé pour cette aire. Les essais conventionnels ont par ailleurs décelé des effets toxiques chez *V. fischeri* lorsqu'exposée à la fraction solide ainsi qu'à l'extrait organique.
- ▶ Un très faible pourcentage (9%) de stations de Cap-aux-Meules ont causé des réponses génotoxiques chez les souches bactériennes (*E. coli* PQ37 et *S. typhimurium* TA1535/psK1002) soumis aux essais. La station 1 de l'aire de confinement a démontré les niveaux de génotoxicité les plus élevées pour ce site, suivie des stations 2 et 5 provenant également de cette aire portuaire. Ces stations se sont également révélées toxiques lors des tests conventionnels, à l'exception de l'essai sur les amphipodes.
Des inductions enzymatiques au niveau du cytochrome P-450 1A furent également observées dans les hépatocytes de poissons exposés à ces sédiments.
- ▶ Le test de précipitation alcaline (APA) s'est révélé le plus sensible des trois essais de génotoxicité réalisés dans cette étude.

Il est donc possible que des sédiments qui démontrent des effets toxiques au niveau de l'organisme ou de la cellule peuvent également causer une réponse à des niveaux inférieurs d'organisation. Par conséquent, il importe de considérer plusieurs niveaux d'organisation biologique lors de la sélection d'une batterie de bioessais, particulièrement lorsque les niveaux de contamination des sédiments sont notables. La méthode d'extraction organique, essentielle pour la réalisation des essais de génotoxicité et d'induction biochimique dont traite la deuxième section de ce rapport, demande certaines modifications afin de conserver le plus possible la composition physico-chimique "originale" des sédiments. De plus, ces essais méritent d'être évalués avec un plus grand nombre d'échantillons, représentatifs d'une gamme plus importante de niveaux de toxicité.

(iv) entre les laboratoires (section 2):

- ▶ Une concordance parfaite (100%) et une corrélation significative furent notée entre les deux

laboratoires impliqués (le Centre Saint-Laurent, à Montréal et l'Institut d'océanographie Bedford, à Dartmouth) pour les essais Microtox en phase solide. Ainsi, les deux équipes ont notés des effets similaires pour la majorité des échantillons et, lorsque classées par ordre croissant de toxicité, les stations ont obtenues le même rang pour les deux laboratoires.

Ces résultats démontrent l'importance d'utiliser une série de paramètres biologiques et de fractions sédimentaires pour évaluer la toxicité des sédiments marins. Chaque organisme répond différemment en présence de matrices contaminées et des effets différents sont notés lorsque le même organisme est exposé à différentes fractions de sédiments. Une analyse basée sur un seul essai ou sur une seule phase pourrait, par conséquent, mener à de fausses conclusions si l'analyste tentait de classer les stations selon leur niveau de toxicité. L'essai Microtox semble approprié pour évaluer la variabilité inter-laboratoire dans la réalisation de tests biologiques mais un nombre plus important de laboratoires et de sites devraient être considérés dans les projets futurs. De plus, l'évaluation devrait porter sur des sédiments offrant une gamme plus importante de niveaux de toxicité.

B. Comparaisons inter-sites et intra-sites:

(i) Black Point vs Anse-à-Beaufils vs Cap-aux-Meules:

- Les stations situées à l'intérieur du port de l'Anse-à-Beaufils ont démontré une toxicité nettement supérieures à l'ensemble des stations analysées, à l'exception de celles localisées dans l'aire de confinement (1) de Cap-aux-Meules. En effet, ces dernières ont démontré des niveaux de toxicité similaires aux stations de dragage de l'Anse-à-Beaufils. Les effets observés avec ces deux groupes de stations sont toutefois attribuables à des fractions sédimentaires différentes. Ainsi, la toxicité est principalement attribuable aux extraits organiques dans le premier cas et à l'eau interstitielle ainsi qu'à la fraction solide dans le deuxième.

(ii) Anse-à-Beaufils - aire de dragage vs aire d'immersion:

- Les indices ECOTOX obtenus pour ces stations illustrent les écarts importants notés entre ces aires. L'indice moyen obtenu pour l'aire de dragage est de 1417, comparativement à 200 pour l'aire d'immersion. Ainsi, des niveaux de toxicité élevée (≥ 900) furent notés pour l'eau interstitielle et la fraction solide des sédiments appartenant au premier groupe.

(iii) Cap-aux-Meules - aires de dragage et de référence

- Les analyses effectuées avec les données brutes (présentées en section 2) et les données uniformisées (section 4) mènent aux mêmes conclusions. En effet, les bioessais réalisés permettent d'établir des distinctions entre l'aire de référence et les aires de dragage, plus particulièrement l'aire de confinement. Les indices ECOTOX obtenus pour les stations de l'aire 1 sont, en moyenne, environ huit fois plus élevées que ceux des stations de référence. Les résultats de toxicité en phase solide et organique sont principalement responsables des écarts notés entre ces groupes de stations.

Par conséquent, l'indice ECOTOX représente un outil prometteur permettant d'établir des distinctions entre des aires sédimentaires contaminées sur la base des données de toxicité. Cette approche, bien qu'elle soit présentement au stade de développement au Centre Saint-Laurent, comporte plusieurs avantages importants, comparativement à l'approche conventionnelle basée sur l'utilisation des données brutes. L'un de ces avantages provient du fait qu'elle tient compte du nombre d'essais réalisés et que, peu importe ce nombre, une valeur intégrant les résultats de tous les tests effectués est attribuée à chacune de stations; une comparaison de l'ensemble des stations considérées est alors possible. En revanche, le problème rencontré avec l'analyse statistique basée sur les données brutes est que l'analyse statistique n'est pas aussi valable dans les cas où il y a des données manquantes pour certains essais (p.e. tests sur amphipodes et oursins, dans cette étude). Dans ces cas, il est possible que des groupes complets de stations doivent être omis de l'analyse. Ce problème ne se pose plus lorsque l'indice ECOTOX est utilisé. De plus, cet indice permet de comparer les réponses toxiques sur une base commune, soit en termes de: UT / g sédiment sec. Enfin, il permet d'établir des seuils de toxicité offrant une base cohérente et scientifiquement défendable pour la prise de décision face à l'utilisation de déblais de dragage contaminés.

C. Évaluation des niveaux d'association entre les paramètres chimiques et biologiques

- Les concentrations de HAP (de poids moléculaire faible et élevé) et de zinc sont fortement corrélées aux résultats de toxicité bruts obtenus avec le Microtox en phases solide et organique (section 2) ainsi qu'aux indices ECOTOX (section 4).
- Les teneurs en carbone organique total (COT) sont, quant à elles corrélées avec les données de toxicité obtenue lors du Microtox sur l'extrait organique ainsi qu'avec l'indice ECOTOX.

Ces résultats semblent supporter l'hypothèse d'une relation de causalité mais lorsque les stations sont considérées de façon individuelle, la correspondance entre les deux types de mesures n'est pas aussi évidente. De plus, la gamme de substances chimiques quantifiées lors des analyses de caractérisation ne représente probablement qu'une partie de ce qui est présent dans le milieu. Les résultats d'analyses chimiques doivent par conséquent être interprétés et utilisés avec prudence. La corrélation importante notée entre certains métaux lourds et la toxicité des extraits organiques, en plus de l'induction des métallothionéines dans les hépatocytes de truites lorsqu'exposés à ces extraits laissent supposer la présence de composés organométalliques dans les extraits. Ces extraits devraient donc faire l'objet d'analyses chimiques afin de vérifier cette hypothèse.

En résumé, cette étude, bien que basée sur un nombre limité d'aires sédimentaires, suggère que les bioessais conventionnels tels que le Microtox et le test de fertilisation des oursins, les tests de génotoxicité tels que l'APA et le SOS Chromotest, ainsi que le test de fluctuation offrent un potentiel important dans l'évaluation de la toxicité de sédiments marins. Leur intégration dans un outil mathématique tel que l'indice ECOTOX contribuerait sans aucun doute à faciliter la prise de décision en ce qui concerne la gestion des matrices contaminées. Ces derniers nécessiteraient toutefois d'être évalués pour leur réplicabilité intra- et inter-laboratoire en ce qui concerne les échantillons de sédiments contaminés. De plus, la méthode d'extraction organique requiert certains ajustements afin de pallier au problème de dissolution incomplète rencontré au cours de cette étude. L'intégration d'autres essais, tels que ceux en stade de développement au Centre Saint-Laurent (OFM, MT) pourraient également être avantageuse dans le cadre d'un exercice d'évaluation.

SECTION V
LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE A. Photographies prises lors de l'échantillonnage à Cap-aux-Meules.
- ANNEXE B. Concentrations de substances organiques mesurées en 1992 pour les sédiments de Cap-aux-Meules.
- ANNEXE C. Contenants, modes de conservation et quantités de sédiments utilisés pour les analyses.
- ANNEXE D. Concentrations certifiées et mesurées de composés organiques dans les matériaux de référence certifiés.
- ANNEXE E. Résultats des bioessais réalisés sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules, exprimés en termes de codes de toxicité (tels que définis au tableau 3).
- ANNEXE F. Propriétés physiques et composantes inorganiques, non-métalliques des sédiments à l'étude.
- ANNEXE G. Concentrations de composés organiques et de métaux dans les sédiments des sites de dragage et d'immersion.
- ANNEXE H. Concentrations moyennes de substances organiques dans les aires de dragage de Cap-aux-Meules (données 1992 et 1994).
- ANNEXE I. Résultats des essais de toxicité effectués sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules en 1994.
- ANNEXE J. SOS Chromotest
- ANNEXE K. Test de fluctuation
- ANNEXE L. Mutatox
- ANNEXE M. Références pour les essais de précipitation alcaline de l'ADN (APA) et MT.
- ANNEXE N. Résultats des essais de génotoxicité et mutagénicité réalisés sur les sédiments de Cap-aux-Meules (1994).
- ANNEXE O. Résultats des essais de génotoxicité sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils (1994).
- ANNEXE P. Exemples de calculs - Détermination des UTs / g sédiment sec.
- ANNEXE Q. Toxicité exprimée en UT / g sédiment sec (données 1993-94).
- ANNEXE R. Humidité totale et résiduelle de sédiments analysés en 1993 et 1994 et poids de sédiment sec associé aux fractions sédimentaires.
- ANNEXE S. Exemples de calculs - Détermination des limites de détection en UTs / g sédiment sec. (Données 1993-94).
- ANNEXE T. Facteurs d'accroissement de toxicité par rapport au seuil d'effet mesurable

ANNEXE U. Seuils de toxicité déterminés pour chaque paramètre bioanalytique.

ANNEXE V. Indice ECOTOX calculé par rapport aux facteurs d'accroissement pour les essais de
 subléthalité (données 1993-94).

ANNEXE A

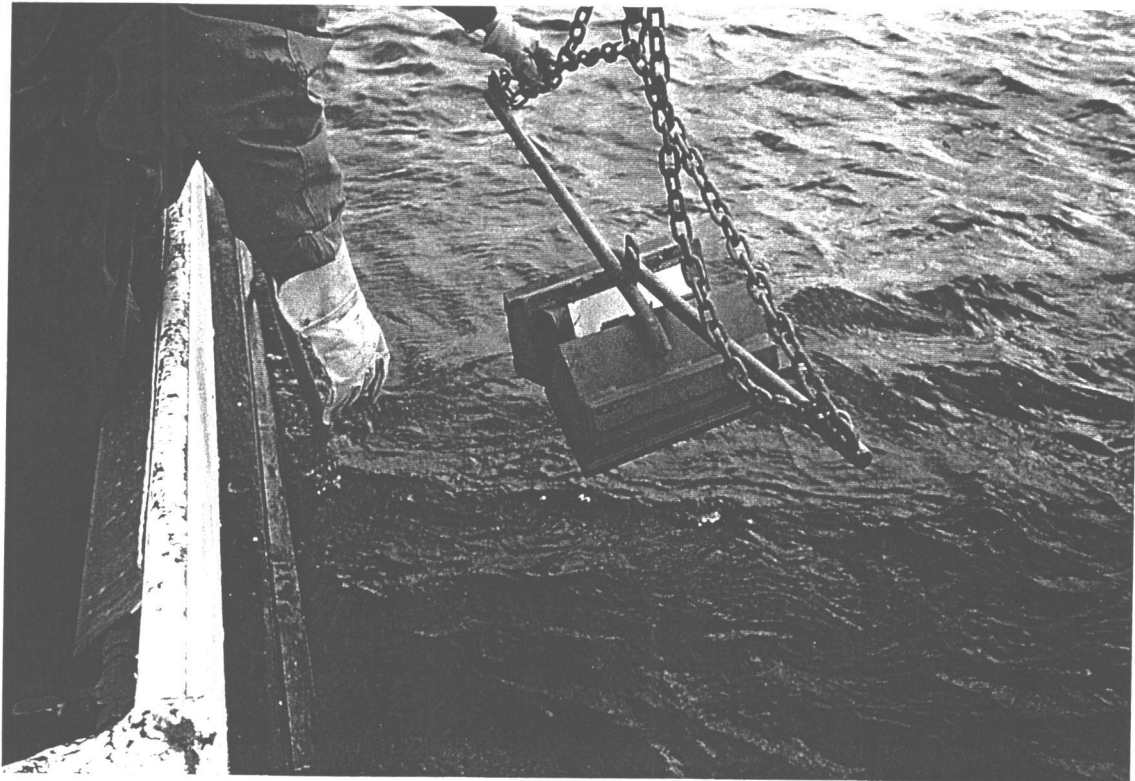
LISTE DES PHOTOS

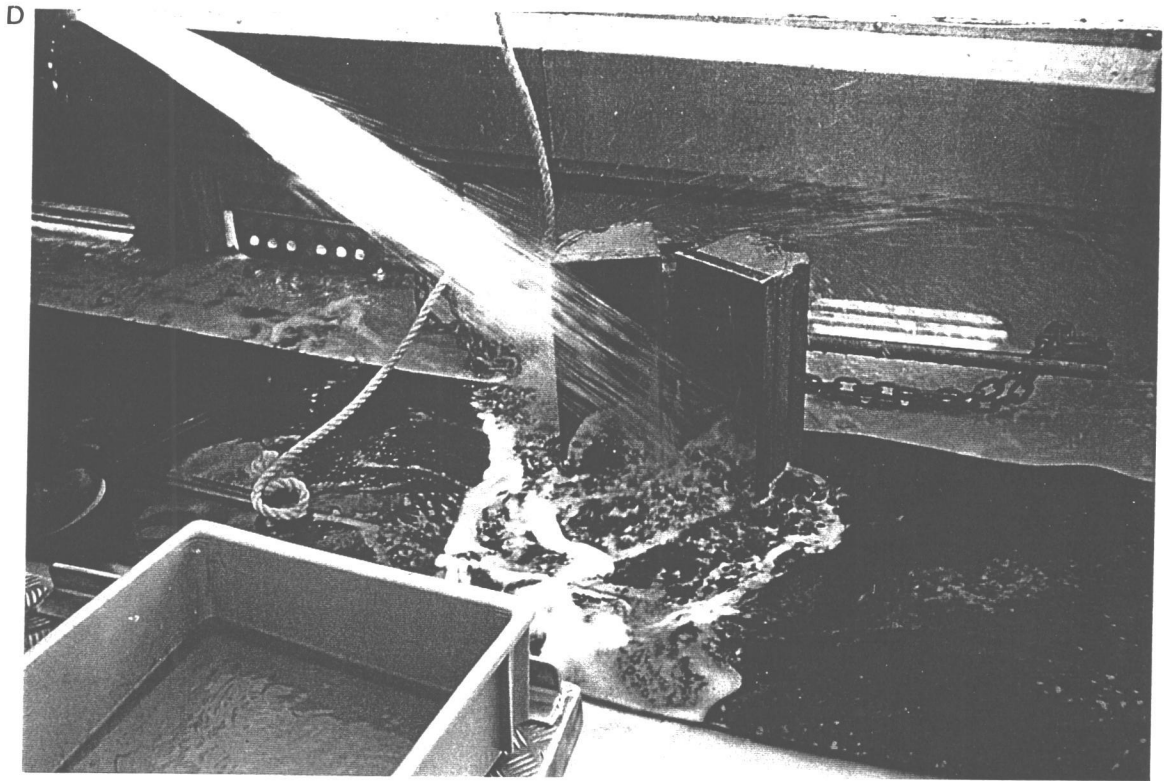
- A. Site portuaire de Cap-aux-Meules, Iles-de-la-Madeleine
- B. Descente de la benne
- C. Déposition des sédiments dans un contenant de plastique (1 L)
- D. Rinsage de la benne
- E. Homogénéisation des sédiments
- F. Répartition des sédiments dans des sacs de plastique
- G. Disposition des sacs dans les seaux pré-identifiés par numéro de stations

A



B





E



F



G



ANNEXE B
Concentrations de substances organiques mesurées
en 1992 pour les sédiments de Cap-aux-Meules.

Aire d'échant. 1992	Aire équivalente 1994	Échantillon	HAP		totaux	BPC totaux
			Type 1	Type 2 µg/g		µg/g
D	1A	8	1,3	5	6,3	0,27*
C	1B	7	26*	41	77	0,26*
A	2A	1	0,06	0,1	0,16	0,12*
		1p	0,06	0,1	0,16	0,35*
		2	0,06	0,1	0,16	0,04
		4	0,2	0,3	0,5	0,29*
		12	0,06	0,1	0,16	0,14*
		12p	0,06	0,1	0,16	0,05
		13	0,06	0,7	0,76	0,11*
		15	0,07	0,8	0,87	0,11*
		16	0,07	0,4	0,47	0,12*
E	2B	9	0,06	0,1	0,16	0,11*
		11	0,1	0,1	0,2	0,05
		14	0,06	0,1	0,16	0,06
F	3A	17	0,06	0,1	0,16	0,28*
		18	0,06	0,1	0,16	0,19*
		19	0,06	0,1	0,16	0,08
		20	0,06	0,1	0,16	0,26*

* - concentration dépasse le seuil d'effets mineurs (SEM) pour le Saint-Laurent (Environnement Canada, 1992)

HAP: Type 1- poids moléculaire moyen Type 2- poids moléculaire élevé

ANNEXE C.
Contenants, modes de conservation et quantités de sédiments utilisés pour les analyses.

Type d'analyses	Laboratoire d'analyse	contenants		Mode de conservation	Sédiment quant. requise/éch.	Nombre d'échantillons		
		description	total requis			Anse-à-Beaufils**	Cap-aux-Meules***	
chimiques								
	organique	Novamann Int.	500 mL verre	36	4°C	50 g	2	34
	inorganique*	CSL	100 mL verre ombré	36	-20°C	10 g	2	34
	mercure	CSL	100 mL verre ombré	42	-20°C	10 g	8	34
	réserve	CSL	500 mL verre	42	-20°C	50 g	12	30
physiques et chimiques, non-métal.								
	% humidité totale	Novamann Int.	100 mL verre	30	4°C	50 g	0	30
	% humidité résiduelle	CSL	500 mL verre	42	4°C	1,000 mL	12	30
	granulométrie et COT	Burlington	100 mL verre ombré	42	-20°C	25 mL	12	30
	solides volatils	Burlington	50 mL verre	42	-20°C	25 mL	12	30
	N total, P total, etc.	CSL	125 mL plastique	42	4°C	50 mL	12	30
	sulfures	CSL	125 mL plastique	42	4°C	50 mL	12	30
biologiques								
	Microtox	CSL - Dartmouth	1,000 mL verre	42	4°C	0,9 g	12	30
	amphipodes	Dartmouth	sac plastique 4L	22	4°C		10	12
	oursins	Dartmouth	sac plastique 4L	22	4°C		10	12
	réserve	CSL	500 mL verre	42	-20°C	50 g	12	30

* excluant le mercure

** échantillons d'essai et/ou de référence

*** échantillons d'essai et de référence + matériaux de référence

ANNEXE D
Concentrations certifiées et mesurées des composés organiques
dans les matériaux de référence

		MRC	HS2-1			HS2-2			HS3-1			HS3-2		
		concentration	certifiée µg/Kg	mesurée µg/Kg	mes/cert µg/Kg	certifiée µg/Kg	mesurée µg/Kg	mes/cert	certifiée mg/Kg	mesurée mg/Kg	mes/cert	certifiée mg/Kg	mesurée mg/Kg	mes/cert
BPC		138	6,92 (0,52)	6,2	0,90	6,92 (0,52)	7	1,01						
		153	6,15 (0,67)	5,1	0,83	6,15 (0,67)	5	0,81						
		170	1,07 (0,15)	1	0,93	1,07 (0,15)	1,4	1,31						
		180	3,7 (0,33)	3,2	0,86	3,7 (0,33)	3,5	0,95						
		194	0,61 (0,07)	0,57	0,93	0,61 (0,07)	0,54	0,89						
		209	0,9 (0,14)	0,65	0,72	0,9 (0,14)	0,82	0,91						
HAP□ type 1		NAP							9 (0,7)	4,7	0,52	9 (0,7)	4,8	0,53
		ACY							0,3 (0,1)	0,077	0,26	0,3 (0,1)	0,079	0,26
		ACE							4,5 (1,5)	2,1	0,47	4,5 (1,5)	2,3	0,51
		FLU							13,3 (3,1)	5,1	0,38	13,3 (3,1)	5,6	0,42
		PHE							85 (20)	50	0,59	85 (20)	53	0,62
		ANT							13,4 (0,5)	5,9	0,44	13,4 (0,5)	5,1	0,38
HAP type 2		FLA							60 (9)	37	0,62	60 (9)	39	0,65
		PYR							39 (9)	23	0,59	39 (9)	24	0,62
		BAN							14,6 (2)	7,7	0,53	14,6 (2)	8,1	0,55
		CRY							14,1 (2)	8	0,57	14,1 (2)	8,6	0,61
		BBF							10,5	9	0,86	10,5	9,8	0,93
		BAP							7,4 (3,6)	3,4	0,46	7,4 (3,6)	3,5	0,47
		DBA							1,3 (0,5)	0,87	0,67	1,3 (0,5)	0,91	0,70
		IND							5,4 (1,3)	2,5	0,46	5,4 (1,3)	2,6	0,48
		BGP							5	2,6	0,52	5	2,8	0,56

□ NAP naphthalène; ACY acénaphthalène; ACE acénaphthène; FLU fluorène; PHE phénanthrène; ANT anthracène; FLA fluoranthène; PYR pyrène; BAN benz(a)anthracène,
CRY chrysène; BBF benzo(bjk)fluoranthène; BAP benzo(a)pyrène; DBA dibenz(a)anthracène; IND indéno(123cd)pyrène; BGP benzo(ghi)pérylène
type 1- faible poids moléculaire; type 2- poids moléculaire élevé

ANNEXE E

Résultats obtenus avec les bioessais réalisés sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules, aux laboratoires de Dartmouth et du Centre Saint-Laurent.

(Les résultats sont exprimés en termes de niveaux de toxicité (tels que définis au Tableau 3).

Site	Station	V. fischeri					A. virginiana % survie Séd. entier N-E	L. pictus % fécondation Eau interstitielle N-E
		Eau interstitielle		Extractions organiques Qc	Phase solide			
		Qc	N-E		Qc	N-E		
Anse-à-Beaufils								
Sédiments	31	o	o	xx	x	x	o	x
Immergés	32	o	o	x	x	x	o	o
	33	o	o	xxx	xx	x	o	x
	34	o	o	xxx	xx	x	o	x
	35	o	o	xx	x	x	o	o
	36	o	o	xxx	x	x	o	x
	37	o		x	x			
	38	o	o	x	x	x	o	o
	Sédiments de référence	39	o	o	x	x	x	o
40		o		o	x			
41		o	o	x	x	x	o	x
42		o		o	x			
Cap-aux-Meules								
Sédiments	1	o		xxx	xx			
portuaires	2	x	o	xxx	xx	x	o	o
	2A	x	o	xxx	xx	xx	o	o
	2B	x	x	xxx	xx	x	o	x
	3	o		xxx	xx			
	4	x	xx	xxx	xx	x	o	x
	5	x	o	xxx	xx	xx	o	x
	5A	o		xxx	xx			
	5B	x		xxx	xx			
	6	o		xxx	xx			
	7	x	o	xxx	x	x	o	x
	8	o	o	xxx	xx	xx	o	o
	9	o		xxx	xx			
	9A	o			xx			
	9B	o			xx			
	10	xx	x	xxx	xx	xx	x	x
	11	xx		xxx	xx			
	12	o		xxx	x			
	13	xx	o	xxx	x	x	o	o
	14	o	o	xxx	xx	xx	o	x
	15	o		xxx	xx			
	16	xx		xxx	xx			
	17	o		xxx	xx			
	18	x		xxx	xx			
	19	xx		xxx	xx			
	20	x		xxx	xx			
	Sédiments de référence	21	o	o		x	o	o
21A		xx		x	x			
21B		x			x			
22		o	o	x	x	x	o	o
MRC	HS-1			xxx	xx			
	HS-2			xxx	xx			
	HS-3			xxx	xxx			
	HS-4			xxx	xxx			

□ * toxicité marginale, ** toxicité modérée, *** toxicité importante, o non-toxique

ND non-défecté

MRC matériaux de référence certifiés

ANNEXE F
Propriétés physiques et composantes non-métalliques des sédiments à l'étude.

Site	Aire	Station	Granulométrie	Humidité		COT	Solides volatils	Azote	Azote	phosphore	sulfures	
			<63 µm	totale	résiduelle			Kjeldahl total	ammoniacal	total	totaux	
			(%)			mg/L						
Anse-à-Beaufils Sédiments d'immersion		31	38,37	43,2	28,3	1,42	4,05	6	3,15	1,81	0,13	
		32	34,56	40,5	26,2	1,93	3,17	6,81	3,42	2,54	0,14	
		33	39,03	41,5	27,2	1,586	3,71	6,24	3,29	3,53	0,09	
		34	40,73	39,5	27	0,283	3,82	6,01	4,83	4,27	0,11	
		35	32,62	31,4	23,9	0,292	2,67	4,74	4,27	2,77	0,09	
		36	34,23	34,5	24	0,548	2,11	11,15	8,94	1,52	0,06	
		37	31,95	31,7	23,2	0,309	1,64	4,85	3,16	2,6	0,07	
		38	31,47	33,8	23,5	0,642	1,52	3,86	2,06	2,82	0,06	
Sédiments de référence		39	34,22	32,3	22,5	0,294	1,51	5,47	4,5	3,07	0,09	
		40	34,9	35,6	25,7	0,547	2,49	5,32	1,89	2,65	0,12	
		41	36,15	36,4	22,6	0,345	2,44	6,69	3,7	3,12	0,11	
		42	34,57	37,3	25,1	0,584	1,82	3,06	2,46	2,4	0,06	
Cap-aux-Meules Sédiments de dragage	1	1	27,52	42,9	27,2	2,586	4,15	24,9	26,3	1,22	29	
		2	25,52	35,9	25,1	1,138	2,98	5,16	17	1,28	0,13	
		2A	31,14	40,2	24,8	2,435	3,85	14,7	17,3	1,49	0,3	
		2B	29,54	40,9	26,5	1,223	3,84	22	26,2	1,62	32	
		3	31,02	43	27,5	1,378	3,83	10,8	15,5	1,7	0,13	
		4	32,52	39,7	25,6	1,431	3,49	10,1	51,6	1,89	35	
		5	34,40	49,5	26,6	1,83	3,89	7,21	21,2	1,73	0,49	
		5A	33,72	43	25,9	1,194	3,1	7,71	22,1	2,26	0,21	
		5B	29,83	42,1	24,3	0,684	3,19	4,08	16,6	1,7	0,19	
		6	40,70	46,4	25	0,187	3,4	4,98	19,8	2,34	34	
		7	54,90	63,6	42,6	1,144	6,15	4,13	18,2	2,82	27	
		2	8	57,74	50,2	32,6	0,681	4,32	20,2	20,8	1,62	0,21
			9	50,87	47,8	29,1	1,072	4,07	8,96	32,1	1,13	7,2
			9A	48,26	48,7	27	1,125	4,41	4,04	11,2	1,06	0,17
			9B	33,86	44,5	24,2	0,445	3,33	23,9	12,5	0,8	0,17
			10	49,66	50,9	33,2	0,777	5,38	87,3	85,8	2,46	46
	11		47,34	45,1	31,1	1,057	4,61	60,1	60,7	4,71	46	
	12		37,27	43,7	25,6	0,463	3,35	15,4	14,4	1,43	19	
	13		27,20	39,6	21,9	0,226	2,44	27,6	27	3,11	36	
	14		61,73	57,8	44,7	1,135	8,05	34,7	26,4	4,4	21	
	15		47,23	53,5	32,2	0,293	6,03	35,3	37,7	6,66	46	
	3	16	29,90	43,6	26,9	0,683	3,54	17	7,3	4,22	70	
		17	38,30	47,6	28	0,928	3,2	35,9	30,3	2,45	0,27	
		18	41,23	48,5	26,9	0,938	3,51	37,4	7,2	2,32	19	
		19	43,56	48,7	30,9	0,793	5,3	50,8	52	4,34	75	
		20	54,58	51	31,5	0,714	5,09	58,5	61,3	7,07	52	
Sédiments de référence	4	21	12,36	31,3	21,2	0,079	0,98	17,3	15,3	9,42	0,08	
		21A	12,96	29,8	22,4	0,556	1,06	20,7	19,6	11	0,28	
		21B	13,63	31,1	22,5	0,175	1,09	16	14,4	6,22	0,83	
		22	12,98	34,4	23	0,03	1,15	17,5	18,7	8,62	0,13	

ANNEXE G
Concentrations en HAP* des échantillons de sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules.
Les concentrations sont exprimées en µg /g.

Matériaux analysés	Aire de dragage	Stations	HAP de Type 1: faible poids moléculaire							HAP de Type 2: poids moléculaire élevé														Total Type 2	TOTAL Type 1 + 2
			NAP	ACY	ACE	FLU	PHE	ANT	Total Type 1	FLA	PYR	BAN	CRY	BBF/BJF/ /BKF	BAP	IND	DBA	BGP	Tetralin	2-MNP	1-MNP	2-CNP			
Anse-à-Beaufils Sédiments immergés		Limite dét.	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03		0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03				
		31																							
		32																							
		33																							
		34																							
		35																							
		36																							
		37																							
	38																								
Sédiments de référence		39																							
		40																							
		41																							
		42																							
Cap-aux-Meules Sédiments portuaires	1A	1	0,14	0,39		0,47	2,3	0,51	3,81	5,2	3,8	1,3	1,4	2	0,75	0,4	0,12	0,43		0,17	0,1		15,67	19,48	
	1B	2					0,27		0,27	0,54	0,38	0,15	0,12	0,16	0,07								1,42	1,69	
		2A		0,07			0,28	0,09	0,44	0,85	0,63	0,25	0,2	0,29	0,14	0,08		0,09					2,53	2,97	
		2B		0,12		0,12	0,71	0,16	1,11	1,1	0,84	0,34	0,27	0,39	0,37	0,09		0,12					3,52	4,63	
		3	0,14	0,27		0,27	1,1	0,19	1,97	1,7	1,2	0,41	0,33	0,37	0,17			0,08					4,26	6,23	
		4					0,12	0,03	0,15	0,22	0,16	0,07	0,06	0,09	0,05			0,03					0,68	0,83	
	1C	5					0,11	0,04	0,15	0,24	0,18	0,06	0,05	0,08	0,03							0,64	0,79		
		5A					0,09	0,05	0,14	0,24	0,16	0,07	0,07	0,08	0,03							0,65	0,79		
		5B					0,16	0,05	0,21	0,29	0,22	0,1	0,09	0,14	0,07	0,04		0,05				1	1,21		
		6					0,1	0,05	0,15	0,31	0,21	0,08	0,05	0,09	0,04							0,78	0,93		
		7					0,16		0,16	0,11	0,09											0,2	0,36		
	2A	8					0,1	0,04	0,14	0,29	0,22	0,07	0,05	0,1	0,04			0,03				0,8	0,94		
		9					0,07	0,04	0,11	0,43	0,3	0,1	0,06	0,12	0,05			0,03				1,09	1,2		
		9A					0,11	0,04	0,15	0,28	0,23	0,08	0,06	0,12	0,06	0,03		0,04				0,9	1,05		
		9A-Dupl.		0,04		0,04	0,24	0,07	0,39	0,4	0,31	0,12	0,09	0,18	0,09	0,05		0,06				1,3	1,69		
		9B		0,03		0,05	0,35	0,06	0,49	0,37	0,28	0,13	0,12	0,18	0,09	0,05		0,06				1,28	1,77		
		10					0,09	0,03	0,12	0,22	0,14	0,05	0,06	0,08	0,04							0,59	0,71		
		11					0,11		0,11	0,18	0,13	0,05	0,06	0,08	0,04							0,54	0,65		
		12					0,12		0,12	0,15	0,1	0,04	0,03	0,06								0,38	0,5		
		13					0,07		0,07	0,06	0,04			0,03								0,13	0,2		
	2B	14					0,06		0,06	0,1	0,06			0,03								0,19	0,25		
		15					0,05		0,05	0,12	0,09	0,06	0,05	0,08	0,03							0,43	0,48		
		16					0,04		0,04	0,03												0,03	0,07		
	3A	17								0,04	0,03											0,07	0,07		
		18					0,04	0,03	0,07	0,14	0,1	0,1	0,05	0,03	0,07							0,49	0,56		
		19					0,05		0,05	0,11	0,08	0,03	0,03	0,05								0,3	0,35		
		20								0,08	0,06			0,04								0,18	0,18		
Sédiments de référence		21																					0		
		21A					0,05		0,05														0,05		
		21A-Dupl.					0,1		0,1													0,1			
		21B																				0			
		22					0,08		0,08														0,08		
MRC	Théor.		9	0,3	4,5	13,60	85	13,4	125,80	60	39	14,6	14,1	10,5	7,4	5,4	1,3	5					157,3	283,1	
	HS3-1		4,7	0,08	2,1	5,1	50	5,9	67,88	37	23	7,7	8	9	3,4	2,5	0,87	2,6					94,07	161,95	
	HS3-2		4,8	0,08	2,3	5,6	53	5,1	70,88	39	24	8,1	8,6	9,8	3,5	2,6	0,91	2,8					99,31	170,19	

* NAP-Naphtalène; ACY-Acénaphylène; ACE-Acénaphthène; FLU-Fluorène; PHE-Phénanthrène; ANT-Anthracène; FLA-Fluoranthène; PYR-Pyrène; BAN-Benzo(a)anthracène; CRY-Chrysène; BBF/BJF/BKF-Benzo(b,j,k)fluoranthène; IND-Indéno(1,2,3-cd)pyrène; DBA-Dibenzo(a,h)anthracène; BGP-Benzo(g,h,i)peryène; Tetralin-1234Tetrahydronaphtalène; MNP-Méthylanthracène; 2-CNP-2-chloronaphtène.

MRC: Matériaux de référence certifiés

ANNEXE G (suite)

Concentrations de pesticides organochlorés (OC) dans les échantillons de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules.

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g} / \text{g}$.

[illegible]

ANNEXE C (suite).
Concentrations des BPC*, congénères de BPC et chlorobenzène (CB) dans les échantillons de sédiments de Cap-aux-Meules.
Les concentrations sont exprimées en µg / g.

Site	Aire	Stations	BPC															Arochlor		CB
			Congénères																	
			101	77	118	153	105	138	126	183	128	180	169	170	194	Total	1254	Total	HCB	
Anse-à-Beaufils Sédiments immergés		Lim. dét.	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05		2		0,05	
		31																		
		32																		
		33																		
		34																		
		35																		
		36																		
		37																		
	38																			
Sédiments de référence		39	0,34		0,2	0,89		1,1		0,38	0,07	1		0,49	0,19	4,66	0,19	50	0,12	
		40																		
		41	0,11		0,12	0,1		0,15				0,1		0,05	0,1	0,73	0,1		0,15	
		42																		
Cap-aux-Meules Sédiments portuaires	1A	1	14		4,4	3,4	3	7,7		1,1	1,3	2,6		2,1	0,69	40,29	230	230		
	1B	2	2,9		1,8	1,7	1,4	3,5		0,57	0,5	2,2		1,2	0,3	16,07	180	180		
		2A	3,7		2,3	2,4	1,6	5		0,8	0,66	1,8		1,2	0,22	19,68	200	200		
		2B	5,4		2,6	2,6	2,4	6,5		0,62	0,88	2,1		1,6	0,23	24,93	220	220		
		3	6,1		2,6	3,4	2,6	7,6		1,1	1,1	3,1		2,3	0,31	30,21	250	250		
		4	2,2		1,9	1,4	1,5	2,8			0,77	1,1		0,73	0,15	12,55	200	200		
	1C	5	1,9		0,83	1,6	0,8	2,8		0,36	0,33	1,2		0,97	0,22	11,01	83	83	0,24	
		5A	1,6		0,8	1,9		3,5		0,52		1,6		1,5	0,42	11,84	120	120	0,06	
		5B	3,2		1,7	5	3,8	11		2,1	1,3	5,1		3,8	0,67	37,67	340	340	0,17	
		6	1,1		0,75	1,6	1,2	3,3		0,64	0,32	1,5		0,95	0,28	11,64	90	90		
		7	0,79		0,49	0,91	0,6	1,9		0,37		0,7		1,8	0,23	7,79	58	58		
	2A	8	4,1		3,2	5,2	1,8	11		2		4,9		3,6		35,8	400	400		
		9	13		6,7	16		35		5,9		18		16	2,6	113,2	650	650		
		9A	35		19	52		110		20	16	61		48	7,8	368,8	4000	4000	0,07	
		9A-Dupl.	30		17	47		75		19	13	54		35	5,8	295,8	4100	4100	0,33	
		9B	0,16		0,56	1,4		2,5		0,67	0,29	1,7		1,2	0,47	8,95	210	210	0,29	
		10	2,3		1,6	3,2		6,7		0,9		2,9		1,9	0,78	20,28	250	250		
		11	2,6		1,7	3,3	2,3	7		1,1	0,89	3,3		2,3	0,49	24,98	250	250		
		12	2,2		1,7	3,3		7,6		1,2	0,92	3,5		2,3	0,62	23,34	300	300		
		13	2,2		1,2	3	1,6	5,7		0,92	0,65	2,8		2	0,31	20,38	300	300		
	2B	14	1,5		0,95	1,6	0,86	2,6		0,34	0,31	1,3		0,97	0,22	10,65	72	72	0,34	
		15	3,1		2	3,9	2,1	7,4		1,2	0,83	3,2		2,1	0,32	26,15	160	160	0,18	
		16	0,49		0,21	0,6	0,3	1		0,16	0,11	0,47		0,33	0,05	3,72	32	32	0,12	
		17	1,1		0,66	1,5	0,7	2,6		0,42	0,25	1,2		0,73	0,14	9,3	73	73	0,19	
	3A	18	2,7		1,5	3,9	2,1	7,3		1,2	0,71	3,8		2,3	0,36	25,87	180	180	0,12	
		19	15		17	11	13	26		2,3	5,3	7,4		5,7	1,1	103,8	790	790	0,22	
		20	2,1		0,96	2,7	1,3	4,8		0,6	0,57	2,5		1,8	0,28	17,61	100	100		
	Sédiments de référence	21														0				
		21A				0,06										0,06				
		21A-Dupl.				0,14										0,14				
		21B				0,15	0,26	0,23								0,64				
22				0,32	0,56	0,45	1				0,62		0,47	0,22	3,64	45	45			
MRC	Théor.				6,15			6,92				3,7		1,07	0,61	18,45				
	HS2-1				5,1			6,2				3,2		1	0,57	16,07				
	HS2-2				5			7				3,5		1,4	0,54	17,44				

MRC: Matériaux de référence certifiés

Lim. dét.: limite de détection

HCB-Hexachlorobenzène

ANNEXE G (suite).

Concentrations mesurées et corrigées de métaux traces dans les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules (données 1994). Les résultats sont exprimés en µg/g sec.

Site	Aire	Station	% particules <63 µm	Cu		Cd		Pb		Zn		As		Hg	
				meas.*	corr.**	meas.	corr.	meas.	corr.	meas.	corr.	meas.	corr.	meas.	corr.
Anse-à-Beaufils sédiments de dragage		31	38,60											0,025	0,041
		32	34,56											0,032	0,049
		33	39,03											0,028	0,046
		34	40,73											0,037	0,062
		35	32,63											0,036	0,053
		36	34,62											0,048	0,073
		37	31,95											0,034	0,050
		38	31,48											0,210	0,306
		39	34,22		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	0,000	0,000
		40	34,89												
sédiments de référence		41	36,15		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	0,000	0,000
		42	34,57												
Cap-aux-Meules sédiments d'immersion	1	1	27,52	52,7	72,71	0,16	0,22	40,30	55,60	152,00	209,71	2,23	3,08	0,102	0,141
		2	25,52	290	389,37	0,15	0,20	22,50	30,21	131,00	175,89	2,68	3,60	0,071	0,095
		2A	31,14	22,3	32,38	0,29	0,42	24,80	36,02	143,00	207,67	1,85	2,69	0,067	0,097
		2B	29,54	27,6	39,17	0,22	0,31	24,50	34,77	202,00	286,69	2,35	3,34	0,090	0,128
		3	31,02	19,6	28,41	0,07	0,10	25,20	36,53	116,00	168,16	2,94	4,26	0,064	0,093
		4	32,52	15,9	23,56	0,14	0,21	15,90	23,56	92,60	137,23	2,68	3,97	0,042	0,062
		5	34,40	19,9	30,34	0,05	0,08	33,00	50,30	188,00	286,59	4,53	6,91	0,048	0,073
		5A	33,72	17,7	26,70	0,1	0,15	86,30	130,21	110,00	165,96	4,91	7,41	0,044	0,066
		5B	29,83	32,6	46,46	0,11	0,16	10,40	14,82	1160,00	1653,13	14,40	20,52	0,035	0,050
		6	40,70	17,9	30,19	0,2	0,34	17,70	29,85	74,00	124,79	3,84	6,48	0,041	0,069
		7	54,90	21	46,56	0,21	0,47	16,20	35,92	90,70	201,11	5,48	12,15	0,022	0,049
	2	8	57,74	26,5	62,71	0,2	0,47	22,80	53,95	119,00	281,59	4,85	11,48	0,086	0,204
		9	50,87	25,6	52,11	0,19	0,39	69,20	140,85	154,00	313,45	3,57	7,27	0,073	0,149
		9A	48,26	29,1	56,24	0,07	0,14	25,00	48,32	125,00	241,59	5,35	10,34	0,082	0,158
		9B	33,86	27,8	42,03	0,23	0,35	72,40	109,46	134,00	202,60	8,25	12,47	0,218	0,330
		10	49,66	30,2	59,99	0,12	0,24	20,10	39,93	134,00	266,19	5,37	10,67	0,085	0,169
		11	47,34	22,6	42,92	0,14	0,27	20,70	39,31	106,00	201,29	5,60	10,63	0,057	0,108
		12	37,27	17,8	28,38	0,16	0,26	17,90	28,53	78,10	124,50	3,70	5,90	0,038	0,061
		13	27,20	13,2	18,13	0,04	0,05	15,30	21,02	75,70	103,98	3,53	4,85	0,029	0,040
		14	61,73	23,5	61,41	0,09	0,24	12,70	33,19	104,00	271,75	6,54	17,09	0,158	0,413
		15	47,23	18,5	35,06	0,07	0,13	13,30	25,20	73,90	140,04	4,67	8,85	0,084	0,159
	3	16	29,90	9,89	14,11	0,01	0,01	19,30	27,53	42,80	61,06	3,33	4,75	0,063	0,090
		17	38,30	19,4	31,44	0,02	0,03	17,70	28,69	115,00	186,39	5,57	9,03	0,054	0,088
		18	41,23	18,7	31,82	0,04	0,07	18,30	31,14	95,70	162,84	3,76	6,40	0,047	0,080
		19	43,56	20,6	36,50	0,11	0,19	14,40	25,51	104,00	184,27	5,10	9,04	0,061	0,108
		20	54,58	18,7	41,17	0,02	0,04	14,40	31,70	83,00	182,74	5,20	11,45	0,055	0,121
sédiments de référence	4	21	12,36	5,28	6,02	0,01	0,01	5,20	5,93	22,50	25,67	2,03	2,32	0,007	0,008
		21A	12,96	5,01	5,76	0,01	0,01	6,00	6,89	21,40	24,59	1,70	1,95	0,008	0,009
		21B	13,63	5,34	6,18	0,01	0,01	5,90	6,83	24,30	28,13	2,09	2,42	0,007	0,008
		22	12,98	5,37	6,17	0,01	0,01	5,50	6,32	23,40	26,89	2,18	2,51	0,005	0,006

meas * - concentration mesurée sur un aliquote de sédiments

corr ** - concentration déterminée en multipliant la concentration chimique totale par un facteur de normalisation obtenu par l'équation suivante. 100/100-%particules>63 µm

ANNEXE H.

Comparaison des niveaux de contamination[®] estimés en 1992 et en 1994 pour les différentes aires de dragage telles que définies au tableau 2. Les résultats sont exprimés en µg/g.

Aire	Aire éq.	HAP type 1		HAP type 2		HAP totaux		BPC totaux	
		1992	1994	1992	1994	1992	1994	1992	1994
D	1A	1.3 (1)	3.8 (1)	5 (1)	15.7 (1)	6.3 (1)	19.5 (1)	0.3 (1)	0.04 (1)
C	1B	26 (1)	0.2-2 (5)	41 (1)	0.7-4.3 (5)	77 (1)	0.7-4.3 (5)	0.3 (1)	0.01-0.03 (5)
A	2A	0.1-0.2 (9)	0.1-0.2 (5)	0.1-0.8 (9)	0.2-1.0 (5)	0.2-0.9 (9)	0.4-1.2 (5)	0.0-0.4 (9)	0.01-0.04 (5)
E	1C	0.1 (1)	0.1-0.5 (9)	0.1 (1)	0.1-0.3 (9)	0.2 (1)	0.2-1.8 (9)	0.1 (1)	0-0.4 (9)
	2B	0.1-0.1 (2)	0.0-0.1 (3)	0.1 (2)	0.0-0.4 (3)	0.2 (2)	0.1-0.5 (3)	0.1 (2)	0.0-0.03 (3)
F	3A	0.1 (4)	0.1 (4)	0.1 (4)	0.1-0.5 (4)	0.2 (4)	0.1-0.6 (4)	0.1-0.3 (4)	0.01-0.1 (4)

® Les résultats représentent les bornes inférieures et supérieures des données obtenues. Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre d'observation (n).

ANNEXE I
Résultats des essais de toxicité effectués sur les sédiments de l'Anse-à-Beaufils et de Cap-aux-Meules en 1994,
aux laboratoires du Centre Saint-Laurent et de Dartmouth.

Site	Aire	Station	% humidité totale (Novamann)	Séd. entier	EI		EO	PS			
				% survie	15 min. CI50	CI25	CI50	5 min. CI50			
				<i>A. virginiana</i>	% v/v	% fécondation	µL/mL	µg séd. sec/mL			
					<i>V. fischeri</i>	<i>L. pictus</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. fischeri</i>			
				Québec	N.-É.			Québec	N.É.		
Martinique Beach				95 ± 3,5							
Anse-à-Beaufils											
Sédiments d'immersion		31	43,2	87±5	>50	>50	29,5	0,8	5251	9900	
		32	40,5	81±7	>50	>50	56,9	6,5	8161	26600	
		33	41,5	72±3	>50	>50	30,5	0,06	3299	6530	
		34	39,5	69±4	>50	>50	41,7	0,05	2181	5320	
		34D		70±11		>50	>100			8920	
		35	31,4	78±16	>50	>50	61,4	0,3	15700	23100	
		36	34,5	80±15	>50	>50	75,1	0,08	16482	31500	
		37	31,7		>50			3,4	24225		
		38	33,8	74±6	>50	>50	79,8	0,2	18105	38600	
Sédiments de référence		39	32,3	71±7	>50	>50	67,2	0,1	19834	29700	
		40	35,6		>50			10	17036		
		41	36,4	80±9	>50	>50	81,9	3	18986	38600	
		42	37,3		>50			10	26368		
blancs de méthode		extraction									
		évaporation									
Cap-aux-Meules											
Sédiments de dragage	1	1	42,9		>50			0,007	1530		
		2	35,9	86±10	12,1	>50	>100	0,03	2792	4810	
		2A	40,2	85±13	24,5	>50	>100	0,02	968	2900	
		2B	40,9	88±8	20,3	26,6	27,4	0,003	2172	4920	
		3	43		>50			0,02	1482		
		4	39,7	85±7	16,7	<6,2	18,5	0,008	2684	3710	
		5	49,5	94±4	28,4	>50	20,5	0,01	2377	3590	
		5A	43		>50			0,02	3133		
		5B	42,1		26,9			0,007	1476		
		6	46,4		>50			0,01	2264		
		7	63,6	87±10	26,2	>50	33,9	0,02	6245	4470	
		2	8	50,2	82±10	>50	>50	70,3	0,02	1800	2780
			9	47,8		>50			0,04	1088	
			9A	48,7		>50				1488	
			9B	44,5		>50				2247	
			10	50,9	74±9	9,1	13,9	11	0,02	2140	1560
	11		45,1		6,4			0,02	2951		
	12		43,7		>50			0,03	5343		
	13		39,6	93±5	6,6	>50	48,2	0,04	4243	6880	
	3	14	57,8	88±7	>50	>50	17,3	0,02	2114	1340	
		15	53,5		>50			0,02	2847		
		16	43,6		2,4			0,02	1955		
		17	47,6		>50			0,02	3670		
		18	48,5		43,8			0,02	3360		
19		48,7		6,7			0,03	2821			
20		51		10,5			0,03	2186			
Sédiments de référence		4	21	31,3	94±7	>50	>50	>100		13043	>76480
	21A		29,8		9,6			0,1	12494		
	21B		31,1		14,3				14097		
	22		34,4	99±2	>50	>50	79,5	0,1	12505	65200	
MRC		HS-1			>50			1159			
	HS-2(1)						0,01	2224			
	HS-2(2)						0,01				
	HS-3(1)						0,01	510			
	HS-3(2)						0,03				
	HS-4							376			
blancs de méthode		extraction-1					10				
		extraction-2					10				
		évaporation					10				

* Les essais Microtox PS avec HS2 et HS3 ont été effectués sur un aliquote de l'échantillon de 50 g, alors que pour les essais Microtox EO, ces deux échantillons ont été divisés en deux répliques.

MRC Matériaux de référence certifiés

ANNEXE J

Le SOS-Chromotest

Le SOS Chromotest est un essai colorimétrique à court terme utilisé pour détecter les substances provoquant des lésions primaires à l'ADN chez *Escherichia coli* PQ37. Chez cette bactérie, le gène *lacZ* qui code pour la β -galactosidase (β -gal) et le gène *sulA* ont été fusionnés par manipulation génétique (Quillardet et Hofnung, 1985). Le gène *sulA* appartient au système SOS, un mécanisme de réparation de l'ADN sujet à erreurs (Walker, 1987; Devoret, 1992). Lorsque l'ADN bactérien est agressé par un produit chimique génotoxique, le gène *sulA* est activé, entraînant ainsi la synthèse de l'enzyme β -gal. La région *lacZ* normale ayant été retirée du génome de la souche *E. coli* PQ37, la production de β -gal résulte donc directement d'agressions à l'ADN. La souche *E. coli* PQ37 porte également un gène constitutif (non réprimé) pour la phosphatase alcaline (Pal). Cette enzyme est utilisée comme un indicateur de la synthèse protéique totale, et son dosage permet de déterminer le degré de cytotoxicité ou de perte de viabilité cellulaire. Les concentrations relatives de β -gal et de Pal sont mesurées après l'ajout de leur substrat respectif. Une augmentation appréciable de la coloration bleue indique une activité génotoxique, alors qu'une diminution significative de la coloration jaune reflète la présence de molécules cytotoxiques.

Les essais SOS Chromotest sont réalisés avec et sans un mélange d'activation mammalien. Ce mélange comprend la fraction microsomale (S9) de foie de rats traités à l'Arochlor 1254 et des cofacteurs. La fraction S9 renferme notamment le cytochrome P-450 qui joue normalement un rôle de détoxification dans le foie, mais qui à l'occasion peut aussi activer le potentiel mutagène ou cancérigène des substances chimiques (De Robertis et De Robertis, 1983). L'utilisation de S9 rend donc possible la détection de substances dites «progénotoxiques», c'est-à-dire de molécules qui une fois métabolisées ont le potentiel d'endommager le matériel génétique. Pour vérifier l'intégrité des fonctions SOS chez *E. coli* PQ37, des génotoxiques de référence sont testés à chaque essai. Il s'agit du nitro-4 quinoléine-*n*-oxyde (en anglais, le 4-nitroquinoline-*n*-oxide ou 4NQO) pour les tests sans S9 et du amino-2 anthracène (en anglais, le 2-aminoanthracene ou 2AA) pour les tests avec S9.

Traitement des données

Les concentrations relatives de Pal (jaune) et de β -gal (bleu) sont lues avec un spectrophotomètre à microplaque (Multiskan™, MCC340) à 405 nm (A405) et à 620 nm (A620), respectivement. Les moyennes

($\bar{x}$), écarts types (s) et coefficients de variation (CV) des valeurs d'absorbance des groupes traités et témoins sont d'abord calculés. Les facteurs de réduction (FR) de la Pal, les facteurs d'induction (FI) de la β -gal, ainsi que les facteurs d'induction corrigés pour la viabilité (FICV) sont ensuite déterminés selon les formules présentées ci-après. Les FICV normalisent l'induction de la β -gal en fonction de la biomasse bactérienne.

$$FR = x \text{ A405 traité} / x \text{ A405 témoin}$$

$$FR = x \text{ A620 traité} / x \text{ A620 témoin}$$

$$FICV = FI/FR$$

Chez les groupes témoins, la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % des A405 et la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % des A620 sont déterminées afin de fixer les seuils d'effets ponctuels (SEP) qui sont calculés comme suit :

$$SEP \text{ de la Pal} = (x \text{ A405} - 2 s) / x \text{ A405}$$

$$SEP \text{ de la } \beta\text{-gal} = (x \text{ A620} + 2 s) / x \text{ A620}$$

Afin de tenir compte de la variabilité dans le temps, des seuils d'effets temporels (SET) ou historiques ont été déterminés. Le SET de la Pal a été fixé à 0,90 et celui de la β -gal à 1,20. Pour la cytotoxicité, la plus petite des valeurs entre le SEP et le SET est sélectionnée pour déterminer la CME0. Pour la génotoxicité, la plus grande des valeurs entre le SEP et le SET est choisie pour déterminer la CME0. L'interprétation des résultats de génotoxicité est d'abord effectuée à partir des valeurs FI. Lorsque qu'une valeur FI parmi les concentrations analysées répond au critère stipulé précédemment, les FICV sont alors utilisés pour fixer la CME0. Selon la variable d'effet mesurée, les paramètres de mesure sont rapportés en unités toxiques (UT_{sc}) ou en unités génotoxiques (UG_{sc}) sublétales chroniques. Le traitement des données est effectué à l'aide d'une feuille de travail élaborée avec un chiffrier électronique.

ANNEXE K

Test de fluctuation

Protocole expérimental

Dans cette étude, le test de *fluctuation* fut réalisé selon une protocole en vigueur dans nos laboratoires « *Protocole - Test de fluctuation*, Mai 1993 ». Seule la souche TA100 fut utilisée. Cette bactérie réagit aux produits qui causent des mutations par substitution des nucléotides et est l'une des plus sensibles du test d'Ames. Tous les essais furent effectués avec et sans mélange d'activation mammalien. Ce mélange, qui permet la détection des substances promutagènes, comprend des cofacteurs et la fraction microsomale d'extrait S9 de foie de rats traités à l'Arochlor 1254. La fraction microsomale fut préparée par ultracentrifugation de l'extrait S9 selon des procédures décrites dans le protocole précité. La souche TA100 et le S9 furent achetés de la compagnie Molecular Toxicology inc. (Annapolis, MD).

Des produits mutagènes de référence ou témoins positifs furent testés à chaque série d'analyses pour certifier l'intégrité génétique de la souche TA100. Il s'agit, du 2-aminoanthracène (2AA) pour les essais avec activation (+ S9) et du 4-nitroquinoline-n-oxyde (4NQO) pour ceux sans activation (- S9). Les concentrations testées de 2AA et de 4NQO furent de 0,25 µg/mL et de 0,005 µg/mL, respectivement. Un témoin négatif constitué de diméthyle sulfoxyde (DMSO) fut également intégré à chaque série d'analyses. Le DMSO ayant été utilisé comme diluant et comme agent de solubilisation des résidus des extraits de sédiment et des mutagènes de référence. Les concentrations finales de S9 et de DMSO dans le milieu d'essai furent respectivement de 1% v/v. Les mutagènes de références ont été achetés de la compagnie Sigma (St. Louis, MO) et le DMSO de la compagnie Aldrich (Milwaukee, WI).

Les extraits de sédiment furent d'abord dilués dans une proportion de 1 dans 4 dans du DMSO (250 µL d'extrait + 750 µL de DMSO). De cette dilution, quatre autres dilutions en série (1:2) furent préparées. Un volume de 200 µL de chacune des concentrations fut ajouté à 20 mL de milieu d'essai. Pour la majorité des échantillons, de 0,16 à 2,5 µL d'extrait organique par mL de milieu d'essai furent testées. Pour les extraits et les témoins positifs une seule microplaque par concentration fut utilisée, alors que pour le témoin négatif trois microplaques furent préparées.

Interprétation

Une activité cytotoxique fut rapportée lorsque le nombre de puits positifs dans une concentration donnée fut égal ou inférieur à la moitié du nombre de puits positifs observés dans le témoin négatif.

La présence d'une activité mutagène fut confirmée lorsque le nombre de puits positifs dans une concentration donnée fut égal ou plus grand que la limite significative déterminée à la table de Gilbert (1980). Cette limite ayant été déterminée à partir de la moyenne des comptes de puits positifs obtenus dans les trois microplaques renfermant le témoin négatif.

Indépendamment de la variable d'effet, la plus petite concentration testée répondant aux critères définis ci-dessus fut rapportée comme étant la concentration minimale avec effet observé (CMEO). Lorsqu'un extrait s'est révélé toxique mais non mutagène, la CMEO rapportée pour la mutagénicité a été fixée à une valeur plus grande (>) que la concentration sans effet observé (CSEO) pour la cytotoxicité. La CSEO étant par définition la concentration testée immédiatement sous la CMEO. Lorsqu'aucune cytotoxicité ne fut observée, la CMEO pour cette variable d'effet ainsi que pour la génotoxicité fut attribuée une valeur plus grande que la plus forte concentration testée.

ANNEXE L

Mutator

La lésion principale responsable de la faible luminescence chez *V. fischeri* M169 n'a pas encore été identifiée. Les données actuelles supportent toutefois l'hypothèse d'une altération de l'activité *gro* ESL dans les cellules du M169. Les six processus proposés pour expliquer la restauration de la photoluminescence chez *V. fischeri* suite à une exposition à certaines substances génotoxiques sont les suivants:

- (a) Activation du système de réparation SOS, comme chez *E. coli* PQ37;
- (b) Formation de mutants auxotrophes pour un acide aminé (comme les bactéries du test d'Ames), ce qui provoque un état de famine entraînant la synthèse de gènes (*htpR* et *groESL*) déclencheurs de la luminescence;
- (c) Production de mutants *lexA* (altération du gène *lexA*) montrant une affinité de liaison plus faible au site d'attache *lux*-ADN;
- (d) Formation de mutants *lux* possédant un site d'attache *LexA* ADN défectueux;
- (e) Induction de mutations menant à une hausse de la quantité intracellulaire de protéines *HtpR* et *Gro* ESL;
- (f) Court-circuit du système de régulation *lux* par des agents intercalants de l'ADN «DNA intercalating agents».

En résumé, les molécules chimiques pouvant entraîner la substitution des nucléotides, les substances provoquant un décalage du cadre de lecture, les inhibiteurs de la synthèse de l'ADN, les produits causant des lésions directes à l'ADN ainsi que les agents intercalants pourraient tous expliquer la régénération la production de lumière chez *V. fischeri* M169.

La figure 1 démontre le protocole utilisé.

Mutatox™ Protocol

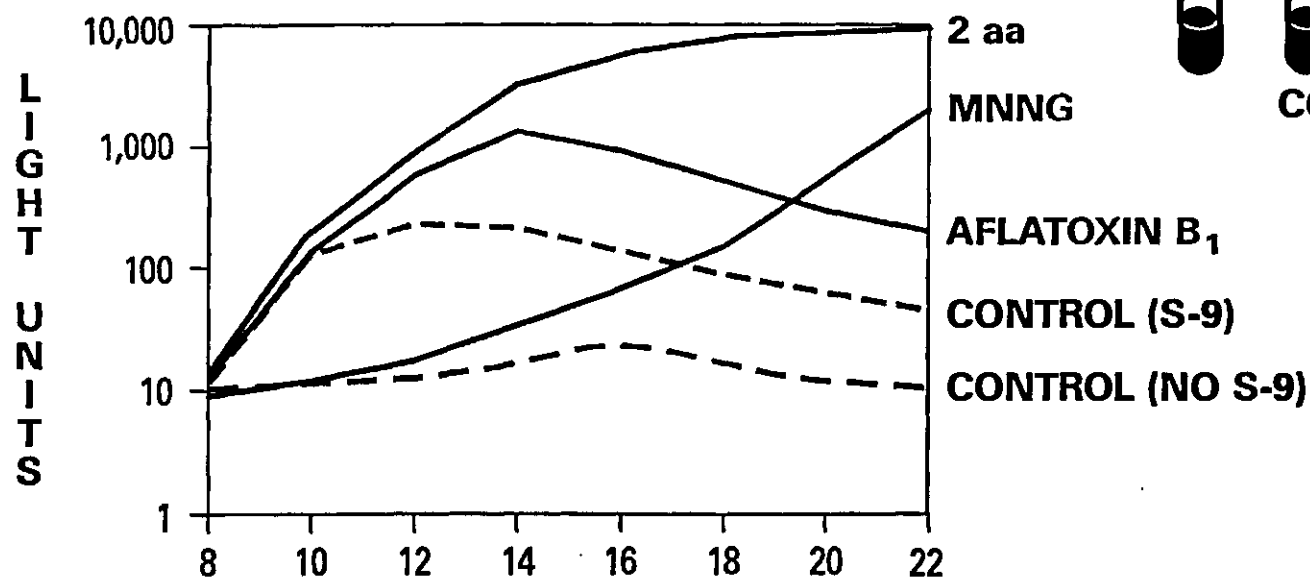
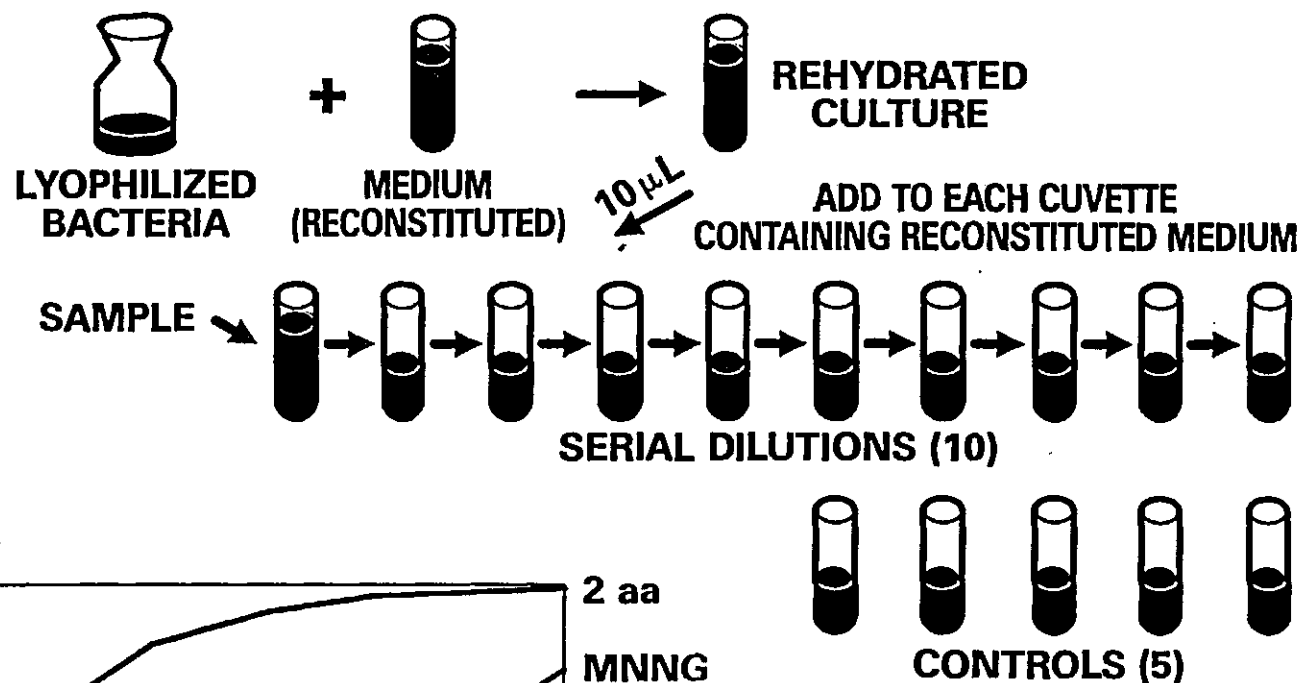


Figure 1.

ANNEXE M

- (a) Gagné, F. et C. Blaise. 1995. Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 10: 217-229.
- (b) Gagné, F. et C. Blaise. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Wat. Res.* 27(11): 1669-1682.

Evaluation of the Genotoxicity of Environmental Contaminants in Sediments to Rainbow Trout Hepatocytes

F. Gagné* and C. Blaise

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

Rainbow trout hepatocytes were used as an *in vitro* bioassay to assess the genotoxic potential of single chemicals and marine sediment extracts. Freshly prepared trout hepatocytes were exposed to either benzo[a]pyrene, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, β -naphthoflavone, or organic extracts of marine sediments for 24 h at 15°C. Genotoxicity was assayed using the nick translation assay, which makes use of a nonradioactive nucleotide (biotin-dUTP), and the DNA alkaline precipitation assay followed by fluorometric detection of DNA strands. Exposure to benzo[a]pyrene or methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, known indirect- and direct-acting genotoxins respectively, produced genotoxicity to rainbow trout hepatocytes with both assays. β -Naphthoflavone displayed genotoxic activity in trout hepatocytes. Sediment extracts and reference sediment extracts displayed high toxicity and genotoxicity to trout hepatocytes. Chemical analyses showed that these sediments contained significant amounts of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons. Cell toxicity was correlated with total levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls but not total levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. No positive correlation was found with the nick translation assay between total levels of chemicals and genotoxicity in marine sediments. Genotoxicity obtained with the alkaline precipitation assay was correlated with levels of the organochlorine pesticide DDT. However, more tests would be required to further substantiate possible links with other specific chemicals. © 1995 by John Wiley & Sons, Inc.

INTRODUCTION

Chemical contaminants enter fresh and salt waters from municipal, agricultural, and industrial origins. Thousands of chemicals can be present in the aquatic biota, water column, and sediments (Babich and Borenfreund, 1991; Malins et al., 1984). Some of these chemicals are very stable, or persistent, while others are more susceptible to chemical or physical transfor-

mation. These chemicals along with their biodegradation products can accumulate in the environment, and potentially threaten the integrity of the ecosystem, as well as human health.

Fish are widely used as test organisms to assess the potential danger of wastewaters that ultimately reach the aquatic ecosystem. Standard protocols exist for evaluating the acute toxicity (LC₅₀ 96 h) of industrial wastewaters (e.g., Environment Canada, 1990a). While using fish as test organisms in toxicity evaluations of complex mixtures is warranted, this approach is time-consuming and costly, and requires live organ-

* To whom correspondence should be addressed.

isms for toxicity testing. Furthermore, there is increasing pressure from the ethical point of view to limit the use of animals in toxicological evaluations. Hence, alternative methods are required that exploit the use of *in vitro* cell systems. For example, rainbow trout gonad fibroblasts, primary cultures of trout hepatocytes, goldfish-scale cells, and bluegill sunfish fibroblasts are useful for toxicity evaluation of chemicals (Baksi and Frazier, 1990; Babich and Borenfreund, 1991; Saito et al., 1991). Primary cultures of rainbow trout hepatocytes are especially useful because they abound in metabolizing enzymes, particularly the cytochrome P-450 multienzymatic system (Pesonen et al., 1992). Several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), like benzo[a]pyrene (BaP), and dioxins and furans require oxidative metabolism by the cytochrome P4501A1 system to become genotoxic. In some cases, this metabolism bioactivates these compounds into electrophiles that can bind with macromolecules like proteins, RNA and especially DNA.

Evaluation of genotoxic potential using fish cell systems is therefore relevant for screening the potential danger of complex mixtures. Genotoxic activity may be assayed at the molecular level using the DNA adducts assay (Masfaraud et al., 1992), unscheduled DNA synthesis (Weisburger and Williams, 1991), and the alkaline DNA unwinding assay (Olive et al., 1988); and at a higher level of organization, the micronucleus, chromosome aberration, and sister chromatid exchange assays (Al-Sabti and Hardig, 1990; Means et al., 1988; Lobillo et al., 1991).

Single-stranded breaks can be examined using the principle of nick translation of DNA (Snyder and Matheson, 1985) with DNA polymerase I (Pol I). This assay is thought to be highly sensitive because of the displacement of the breaks by the action of Pol I, resulting in higher amounts of nucleotide incorporation in the DNA relative to the initial size of single-stranded breaks. This assay originally used radioactive thymidine for detection of DNA damage. Similarly, double- and single-stranded breaks can be examined using the alkaline precipitation assay, a simplified version of the alkaline DNA unwinding assay (Olive, 1988). This assay also makes use of radionucleotides for detection of DNA damage but is rapid and cost efficient and can be easily adapted to different tissue types. The use of nonradioactive nucleotides for detection of DNA strands will greatly improve the flexibility of these tests in aquatic environmental toxicology studies.

The purpose of this study therefore was to use a rainbow trout hepatocyte model to investigate the cytotoxic and genotoxic potential of complex mixtures like organic extracts of marine sediments. Cytotoxicity was investigated using the propidium iodide exclu-

sion test with flow cytometry. Genotoxic activity was assayed using a modified nick translation assay with a nonradioactive nucleotide (biotin-dUTP) and flow cytometry technology, and an alkaline DNA precipitation assay with detection of DNA strands by fluorescence. An attempt was made to find possible correlations between chemical data and genotoxicity or cell toxicity using these assays applied to organic extracts of marine sediment.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Phosphate buffered saline (Dulbecco's PBS), calcium chloride, β -naphthoflavone (β -NF), BaP, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), collagenase type IV, fetal bovine serum (FBS), gentamycin sulfate, trypan blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Liebovitz medium (L-15), sodium citrate, tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), Tween-20, digitonin, dimethylsulfoxide (DMSO), dithiothreitol (DTT), bovine serum albumin (BSA), sodium dodecylsulphate (SDS), hoescht 33258, deoxyribonuclease I (DNase), ribonuclease A, Pol I, and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemical Co. Biotin-16-dUTP, streptavidin-fluorescein, dCTP, dATP, dGTP, and dTTP were obtained from Boehringer Mannheim.

Preparation of Marine Sediment Extracts

Organic phase extracts of marine sediment were studied for their (cyto)genotoxic potential. Thirty grams of sediment were extracted in dichloromethane ($V = 15$ mL); the liquid organic phase was decanted, dried under a nitrogen stream, and resuspended in 1 mL of DMSO (100% v/v). Chemical analyses were performed for organochlorine pesticides (OCs), polychlorinated biphenyl congeners (PCBs), chlorobenzenes (CB), and PAHs. For a complete description of chemicals analyzed, refer to the caption in Table III. These chemicals were quantified using established methods (Oliver and Niimi, 1988; Oliver and Nicol, 1982; Environmental Protection Agency, 1986) under a quality control and assurance program (Fouquet, 1994, report in preparation) in order to ensure the validity and pertinence of the data.

Preparation and Exposure of Rainbow Trout Hepatocytes

Primary cultures of rainbow trout hepatocytes were prepared according to the double perfusion methodology of Klauning et al. (1985), with some modifications.

After a portal vein perfusion with sterile PBS (without calcium), pH 7.5, containing 1 mM glucose, 0.3 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B, 2 mg/mL BSA, and 5 mM EDTA, the liver was perfused with 10 mL of collagenase (100 units in PBS with 1 mM CaCl_2 and no EDTA) and removed from the abdominal cavity. The liver was cut into small slices and mixed continually in 50 mL collagenase solution (100 units/mL) for 20 min at room temperature. Afterwards the cells were liberated from the tissue with a cell dissociation sieve kit (Sigma Chemical Co.). The cells were then washed 4 times by centrifuging at $200\times g$ for 2 min and resuspended in sterile PBS without calcium and EDTA. The cells were counted and cell viability was estimated by the trypan blue exclusion test (Klauning et al., 1985). Typical cell yields were around $(2.3 \pm 0.5) \times 10^6$ cells/g body weight with a viability of $95 \pm 2\%$ (derived from $n = 50$ isolations). The cells were resuspended in 4 mL of sterile L-15 containing 1% FBS, 25 $\mu\text{L/mL}$ gentamycin sulfate, and 2.5 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B (referred to as complete medium). For each evaluation of chemicals and organic sediment extracts, cells obtained from 5 yearling individuals were pooled before exposure.

The hepatocytes were distributed in 24-well microplates (cell culture treated, obtained from Corning) at a density of 1×10^6 viable cells/mL of complete medium. These were exposed to several dilutions of organic sediment extracts (0, 0.001, 0.01, 0.1, and 1% v/v). Control cells (i.e., unexposed cells) for sediment extract samples received the appropriate amount of DMSO (1% v/v). Hepatocytes were exposed for 24 h at 15°C to the sediment extracts and single chemicals: Cd (0, 25, 50, 75, 100, and 200 ng/mL), BaP (0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 ng/mL), MNNG (0, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$), and β -NF (0, 25, 50, 75, 100, and 200 ng/mL).

Cell Viability Evaluation

Cell viability was assayed by flow cytometry using the PI exclusion test (Zucker et al., 1988). In order to favor single-cell hepatocyte suspension for flow cytometry analysis, cells were treated with a calcium chelator, sodium citrate, during the washing step. After the exposure period, cells were centrifuged at $200\times g$ for 5 min, the cell media removed, and the cells were resuspended in 200 μL solution saline citrate (SSC: 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate, pH 7.2). An aliquot of washed cells (50×10^4 cells) was incubated in the presence of PI (10 $\mu\text{g/mL}$) in PBS for 10 min at room temperature. The cells were analyzed by flow cytometry as described below. The proportion of viable cells relative to exposure treatments was calculated using digitonin-permeabilized cells as a positive

control. The same amount of cells were treated with one volume of 0.02% digitonin in PBS for 5 min, incubated with PI for 10 min, and analyzed by flow cytometry. The percentage of live cells was calculated as follows:

Proportion of live cells (%)

$$= [1 - (X - A)/B - A)] \times 100$$

where X is the proportion of stained cells in the exposed group, A is the proportion of stained cells in the unexposed group, and B is the proportion of stained cells in the digitonin-treated group.

In situ Nick Translation Assay

Intracellular repair of single-stranded nicks on genomic DNA was achieved using a modification of the method of Snyder and Matheson (1985). Our approach makes use of nonradioactive nucleotide, cell fixation, and flow cytometry technology. After the exposure period, the cells were washed in SSC as described above for 5 min. The cells were centrifuged ($200\times g$ for 4 min), the supernatant removed, and the cells fixed in 200 μL of 70% ethanol for 45 min at 4°C . The cells were then centrifuged as above and permeabilized with 0.1% Tween-20 in PBS for 15 min at room temperature. The cells were centrifuged and resuspended in 20 units of Pol I in a 50 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM DTT, 1 mM MgCl_2 , 0.1% BSA, and 50 μM of each of the nucleotides (dCTP, dTTP, dATP, dGTP). The reaction mixture also contained 10 μM of biotin-16-dUTP as the nucleotide analogue of dTTP and incubation was allowed to progress for 1 h at 37°C . After the incubation period, the cells were centrifuged and resuspended in 200 μL of PBS containing 0.1% Tween-20 and BSA for 5 min. The cells were centrifuged as described above and exposed to 1 μg of streptavidin-fluorescein in PBS containing 0.1% Tween-20 and BSA for 30 min at 37°C . The cells were then centrifuged and washed in PBS for 10 min and centrifuged again. The cells were finally resuspended in PBS containing 50 units/mL ribonuclease A and 25 $\mu\text{g/mL}$ PI. The cells were incubated at room temperature for 30 min before flow cytometric analysis to allow degradation of cellular RNA. In some cases, 5 units of DNase along with Pol I were added to the reaction mixture to see whether any increased incorporation of biotin-16-dUTP into DNA was obtained.

Alkaline Precipitation Assay

Genotoxic damage to DNA was also assayed using the alkaline precipitation assay (Olive, 1988), with slight modifications. Detection of DNA breaks was made possible using the hoescht dye (West et al., 1985) in-

stead of tritium-labeled DNA with ^3H -thymidine. After exposure, the cells were washed in SSC (200 μL) for 5 min as described above. A subsample (150,000 cells) was taken for cell density evaluation (absorbance at 600 nm) and for the alkaline precipitation assay. The blanks and standards contained the equivalent volume of SSC without hepatocytes. Cells were treated in a microcentrifuge tube with 250 μL of 2% SDS in 10 mM Tris and EDTA, pH 12.3, for 1 min. A solution of 250 μL of 0.12 M KCl was then added to the mixture, which was allowed to incubate at 60°C for 10 min. At the end of the incubation period, the mixture was placed in ice for 20 min and centrifuged at $8000\times g$ for 5 min. A 450 μL sample volume of the supernatant was carefully removed and mixed with 2550 μL of 75 mM KH_2PO_4 buffer, pH 7.0, containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of hoescht. Fluorescence analysis consisted in reading emission intensity at 460 nm while exciting at 350 nm with bandpasses of 10 nm. Quantitation was done using known amounts of salmon sperm DNA in the same mixture without addition of cells.

Flow Cytometric Analysis

Flow cytometric measurements were performed with a FASCan flow cytometer (Becton-Dickinson) equipped with an analytical flow cell, argon (blue) laser emitting at 488 nm at 15 mW. The data from 5000 gated cells were recorded, analyzed, and stored with the Lysis II software program. The cells were gated according to the forward (fsc) and orthogonal light scatter (ssc detector) characteristics to isolate the population from smaller particles. The fsc detector was set at -1 exponential in log scale and the ssc detector was set at 200 volts (V).

The detector for fluorescein emission (500–550 nm, fl-1 detector) was set at 400 V and the channel number, at 1024 for maximum resolution. The cells were aspirated into the flow cytometer and 5000 cells were collected. A second gate was constructed so that DNA-containing cells were analyzed for fluorescein emission. The data were reported in a two-dimensional plot: cell volume (forward light scatter) on the y axis and fluorescence emission on the x axis. For analysis, the fluorescence cell distribution was gated in unexposed cells in order to measure a shift in cells having higher fluorescence.

For cell viability measurement, the detector pertaining to DNA-propidium iodide complex fluorescence (620 nm, fl-3 detector) was set at 275 V and the channel number, at 256. Unexposed cells were aspirated, analyzed, and reported in a two-dimensional plot: forward light scatter on the y axis and red fluorescence on the x axis. A second gate was constructed in

order to analyze the number of cells that became more fluorescent (i.e., cells that did not exclude PI dye).

Statistical Analysis

The cells were exposed to pure compounds (BaP, MNNG, and β -NF) and marine sediment organic extracts in quadruplicate. The flow cytometric data (mean fluorescence of 5000 cells population) were subjected to a Barlett's homogeneity of variance test and a normality test. When variances were homogeneous, the data were subjected to an analysis of variance, and critical differences between unexposed and exposed cells were determined using the Dunnett's *t* test. In some cases, the variances were not homogeneous and the data were not normal so that nonparametric Kruskal-Wallis analysis of variance was performed and critical difference between control and treatment was appraised by a distribution-free multiple comparison test (Dunn's test). Significance was set at $p \leq 0.05$ in both cases. The lowest observable effect concentration in % v/v (LOEC) and the no observable effect concentration in % v/v (NOEC) were therefore determined. A toxicity threshold (TT) was calculated as $\text{TT} = (\text{NOEC} \times \text{LOEC})^{1/2}$. Finally, concentration data were expressed in toxicity units (TU) derived from the following equation: $\text{TU} = 100/\text{TT}$. This transformation establishes direct proportionality between the concentration data (TU) and toxicity intensity. Correlations between total levels of chemicals and cytotoxic effects were computed using the Pearson product-moment correlation coefficient. Significance of the correlation coefficient was set at $p \leq 0.05$ and marginal significance, at $0.1 < p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Nick Translation of Intracellular DNA

An intracellular DNA repair methodology following the principle of nick translation is described. Pol I will fill in the nicks produced by DNA-damaging agents by adding nucleotides (5' to 3'-DNA dependent polymerase activity) and translating them along the DNA molecule (5' to 3'-exonuclease activity). Therefore Pol I will incorporate considerably more nucleotides, particularly biotin-16-dUTP, than the number of thymidine nucleotides in the initial nicks provided that no significant steric hindrance limits its accessibility. Fixation of cells with ethanol followed by a permeabilization step is required to preserve cell morphology and to facilitate diffusion of Pol I into the nuclear compartment. Fixation with 4% formaldehyde (in PBS) is not recommended because of limited diffusion of Pol I in

cells. Formaldehyde forms cross-links within the molecular sites in cells and restricts diffusion of Pol I to the nuclear compartment. Indeed, it has been found that formaldehyde fixation requires a 12 h enzyme incubation with Pol I (Gold et al., 1993), while ethanol fixation followed by a rehydration/permeabilization step requires only 0.5–2 h of incubation time, as demonstrated in this study. When hepatocytes were incubated with Pol I with biotin-16-dUTP or fluorescein-12-dUTP for 1 h at 37°C, significant incorporation was obtained relative to cells without addition of Pol I (Table I). Moreover, the addition of DNase to the reaction mixture along with Pol I significantly increased the incorporation of nucleotides into cells as shown by the high relative fluorescence value (Table I). DNase was added sometimes with Pol I to double-stranded DNA to produce nicks and permit Pol I to incorporate nucleotides and translate the nick. The nick translation assay can detect single-stranded breaks or nicks in the DNA molecule (Snyder and Matheson, 1985), which are considered early damaging effects (Fenech, 1993). Because Pol I requires a complementary strand for nucleotide incorporation (or nick repair) and translation of the nick, this assay is not capable of detecting damage such as double-stranded nicks and single-stranded conformation in DNA. The inclusion of a second test, the alkaline precipitation assay, which can detect double-stranded strand breaks and possibly single-stranded conformations because of their potential fragility, can prove useful in some situations. In some cases, with highly toxic compounds, significantly less biotin-16-dUTP can be incorporated in cells relative to unexposed ones and at the same time can show some effect with the alkaline precipitation assay. These results suggest that the type of damage may be double-

stranded breaks, single-stranded conformation regions, or a DNA adduct uncleavable by Pol I exonuclease activity. This phenomenon was observed when significant cell viability reduction was obtained. Therefore, lower fluorescence values relative to control cells can be also indicative of genotoxicity. Formation of single-stranded nicks can also occur during apoptotic cell death (Gold et al., 1993). The two assays described in this paper can also detect this phenomenon. Apoptosis, although producing DNA damage, is not chemically induced genetic damage, but some chemicals can induce apoptosis in cells, hence DNA damage. Apoptotic cells have degraded DNA, and lower DNA levels (PI staining of cells) can be indicative of this phenomenon. Evaluation of DNA content in hepatocytes is therefore necessary to take into account this type of DNA damage.

Exposure of Trout Hepatocytes to Single Compounds

Exposure of cells to BaP, a well-known genotoxic/carcinogenic xenobiotic, elicited a genotoxic response with the nick translation assay (LOEC = 100 ng/mL) and the DNA alkaline precipitation assay (LOEC = 100 ng/mL), as shown in Fig. 1A and B. BaP must be converted into the diol metabolite to exercise its genotoxic effects. Similarly, cells exposed to MNNG, a direct-acting genotoxic compound, shows genotoxicity with both assays: LOEC = 50 µg/mL for the nick translation assay and LOEC = 100 µg/mL for the DNA alkaline precipitation assay (Fig. 2A and B). BaP is about 1000 times more potent in eliciting DNA damage to hepatocytes than is MNNG.

Exposure of cells to β -NF for 48 h was shown to be genotoxic with both assays (Fig. 3A and B). A LOEC value of 100 ng/mL was obtained in each case. The aromatic hydrocarbon β -NF is a specific and potent inducer of the cytochrome P4501A1 responsible for biotransformation of xenobiotics (Pesonen et al., 1992). However, the mutagenic potential of β -NF was not clearly established in earlier work (McKillop and Case, 1991). According to our results, β -NF is genotoxic to trout hepatocytes exposed in vitro. Cd was also genotoxic to trout hepatocytes with the two assays, with a TT = 122 ng/mL after a 48 h exposure time (results not shown).

Toxicity Evaluation of Marine Sediment Organic Extracts

The genotoxic potential of organic extracts of marine sediments taken from an Atlantic harbor site was also evaluated in this study (Table II). The results of chemi-

TABLE I. In situ nick translation of DNA

Conditions	Relative Fluorescence (f11/f13)
Cells and PI	10 $\pm$ 5
Cells, streptavidin-fluorescein, and PI	95 $\pm$ 7
Cells, streptavidin-fluorescein, biotin-dUTP, and PI	95 $\pm$ 8
Cells, ^a streptavidin-fluorescein, biotin-dUTP, Pol I, and PI	225 $\pm$ 12
Cells, ^a streptavidin-fluorescein, biotin-dUTP, Pol I + DNase, ^b and PI	418 $\pm$ 30

^a Cells treated with 200 ng/mL BaP for 48 h at 15°C.

^b DNase: Deoxyribonuclease I.

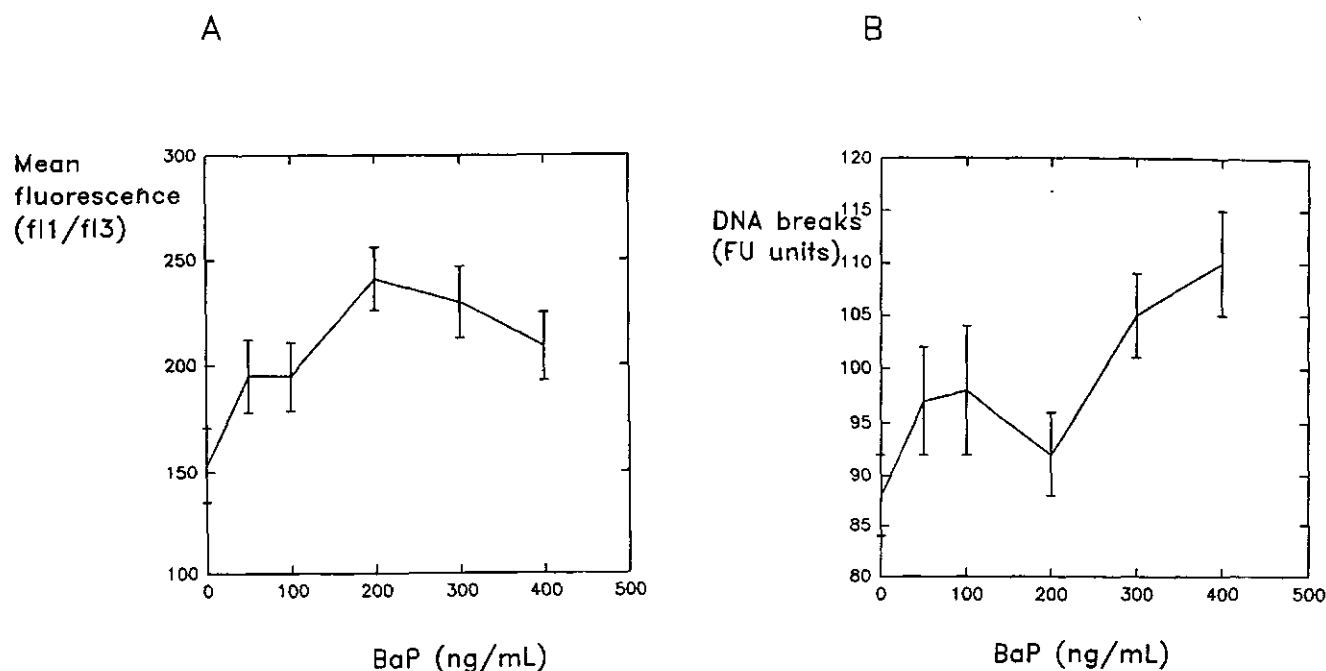


Fig. 1. Genotoxic potential of BaP evaluated with the nick translation and DNA alkaline precipitation assays. Rainbow trout hepatocytes were exposed to BaP for 24 h at 15°C and DNA damage was assayed with the nick translation (A) and the DNA alkaline precipitation (B) assays. Data points represent the mean with the standard error from 4 replicates.

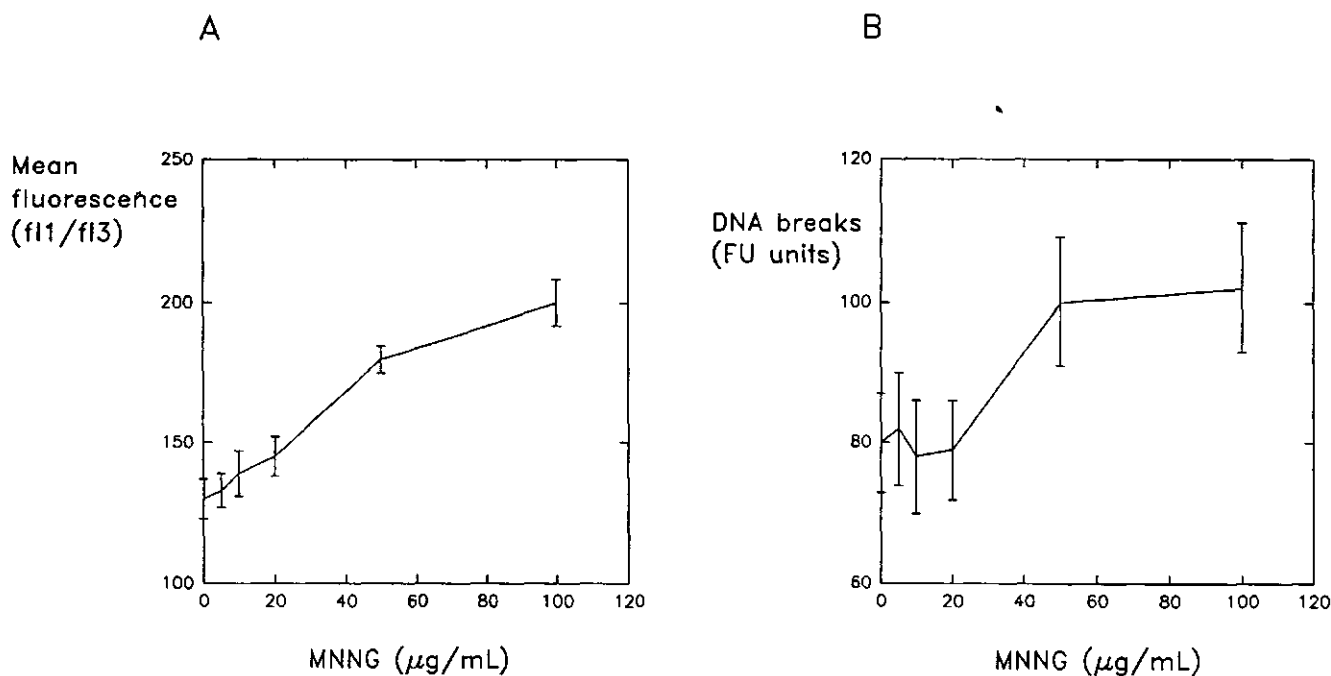


Fig. 2. Genotoxic potential of MNNG evaluated with the nick translation and DNA alkaline precipitation assays. Rainbow trout hepatocytes were exposed to MNNG for 24h at 15°C and DNA damage was assayed with the nick translation (A) and the DNA alkaline precipitation (B) assays. Data points represent the mean with the standard error from 4 replicates.

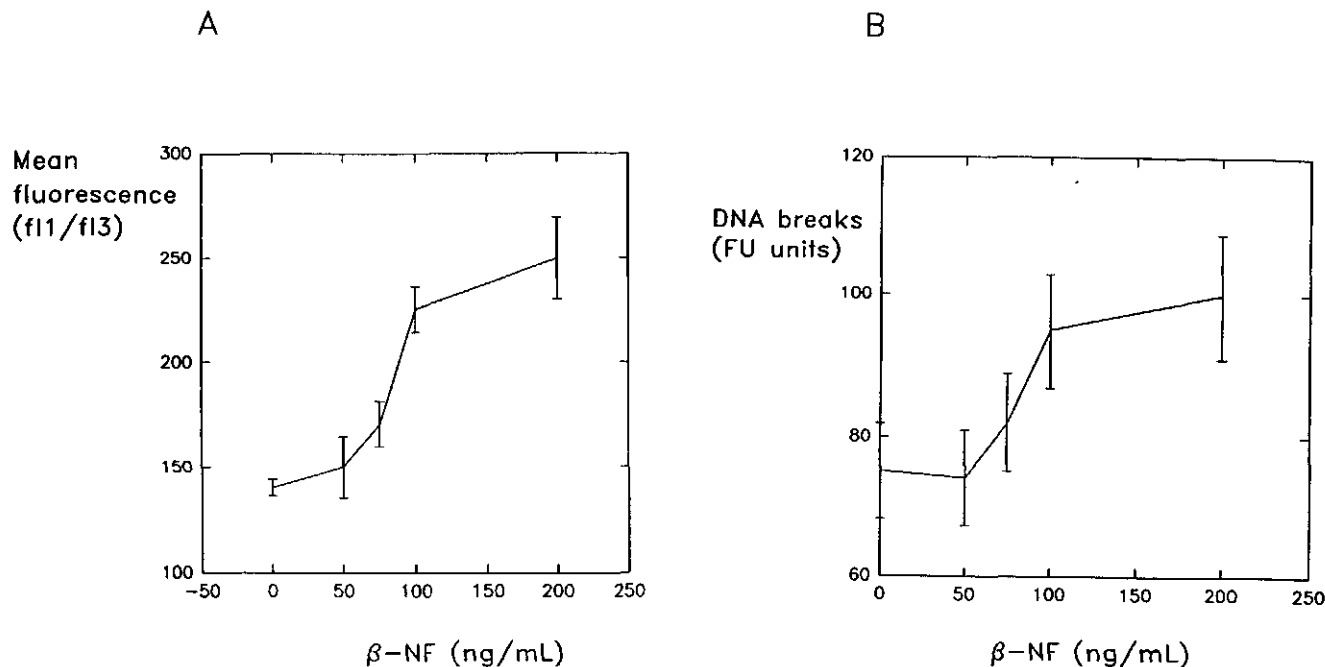


Fig. 3. Genotoxic potential of β -NF evaluated with the nick translation and DNA alkaline precipitation assays. Rainbow trout hepatocytes were exposed to β -NF for 24 h at 15°C and DNA damage was assayed with the nick translation (A) and the DNA alkaline precipitation (B) assays. Data points represent the mean with the standard error from 4 replicates.

cal analyses performed on these extracts are shown in Table III. Samples 1–8 represent randomly collected sediment from the harbor site and Samples 9–12 repre-

TABLE II. Toxicological characteristics of marine sediment organic extracts

Sediment Extract No.	Viability TU	Nick Translation TU	Alkaline Precipitation TU
1	320	nd ^a	nd
2	32,000	32,000	32,000
3	320	nd	320
4	3200	32,000	3200
5	320	32,000	32,000
5	320	nd	32,000
7	3200	nd	nd
8	320	320	nd
9	3200	nd	nd
10	320	3200	nd
11	32,000	3200	nd
12	320	3200	3200
13	320	nd	nd
14	nd	nd	nd

^a No effect was measured hence not determined (nd).

sent reference sediment extracts with known amounts of organochlorine pesticides (OCs), polychlorinated biphenyl congeners (PCBs), and PAHs. Sample 13 was clean sand extracted with dichloromethane. Sample 14 was dichloromethane only (i.e., without sediment) followed by an exchange in DMSO as described in Materials and Methods. Almost all extracts (93%) were toxic to cells except for the blank Sample 14. Samples 2 and 11 displayed the highest cytotoxicity with a TT of 32,000 TU, while Samples 4, 7, and 9 showed moderate toxicity with a TT of 3200 TU. The remaining extracts (Samples 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, and 13) displayed toxicity with a TT of 320 TU. Genotoxic activity was observed in 7 out of the 14 samples (50%) with the nick translation assay and 6 extracts out of 14 samples (42%) with the DNA alkaline precipitation assay. Nine of the 14 samples tested (64%) displayed a genotoxicity response with one or both the genotoxic end points used. Other studies have also shown that organic phase extracts from freshwater sediments proved to be mutagenic with the Ames test and contained detectable amounts of OCs, PAHs, and PCBs (Metcalf et al., 1990; Maccubbin and Erising, 1991; Langevin et al., 1992).

Correlation tests were done to identify possible trends or links between the total levels of chemicals and toxicity (Table IV). Considering Samples 1–8 from

TABLE III. Chemical characteristics of marine sediment extracts

Sample		PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
1	Congener	101 0.23	Phenanthrene 0.04	DDE 0.13
		118 0.16	Fluoranthrene 0.06	T: 0.13
		153 0.21	Pyrene 0.05	
		105 0.03	T: 0.15	
		138 0.36		
		183 0.12		
		180 0.37		
		170 0.07		
		194 0.12		
		T ^d : 14.07		
		Aroclor 1242 5.4		
		Aroclor 1260 7		
2	Congener	101 0.11	nd ^e	DDE 0.12
		118 0.2		T: 0.12
		153 0.11		
		105 0.02		
		138 0.16		
		180 0.04		
		170 0.09		
		T: 0.73		
		Aroclor 1242 2.7		
		Aroclor 1260 1.7		
3	Congener	101 1.2	Naphtalene 0.06	DDE 0.07
		118 1	2-methylnaphtalene 0.04	DDT(o,p') 0.54
		153 1.3	Acenaphtalene 0.06	T: 0.61
		105 0.12	Fluorene 0.08	
		138 1.7	Phenanthrene 0.25	
		183 0.27	Anthracene 0.13	
		128 0.1	Fluoranthrene 0.72	
		180 1.3	Pyrene 0.56	
		170 0.16	Benz(a)anthracene 0.09	
		194 0.24	Chrysene 0.1	
		T: 7.39	Benzo(b)fluoranthrene 0.08	
		Aroclor 1242 36	Benzo(k)fluoranthrene 0.09	
		Aroclor 1254 27	Benz(a)pyrene 0.12	
		Aroclor 1260 13	T: 2.38	
4	Congener	101 1.1	Naphtalene 0.04	DDE 0.39
		118 0.55	Phenanthrene 0.1	DDD(o,p') 0.26
		153 0.99	Anthracene 0.04	DDD(p,p') 0.57
		105 0.1	Fluoranthrene 0.17	T: 1.22
		138 1.2	Pyrene 0.14	
		183 0.15	Chrysene 0.04	
		128 0.07	T: 0.53	
		180 0.45		
		170 0.12		
		194 0.09		
		T: 4.61		
		Aroclor 1242 18		
		Aroclor 1254 9.3		
		Aroclor 1260 5.6		

TABLE III. (Continued)

Sample		PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
5	Congener	101 0.62	Naphtalene 0.04	DDE 0.39
		118 0.33	Phenanthrene 0.1	DDD(o,p') 0.26
		153 0.52	Anthracene 0.04	DDD(p,p') 0.57
		105 0.12	Fluoranthrene 0.17	T: 1.22
		138 0.92	Pyrene 0.14	
		183 0.1	Chrysene 0.04	
		128 0.07	T: 0.5	
		180 0.35		
		170 0.08		
		194 0.11		
		T: 3.22		
		Aroclor 1242 18		
		Aroclor 1254 9.3		
		Aroclor 1260 5.6		
6	Congener	101 0.19	Naphtalene 0.04	DDE 8.3
		118 0.33	2-methylnaphtalene 0.17	DDD(o,p') 1
		153 0.14	Phenanthrene 0.11	DDT(o,p') 9.2
		105 0.04	Anthracene 0.04	DDD(p,p') 19
		138 0.27	Fluoranthrene 0.12	DDT(p,p') 12
		180 0.08	Pyrene 0.10	T: 49.5
		170 0.06	Benzo(k)fluoranthrene 0.04	
		T: 1.11	Benz(a)pyrene 0.05	
		Aroclor 1242 4.1	T: 0.67	
		Aroclor 1254 1.3		
		Aroclor 1260 1.9		
7	Congener	101 0.66	Phenanthrene 0.11	DDE 0.6
		118.059	Anthracene 0.05	DDD(o,p') 0.6
		153 0.39	Fluoranthrene 0.53	DDD(p,p') 1.9
		105 0.15	Pyrene 0.45	T: 3.1
		138 0.64	Benzo(a)anthracene 0.13	
		183 0.08	Chrysene 0.12	
		128 0.03	Benzo(b)fluoranthrene 0.14	
		180 0.27	Benzo(k)fluoranthrene 0.12	
		170 0.04	Benz(a)pyrene 0.13	
		194 0.09	T: 1.78	
		T: 2.94		
		Aroclor 1242 22		
		Aroclor 1260 8.1		
8	Congener	101 0.38	Naphtalene 0.07	DDE 0.49
		118 0.77	2-methylnaphtalene 0.04	DDD(o,p') 0.2
		153 0.43	Acenaphtalene 0.06	DDD(p,p') 0.34
		105 0.16	Fluorene 0.08	T: 1.03
		138 0.88	Phenanthrene 0.65	
		183 0.08	Anthracene 0.2	
		128 0.07	Fluoranthrene 0.74	
		180 0.28	Pyrene 0.73	
		170 0.07	Benzo(a)anthracene 0.2	

TABLE III. (Continued)

Sample	PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
	194 0.05	Chrysene 0.24	
	T: 3.17	Benzo(b)fluoranthrene 0.11	
	Aroclor 1242 5.3	Benzo(k)fluoranthrene 0.34	
	Aroclor 1254 3.7	Benz(a)pyrene 0.3	
	Aroclor 1260 4.2	Indenolpyrene 0.14	
		Benzo(ghi)perylene 0.15	
		T: 4.05	
9	Congener 101 1.1	Naphtalene 3.6	DDE 6.1
	118 1	2-methylnaphtalene 1.2	DDD(p,p') 13
	153.17	1-methylnaphtalene 1	T: 18.1
	105 0.27	Acenaphtalene 1.9	
	138 1.9	Fluorene 4.9	
	183 0.12	Phenanthrene 51	
	128 0.2	Anthracene 5	
	180 1.2	Fluoranthrene 32	
	170 0.56	Pyrene 21	
	194 0.4	Benz(a)anthracene 5.8	
	T: 8.45	Chrysene 7.6	
	Aroclor 1254 20	Benzo(b+k)fluoranthrene 7.3	
	Aroclor 1260 12	Benz(a)pyrene 2.9	
		Indenolpyrene 1.7	
		Benzo(ghi)perylene 1.5	
		T: 150.1	
10	Congener 101 3.8	Naphtalene 0.05	DDE 1.5
	118 3.5	Acenaphtalene 0.04	DDD(p,p') 10
	153 4.9	Fluorene 0.06	T: 11.5
	105 1.8	Phenanthrene 0.85	
	138 7.8	Anthracene 0.06	
	183 0.78	Fluoranthrene 1.5	
	128.76	Pyrene 1.1	
	180 4.2	Benz(a)anthracene 0.38	
	170 1.7	Chrysene 0.66	
	194 0.58	Benzo(b+k)fluoranthrene 0.97	
	T: 29.82	Benz(a)pyrene 0.24	
	Aroclor 1242 18	Indenolpyrene 0.23	
	Aroclor 1254 92	Benzo(ghi)perylene 0.24	
	Aroclor 1260 41	T: 6.38	
11	Congener 101 15	Naphtalene 0.1	DDE 38
	118 5	2-methylnaphtalene 0.1	DDD(o,p') 72
	153 15	Acenaphtalene 0.05	DDD(p,p') 160
	105 7.9	Fluorene 0.15	T: 270
	138 37	Phenanthrene 2.7	
	183 5	Anthracene 0.24	
	128 4.7	Fluoranthrene 3.8	
	180 36	Pyrene 3	
	170 12	Benz(a)anthracene 1.1	
	194 4.9	Chrysene 1.6	

TABLE III. (Continued)

Sample	PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
	T: 142.5	Benzo(b+k)fluoranthrene 2.3	
	Aroclor 1254 216	Benz(a)pyrene 0.98	
	Aroclor 1260 232	Indenolpyrene 0.53	
		Benzo(ghi)perylene 0.56	
		Dibenz(ah) Anthracene 0.23	
		T: 17.44	
12	Congener 101 1	Naphtalene 0.04	DDE 21
	118 1.2	2-methylnaphtalene 0.04	DDD(p,p') 6.2
	153.2	Phenanthrene 0.32	T: 27.2
	105 0.39	Anthracene 0.04	
	138 3.2	Fluoranthrene 0.53	
	183 0.47	Pyrene 0.44	
	128 0.57	Benz(a)anthracene 0.22	
	180 1.9	Chrysene 0.29	
	170 0.82	Benzo(b+k)fluoranthrene 0.59	
	194 0.27	Benz(a)pyrene 0.36	
	T: 11.82	Indenolpyrene 0.2	
	Aroclor 1254 28	Benzo(ghi)perylene 0.2	
	Aroclor 1260 20	Dibenz(ah)Anthracene 0.09	
		T: 3.36	
13	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd

^a PCB congeners assayed were 101, 77, 118, 153, 105, 138, 126, 183, 128, 180, 169, 170, 194, Aroclor 1016, 1242, 1248, 1254, 1260 and the following chlorobenzenes: o,m,p-dichlorobenzene, 1,3,5-trichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, 1,2,3-trichlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, 1,2,3,5-tetrachlorobenzene, 1,2,3,4-tetrachlorobenzene, pentachlorobenzene and hexachlorobenzene.

^b PAHs assayed were naphtalene, 2-methylnaphtalene, 1-methylnaphtalene, acenaphtalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthrene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene, benzo(b and k)fluoranthrene, benzo(a)pyrene, indenol(1,2,3-cd)pyrene, dibenzo(ah)anthracene, benzo(ghi)perylene, 1,2,3,4-tetrahydronaphtalene, and 2-chloronaphtalene.

^c Organochlorine pesticides assayed were heptachlor, aldrin, p,p'-DDE, Mirex, α-BHC, β-BHC, lindane, trans and cis chlordane, o,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDT, methoxychlor, a-endosulfan, dieldrin, endrin, oxychlordane, octochlorostyrene, photomirex.

^d total levels (T:).

^e nd: not detected.

the harbor site, significant correlation was obtained between cell viability effects and total OCs, (o,p),p'-DDE, p,p'-DDD, total PCBs, some PCB congeners, and Aroclor 1254 and 1260 levels. Genotoxicity assayed with the alkaline precipitation assay was correlated only with o,p'-DDT and p,p'-DDT levels. Interestingly, no correlation was found between genotoxicity evaluated with the nick translation assay and any compounds. These results suggest that compounds causing nicks may actually differ from those causing breaks. Other different chemicals or associations of chemicals may exercise their effects on cell viability and genotoxicity even though some OCs, PCBs, and PAHs are known to be genotoxic and carcinogenic (Sharma and Gautam, 1991; Walton et al., 1988; Houk and DeMarini, 1987). The verification of

the effects of individual chemicals within a complex mixture is clearly not an easy task.

Although the sample size of the reference sediment extracts was small (6), some positive correlations were obtained. OC levels were correlated with total PCB levels ($R = 0.957$; $p < 0.003$) and with cell toxicity ($R = 0.998$; $p < 0.001$). Moreover, total levels of PCBs were correlated with cell toxicity ($R = 0.942$; $p = 0.005$). More data from reference sediments would be necessary to further confirm a link between pesticide levels and genotoxicity. No correlations were observed between chemical concentration and the genotoxicity response. PAH levels seem not to vary with OC levels, total PCB levels, cell toxicity, nick translation, or DNA alkaline precipitation.

Since the chemical data for total PCBs, PAHs, and

TABLE IV. Correlations^a between chemical and toxicological data

Viability	APA ^b	NTA ^c
Total OCp (R = 0.522)	o,p'-DDT (R = 0.529)	NC ^d
Total PCB (R = 0.593)	p,p'-DDT (R = 0.529)	
PCB Congener 101 (R = 0.617)		
Congener 118 (R = 0.460) ^e		
Congener 153 (R = 0.593)		
Congener 105 (R = 0.635)		
Congener 138 (R = 0.631)		
Congener 183 (R = 0.636)		
Congener 128 (R = 0.637)		
Congener 180 (R = 0.656)		
Congener 194 (R = 0.646)		
p,p'-DDE (R = 0.628)		
o,p'-DDE (R = 0.673)		
p,p'-DDD (R = 0.650)		
Aroclor 1254 (R = 0.569)		
Aroclor 1260 (R = 0.638)		

^a Pearson product-moment correlation. Correlation is considered significant when R is positive with $p < 0.05$ or marginally significant at $0.1 < p < 0.05$.

^b APA: alkaline precipitation assay.

^c NTA: nick translation assay.

^d NC: no correlation was obtained.

^e Marginally significant.

OCs do not correlate with genotoxic activity in marine sediment extracts, we can propose the hypothesis that the genotoxic response is more specific.

Conclusion

A rainbow trout hepatocyte genotoxicity assay for the evaluation of environmental samples is described. This assay seems to be very sensitive for detection of genotoxicity in marine sediment organic extracts. This

study confirmed positive and significant trends between total levels of DDT and genotoxicity obtained with the alkaline precipitation assay. Trends between OCs and PCBs and cell toxicity were also observed. Further studies will be required to substantiate genotoxic potency in relation to total OCs, PCBs, and PAHs in reference sediment extracts.

The authors are grateful to Sylvain Trottier for performing the assays on marine sediment organic extracts. The helpful comments of Joan Dyer for the preparation of the manuscript are acknowledged. The support of the management of the St. Lawrence Centre, Conservation and Protection, Environment Canada, Quebec, is recognized.

REFERENCES

- Al-Sabti, K., and J. Hardig. 1990. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects from industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C:179-182.
- Babich, H., and E. Borenfreund. 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicol. in Vitro* 5:91-100.
- Baksi, S. M., and J. M. Frazier. 1990. Isolated hepatocytes—model systems for toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 16:229-259.
- Environment Canada. 1990. Biological Test Method, Acute Lethality Test Method Using Rainbow Trout. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, Report No. EPS 1/RM/9.
- Environmental Protection Agency. 1986. Test Methods for Evaluating Solid Waste. Volume 1B: Laboratory Manual Physical/Chemical Methods, method 3540, 7 p.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285:35-44.
- Fouquet, A. 1994. Directives d'assurance et contrôle de la qualité pour l'analyse de substances organiques dans différents milieux. Methodological report. St. Lawrence Centre, Environment Canada, Quebec Region, 80 p.
- Gold, R., M. Schmied, G. Rothe, H. Zischler, H. Breitschopf, H. Wekerle, and H. Lassmann. 1993. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: Application of In situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 41:1023-1030.
- Houk, V. S., and D. M. DeMarini. 1987. Induction of prophase lambda by chlorinated pesticides. *Mutat. Res.* 182:193-201.
- Klauning, J. E., R. J. Ruch, and P. J. Goldblatt. 1985. Trout hepatocyte culture: Isolation and primary culture. *In Vitro Cell. Devel. Biol.* 21:221-228.
- Langevin, R., J. B. Rasmussen, H. Sloterdick, and C. Blaise. 1992. Genotoxicity in water and sediment extracts

- from the St. Lawrence river system, using the SOS Chromotest. *Water Res.* **26**:419-429.
- Lobillo, J., J. V. Delgado, and A. Rodero. 1991. Sister chromatid exchange test detection of toxin-induced damage in cultured fish. *Gen. Sel. Evol.* **23**:160S-162S.
- Maccubbin, A. E., and N. Eising. 1991. Mutagenic potential of sediments from the Grand Calumet river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**:308-315.
- Malins, D. C., B. B. McCain, D. W. Brown, S. L. Chan, M. S. Meyers, J. T. Landhal, P. G. Prohaska, A. J. Freidman, 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.
- Masfaraud, J.-F., A. Pfohl-Leszkowicz, C. Malaveille, G. Keith, and G. Monod. 1992. 7-Ethylresorufin O-deethylase activity and level of DNA adducts in trout treated with benzo[a]pyrene. *Marine Environ. Res.* **34**:352-354.
- McKillop, D., and D. E. Case. 1991. Commentary—Mutagenicity, carcinogenicity and toxicity of β -naphthoflavone, a potent inducer of P448. *Biochem. Pharmacol.* **41**:1-7.
- Means, J. C., C. B. Daniels, S. M. Bakshi, J. J. Stegeman, and M. N. Moore. 1988. Development of in vivo genotoxicity tests in estuarine fish and their application to aquatic toxicology. *Marine Environ. Res.* **24**:327-331.
- Metcalfe, C. D., G. C. Balch, V. W. Cairns, J. D. Fitzsimons, and B. P. Dunn. 1990. Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western Lake Ontario. *Sci. Total Environ.* **94**:125-141.
- Olive, P. L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **11**:487-495.
- Olive, P. L., A. P. S. Chan, and S. S. Cu. 1988. Comparison between the DNA precipitation and alkaline unwinding assays for detecting strand breaks and cross-links. *Cancer Res.* **48**:6444-6449.
- Oliver, B. G., and K. D. Nicol. 1982. Gas chromatographic determination of chlorobenzenes and other chlorinated hydrocarbons in environmental samples using fused silica capillary columns. *Chromatographia* **16**:336-340.
- Oliver, B. G., and A. J. Niimi. 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* **22**:388-397.
- Pesonen, M., A. Goksoyr, and T. Andersson. 1992. Expression of P450IA1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**:228-233.
- Sharma, A. K., and D. C. Gautam. 1991. Chromosomal aberrations induced by phosphamidon and endosulfan in the bone marrow cells of mice in vivo. *Cytologia* **56**:73-78.
- Saito, H. S., S. Iwami, and T. Shogoka. 1991. In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-scale (GFS) cells. *Chemosphere* **23**:525-537.
- Snyder, R. D., and D. W. Matheson. 1985. Nick translation—A new assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts. *Environ. Mutagen.* **7**:267-279.
- Walton, D. G., D. G. Acton, and H. F. Stich. 1988. Chromosome aberrations in cultured central mudminnow heart cells and Chinese hamster ovary cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and sediment extracts. *Comp. Biochem. Physiol.* **89C**:395-402.
- Weisburger, J. H., and G. M. Williams. 1991. Critical effective methods to detect genotoxic carcinogens and neoplasm-promoting agents. *Environ. Health Perspect.* **90**:121-126.
- West, D. C., A. Sattar, and S. Kumar. 1985. A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Analyt. Biochem.* **147**:289-295.
- Zucker, R. M., K. H. Elstein, R. E. Easterling, and E. J. Massaro. 1988. Flow cytometric analysis of the toxicity of tributyltin. *Toxicol. Lett.* **43**:201-208.

HEPATIC METALLOTHIONEIN LEVEL AND MIXED FUNCTION OXIDASE ACTIVITY IN FINGERLING RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) AFTER ACUTE EXPOSURE TO PULP AND PAPER MILL EFFLUENTS

FRANÇOIS GAGNÉ¹ and CHRISTIAN BLAISE^{2*}

¹Analex Inc., 3025 Montée St Aubin, Chomedey, Laval, Québec, H7L 4E4 and ²Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, 105 rue McGill, Montréal, Québec, Canada H2Y 2E7

(First received March 1992; accepted in revised form March 1993)

Abstract—Hepatic metallothionein (MT) levels and mixed function oxidase (MFO) activity (7-ethoxycoumarin-*o*-deethylase or EROD) were measured in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sublethal concentrations of 12 pulp and paper effluents, after completion of 96 h static acute lethality assays. Barring one primary-treated effluent where MFO levels were significantly depressed and two secondary-treated effluents where no significant MFO induction were observed, all other effluents triggered significant induction of MT and EROD, regardless of mill process/treatment or of effluent lethality and chemical characteristics. MT and EROD inductions were significant, however, at higher concentrations for secondary-treated effluents than for primary-treated ones. Lethal (96 h LC₅₀) to sublethal (MT and EROD lowest observable effect concentrations) ratios were variable and indicated that significant biochemical effects were present at effluent concentrations that were roughly 4–33 (MT) and 3–59 (EROD) times lower than the LC₅₀. Enzyme induction ranged from 1.3 to 2.5-fold for MT and from 1.3 to 9.4-fold for EROD compared to controls. Limited chemical data available suggest that there were indeed classes of compounds present capable of inducing MT or EROD. Observed patterns of MT/MFO responses also suggest that contaminant interactions may have interfered with induction for some of the effluents studied. Refinements of this combined (sub)lethal bioassay procedure are envisaged to determine whether it can provide an efficient means of detecting hazardous chemicals in industrial wastewaters.

Key words—metallothionein, mixed function oxidase, EROD, fingerling rainbow trout, liver enzyme activity, acute exposure, pulp and paper effluents, LC₅₀ bioassay

INTRODUCTION

Although expanding use of multitrophic tests has clearly marked the field of aquatic toxicology in recent years (Leclerc and Dive, 1982; Persoone *et al.*, 1984; Bitton and Dutka, 1986; Blaise *et al.*, 1988; Munawar *et al.*, 1989), interest in fish as bioassay organisms to assess hazards of chemicals and liquid wastes has certainly not waned (Heath, 1987; APHA, 1989; Sprague, 1990). Salmonids, for example, have already contributed enormous knowledge in fields of pathology, physiology and toxicology (Wells and Moyse, 1981). In Canada, on-going efforts to upgrade and standardize fish bioassay protocols (Environment Canada, 1990a, b), whether for research, monitoring or regulatory purposes, are an unambiguous indication that fish will continue to play a major role as ecotoxicity indicators in the future.

While understanding the integrative effects of toxic

stress on fish populations and communities may require a comprehensive multidisciplinary approach at biochemical, physiological, behavioural, immunological, genetic, pathological and ecological levels of organization (Sindermann, 1988; Adams *et al.*, 1989), early warning systems to screen for the presence of potentially hazardous chemicals in industrial point source discharges must be at the forefront of environmental protection strategies. Metallothioneins (MTs) and mixed function oxidases (MFOs) are two such early-warning and defensive systems which may prove useful for detecting biochemical changes in fish after laboratory or field exposure to environmental pollutants (Neff, 1985).

MTs represent a family of metal-binding proteins, characterized by a 25–30% cysteine content and devoid of aromatic amino acids and histidine (Price-Haughy *et al.*, 1986). MTs are inducible by several divalent heavy metal cations (e.g. Cu²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺) and it is generally held that their role is to regulate and detoxify heavy metals (Bremner and Mehra, 1983; Cherian and Nordberg, 1983). Measuring MT levels in fish liver, the major organ of

*All correspondence should be addressed to: Dr C. Blaise, Ecotoxicologie & Écosystèmes, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 1001 Pierre Dupuy, Longueuil, Québec, Canada J4K 1A1.

induction, can serve as a useful index of metallic stress (Roch *et al.*, 1982; Hamilton and Mehrle, 1986).

The cytochrome *P*-450-dependent MFO enzymatic system represents a family of hemoproteins (cytochrome *P*-450s) found on the smooth endoplasmic reticulum (deBethizy and Hayes, 1989). Cytochrome *P*-450s abound in monooxygenase activity and are involved in the phase I biotransformation of various lipophilic compounds, including xenobiotics (Neff, 1985). In particular, 7-ethoxyresorufin-*o*-deethylase (EROD), catalyzed by a specific cytochrome *P*-450 isozyme in fish livers, responds specifically (induced levels of activity) to planar organic compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, chlorinated dibenzo dioxins and chlorinated dibenzo furans (Hansen and Addison, 1990). Measuring induced hepatic cytochrome *P*-450 levels and EROD activity in fish can therefore be indicative of exposure to certain hazardous organic compounds.

Industrial wastewaters are major sources of mixed contaminants to aquatic ecosystems (Bergman *et al.*, 1986; OECD, 1987; Blaise *et al.*, 1988), and are strong candidates as potential inducers of MTs and MFOs (Payne, 1984; Neff, 1985; Vindimian and Garric, 1989). Pulp and paper mill effluents, in particular, are notorious for the (sub)lethal effects which they exert on fish (Couillard, 1980; Holmbom and Lehtinen, 1980; Blaise *et al.*, 1986; Kovacs, 1986; Blaise and Costan, 1987; Environment Canada, 1987; Södergren, 1987). These effluents contain a plethora of chemicals (Holmbom and Lehtinen, 1980; Kringstad and Lindström, 1984; Environment Canada, 1987) and have been shown to induce hepatic detoxification in both feral fish (Förlin *et al.*, 1985; Södergren, 1987; Lindström-Seppä and Oikari, 1990; Munkittrick *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991; Hodson *et al.*, 1992) and laboratory-exposed fish (Förlin *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1987; Oikari *et al.*, 1988). Several laboratory experiments with long-term exposures (weeks to months) have demonstrated the effects of effluents on fishes hepatic xenobiotic metabolism (e.g. Andersson *et al.*, 1987; Oikari *et al.*, 1988; Lehtinen *et al.*, 1990), but significant induction of cytochrome *P*-450-dependent enzyme activities after just 3–5 days' exposure to inducers has also been documented (Lidman *et al.*, 1976; Addison *et al.*, 1981; Fingerman *et al.*, 1983).

Our laboratory regularly undertakes 96 h acute lethal toxicity testing of industrial effluents with rainbow trout for monitoring, compliance and regulatory purposes with a well-established procedure (Environment Canada, 1990a). Building in a concurrently-run sublethal bioassay to measure biochemical parameters indicative of the presence and effects of certain (in)organic pollutants appeared a worthwhile objective. This would clearly optimize bioanalytical efficiency and information output. In considering this investigation, we sought answers to the following

questions: does significant induction of hepatic MT/MFO result in rainbow trout exposed for 96 h to pulp and paper effluents? If so, are there relationships between lethality and sublethality data? Can MT/MFO data discriminate between mill processes and/or treatment levels? Could such a procedure eventually have value as a useful (sub)lethal bioassay to screen industrial effluents?

In this paper, we report that hepatic MT and MFO induction occurred in rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*) following a 96 h exposure to sublethal concentrations of 12 pulp and paper mill effluents. Interferences linked to MT and MFO measurements in chemically complex effluents are also discussed herein. In this initial work, we emphasize once again our wish to examine whether these two biochemical systems could prove to be practical endpoints to screen for the presence of potentially hazardous bioavailable (in)organic xenobiotics in effluents, during routine laboratory acute toxicity tests.

MATERIALS AND METHODS

Effluent samples

Twelve pulp and paper mill effluent samples, representative of various mill processes with primary or primary and secondary wastewater treatment, were used in this study (Table 1). Each was a 24 h composite collected according to an Environment Canada sampling protocol (Vezeau, 1982). Brought back to the laboratory in several Rubbermaid 60 l. containers lined with polyethylene bags, each effluent was recomposited to ensure homogeneity and separated once more to meet biological (360 l.) and chemical (40 l.) volumetric analytical requirements. Chemical characterization was performed in accordance with specific analytical procedures for metals (APHA, 1989), PAHs, PCBs, dioxins and furans (US EPA, 1982).

General bioassay procedure

Since the effluent samples studied were part of an on-going monitoring program to determine the degree of acute lethality to rainbow trout fingerlings of pulp and paper mill effluents from the province of Québec, both acutely lethal and sublethal (MT and MFO measurements) effects were determined concurrently. Acute lethality testing was performed with the standardized 96 h static LC₅₀ bioassay procedure recommended by Environment Canada (1990a) with fingerling (5.5 ± 0.3 cm; 2.3 ± 0.4 g) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bioassays were undertaken at 15°C in experimental vessels each of which contained 10 fish and 60 l. of a logarithmic series of effluent concentrations (100, 65, 56, 42, 24, 18, 13.5, 10, 7.5, 5.6, ... 0% v/v). Preliminary 24 h exposure tests (i.e. 4 trout placed in each of 5 l. rigid polyethylene beakers containing 4 l. of 100, 50, 10, 1 and 0% v/v effluent) were conducted prior to execution of the standard 96 h bioassays. As trout mortality predominantly occurs within the first 24 h during 96 h acute lethality bioassays with industrial effluents (Blaise and Costan, 1987), preliminary testing is useful to delineate the appropriate range of concentrations at which the definitive 96 h LC₅₀ should be carried out. It also ensured selection of a minimum of 3 sublethal concentrations for each effluent from which surviving fish, after the 96 h exposure, could be recovered for subsequent MT and MFO measurements (Table 1). After three sublethal effluent concentrations had been selected based on results of each 24 h preliminary test,

four replicates of each of these sublethal effluent concentrations (and four control replicates) were incorporated into the 96 h bioassay.

Chemicals

Chemicals for protein analysis (serum bovine albumin and Coomassie brilliant blue G-250) were purchased from Sigma Chemical Company. For MT analysis, glycine, rabbit MT and hemoglobin (Hb) were purchased from Sigma Chemical Company, and silver nitrate

was purchased from Fisher Scientific. For MFO determinations, potassium phosphate (KH_2PO_4), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 7-ethoxy-3H-phenoxazin-3-one ethyl ether (ethoxyresorufin) and 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one (resorufin), phenazine ethanesulfonate, ascorbate, Triton N-101, sodium cholate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sucrose, potassium chloride (KCl), dithiothreitol (DTT), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and glycerol were purchased from Sigma Chemical Company.

Table 1. Toxicological characteristics associated with the pulp and paper mill effluents studied

Effluent No.	Mill process†	Treatment‡	96 h LC_{50} (% v/v)§	Sublethal exposure concentrations (% v/v) used for MT and MFO measurements¶ and induction factors over controls			Lethal (L) to sublethal (S) ratios (L/S)†† observed with the effluents	
							L/S (MT)	L/S (MFO)
1	TMP	1	4.2–5.6		0.56	1.0	1/8	
				MT	1.1	1.4*	2.3*	
				MFO	0.4*	0.1*	0.3*	4.9
2	TMP	1	5.6–7.5		0.56	1.0	1.8	—§§
				MT	1.0	1.3*	1.3*	
				MFO	1.3*	1.1	1.1	6.6
3	GWMP	1	6.3		0.56	1.0	1.8	11.8
				MT	1.7	1.1	1.2	
				MFO	1.4	2.8*	1.8	11.3
4	TMP	1	8.4		0.56	1.0	1.8	6.3
				MT	1.1	1.1	1.5*	
				MFO	2.2*	1.8*	2.6*	4.7
5	TMP, TCP	1	9.0		0.56	1.0	1.8	15.0
				MT	1.7	2.0*	1.8*	
				MFO	1.7	1.6	5.2*	9.0
6	TMP, SCP	1	10–18		0.56	1.0	1.8	5.0
				MT	1.6*	1.5*	1.4	
				MFO	1.7*	1.5*	1.4	25.0
7	KP	1	18–24		5.6	10	18	25.0
				MT	1.5*	2.0*	2.4*	
				MFO	2.9*	2.2*	2.1*	3.8
8	TMP, TCP	1	24–42		0.56	1.0	1.8	3.8
				MT	1.0	1.3*	1.4*	
				MFO	4.5*	1.1	2.6††	33.0
9	KP	1	24–42		5.6	10	18	59.0
				MT	1.7*	1.6*	1.8*	
				MFO	2.0††	2.0*	0.8	5.9
10	TMP	2	42		5.6	10	18	33.0
				MT	1.8*	2.5*	2.3*	
				MFO	1.0	1.4	0.9	7.5
11	SCP, GWMP	2	42–56		5.6	10	13.5	<2.3
				MT	1.8*	1.8*	2.0*	
				MFO	9.4*	5.3††	5.1††	8.8
12	KP	2	65–100		5.6	1.0	18	8.8
				MT	1.3	1.2	2.1*	
				MFO	1.6	2.1††	1.7	4.6

*Significant difference over controls at $P < 0.05$.

†GWMP (groundwood mechanical pulping), KP (Kraft pulping), SCP (sulphite chemical pulping), TCP (thermochemical pulping), TMP (thermomechanical pulping).

‡1 (primary treatment), 2 (primary and secondary treatment).

§When insufficient numbers of effluent concentration data points displaying between 0 and 100% mortality effects were obtained, an LC_{50} range value was reported (e.g. 96 h $\text{LC}_{50} = 18\text{--}24\%$ v/v for effluent 7). Specific 96 h LC_{50} values reported were determined by Probit analysis (Litchfield and Wilcoxon, 1949).

¶MT (metallothionein), MFO (mixed function oxidase: specifically, EROD activity is considered here).

||Lowest observable effect concentration (LOEC) exhibiting a significant induction of MT or MFO (EROD activity) over control values.

††In reporting the lethal to sublethal (L/S) ratio values, a median LC_{50} value was first determined from those effluents presenting a 96 h LC_{50} range value (e.g. Table 1: effluent 1 median $\text{LC}_{50} = (4.2 + 5.6)/2 = 4.9$). The respective L/S ratios for MT and MFO were then calculated with LOECs (e.g. L/S ratio of effluent 1 for MT = 4.9% v/v/ 1% v/v = 4.9).

‡‡Although induction factor appears elevated, Dunnett's t -test did not show significance, owing to replicate variability.

§§Not calculable because of toxicity effects on EROD activity.

Fish liver preparation

After the bioassay had run its course, fish destined for MT and MFO measurements were anesthetized in groups of 10 with 25 mg/l of tricaine methanesulfonate (MS 222, Sandoz) for 50 ± 10 s at 15°C . This level of anesthetic treatment (as well as 125 mg/l tricaine) was tested for MT or MFO induction. After decapitation, dissected livers from 10 fingerlings present in each replicate effluent concentration were then individually rinsed in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, containing 154 mM KCl and 1 mM EDTA, blotted dry and pooled in a centrifuge tube with 3 ml of a 20 mM Tris-acetate buffer containing 250 mM sucrose and 2 mM DTT. Pooling the small (pin point) livers was necessary to ensure sufficient biological material for running biochemical analyses. Livers were homogenized with a Teflon pestle tissue grinder at 4°C , and centrifuged (10,000 g, 20 min, 4°C); the S_{10} supernatant fraction was collected and stored at -80°C for analysis the next day. Aliquots of the S_{10} fraction (25 μl) were kept for protein analysis using serum bovine albumin as standard (Bradford, 1976).

Metallothionein analysis

Levels of hepatic MT in the S_{10} fraction were determined by the silver saturation assay of Scheuhammer and Cherian (1986) as modified by Gagné *et al.* (1990). A 200 μl volume of the S_{10} fraction was heat denatured in a boiling water bath for 3 min, after which coagulated proteins were removed by centrifugation (10,000 g, 2 min). A 50 μl subsample of the heat denatured supernatant was then saturated with 100 μl of 20 mg/l Ag^+ in a pH 8.5 500 mM glycine buffer and incubated for 5 min at room temperature. Afterwards, sample volume was adjusted to 1.1 ml with glycine buffer. Removal of excess Ag^+ loosely (or not) bound to MT and precipitation of other proteins were achieved by adding 100 μl of a 2% Hb solution (w/v in water) to the sample and incubating for 5 min, followed by heating in a boiling water bath for 2.5 min, cooling on ice and centrifuging (10,000 g, 2 min). The Hb addition, heat denaturation and centrifugation steps were repeated once more. The total Ag in the supernatant was quantified using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer equipped with a Zeeman effect background corrector (Varian AA-300/400). The levels of MT were determined assuming that 17 mol of Ag^+ bind to 1 mol of MT (Scheuhammer and Cherian, 1986), as is the case for mammalian MT. Results are expressed in units of mammalian MT equivalents, where 1 unit of mammalian MT corresponds to 1 pmol of MT/mg protein in the S_{10} fraction. The exactness of this ratio was confirmed with standard additions of rabbit MT (0.5–3 μg) in the S_{10} fraction in triplicate.

Mixed function oxidase analysis

EROD activity was measured by a direct enzymatic assay (Prough *et al.*, 1978). The assay buffer contained 10 μM dicoumarol to prevent further metabolism of the fluorescent product (i.e. resorufin) to a non-fluorescent molecule (Nims *et al.*, 1984). EROD activity was expressed as pmol of resorufin formed/min/mg protein (total) in the S_{10} fraction. In addition to total protein, levels of cytochrome P-450 protein in the S_{10} fraction were measured according to the sodium dithionite difference spectrum principle in the presence of ascorbate and phenazine ethanesulfonate, which corrects for hemoglobin and methemoglobin spectral interferences (Johannessen and De Pierre, 1978). In order to reduce turbidity owing to microsomes and other membranous vesicles, 300 μl of the S_{10} fraction were mixed with 700 μl of a pH 7.4 100 mM potassium phosphate buffer containing 0.4% sodium cholate, 0.2% Triton N-101, 1 mM EDTA and 20% glycerol.

Data analysis

Four pooled biochemical values (S_{10} fraction protein, MT, cytochrome P-450 content and EROD activity) from each of the control and three sublethal effluent concentrations were tested by analysis of variance and significant differences between controls and treatments were determined by Dunnett's *t*-test ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Fish anesthesia with tricaine methanesulfonate (MS 222)

MS 222 as an anesthetic for fish subjected to mixed function oxidase analysis has been reported to produce interferences, resulting in significant depression of subsequent *in vitro* activities of cytochrome P-450 (Chevion *et al.*, 1977; Fabacher, 1982) and of EROD (Fabacher, 1982). To ensure no effects of this anesthetic on the biochemical data generated in this study, an experiment was conducted with both anesthetized and unanesthetized (blow on head followed by decapitation) fish.

As shown in Fig. 1, anesthesia with a 25 mg/l solution of tricaine for 50 ± 10 s (the exposure concentration and time adhered to throughout this study) had no significant effects on either MT, cytochrome P-450 or EROD in relation to unanesthetized control fish. Neither were any effects noted for these parameters with a 125 mg/l tricaine solution applied to fish with the same exposure time. The latter concentration is slightly higher than that employed by Fabacher (1982) who had demonstrated effects on the MFO system of immature brook trout with 112.5 mg/l tricaine following a 5 min exposure. On the basis of Fig. 1 results, however, there is no evidence to suggest that the anesthetic procedure applied in this investigation may have interfered with the hepatic parameters measured.

Toxicological effects of the pulp and paper effluents studied

All effluents tested (Table 1) invariably displayed (sub)lethal effects, regardless of mill characteristics (process and treatment). Effluents subjected to primary and secondary treatment (effluents 10–12) were less toxic than those receiving primary treatment only (effluents 1–9), corroborating earlier findings on the benefits of secondary treatment (Blaise *et al.*, 1987).

Significant induction of both MT and MFO occurred in one or more of the three sublethal concentrations tested in nine effluents, barring effluent 1, where MFO levels were significantly depressed, and effluents 10 and 12, where no significant MFO induction was observed. MT and MFO induction generally occurred at higher concentrations for secondary-treated effluents than for primary-treated effluents, in part through the selection of sublethal effluent exposure concentrations based on results of preliminary 24 h LC_{50} tests. Although our experimentation at this time was not designed to specify sublethal (MT and MFO) effluent threshold effects concentrations,

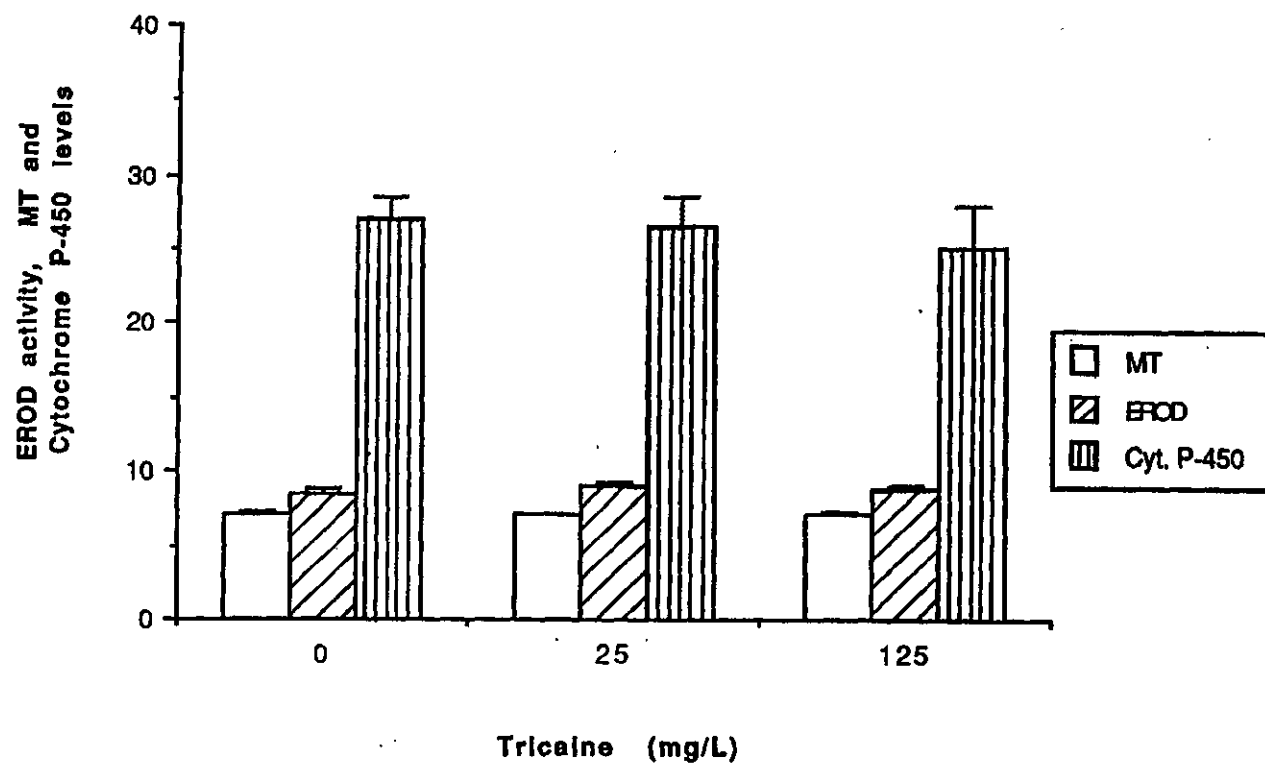


Fig. 1. EROD activity and levels of MT and cytochrome *P*-450 after a 50 ± 10 s exposure of fingerling rainbow trout to 0, 25 and 125 mg/l of tricaine methanesulfonate. Bars represent means ($n = 4$ from each of 10 pooled livers) with SE. There are no significant differences of tricaine-anesthetized fish from controls at $P < 0.05$. EROD activity is expressed as pmol of resorufin formed/min/mg protein, cytochrome *P*-450 level is expressed as pmol/mg protein and level of MT is expressed in units of mammalian equivalents.

biochemical responses would nevertheless be expected to occur at increasingly lower effluent concentrations as acute lethality intensifies (Blaise *et al.*, 1986).

Interestingly, lethal to sublethal (L/S) ratios, as explained and shown in Table 1, indicate that LOECs (lowest observable effect concentrations) corresponding to significant MT and MFO inductions were observed at effluent concentrations which were 3.8–33 and 3.3–59 times lower than the LC₅₀ values, respectively. Highest L/S ratios came from effluents 6 (L/S for MT and MFO = 25) and 8 (L/S for MT and MFO = 33 and 59, respectively). In complex effluents such as these, chemicals responsible for observed lethal effects may (or may not) be the same as those producing sublethal (i.e. MT/MFO inductions) effects. While L/S ratios are clearly an area for further study (e.g. to examine whether relationships can exist between lethality and sublethality in effluents shown to induce MTs and MFOs), short-term goals in our laboratory will focus on refining this combined (sub)lethal bioassay to obtain NOECs (no observable effect concentrations) for MT/MFO activity in pulp and paper as well as in other groups of industrial effluents. Table 1 data already indicate NOECs for certain effluents, although their determination was not sought specifically in this initial study. Evidently, there would be value in reporting precise MT/MFO NOECs for effluents, as those exhibiting low NOEC (high toxicity) values would certainly be targeted as priority wastewaters for further detailed investigations.

MT/MFO induction activity after exposure to effluents

Following a 96 h sublethal exposure, statistically significant induction ranging from 1.3 (effluents 2 and 8) to 2.5 (effluent 10) for MT and from 1.3 (effluent 2) to 9.4 (effluent 11) for MFOs (EROD), respectively, were measured over controls (Table 1). These responses may be considered marginal in comparison to those expected for fish exposed for lengthy periods to similar effluents (Lindström-Seppä and Oikari, 1989). As they are statistically significant, induction indicates the presence of bioavailable MT/MFO inducers which are rapidly absorbed either via the water column or through the ingestion of suspended particles from the effluents.

Our results for MFOs parallel those observed in other fish exposures to pulp and paper effluents. EROD activities were increased 3–5 times over controls in fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) exposed to bleached pine/birch pulp effluent for 5–9 months (Andersson *et al.*, 1987). With immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed for 7 weeks to two concentrations (0.05 and 0.25 % v/v) of each of six different bleached kraft mill effluents (BKME), Lehtinen *et al.* (1990) reported up to 6-fold increases in liver EROD activity. Again, with BKME concentrations (10, 20 and 40% v/v) and times of exposure (1, 3, 7 and 14 days) more closely matching

our own, Mather-Mihaich and Di Giulio (1991) observed 3–10-fold increases in EROD activities with channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Their data more precisely reveal significant EROD inductions of 3–5 times and 3–8 times over controls after just 1 and 3 days of exposure, respectively. Finally, hepatic AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase), another key monooxygenase expressed as a result of P-450 IA1 induction, revealed 10-fold and 5-fold activity increases in feral white suckers (*Catostomus commersoni*) caught immediately and 95 km downstream, respectively, from a BKME effluent relative to fish caught 10 km upstream (Hodson *et al.*, 1992).

We are not aware of MT induction having been reported for fish exposed directly to industrial effluents in laboratory studies. However, hepatic MT concentrations in wild rainbow trout and in rainbow trout held in a series of lakes contaminated by a mixture of zinc, copper and cadmium (Zn:Cu:Cd, 400:20:1) were increased to levels corresponding to maximum induction factors of close to 4, as calculated from the data reported by Roch *et al.* (1986). Maximum induction from laboratory data reported by the same authors closely matched those of the field observations, after juvenile rainbow trout had been continuously exposed to identical metal mixtures for 4 weeks. In another study, MT induction ranged from 1 to 1.6-fold, after brook trout had been exposed to waterborne cadmium (0–19.1 µg/l) for 30 days (Hamilton *et al.*, 1987). Overall, the MT induction factors (1–4) determined from these studies are not much different than those (1–2.5) we report.

In this initial study of a combined (sub)lethal bioassay where measurement of MT/MFO levels are "piggy-backed" onto a standardized acute lethality procedure, no attempt was made to run time-course experiments with the effluents to see whether more elevated induction factors could be obtained with prolonged exposures. With complex liquid wastes, optimal time-course inductions for MT and MFOs would likely vary according to the specific chemical composition of each effluent. An extended exposure might enhance MFO levels where low concentrations of one or more inducers are present, for example, while decreasing these same levels in another effluent where prolonged exposure would degrade cytochrome P-450 because of the action of other toxic chemicals. Time-course MT/MFO induction is clearly an area requiring major investigation to optimize the detection of the presence/effects of xenobiotics impacting on hepatic metabolism in effluent-exposed fish.

Chemical characteristics of the pulp and paper effluents studied

Basic chemical characteristics determined for the pulp and paper effluent samples used in the (sub)lethal bioassay procedure are detailed in Table 2. Summarized here are those classes of (in)organic chemicals detected in the effluents for

Table 2. Chemical characteristics associated with the pulp and paper mill effluents studied: classes of toxic xenobiotics potentially linked to MT and MFO inductions

Effluent	Metals† (µg/l)				Total PAHs‡ (µg/l)		Dioxins (pg/l)	Furans (pg/l)	PCBs (µg/l)
	Cu¶	Cd¶	Zn¶	Hg¶	No.	Conc.			
1	40	<30	300	5	1	1.3¶ (¶Naphthalene: only species assayed)	NA§	NA	NA
2	<30	<30	350	<0.2	11	6.6¶ (¶Naphthalene, 0.70; ¶Benzo-a-pyrene, 0.13)	NA	NA	Not found (<0.1)
3	<30	<30	160	<0.2	4	2.2¶ (¶Naphthalene, 1.3)	NA	NA	Not found (<0.1)
4	<30	<30	220	<0.2	1	0.6¶ (¶Naphthalene: only species assayed)	NA	NA	Not found (<0.1)
5	<30	<30	130	<0.2	2	0.3¶ (¶Naphthalene, 0.13)	NA	NA	Not found (<0.1)
6	<30	<30	220	<0.2	2	0.6¶ (¶Naphthalene, 0.5)	NA	NA	Not found (<0.1)
7	<30	<30	<100	<0.2	2	0.3¶ (¶Naphthalene, 0.2)	760 (O ₄ CDD)	41 (2,3,7,8 TCDF)¶	<0.5 Aroclor 1254 <0.5 Aroclor 1242 <0.02 Aroclor 1260 0.2 Aroclor 1242
8	<30	<30	120	<0.2	2	0.6¶ (¶Naphthalene, 0.5)	NA	NA	Not found (<0.1)
9	<30	<30	90	<0.2	2	0.4¶ (¶Naphthalene, 0.3)	NA	NA	Not found (<0.1)
10	<30	<30	200	<0.2	2	0.5¶ (¶Naphthalene, 0.4)	NA	NA	Not found (<0.1)
11	<30	<30	190	<0.2	6	12 (¶Naphthalene, 6.9)	NA	NA	<0.2 Aroclor (1242, 1248, 1254, 1260)
12	<30	<30	60	<0.2	2	0.4¶ (¶Naphthalene, 0.3)	390 (O ₄ CDD)	<10	Not found (<0.1)

†Reported concentrations refer to total metal concentrations for which cation content is unknown.

‡Number of PAH species reported refer to the number analysed in each effluent.

§NA = not assayed.

¶Indicates known inducers for MTs and MFOs found in effluents: Cu, Zn, Hg (Dunns *et al.*, 1987); Cd (Hamer, 1986); naphthalene, benzo-a-pyrene (Fingerman *et al.*, 1983); 2,3,7,8-TCDF (Smolowitz *et al.*, 1991); PCBs (Elcombe and Lech, 1987).

which MT and MFO induction has been documented. Divalent cations of metals including Cu, Cd, Zn and Hg are known to induce MTs (Roch *et al.*, 1982; Bremner and Mehra, 1983; Cherian and Nordberg, 1983; Dunns *et al.*, 1987) and some PAHs (Fingerman *et al.*, 1983), as well as some chlorinated dibenzo dioxins/furans and polychlorinated biphenyls (Hansen and Addison, 1990) can induce MFOs.

Limited chemical analysis of these effluents cannot suggest that identified metals and compounds are solely responsible for the significant MT/MFO inductions previously discussed. Clearly, such a conclusion would have to be backed by proof that measured levels of chemicals are sufficient to induce MTs and MFOs in a 96 h time-frame, or by the detection of sufficient residues in fish tissue. Such investigations would also shed light on the biological relevance of MT/MFO inductions, which remains largely an unanswered question. The chemical data are rather illustrated to demonstrate that there are indeed (classes of) compounds present in the effluents potentially capable of eliciting MT/MFO inductions. Other unidentified chemicals may have played an induction role as well, since many components have yet to be identified in pulp and paper mill processes (Andersson *et al.*, 1987; Mather-Mihaich and Di Giulio, 1991). Significant elevations of MTs and MFOs (Table 1) represent an integrated response to a number of (in)organic pollutants and constitute direct evidence that biologically-active xenobiotics did in fact enter the fish. Given the potential range of chemicals in such complex effluents, the biological response (induction) may be, in fact, more useful than chemical analysis in detecting significant "toxic" mixtures of chemicals.

Observed patterns of MT/MFO responses with the effluents studied

Hepatic MT levels in trout exposed to the pulp and paper effluents suggest that divalent cations of metals such as Cu, Cd, Zn and Hg were biologically available, since these are the species which induce MT (Hamer, 1986; Dunns *et al.*, 1987). With the 12 effluent samples investigated, induction of MTs indicated increased levels of protein, with or without an apparent linear dose-response (Table 1). However, only effluent 3 showed a significant increase in MT levels at the lowest sublethal concentration followed by depression of MT levels at the two highest concentrations of exposure (Table 1). These two types of response patterns are illustrated in Fig. 2 based on data obtained with effluents 1 and 3.

It is evident that exposing fish to effluents which are complex mixtures of (in)organic chemicals could produce interfering effects (antagonism, synergism) on the subsequent measurement of biochemical parameters. Under this assumption, it is plausible that some organic chemicals could have produced deactivating effects on MT induction as fish were exposed

to higher (and therefore more toxic) concentrations in the case of effluent 3 (Fig. 2).

Figure 3 reflects the types of response patterns observed for trout MFO levels based on induction factors reported in Table 1. Responses ranged from extremes of significant depression of MFO levels over controls (effluent 1) to no significant induction of MFO levels (effluent 10), with intermediate responses of significant induction with exposure to increasing effluent concentration (effluent 5) and significant induction at lower sublethal concentrations of exposure followed by a drop in induced levels at higher sublethal concentrations of exposure (effluent 6). These observations tend to show that the MFO response system is perhaps more sensitive to interference resulting from exposure to complex wastewaters than is the MT response system, as inhibitory effects are suggested in effluents 1, 3, 6, 7, 8, 9 and 11 (Table 1).

The activity of EROD, our measure of MFOs, reflects the amount of the *P*-450IA1 isoform (also known as cytochrome *P*-448 or as LM4b by Miranda *et al.*, 1990) of the cytochrome *P*-450 family. This is the principal form induced by PAHs, PCBs, dioxins and furans (Vodcnik *et al.*, 1981; Melançon *et al.*, 1989; Hansen and Addison, 1990) and it has a high specificity for the substrate 7-ethoxyresorufin. Therefore, EROD activity displays the induction of this specific cytochrome *P*-450 isoform (Buhler and Williams, 1988) and is the one apparently subjected to interferences by chemical components in some of the effluents. Similar interferences on total cytochrome *P*-450 levels (i.e. significant depression with increasing effluent concentration) were also observed in our study with effluents 3, 8 and 10 (data not shown) which further suggest that chemical components of these liquid wastes might interfere with other biotransformation enzymes.

Difficulties linked to predicting the biochemical outcome of exposure of fish to complex effluents have been documented to some extent. A field study, measuring MFO and cytochrome *P*-450 levels in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*) inhabiting areas contaminated by (non)inducer organics and trace metals stemming from complex waste discharges, found depressed hepatic microsomal *P*-450 concentrations and similar EROD activities when compared to those from an unpolluted site. Metals may possibly have played a role in reducing the synthesis of (or in destroying) cytochrome *P*-450 while nevertheless allowing other xenobiotic inducers to stimulate EROD to some extent (Gallagher and Di Giulio, 1989). While there is a virtual absence of information dealing with metal effects on fish hepatic cytochrome *P*-450, Maines and Kappas (1976) and Eaton *et al.* (1980) have shown that several (Cd, Zn, Cu, Co, Hg) can reduce total levels of cytochrome *P*-450 in rat livers. One recent study has demonstrated that plaice (*Pleuronectes platessa*) exposed simultaneously to cadmium and 3-methylcholanthrene (3-MC) decreased *P*-450 and EROD activities.

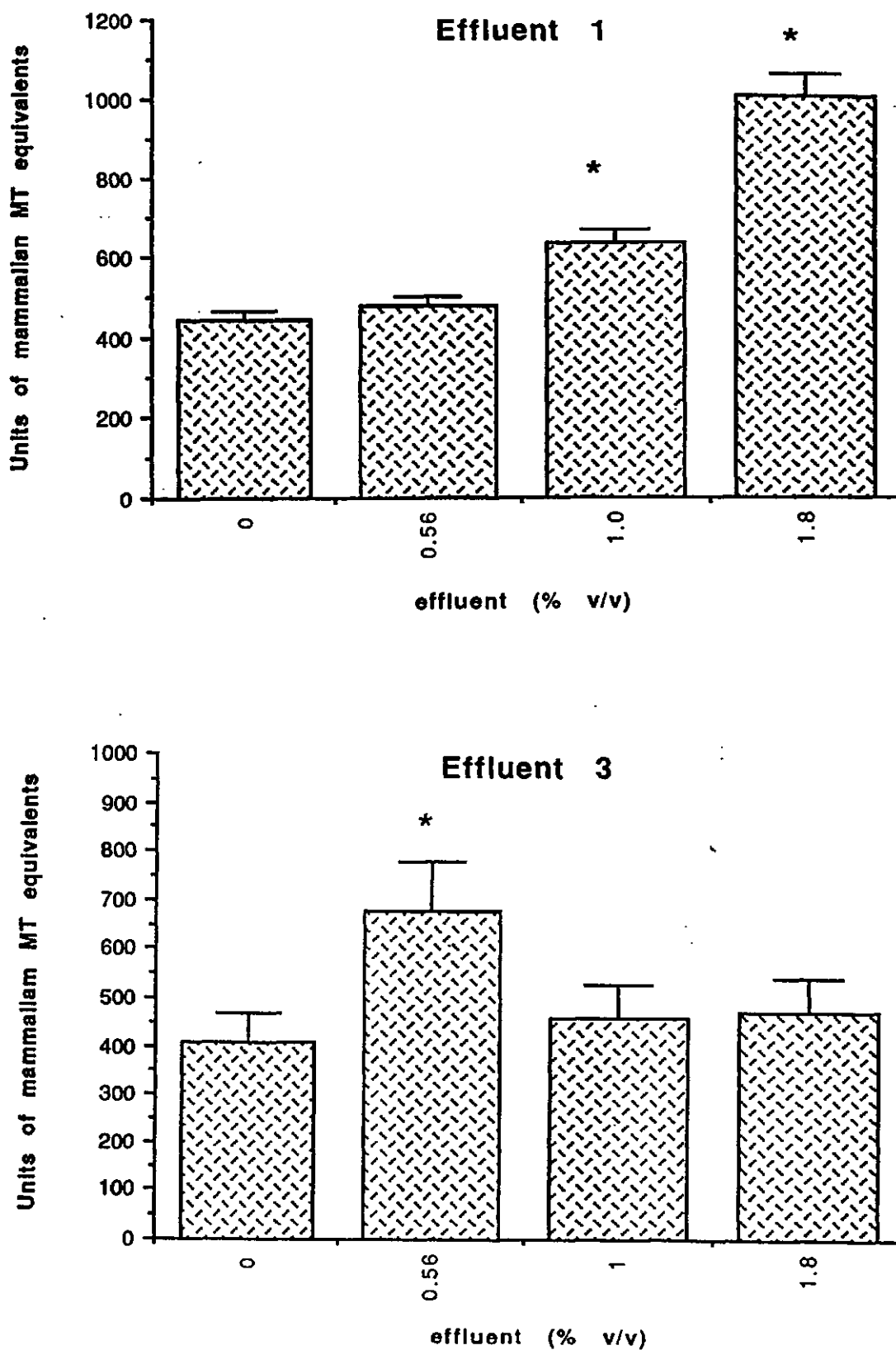


Fig. 2. Types of response patterns observed with MT after acute exposure to sublethal effluent concentrations. Bars represent means ($n = 4$ replicates from each of 10 pooled livers) with SE. *Significant from controls (0%) at $P < 0.05$.

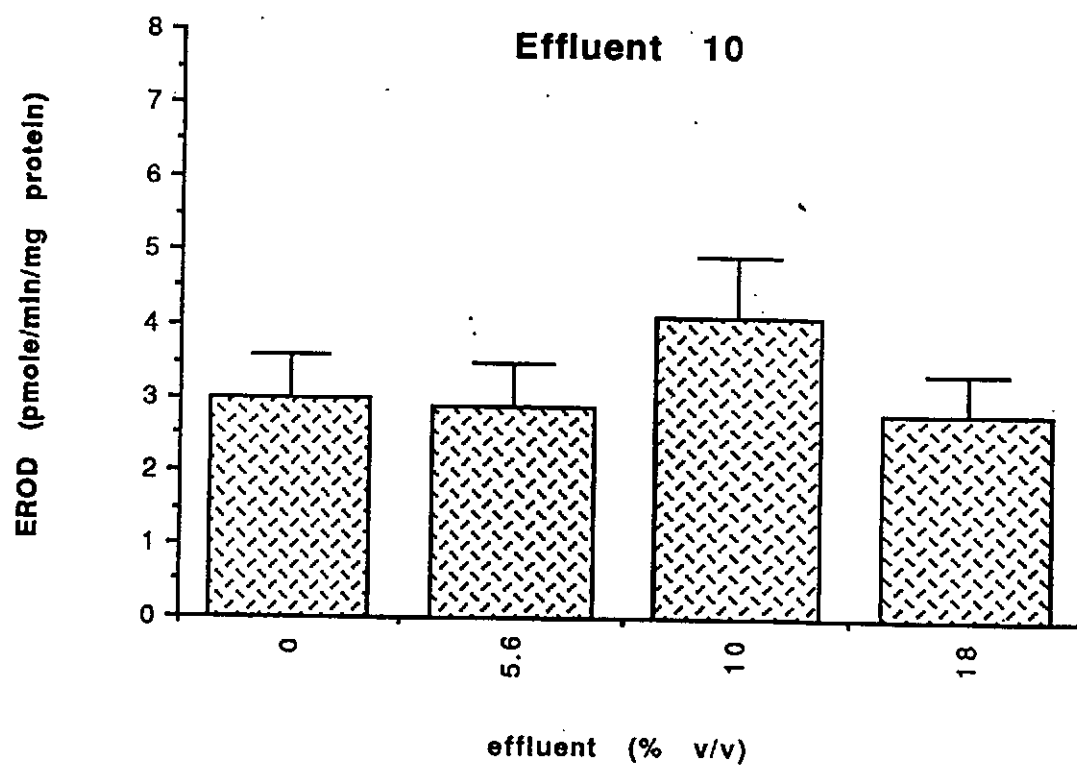
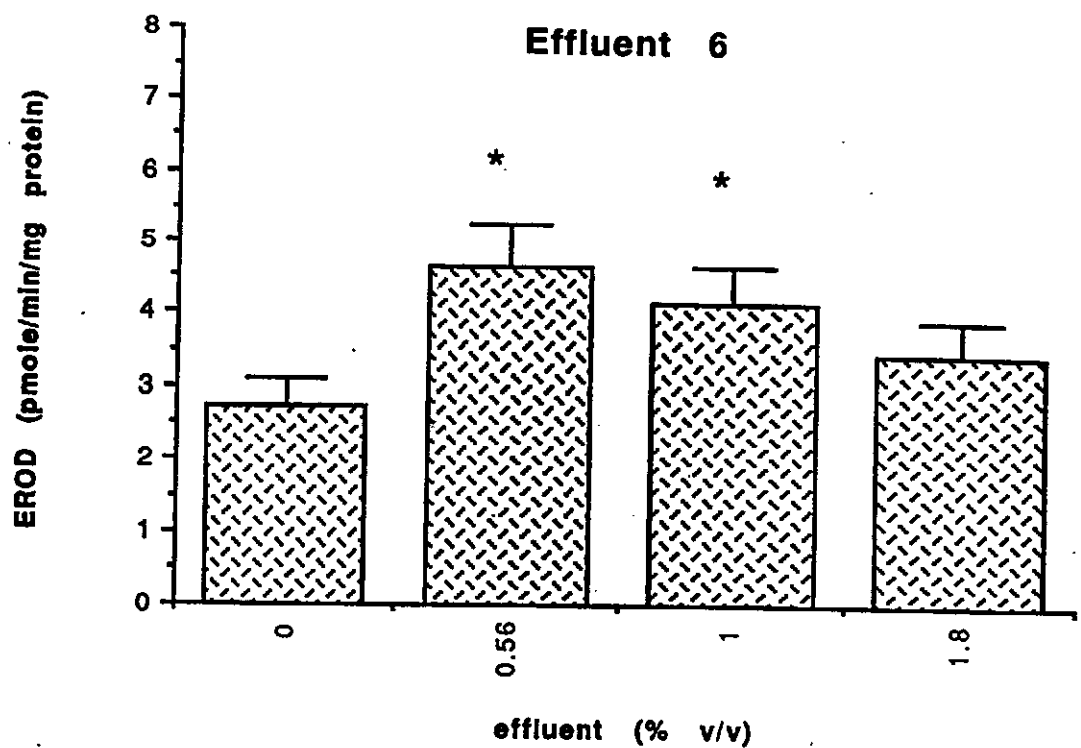


Fig. 3(a). Caption opposite.

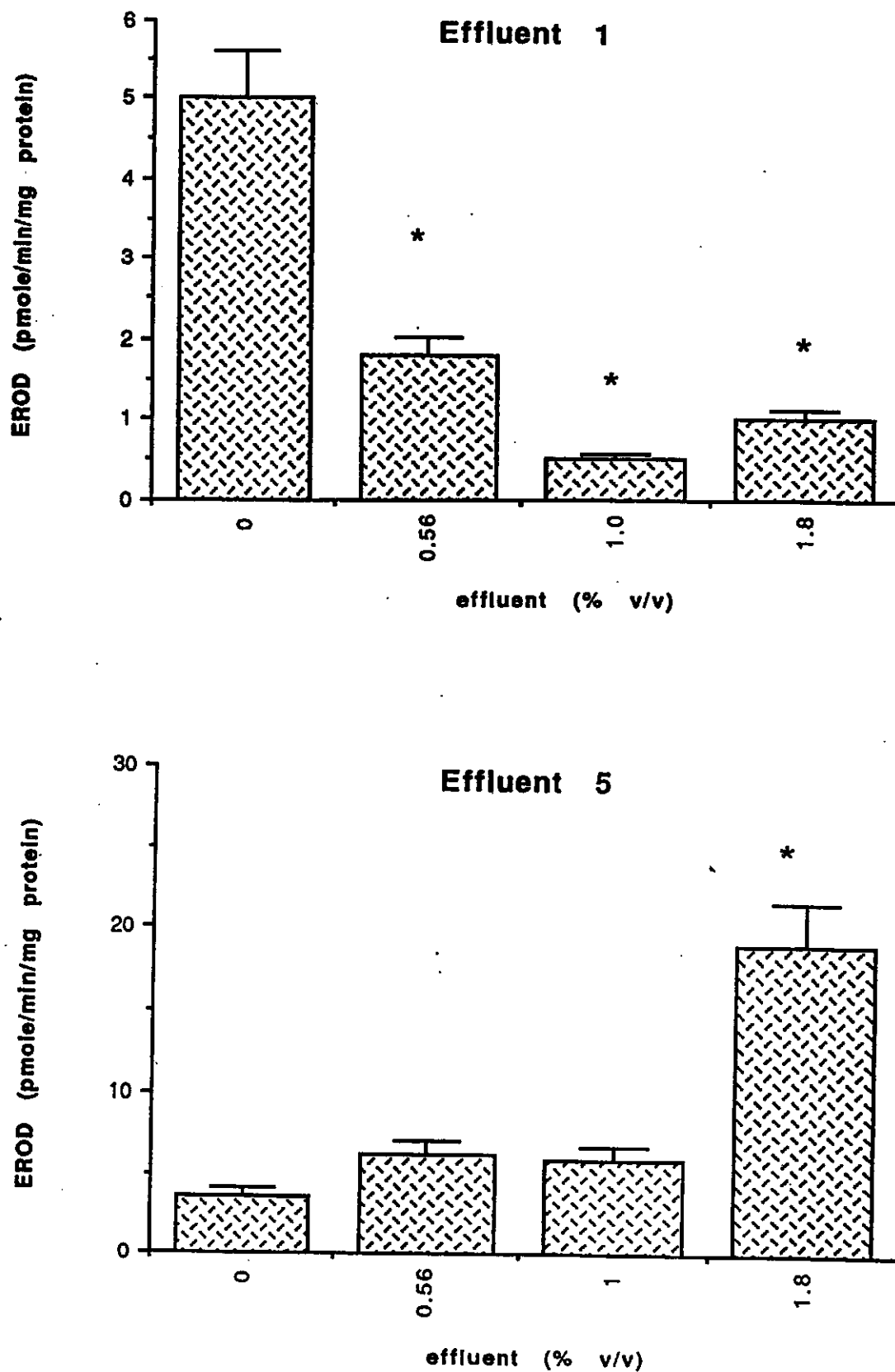


Fig. 3. Types of response patterns observed with EROD activity after acute exposure to sublethal effluent concentrations. Bars represent means ($n = 4$ replicates from each of 10 pooled livers) with SE. *Significant from controls (0%) at $P < 0.05$.

while exposure to 3-MC alone increased their activities (George and Young, 1986). Analogously, metal interferences may perhaps have contributed in depressing EROD activity, as observed with some of our effluents.

Antagonistic interference of fish detoxification systems purportedly due to industrial effluents was reported by Ahokas *et al.* (1976), where MFO activity was reduced in pike (*Esox lucius*) taken from a lake polluted by chemical and pulp and paper plants. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed for 7 weeks to BKME effluent had depressed EROD activity compared to controls (Lehtinen *et al.*, 1990); unusually high concentrations of resin acids in this effluent may have inhibited EROD in these fish. These same authors rightfully conclude that complex patterns of effects can occur when fish biotransformation enzymes are exposed to such effluents and that measured biochemical responses may well depend on the relative prevalence of MFO-stimulating and MFO-inhibiting substances at play. Results of the present study suggest that different categories of chemicals may be clashing in their combined effects on MT/MFO induction by the effluents studied and that future research efforts might consider (in)organic contaminant interactions. Clearly, our selection of only three sublethal concentrations to measure MT levels and MFO activity, based on acute lethality of the effluents, may have influenced the observed response patterns. Had MFO activity been measured at sublethal concentrations lower than those reported for effluent 1, for example, a normal dose-response pattern may have been recorded instead of significantly reduced activity (Table 1). Nevertheless, the above discussion illustrates some of the inherent difficulties linked to performing sublethal biochemical testing with complex effluents and supports the notion that future studies should attempt to report threshold effects concentrations, where the relative impact of various contaminants on MT or MFO measurements should, at least, be minimized.

CONCLUSIONS

Since MT and MFO systems are induced by specific classes of hazardous (in)organic pollutants (Varanasi *et al.*, 1981; Roch *et al.*, 1982; Neff, 1985; Hansen and Addison, 1990), whose introduction into aquatic systems is undesirable, eventual application of a sublethal bioassay measuring these two biochemical endpoints would seem to have value to screen, control and possibly even regulate the presence of particular xenobiotics in effluents. The present work has shown that fingerling rainbow trout can be employed in a cost-effective manner to monitor the presence of potentially hazardous classes of chemicals in pulp and paper effluents, by measuring hepatic MT and MFO induction levels following regulatory (96 h) acute lethality tests. Exposure to sublethal concentrations of 12 effluents, representative of varied mill

processes/treatments, elicited significant MT (all effluents) and MFO (9 effluents) induction. In this initial study, the limited use of three sublethal concentrations for biochemical measurements did not allow any conclusions to be drawn concerning mill process/treatment type and MT/MFO inductions. Future investigations capable of determining precise MT/MFO NOECs may be helpful in this regard. With such complex effluents, however, interferences owing to the simultaneous presence of inorganic and organic substances can affect the expression of specific biochemical induction responses. In this respect, further long-term research into contaminant interactions is required to unravel the significance of xenobiotic-mediated cause-effect associations that can either induce or depress specific isoforms of MTs and MFOs. In our laboratory, future work will focus on refining the combined (sub)lethal bioassay procedure described herein to measure precise MT and MFO NOECs for pulp and paper as well as for other types of industrial effluents. These additional investigations should help to determine whether this bioanalytical approach can be sufficiently validated to be useful for undertaking routine toxicological characterization of industrial effluents, the application of which could also prove beneficial for the regulatory community.

Acknowledgements—The authors thank the management of the Centre Saint-Laurent, Conservation and Protection, Environment Canada, Québec, for supporting this research. Technical support was provided by S. Thorn (fish bioassays), I. Jobin (metal analysis) and B. Beaumier (MT and MFO analyses).

REFERENCES

- Adams S. M., Shepard K. L., Greeley M. J. Jr, Jimenez B. D., Ryon M. G., Shugart L. R. and McCarthy J. F. (1989) The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. envir. Res.* 28, 459-464.
- Addison R. F., Zinck M. E. and Willis D. E. (1981) Time- and dose-dependence of hepatic mixed function oxidase activity in brook trout *Salvelinus fontinalis* on polychlorinated biphenyl residues: implications for "biological effects monitoring". *Envir. Pollut. Ser. A* 25, 211-218.
- Ahokas J. T., Karki N. T., Oikari A. and Soivio A. (1976) Mixed function monooxygenase of fish as an indicator of pollution of aquatic environment by industrial effluent. *Bull. envir. Contam. Toxicol.* 16, 270-274.
- Andersson T., Bengtsson B. E., Förlin L., Hårdig J. and Larsson A. (1987) Long-term effects of bleached kraft mill effluents on carbohydrate metabolism and hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish. *Ecotoxic. envir. Saf.* 13, 53-60.
- APHA, AWWA and WPCF (1989) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th edition. American Public Health Association, Washington D.C.
- Bergman H. L., Kimerle R. A. and Maki A. W. (1986) *Environmental Hazard Assessment of Effluents*. Pergamon Press, New York.
- de Bethizy J. P. and Hayes J. R. (1989) Metabolism: a determinant of toxicity. In *Principles and Methods of Toxicology* (Edited by Hayes A. W.), 2nd edition. Raven Press, New York.
- Bitton G. and Dutka B. (1986) *Toxicity Testing Using*

- Microorganisms*, Vols I and II. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Blaise C. and Costan G. (1987) La toxicité létale aiguë des effluents industriels vis-à-vis de la truite arc-en-ciel. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 22, 385-402.
- Blaise C., van Coillie R., Bermingham M. and Coulombe G. (1987) Comparaison des réponses toxiques de trois indicateurs biologiques (bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents de fabriques de pâtes et papiers. *Rev. Int. Sci. Eau* 3, 9-17.
- Blaise C., Trottier B., van Coillie R. and Couture P. (1986) Evaluation de la toxicité sub létale des effluents industriels vis-à-vis du poisson en mesurant l'ATP du muscle squelettique. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 21, 71-90.
- Blaise C., Sergy G., Wells P., Bermingham N. and van Coillie R. (1988) Biological testing-development, application and trends in canadian environmental protection laboratories. *Toxic. Assess.* 3, 385-406.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analyt. Biochem.* 72, 249-251.
- Bremner I. and Mehra R. K. (1983) Metallothionein: some aspects of its structure and function with special regard to its involvement in copper and zinc metabolism. *Chem. Scr.* 21, 117-121.
- Buhler D. R. and Williams D. E. (1988) The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxic.* 11, 19-28.
- Cherian M. G. and Nordberg M. (1983) Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28, 1-5.
- Chevion M., Stegeman J. J., Plisach J. and Blumberg W. E. (1977) Electron paramagnetic resonance studies on hepatic microsomal cytochrome P-450 from a marine teleost fish. *Life Sci.* 20, 895-900.
- Couillard D. (1980) Evaluation de la pollution et des répercussions des rejets des industries des pâtes et papiers sur la vie aquatique. *Sci. Total Envir.* 14, 167-184.
- Dunnas M. A., Blalock T. L. and Cousins R. J. (1987) Metallothionein. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 185, 107-109.
- Eaton D. L., Stacey N. L., Wong K. L. and Klaassen C. D. (1980) Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxic. appl. Pharmacol.* 55, 393-402.
- Elcombe C. R. and Lech J. J. (1978) Induction of monooxygenation in rainbow trout by polychlorinated biphenyls: a comparative study. *Envir. Hlth Perspect.* 23, 309-314.
- Environment Canada (1987) Aquatic toxicity of pulp and paper mill effluent: a review. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS 4/PF/1.
- Environment Canada (1990a) Biological test method, acute lethality test method using rainbow trout. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS 1/RM/9.
- Environment Canada (1990b) Biological test method, acute lethality using threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS 1/RM/10.
- Fabacher D. L. (1982) Hepatic microsomes from freshwater fish—II. Reduction of benzo(a)pyrene metabolism by the fish anesthetics quinaldine sulfate and tricaine. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C, 285-288.
- Fingerman S. W., Brown L. A., Lynn M. and Short C. S. (1983) Responses of channel catfish to xenobiotics: induction and partial characterization of a mixed function oxygenase. *Arch. envir. Contam. Toxicol.* 12, 195-201.
- Förlin L., Andersson T., Bengtson B., Harding J. and Larsson A. (1985) Effects of pulp bleach plant effluents on hepatic xenobiotic biotransformation enzymes: laboratory and field studies. *Mar. envir. Res.* 17, 109-112.
- Gagné F., Marion M. and Denizeau F. (1990) Metal homeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to cadmium. *Fund. appl. Toxic.* 14, 429-437.
- Gallagher E. P. and Di Giulio R. T. (1989) Effects of complex waste mixtures on hepatic monooxygenase activities in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Envir. Pollut.* 62, 113-128.
- George S. G. and Young P. (1986) The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83C, 37-44.
- Hamer D. H. (1986) Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- Hamilton S. F. and Mehrle P. M. (1986) Metallothionein in fish: a review of its importance in assessing stress from metal contamination. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 596-609.
- Hamilton S. J., Mehrle P. M. and Jones J. R. (1987) Cadmium-saturation technique for measuring metallothionein in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116, 541-550.
- Hansen P. D. and Addison R. F. (1990) The use of mixed function oxidase (MFO) to support biological effects monitoring in the sea. Marine Environmental Quality Committee. Int. Counc. Explor. Sea E: 33.
- Heath A. G. (1987) *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Hodson P. V., McWhirter M., Ralph K., Gray B., Thivierge D., Carey J. H., Van der Kraak G., Whittle D. M. and Levesque M. C. (1992) Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Québec. *Envir. Toxic. Chem.* 11, 1635-1651.
- Holmbom B. and Lehtinen K. J. (1980) Acute toxicity to fish of kraft pulp mill waste waters. *Paperi ja puu-Papper och trä* 11, 673-684.
- Johannessen K. A. and De Pierre J. W. (1978) Measurement of cytochrome P-450 in the presence of large amounts of contaminating hemoglobin and methemoglobin. *Analyt. Biochem.* 86, 725-732.
- Kovacs T. (1986) Effects of bleached kraft mill effluent on freshwater fish: a Canadian perspective. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 21, 91-118.
- Kringstad K. and Lindström K. (1984) Spent liquors from pulp bleaching. *Envir. Sci. Technol.* 18, 236A-248A.
- Leclerc H. and Dive D. (1982) Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique. *Inst. Nat. Santé Rech. Med.* 106, 600 pp.
- Lehtinen K. J., Kierkegaard A., Jakobsson E. and Wändell A. (1990) Physiological effects in fish exposed to effluents from mills with six different bleaching processes. *Ecotoxic. envir. Saf.* 19, 33-46.
- Lidman U., Förlin L., Molander O. and Axelsson G. (1976) Induction of the drug metabolizing system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Acta Pharmacol. Toxic.* 39, 262-272.
- Lindström-Seppä P. and Oikari A. (1989) Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxic. envir. Saf.* 18, 191-203.
- Lindström-Seppä P. and Oikari A. (1990) Biotransformation activities of feral fish in waters receiving bleached pulp mill effluents. *Envir. Toxic. Chem.* 9, 1415-1424.
- Litchfield J. T. Jr and Wilcoxon F. (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 96, 99-103.
- Maines M. D. and Kappas A. (1976) Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and metal ions. *Biochem. J.* 154, 125-131.
- Mather-Mihaich E. and Di Giulio R. T. (1991) Oxidant, mixed function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. *Arch. envir. Contam. Toxicol.* 20, 391-397.
- Melançon M. J., Turnquist K. A. and Lech J. J. (1989) Relation of hepatic microsomal monooxygenase activity

- to tissue PCB's in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) injected with [¹⁴C] PCB's. *Envir. Toxic. Chem.* 8, 77-782.
- Miranda C. L., Wang J. L., Henderson M. C. and Buhler D. R. (1990) Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P-450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital-induced rat P-450s. *Biochem. biophys. Acta* 1037, 155-160.
- Munawar M., Dixon G., Mayfield C. I., Reynoldson T. and Sadar M. H. (eds) (1989) *Environmental Bioassay Techniques and Their Application*; (*Hydrobiologia* 188/189). Kluwer, The Netherlands.
- Munkittrick K. R., Portt C. B., van der Kraak G. J., Smith I. R. and Rokosh D. A. (1991) Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1371-1380.
- Neff J. M. (1985) Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium ASTM STP 854* (Edited by Cardwell R. D., Purdy R. and Bahner R. C.), pp. 155-183. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- Nims R. W., Prough R. A. and Lubet R. A. (1984) Cytosol-mediated reduction of resorufin: a method for measuring quinone oxydoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 459-465.
- OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development (1987) The use of biological tests for water pollution assessment and control. Environment Monographs No. 11.
- Oikari A., Lindström-Seppä P. and Kukkonen J. (1988) Subchronic metabolic effects and toxicity of a simulated pulp mill effluent on juvenile lake trout, *Salmo trutta m. lacustris*. *Ecotoxic. envir. Saf.* 16, 202-218.
- Payne J. F. (1984) Mixed function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage in different phyla of aquatic animals. In *State University of Ghent and Institute of Marine Scientific Research* (Edited by Persoone G., Jaspers E. and Claus C.), Vol. 1, pp. 625-655. Bredene, Belgium.
- Persoone G., Jaspers E. and Claus C. (Eds) (1984) *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment. State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research*, Vols I and II. Bredene, Belgium.
- Price-Haughey J., Bonham K. and Gedamu L. (1986) Heavy metals induced gene expression in fish and fish cell lines. *Envir. Hlth Perspect.* 65, 141-147.
- Prough R. A., Mayer R. T. and Burke M. D. (1978) Direct fluorometric method for measuring mixed function oxidase activity. *Drug Metabol. Disp.* 5, 1-8.
- Roch M., Noonan P. and McCarter J. A. (1986) Determination of no effect levels of heavy metals for rainbow trout using hepatic metallothionein. *Wat. Res.* 20, 771-774.
- Roch M., McCarter J. A., Mathieson A. T., Clark M. J. R. and Olafson R. W. (1982) Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell river system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 1596-1601.
- Scheuhammer A. M. and Cherian M. G. (1986) Quantitation of metallothioneins by a silver saturation assay. *Toxic. appl. Pharmacol.* 82, 417-421.
- Sinderman C. (1988) Biological indicators and biological effects of estuarine/coastal pollution. *Wat. Resour. Bull.* 24, 931-939.
- Smith I. R., Portt C. B. and Rokosh D. A. (1991) Hepatic mixed function oxidases induced in populations of white sucker, *Catostomus commersoni*, from areas of Lake Superior and the St. Mary's River. *J. Grt Lakes Res.* 17, 382-393.
- Smolowitz R. M., Hahn M. E. and Stegeman J. J. (1991) Immunohistochemical localization of cytochrome P-450 IAI induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). *Drug Metabol. Disp.* 19, 113-123.
- Södergren A. (1987) Biological effects of effluents from pulp mills: preliminary results from the Swedish environment/cellulose project. *Päperi ja Puu-Papper och trä* 5, 422-426.
- Sprague J. B. (1990) *Aquatic Toxicology. Methods for Fish Biology* (Edited by Schreck C. B. and Moyle P. B.). American Fisheries Society, Bethesda, Md.
- US Environmental Protection Agency (1982) Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. National Technical Information Service, Cincinnati, Ohio, Report No. PB83-201798.
- Varanasi V., Stein J. E. and Hom T. (1981) Covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA in fish liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 102, 780-787.
- Vezeau R. (1982) Protocoles d'échantillonnage, de préservation et de préparation des échantillons pour l'analyse des polluants prioritaires. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Montréal.
- Vindimian E. and Garric J. (1989) Freshwater fish cytochrome P-450-dependent enzymatic activities: a chemical pollution indicator. *Ecotoxic. envir. Saf.* 18, 277-285.
- Vodienik M. J., Elcombe C. R. and Lech J. J. (1981) The effects of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. *Toxic. appl. Pharmacol.* 59, 364-374.
- Wells P. C. and Moyle C. (1981) A selected bibliography on the biology of *Salmo gairdneri* Richardson (Rainbow, Steelhead, Kamloops trout), with particular reference to studies with aquatic toxicants. Environment Canada, Environmental Protection Service, Economic and Technical Review Report EPS-3-AR-81-1.

ANNEXE N

Résultats des essais de génotoxicité réalisés sur les sédiments de Cap-aux-Meules (données 1994).

Site	Station*	CMEQ (µL/mL)**															
		SOS Chromotest				Umu				Test de fluctuation				Mutatox			
		Viabilité		Génotoxicité		Viabilité		Génotoxicité		Viabilité		Génotoxicité		Viabilité		Génotoxicité	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
	Blanc 1	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>2,5	>2,5	>2,5	>2,27	>0,4	>0,4	>10	>10
	Blanc 2	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
	Témoin	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>2,5	>2,27	>2,5	>2,27	>0,4	>0,4	>10	>10
Sédiments portuaires	1	2,5	5	10	10	5	5	>10	0,63	2,5	>5	0,63	1,25	>0,4	>0,4	>0,4	0,2
	2					2,5	5	>5	2,5	1,25	>2,27	>0,63	>2,27				
	2B	1,25	5	>10	>10												
	3	2,5	5	>10	>10	10	10	>10	5	0,63	>2,27	>0,32	0,57				
	4	2,5	5	>10	10	1,25	2,5	>2,5	>2,5	0,63	>2,27	>0,32	>2,27				
	5					2,5	5	>2,5	2,5	1,25	>2,27	>0,63	>2,5				
	5B	1,25	2,5	>10	>10									>0,4	>0,4	>0,4	>0,4
	6	2,5	5	>10	>10	5	10	>5	>10	1,25	>2,5	>0,63	1,25				
	7	2,5	5	>10	>10	5	5	5	>10	1,25	>2,5	>0,63	>2,5				
	8	2,5	5	>10	>10									>0,4	>0,4	>0,4	>0,4
	9									0,32	>2,5	>0,16	>2,5				
	9A-dupl.	1,25	2,5	>10	>10												
	10	2,5	5	>10	>10					0,32	>2,5	>0,16	>2,5				
	11	2,5	5	>10	>10					0,32	>2,5	>0,16	>2,5				
	12	2,5	5	>10	>10					0,63	>2,5	>0,32	>2,5				
	13	2,5	5	>10	>10					1,25	>2,5	>0,63	>2,5				
	14	2,5	2,5	>10	>10					<0,16	>2,5	>0,16	>2,5				
	15	2,5	2,5	>10	>10					0,16	>2,5	>0,16	>2,5	>0,4	>0,4	>0,4	>0,4
	16	2,5	2,5	>10	>10					0,63	>2,5	>0,32	>2,5				
	17	2,5	2,5	>10	>10					0,63	>2,5	>0,32	>2,5				
	18	2,5	2,5	>10	>10					0,63	>2,5	>0,32	>2,5				
	19	2,5	2,5	>10	>10					0,63	>2,5	>0,32	>2,5				
	20	2,5	2,5	>10	>10					0,32	>2,5	>0,16	>2,5				
Sédiments de référence	21									>2,5	>2,5	>2,5	>2,5				
	21B	10	>10	>10	>10												
	22	10	>10	>10	>10					2,5	>2,5	>1,25	>2,5				
MRC	HS2-1	0,16	10	>10	>10					0,16	>2,5	>0,16	0,32	>0,4	>0,4	>0,4	0,4***
	HS2-2	0,16	10	>10	>10												
	HS3-1	0,16	>10	>10	2,5					2,5	>5	<0,63	0,63	>0,4	>0,4	0,4	0,2
	HS3-2	0,16	>10	>10	5												

* Les échantillons 2A, 5A, 9A et 21A n'ont pas été analysés

** Les concentrations minimales avec effet observé (CMEQ) sont rapportées en µL d'extraits par mL de milieu d'essai

*** Résultat équivoque, tout près de la limite significative

MRC Matériaux de référence certifiés

ANNEXE N - suite
Précipitation alcaline de l'ADN et marqueurs biochimiques induits par
les sédiments de Cap-aux-Meules (données 1994).

Site	Station	CMEQ (µL/mL)*		MFO	HAP totaux		Pesticides		
		APA			composantes**	composantes***			
		Viabilité	Génotoxicité				µg/g sec	µg/g sec	
	Blanc 1	>2	0,2	>2	>2				
	Blanc 2	>2	>2	>2	>2				
	Témoin 1	>2	>2	>2	>2				
	Témoin 2	>2	0,2	2	2				
Sédiments portuaires	1	0,2	>2	>2	0,02	19,48	g,h,e,k,j,i,l,f,d,o,m,b,a	12,5	g,c,f,j,a
	2	2	0,02	2	0,2	1,69	g,h,e,k,i,j,l	3,05	g,f,j,h
	2A	2	>2	0,02	>2	2,97	g,h,k,e,i,j,l,o,f,m,b	4,11	g,f,h,b,c
	2B	2	0,2	0,02	0,2	4,63	g,h,k,l,i,j,f,d,b,o,m	8,45	g,j,f,e,h
	3	2	0,2	2	0,2	6,23	g,h,e,i,k,j,b,d,f,l,a,o	6,77	g,j,f,h,e
	4	2	2	>2	0,002	0,83	g,h,e,k,i,j,l,o,f	2,66	g,f,b,h
	5	2	>2	>2	0,02	0,79	g,h,e,k,i,j,f,l	3,37	g,j,f,a,e
	5A	2	>2	>2	0,2	0,79	g,h,e,k,i,j,f,l	4,32	g,f,c,j,b
	5B	2	0,002	>2	0,02	1,21	g,h,e,k,i,j,l,f,o,m	3,48	g,f,c,b
	6	2	>2	>2	>2	0,93	g,h,e,k,i,j,f,l	2,58	g,c,f,b
	7	2	2	>2	>2	0,36	e,g,h	4,83	c,g,f,k,j
	8	2	0,002	0,2	0,002	0,94	g,h,e,k,i,j,f,l,o	4,91	g,c,f,e,b
	9	2	>2	0,2	>2	1,2	g,h,k,i,e,j,l,f,o	5,28	g,f,e,h,b
	9A	2	0,2	>2	>2	1,05	g,h,k,e,i,j,l,f,o,m	4,53	f,c,e,b
	9A-dupl.	0,2	>2	>2	>2	1,69	g,h,e,k,i,j,l,f,o,m,b,d	4,55	f,c,b
	9B	0,2	>2	>2	0,02	1,77	g,e,h,k,i,j,l,f,o,d,m,b	1,48	g,c,f
	10	0,02	0,2	2	>2	0,71	g,h,e,k,j,i,l,f	5,84	g,c,e,f,b
	11	2	0,2	>2	0,2	0,65	g,h,e,k,j,i,l	3,89	g,c,k,f
	12	0,2	>2	>2	>2	0,5	g,e,h,k,i,j	4,09	g,c,f,b
	13	2	>2	>2	0,02	0,2	e,g,h,k	1,89	g,j,e,c
	14	2	0,002	>2	0,002	0,25	g,e,h,k	3,19	g,c,f,a,e,h
15	0,2	0,2	>2	>2	0,48	g,h,i,k,e,j,l	2,03	g,f,c,e	
16	0,2	0,002	0,002	>2	0,07	e,g	0,89	c,g,i,e,b	
17	0,2	0,2	0,02	0,2	0,07	g,h	2,54	g,i,j,f,c	
18	2	>2	>2	>2	0,56	g,h,i,l,j,e,f,k	2,44	g,f,e,b,c,h	
19	2	>2	0,02	0,2	0,35	g,h,e,k,i,j	10,72	f,j,c,b	
20	2	>2	0,02	>2	0,18	g,h,k	0,33	c,g	
Sédiments de référence	21	2	>2	0,2	>2	0		0,7	e,b
	21A	2	>2	>2	0,2	0,05	e	0,61	d
	21A-dupl.1	2	0,02	0,02	0,02	0,1	e		
	21A-dupl.2	0,2	>2		>2				
	21B	2	>2	0,02	>2	0		0,49	h,b,f
	22	2	>2	>2	>2	0,08	e	0,49	h,b,f
MRC	HS2-1	0,2	2	>2	0,2				
	HS2-2	0,02	0,2	0,02					
	HS3-1	2	0,002	0,2	0,2	161,95	e,g,h,k,j,i,f,d,a,l,o,m,c,n,b		
	HS3-2	2	0,2	>2	0,02	170,19	e,g,h,k,j,i,d,f,a,l,o,m,c,n,b		

MRC Matériaux de référence certifiés

* Les concentrations minimales avec effet observé (CMEQ) sont rapportées en µL d'extraits par mL de milieu d'essai

** cités par ordre décroissant de concentration dans les extraits: a naphthalène, b acénaphthylène, c acénaphthène, d fluorène, e phénanthrène, f anthracène, g fluoranthène, h pyrène, i benzo(a)anthracène, j chrysène, k benzo(b,j,k)fluoranthène, l benzo(a)pyrène, m indéno(1,2,3-cd)pyrène, n dibenzo(a,h)anthracène, o benzo(g,h,i)peryène.

*** cités par ordre décroissant de concentration dans les extraits: a BHC, b lindane, c heptachlore, d aldrine, e trans-chlordane, f cis-chlordane, g p,p-DDE, g dieldrine i o,p-DDD, j p,p-DDD, k mirex.

ANNEXE O
Résultats des essais de génotoxicité réalisés sur les sédiments
de l'Anse-à-Beaufils (données 1994).

Site	Station	CME0 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)* SOS Chromotest			
		Viabilité		Génotoxicité	
		-S9	+S9	-S9	+S9
	Blanc 1	>10	10	> 10	> 10
	Blanc 2	>10	10	>10	> 10
	Témoin	>10	>10	> 10	> 10
Sédiments portuaires	31	5	>10	> 10	> 10
	32	5	>10	> 10	> 10
	33	2,5	5	> 10	> 10
	34	2,5	5	> 10	> 10
	35	2,5	10	> 10	> 10
	36	2,5	10	> 10	> 10
	37	10	>10	> 10	> 10
	38	10	10	> 10	> 10
Sédiments de référence	39	5	>10	> 10	> 10
	40	>10	>10	> 10	> 10
	41	5	>10	> 10	> 10
	42	2,5	>10	> 10	> 10

* Les CME0 sont rapportées en μL d'extraits par mL de milieu d'essai

ANNEXE P

EXEMPLES DE CALCUL - Détermination des UTs/g de sédiment sec.

SITE PAB3 - 1993

ESSAIS SUR EAU INTERSTITIELLE

	% v/v obtenu	UTs par bain d'essai (100 / % v/v)	volume (ml) par bain d'essai	masse (g) de séd. sec associée au volume du bain d'essai	UTs par g
BIOESSAI					
OURSINS	54	1.9	10	16.1	0.12
MICROTOX	43	2.3	1	1.6	1.4

ESSAI AVEC MICROTOX SUR LA PHASE SOLIDE

ppm obtenu	UTsl par masse (g) de sédiment sec présent dans le bain d'essai testé (1000,000 / ppm)	UTs/g
1526	655	0.23

ESSAI AVEC TOXICHROMOTEST SUR LA PHASE SOLIDE

% poids humide / volume	UTsl par bain d'essai (100 / % p/v)	volume (ml) par bain d'essai	masse (g) de séd. sec associée au poids humide du bain d'essai (10%)	UTs par g
10	10.0	1	0.07	145

ESSAIS SUR EXTRAIT ORGANIQUE

SITE PAB3 - 1993

	ml de DMSO obtenu	UTsl par bain d'essai (0.2 ml / ml obtenu)	masse (g) de séd. humide par 0.2ml DMSO ((20g/10ml)x0.2ml)*	masse (g) de séd. sec associée au 0.2 ml du bain d'essai	UTs par g
BIOESSAI					
SOS -S9	0.00035	571	0.40	0.19	2952
APA	0.00002	10000	0.40	0.19	51653

SITE AB31 - 1994

	ml de DMSO obtenu	UTsl par bain d'essai (1 ml / ml obtenu)	masse (g) de séd. humide par ml de DMSO (50g/10ml)**	masse (g) de séd. sec associée à 1ml du bain d'essai	UTs par g
BIOESSAI					
MICROTOX	0.0008	1250	500	2.84	440

* bioessais effectués à partir d'un extrait organique (20g sédiments humides / 10mL DCM); DCM évaporé et extraits organiques dissous dans un volume égal de DMSO servant aux essais; volume du bain d'essai: 0.2mL.

** bioessais effectués à partir d'un extrait organique (50g sédiments humides / 10mL DCM); DCM évaporé et extraits organiques dissous dans un volume égal de DMSO servant aux essais; volume du bain d'essai: 1.0mL.

ANNEXE Q
Toxicité exprimée en unités toxiques / g sédiment sec.
Résultats 1993.

Niveau de toxicité	Létalité aigue		Sublétalité chronique										
Fraction sédimentaire	Séd. entier		Eau interstitielle		Phase solide		Extraits organiques						
Espèce	R. abromius	A. virginiana	L. pictus	V. fischeri		E. coli		O. mykiss					
Essai	Amphipodes		Oursins	Microtox		TCT	SOS	Viabilité IP	viabilité Rh123	APA	NTA	OFM	
Paramètre de mesure	CL50		CI25	CI50		CI100	CME0	CME0	CME0	CME0	CME0	CME0	
Paramètre d'effet	survie		fertilisation	Inh. lumin.	Inh. lumin.	Ind. enz.	Cytotox -S9	Cytotox +S9					
Sédiments portuaires Balck Point													
SJ1	<1	<1	<.04	<.4	598	19	1694	410	<2500	<2500	<2500	<2500	
SJ3	<1	<1	0	<.4	622	42	2774	1367	<2500	<2500	<2500	4854	
SJ4	<1	<1	0	<.4	1075	42	2607	1285	4562	<2500	4562	45620	
SJ5	<1	<1	0	<.4	542	61	4444	2286	<2500	4000	40000	40000	
SJ6	<1	<1	<.04	<.4	82	15	697	381	<2500	<2500	36928	<2500	
SJ7	<1	<1	<.04	<.4	797	<14	4987	4987	4488	44883	<2500	<2500	
Sédiments de référence Dartmouth													
SJR-1	<1	<1	<.04	<.4	167	27	<250	<250	46992	4699	46992	46992	
SJR-2	<1	<1	<.04	<.4	474	26	675	<250	<2500	3981	<2500	<2500	
Martinique	<1	<1	<.04	<.4	<14	<14	<250	<250	<2500	<2500	<2500	<2500	
Sédiments dragués Anse-à-Beaufils													
AB1	<1	<1	<.04	<.4	219	36	821	821	57870	<2500	<2500	<2500	
AB2	<1	<1	<.04	<.4	262	54	2515	4890	<2500	<2500	44014	44014	
AB3	<1	<1	0	1	655	145	2952	2952	5165	<2500	51653	<2500	
AB4	<1	<1	3	75	917	153	12626	1601	5682	22727	56818	<2500	
AB5	<1	<1	0	9	431	236	25151	2874	<2500	20121	50302	<2500	
AB6	>1	<1	9	83	777	132	21044	2668	<2500	<2500	<2500	94697	
AB7	<1	<1	1	1	103	26	3328	1410	<2500	<2500	<2500	<2500	
AB11	>1	<1	8	58	1056	69	5453	2688	<2500	<2500	<2500	<2500	
Sédiments de référence Anse-à-Beaufils													
ABR8	<1	<1	<.04	<.4	60	27	1109	<250	<2500	<2500	39370	<2500	
ABR9	<1	<1	<.04	<.4	63	20	714	<250	<2500	<2500	39620	<2500	
ABR10	<1	<1	<.04	<.4	60	<14	788	<250	<2500	<2500	3981	<2500	
MRC													
HS1					259		1429	704	2500	<2500	<2500	2500	
HS2					56		2778	704	<2500	<2500	<2500	2500	
HS3					1980		1429	1429	25000	<2500	<2500	2500	
HS4					1093		1429	704	<2500	2500	2500	2500	
Ajout dosé 1							253	<250	<2500	<2500	<2500	<2500	
Ajout dosé 2							1429	<250	<2500	<2500	<2500	<2500	
Blanc							<250	<250	<2500	<2500	<2500	<2500	

ANNEXE Q - suite
Toxicité exprimée en unités toxiques / g sédiment sec.
Résultats 1994.

Niveau de toxicité	Létalité aigue	Sublétalité chronique							
Fraction sédimentaire	Séd. entier	Eau interstitielle	Phase solide	Extraits organiques					
Espèce	<i>A. virginiana</i>	<i>L. picus</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>E. coli</i>				<i>O. mykiss</i>	
Essai	Amphipodes	Oursins	Microtox	SOS				Viabilité I	MT
Paramètre de mesure	CI50	CI25	CI50	CME0				CME0	CME0
Paramètre d'effet	survie	fertilisation	inh. lumin.	Cytotox -S9	Cytotox +S9	Génotox -S9	Génotox +S9	CME0	CME0
Sédiments immergés Anse-à-Beaufils									
31	0	0	<0.3	190	0	352	0	<100	<100
32	0	0	<0.3	123	0	0	0	<100	<100
33	0	0	<0.3	303	0	0	0	<100	<100
34	0	0	<0.3	459	0	0	0	<100	<100
34D	0	<0.03							
35	0	0	<0.3	64	0	0	0	<100	<100
36	0	0	<0.3	61	0	0	0	<100	<100
37	0	0	<0.3	41	0	0	0	<100	<100
38	0	0	<0.3	55	0	0	0	<100	<100
Sédiments de référence Anse-à-Beaufils									
39	0	0	<0.3	50	0	0	0	<100	<100
40	0	0	<0.3	59	0	0	0	<100	<100
41	0	0	<0.3	53	0	0	0	<100	<100
42	0	0	<0.3	38	0	0	0	<100	<100
Blancs de méthode									
Extraction	0		<0.3	<14	0	143	<100	<100	<100
Évaporation	0		<0.3	<14	0	0	<100	<100	<100
Sédiments portuaires Cap-aux-Meules									
1		<0.03	<0.3	654	0	350	<100	<100	<1000
2	0	<0.03	2	358	0	<100	<100	<100	15601
2A	0	0	1	1033	0	<100	<100	<100	<1000
2B	0	0	2	460	0	3076	763	<100	2538
3			<0.3	675	0	702	351	<100	1754
4	0	0	2	373	0	659	166	<100	<1000
5	0	0	2	421	0	<100	<100	<100	<1000
5A			<0.3	319	0	<100	<100	<100	<1000
5B			2	678	0	5670	1546	<100	259067
6			<0.3	442	0	742	375	<100	<1000
7	0	0	4	160	0	1087	549	<100	<1000
8	0	0	<0.3	556	0	806	403	<100	200803
9			<0.3	919	0	<100	<100	<100	<1000
9A			<0.3	672		6912	3549	<100	2924
9A-D1									<1000
9B			<0.3	445		<100	<100	<100	<1000
10	0	0	6	467	0	815	204	<100	2037
11			6	339	0	726	361	<100	1821
12			<0.3	187	0	703	355	<100	<1000
13	0	0	6	236	0	653	331	<100	<1000
14	0	0	<0.3	473	0	940	940	<100	236967
15			<0.3	351	0	866	866	<100	2151
16			17	512	0	709	709	<100	177305
17			<0.3	272	0	752	1505	<100	1908
18			1	298	0	773	773	<100	<1000
19			8	354	0	772	1514	<100	<1000
20			6	457	0	816	1594	<100	<1000
Sédiments de référence Cap-aux-Meules									
21	0	<0.03	<0.3	77		<100	<100	<100	<1000
21A			1	80	0	<100	<100	<100	<1000
21A-D1									14245
21A-D2									<1000
21B			1	71		669	<100	<100	<1000
22	0	0	<0.3	80	0	158	<100	<100	<1000
Blancs de méthode									
Extraction 1					0	<100	<100	<100	1000
Extraction 2					0	<100	<100	<100	<1000
Évaporation					0	<100	<100	<100	1000
MRC									
HS2-1			863	0	6583	399	<100	<100	<1000
HS2-2			450	0	6050	398	<100	<100	1000
HS3-1			1961	0	6506	<100	<100	400	100000
HS3-2			2660	0	6437	<100	<100	200	1000

Annexe R
Humidité totale et résiduelle des échantillons de sédiments
analysés en 1993 et poids de sédiment sec associé
aux fractions sédimentaires.

STATION	% humidité		poids en gram		
	a	b	x	y	z
	TOTAL	RESIDUEL	E.I.C.	E.I.N.C.	S.S.
SEDIMENTS DE BLACK POINT - MAI 1993					
SJ1	37,2	22,7	1	0,98	3,35
SJ3	48,5	27,7	1	0,69	1,79
SJ4	45,2	27,5	1	0,85	2,24
SJ5	37,5	21,5	1	0,84	3,07
SJ6	32,3	20,1	1	1,11	4,42
SJ7	44,3	27,4	1	0,90	2,39
SEDIMENTS DE REFERENCE DE L'ATLANTIQUE					
SJR-1	46,8	25,2	1	0,62	1,84
SJR-2	37,2	24,3	1	1,18	3,69
Mart		19,1		1,00	4,24
SEDIMENTS DE L'ANSE A BEAUFILS - JUILLET 1993					
PAB-1	56,8	33,7	1	0,63	1,24
PAB-2	43,2	26	1	0,86	2,44
PAB-3	51,6	30,8	1	0,72	1,61
PAB-4	56	34,5	1	0,71	1,34
PAB-5	50,3	29,3	1	0,69	1,67
PAB-6	73,6	41,7	1	0,35	0,48
PAB-7	39,9	22,1	1	0,75	2,63
PAB-11	73,8	41,8	1	0,34	0,48
SEDIMENTS DE L'ANSE A BEAUFILS - JUILLET 1993					
PAB-8	36,5	27,1	1	1,82	4,90
PAB-9	36,9	24,6	1	1,26	3,87
PAB-10	37,2	26,2	1	1,50	4,21

ANNEXE S EXEMPLES DE CALCULS

Détermination des limites de détection UTs/g sédiment sec.

ESSAIS SUR EAU INTERSTITIELLE

BIOESSAI	% v/v MAX obtenable	UTs MIN par bain d'essai	volume (ml) par bain d'essai	masse (g) de séd. sec associée au volume du bain d'essai	UTs MIN par g
OURSINS	100	1.0	10	25.1	0.04
MICROTOX	100	1.0	1	2.5	0.4

ESSAI AVEC MICROTOX SUR LA PHASE SOLIDE

ppm humide MAX obtenable	UTs MIN par masse (g) de séd. humide (1,000,000 /ppm)	rapport moyen (g) séd. sec / séd. humide (2.5g / 0.9g + 2.5g)	UTs MIN par masse séd. humide (10UTs / 0.74)	UTs MIN par g
100000	10	0.74	13.6	14

ESSAI AVEC TOXICHROMOTEST SUR LA PHASE SOLIDE

% p/v MAX obtenable	UTs MIN par bain d'essai (100 / % p/v)	volume (ml) par bain d'essai	masse (g) de séd. sec associée à 0.1g poids humide (10%)	UTs MIN par g
100	1.0	1	0.074	14

ESSAIS SUR EXTRAIT ORGANIQUE

SITE PAB3 - 1993

BIOESSAI	mL MAX de DMSO obtenable	UTs MIN par bain d'essai (0.2 ml / ml obtenable)	masse MAX (g) de séd. sec associée au 0.2 ml [(20g/10mL) x 0.2mL]*	UTs MIN par g
SOS -S9	0.002	100	0.40	250
APA	0.0002	1000	0.40	2500

SITE AB31 - 1994

BIOESSAI	mL MAX de DMSO obtenable	UTs MIN par bain d'essai (1 ml / ml obtenable)	masse (g) de séd. sec associée à 1mL [(50g / 10mL) x 1mL]**	UT MIN par g
MICROTOX	0.001	1000	5.00	200

* bioessais effectués à partir d'un extrait organique (20g sédiments humides / 10mL DCM); DCM évaporé et extraits organiques dissous dans un volume égal de DMSO servant aux essais; volume du bain d'essai: 0.2mL.

** bioessais effectués à partir d'un extrait organique (50g sédiments humides / 10mL DCM); DCM évaporé et extraits organiques dissous dans un volume égal de DMSO servant aux essais; volume du bain d'essai: 1.0mL.

ANNEXE T
Facteurs d'accroissement de toxicité par rapport au seuil d'effet mesurable.
Résultats 1993.

Niveau de toxicité	Létalité aigue		Sublétalité chronique									
Fraction sédimentaire	Séd. entier		Eau interstitielle	Phase solide			Extraits organiques					
Espèce	R. abromius	A. virginiana	L. pictus	V. fischeri		E. coli		O. mykiss				
Essai	Amphipodes		Oursins	Microtox	TCT*	SOS	Viabilité IP	viabilité Rh123	APA	NTA	OFM	
Paramètre de mesure	CL50		CI25	CI50	CI100	CME0	CME0	CME0	CME0	CME0	CME0	
Paramètre d'effet	survie		fertilisation	inh. lumin.	Ind. enz.	Cytotox -S9	Cytotox +S9					
Sédiments portuaires Black Point												
SJ1	0	0	0	0	43	14	7	2	0	0	0	
SJ3	0	0	2	0	44	30	11	5	0	0	2	
SJ4	0	0	5	0	77	30	10	5	2	2	18	
SJ5	0	0	2	0	39	43	18	9	0	16	16	
SJ6	0	0	0	0	6	11	3	2	0	15	0	
SJ7	0	0	0	0	57	0	20	20	2	0	0	
Sédiments de référence Dartmouth												
SJR-1	0	0	0	0	12	19	0	0	19	19	19	
SJR-2	0	0	0	0	34	19	3	0	0	0	0	
Martinique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sédiments dragués Anse-à-Beaufils												
AB1	0	0	0	0	16	26	3	3	23	0	0	
AB2	0	0	0	0	19	39	10	20	0	18	18	
AB3	0	3	4	47	103	12	12	2	0	21	21	
AB4	0	69	187	66	109	51	6	2	9	23	23	
AB5	0	4	23	31	168	101	11	0	8	20	20	
AB6	100	216	207	56	94	84	11	0	0	0	38	
AB7	0	33	3	7	18	13	6	0	0	0	0	
AB11	100	210	146	75	49	22	11	0	0	0	0	
Sédiments de référence Anse-à-Beaufils												
ABR8	0	0	0	4	20	4	0	0	0	16	0	
ABR9	0	0	0	4	14	3	0	0	16	0	0	
ABR10	0	0	0	4	0	3	0	0	0	2	16	
MRC												
HS1				19		6	3	1	0	0	1	
HS2				4		11	3	0	0	0	0	
HS3				141		6	6	10	0	0	0	
HS4				78		6	3	0	1	1	1	
Ajout dosé 1						1	0	0	0	0	0	
Ajout dosé 2						6	0	0	0	0	0	
Blanc						0	0	0	0	0	0	

* Les Fac pour le Toxy-Chromotest ont été multipliés par un facteur de 10.

ANNEXE T - suite
Facteurs d'accroissement de toxicité par rapport au seuil d'effet mesurable.
Résultats 1994.

Résultats 1994													
Niveau de toxicité	Létalité aigue			Sublétalité chronique									
Fraction sédimentaire	Séd. entier	Eau interstitielle	Phase solide	Extraits organiques									
Espèce	<i>A. virginiana</i>	<i>L. pictus</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>E. coli</i>						<i>O. mykiss</i>			
Essai	Amphipodes	Oursins	Microtox	SOS				CME0		Viabilité IP	MT	OFM	APA
Paramètre de mesure	CL50	CI25	CI50	CME0		CME0		CME0		CME0	CME0	CME0	CME0
Paramètre d'effet	survie	fertilisation	Inh. lumin.	Cytotox -S9	Cytotox +S9	Génotox -S9	Génotox +S9						
Sédiments immergés Anse-à-Beaufils													
31	0	4	0	14	2	4	0	0	0				
32	0	2	0	9	0	3	0	0	0				
33	0	4	0	22	28	7	3	0	0				
34	0	2	0	33	33	7	3	0	0				
34D	0	0											
35	0	1	0	5	5	6	1	0	0				
36	0	1	0	4	19	6	2	0	0				
37			0	3	0	1	0	0	0				
38	0	1	0	4	8	2	2	0	0				
Sédiments de référence Anse-à-Beaufils													
39	0	1	0	4	15	3	0	0	0				
40			0	4	2	0	0	0	0				
41	0	1	0	4	0	3	0	0	0				
42			0	3	0	2	0	0	0				
Blancs de méthode													
Extraction					0	1	0	0	0				
Évaporation					0	0	0	0	0				
Sédiments portuaires Cap-aux-Meules													
1			0	47	250	3	0	0	0	2	0	18	0
2	0	0	6	26	52	0	0	0	0	0	0	2	16
2A	0	0	5	74	836	0	0	0	0	0	17	0	0
2B	0	4	5	33	846	31	8	0	0	0	25	3	3
3			0	48	88	7	4	0	0	0	0	2	2
4	0	6	6	27	370	7	2	0	0	0	0	166	0
5	0	10	7	30	187	0	0	0	0	0	0	20	0
5A			0	23	137	0	0	0	0	0	0	2	0
5B			5	48	100	57	15	0	0	0	0	26	259
6			0	32	48	7	4	0	0	0	0	0	0
7	0	10	13	11		11	5	0	0	0	0	0	0
8	0	2	0	40		8	4	0	0	0	2	201	201
9			0	66		0	0	0	0	0	2	0	0
9A			0	48		69	35	0	0	0	0	0	3
9A-D1										3	0	0	0
9B			0	32		0	0	0	0	2	0	18	0
10	0	16	20	33	102	8	2	0	0	20	0	0	2
11			19	24	91	7	4	0	0	0	0	2	2
12			0	13	59	7	4	0	0	2	0	0	0
13	0	3	19	17	41	7	3	0	0	0	0	17	0
14	0	11	0	34	118	9	9	0	0	0	0	237	237
15			0	25	108	9	9	0	0	2	0	0	2
16			56	37	89	7	7	0	0	2	177	0	177
17			0	19	95	8	15	0	0	2	19	2	2
18			4	21	97	8	8	0	0	0	0	0	0
19			25	25	65	8	15	0	0	0	19	2	0
20			18	33	68	8	16	0	0	0	20	0	0
Sédiments de référence Cap-aux-Meules													
21	0	0	0	5		0	0	0	0	0	1	0	0
21A			5	6	14	0	0	0	0	0	0	1	0
21A-D1										0	142	14	14
21A-D2										1		0	0
21B			4	5		7	0	0	0	0	22	0	0
22	0	1	0	6	15	2	0	0	0	0	0	0	0
Blancs de méthode													
Extraction 1					0	0	0	0	0	0	0	0	1
Extraction 2					0	0	0	0	0	0	0	0	0
Évaporation					0	0	0	0	0	0	0	0	1
MRC													
HS2-1				62	61	66	4	0	0	1	0	1	0
HS2-2				32	61	61	4	0	0	10	10		1
HS3-1				140	61	65	0	0	4	0	1	1	100
HS3-2				190	20	64	0	0	2	0	0	10	1

ANNEXE U
Seuils de toxicité déterminés pour chaque paramètre bioanalytique.

Phase sédimentaire	Espèce	Paramètre d'effet	Unités de mesure	Seuils de toxicité		
				Nulle	Marginale	Élevée
Entier	<i>A. virginiana</i> , <i>R. abronius</i>	survie	%	100	60	20
Eau interstitielle	<i>L. pictus</i>	fertilisation	% v/v	100	10	1
	<i>V. fischeri</i>	Microtox	% v/v	100	10	1
Phase solide	<i>V. fischeri</i>	Microtox	ppm	100 000	10 000	1000
	<i>E. coli</i>	Toxi-Chromotest	% p/v	100	10	1
Extraits organiques	<i>V. fischeri</i>	Microtox	µL/mL	1	0.2	0.02
	<i>E. coli</i>	Viabilité - S9	µL/0.2 mL	2	0.2	0.02
		Viabilité + S9	µL/0.2 mL	2	0.2	0.02
		Génotoxicité - S9	µL/0.2 mL	2	0.2	0.02
		Génotoxicité + S9	µL/0.2 mL	2	0.2	0.02
		Viabilité cellulaire	µL/0.2 mL	0.2	0.02	0.002
	<i>O. mykiss</i>	Rhodamine 123	µL/0.2 mL	0.2	0.02	0.002
		MT	µL/0.2 mL	0.2	0.02	0.002
		OFM	µL/0.2 mL	0.2	0.02	0.002
		APA	µL/0.2 mL	0.2	0.02	0.002
		NTA	µL/0.2 mL	0.2	0.02	0.002

ANNEXE V
Indice ECOTOX calculé par rapport aux facteurs d'accroissement pour les
essais de subléthalité.
Résultats 1993.

Fraction sédimentaire	Empreinte toxique subléthale			Toximesure
	Eau interstitielle	Phase solide	Extraits organiques	UT/g sec
Sédiments portuaires Black Point				
SJ1	0	283	5	287
SJ3	5	372	15	392
SJ4	14	533	21	568
SJ5	5	410	49	464
SJ6	0	83	38	121
SJ7	0	142	66	209
moyenne du site	4	304	32	340
Sédiments de référence Dartmouth				
SJR-1	0	155	65	220
SJR-2	0	264	2	266
Martinique	0	0	0	0
moyenne du site de réf.	0	140	22	162
Sédiments dragués Anse-à-Beaufils				
AB1	0	206	25	231
AB2	0	287	72	359
AB3	32	750	51	834
AB4	1278	873	126	2277
AB5	135	996	156	1287
AB6	2116	749	53	2917
AB7	176	129	11	316
AB11	1778	623	18	2419
moyenne du site	689	577	64	1330
Sédiments de référence Anse-à-Beaufils				
ABR8	0	119	11	131
ABR9	0	93	10	104
ABR10	0	11	17	28
moyenne du site de réf.	0	74	13	88
MRC				
HS1		185	12	197
HS2		40	8	48
HS3		1414	18	1432
HS4		781	16	797
Ajout dosé 1			0	0
Ajout dosé 2			2	2
Blanc			0	0

ANNEXE V - suite
Indice ECOTOX calculé par rapport aux facteurs d'accroissement pour les
essais de subléthalité
Résultats 1994.

Fraction sédimentaire	Eau interstitielle	Empreinte toxique subléthale		Toximesure
		UT/g sec	UT/g sec	UT/g sec
		Phase solide	Extraits organiques	
Sédiments immergés Anse-à-Beaufils				
31	11	136	13	159
32	5	88	4	96
33	9	217	129	355
34	6	328	143	477
34D	2	45	41	88
35	2	43	89	134
36	0	29	2	31
37	2	39	35	76
38	5	116	57	177
Sédiments de référence Anse-à-Beaufils				
39	2	36	39	77
40	0	42	2	44
41	3	38	3	44
42	0	27	2	29
moyenne du site	1	36	12	49
Blancs de méthode				
Extraction			2	2
Évaporation			0	0
Sédiments portuaires Cap-aux-Meules				
1	0	467	223	690
2	15	256	42	313
2A	12	738	348	1098
2B	47	329	1120	1496
3	0	482	104	586
4	60	266	311	637
5	87	300	89	476
5A	0	228	37	265
5B	50	484	742	1276
6	0	315	121	436
7	113	114	94	321
moyenne AIRE 1	35	362	294	691
8	6	397	632	1035
9	0	657	20	677
9A	0	480	90	570
9B	0	318	11	329
10	181	334	137	652
11	193	242	108	543
12	0	134	58	192
13	108	168	55	331
14	27	338	624	989
15	0	251	132	383
16	563	365	562	1490
moyenne Aire 2	98	335	221	654
17	0	195	204	399
18	44	213	69	326
19	250	253	112	615
20	184	327	92	603
moyenne AIRE 3	120	247	119	485
Sédiments de référence Cap-aux-Meules				
21	0	55	0	55
21a	47	57	6	110
21b	38	51	16	105
22	2	57	7	66
moyenne AIRE 4	22	55	7	84
Blancs de méthode				
Extraction 1			0	0
Extraction 2			0	0
Évaporation			0	0
MRC				
HS2-1		616	135	751
HS2-2		321	243	564
HS3-1		1401	232	1633
HS3-2		1900	78	1978

SECTION VII
BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, W.J. 1987. Bioavailability of neutral lipophilic organic chemicals contained on sediments: a review. Pp. 219-244 In K.L. Dickson, A.W. Maki et W.A. Brungs, eds. Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems. Sixth Pellston Workshop. Pergamon, Elmsford, N.Y..
- Adar, Y.Y., M. Simaan et S. Ulitzur. 199. Formation of the *LuxR* protein in the *Vibrio fischeri lux* System is controlled by HtpR through the GroESL proteins. J. Bacteriol. 174(22): 7138-7143.
- Allen, H.E. 1993. The significance of trace metal speciation for water, sediment and soil quality criteria and standards. Sci. Total Environ. Suppl.: 23-45.
- American Society for Testing and Materials. 1991a. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. Pp. 1052-1075 In Pesticides, resource recovery, hazardous substances and oil spill responses, waste disposal, biological effects. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04. Philadelphia, PA.
- American Society for Testing and Materials. 1991b. Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicity testing. Pp. 1105-1119 In Pesticides, resource recovery, hazardous substances and oil spill responses, waste disposal, biological effects. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04. Philadelphia, PA.
- American Society for Testing and Materials. 1992. Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of the test method. E 691-92 Annual book of standards. Philadelphia, PA. Vol. 14.02: 491-510.
- Ames, B.N., J. McCann et E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31: 347-364.
- Ankley, G.T., m.K. Schubauer-Berigan et J. R. Dierkes. 1991. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore-water vs elutriate. Environ. Toxicol. chem. 10: 1359-1366.

- Batley, G.E. 1987. Trace element speciation: analytical methods and problems. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Baudo, R., J. Giesy et H. Munto. 1990. Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants. Lewis Publ. Chelsea. MI. 457pp.
- Becker, D.S. et T.C. Ginn. 1990. Effects of sediment holding time on sediment toxicity. Puget Sound Estuary Program. EPA 910/9-90-009. Final Report, U.S. Environmental Protection Agency, Seattle, WA.
- Becker, D.S. et T. C. Ginn. 1995. Effects of storage time on toxicity of sediments from Puget Sound, Washington. Environ. Toxicol. Chem. 14: 829-835.
- Beckman Instruments. 1982. Beckman Microtox Operating Manual. Carlsbad, CA.
- Benton, M.J., M.L. Malott, S.S. Knight, C.M. Cooper et 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., G. Serogy, P. Wells, N. Bermingham et R. Van Coillie. 1988. Biological testing - development, application, and trends in Canadian environmental protection laboratories. Toxicity Assessment: An International Journal 3: 385-406.
- Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle. 1990. A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. Environ. Toxicol. Chem. 9: 1353-1358.
- Brown, B. et J. Neff. 1993. Bioavailability of sediment-bound contaminants to marine organisms. National Ocean Pollution Program Office, National Oceanic and Atmospheric Administration, Pacific Northwest Laboratory, Richland, WA.
- Bureau, J., N. Bermingham, M. Harwood et R. Legault. 1995. Évaluation chimique et biologique de la contamination des sédiments d'un site de dépôt - mesure comparative de la toxicité par des essais biologiques. Rapport préliminaire. Direction de la protection de l'environnement, Environnement

Canada, Région du Québec.

Burton, G.A., Jr. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10(12): 1585-1627.

Chapman, P.M. 1988. Marine sediment toxicity tests. Pp. 391-402 In J.J. Lichtenberg, F.A. Winter, C.I. Weber et L. Fradkin, eds. Chemical and biological characterization of sludges, sediments, dredged spoils and drilling muds. American Society for Testing Materials, ASTM STP 976. Philadelphia.

Cherian, M.G. et M. Nordberg. 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28: 1-5.

Cherian, M.G. et H.M. Chan. 1993. Biological functions of metallothioneins. Pp. 87-109 In K.T. Suzuki, N. Imura et M. Kimura (éds). *Metallothioneins III - biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Clesceri, L.S., A.E. Greenberg et R.R. Trussel. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. ALPHA-AWWA-WPCF, 17^e éd. Pp. 2-77.

Costan, G., N. Bermingham, C. Blaise et J.F. Ferard. 1993. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 115-140.

Dave G. et E. Nilsson. 1994. Sediment toxicity in the Kattegat and Skagerrak. *J. Aquat. Ecosys. Health* 3: 193-206.

Di Toro, D.M., J.D. Mahony, K.J. Scott, M.B. Hicks, S.M. Mayr et M.S. Redmond. 1990. The role of acid volatile sulphide. *Environ. Toxicol. Chem.* 7: 483-498.

Duncan, G.A. et G.G. LaHaie. 1979. Size analysis procedures used in the sedimentology laboratory. NWRI, CCIW, Hydraulics Division, manual.

Environnement Canada. 1979. Analytical methods manual. Inland waters directorate, Water quality Branch, Ottawa.

Environnement Canada. 1990a. Interim contaminant testing guidelines for ocean disposal - Pacific and Yukon region. Rapport préliminaire. Conservation et Protection, Environnement Canada, février 1990.

Environnement Canada. 1990b. Interim contaminant testing guidelines for ocean disposal - Pacific and Yukon region. Conservation et Protection, Environnement Canada, novembre 1990.

Environnement Canada. 1990c. Interim contaminant testing guidelines for ocean disposal - Atlantic region. Rapport préliminaire. Dartmouth (N.É.). Environnement Canada, mai 1990.

Environnement Canada. 1992a. Guide méthodologique de caractérisation des sédiments. Centre Saint-Laurent, Environnement Canada en collaboration avec le Ministère de l'Environnement du Québec.

Environnement Canada. 1992b. Méthode d'essai biologique: essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*. Protection de l'Environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada.

Environnement Canada. 1992c. Méthode d'essai biologique: essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens. Protection de l'Environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada.

Environnement Canada. 1992d. Méthode d'essai biologique: essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et plats). Protection de l'Environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada.

Environnement Canada. 1992e. Critères intérimaires pour l'évaluation de la qualité des sédiments du Saint-Laurent. Centre Saint-Laurent, Environnement Canada et Ministère de l'Environnement du Québec.

- Environnement Canada. 1993. Qualité des sédiments et bilans des dragages sur le Saint-Laurent. Division des technologies de restauration, Direction du développement technologique, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada.
- Environnement Canada (en publ.). Guidance document on the collection and preparation of physico-chemical characterization and biological testing. Environmental Protection Series, report EPS1/RM.
- Fent, K. et T.D. Bucheli. 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in vitro in freshwater fish. *Aquat. toxic.* 28: 107-126.
- Fish, F., I. Lampert, A. Halachmi, G. Riesenfeld and M. Herzberg. 1987. The SOS Chromotest Kit: A Rapid Method for the Detection of Genotoxicity. *Toxicity Assessment* 2: 135 - 147.
- Frenette, M., C. Barbeau et R. Frenette. 1990. Fleuve Saint-Laurent: priorisation et caractérisation des fonds contaminés (bilan dynamique des 65 sites contaminés ou potentiellement contaminés). Hydrotech Inc. Experts-conseils.
- Gagné, F., M. Marion, et F. Denizeau. 1990. Metalhomeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to cadmium. *Fund. Appl. Toxic.* 14: 429-437.
- Gagné, F. et C. Blaise. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxydase activity in fingerling Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Wat. Res.* 27(11): 1669-1682.
- Gagné, F. et C. Blaise. 1995. Flow cytometry measurement of mixed function oxydase (MFO) activity and cell viability in Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes: method development. (en publ.).
- Gagné, F., S. Trottier, C. Blaise, J. Sproull et B. Ernst. 1995. Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. *Toxicol Lett.* (en publ.).
- Gilbert, R.I. 1980. The analysis of fluctuation tests. *Mutat. Res.* 38: 33.

Giesy, J.P., R.L. Graney, J.L. Newsted, C.J. Rosiu, A. Benda, R.G. Kreis, Jr. et F.J. Horvath. 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 7: 483-498.

Green, M.H.L., W.J. Muriel et B.A. Bridges. 1976. Use of a simple fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutat. Res.* 38: 33.

Greene, M.W., A.A. Bulich et S.R. Underwood. 1992. Measurement of soil and sediment toxicity to bioluminescent bacteria when in direct contact for a fixed time period. *Proceedings, 65th Annual Conference and exposition of the Water Environment Federation, New Orleans, LA, Septembre 20-24.*

Hamilton, S.F. et P.M. Mehrle. 1986. Metallothionein in fish: a review of its importance in assessing stress from metal contamination. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 596-609.

Harkey, G.A., P.F. Landrum et 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(8): 1315-1329.

Giesy, J.P. et R.A. Hoke. 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.* 15: 539-569.

Goldstein, I.F. 1981. The use of biological markers in studies of health effects of pollutants. *Environ. Res.* 25: 36-240.

Ho, K.T.Y. et J.G. Quinn. 1993. Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox®. *Environ. Toxicol. chem.* 12: 615-625.

Hollaender, A. 1987. Screening chemicals for genotoxic properties. Chap. 4 In D. Brusick, *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press, N.Y.

Hubbard S.A., M.H.L. Green, D. Gatehouse et J.W. Bridges. 1984. The fluctuation test in bacteria. Pp.

141-160 In B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols et C. Ramel (éds). *Handbook of mutagenicity testing* (2^e éd.). Elsevier Science, N.Y.

International Joint Commission. 1988. *Procedures for the assessment of contaminated sediment problems in the Great Lakes*. Great Lakes Water Quality Board, Windsor, Ontario, Canada.

Jenne, E.A. et J.M. Zachara. 1987. Factors influencing the sorption of metals. Pp. 83-98 In *Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems: proceedings of the 6th Pellsonton Workshop*, Florissant, CO. Pergamon Press, N.Y.

Jimenez, B.D. et J.J. Stegeman. 1990. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 67-79.

Kägi, J.H.R. 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. Pp. 29-55 In K.T. Suzuki, N. Imura et M. Kimura (éds). *Metallothioneins III - biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Karickhoff, S.W., D.S. Brown et T.A. Scott. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat. Res.* 13: 241-248.

Knezovich, J.P., L. Harrison et R.G. Wilhelm. 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: a review. *Water Air Soil Pollut.* 32: 233-245.

Kohn, H.W. 1983. The significance of DNA-damaging assays in toxicity and carcinogenicity assessment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 407: 106-118.

Langevin, R. J.B. Rasmussen, H.H. Sloterdijk et C. Blaise. 1992. Genotoxicity in water and sediment extracts from the St-Lawrence river, using the SOS Chromotest. *Wat. Res.* 26: 419-429.

Lavalin Environnement Inc. 1989. *Sites aquatiques contaminés du Saint-Laurent. Inventaire et priorisation*.

LeCurieux, F., D. Marzin et F. Erb. 1993. Comparison of three short-term assays: results on seven

chemicals. Mutat. Res. 319: 223-236.

Lee, H., B.L. Boese, J. Pelliter, M. Winsor, D.T. Specht et R.C. Randall. 1989. Guidance manual: bedded sediment tests. U.S. Environmental Protection Agency, Pacific Ecosystems Branch, Bioaccumulation Team, Newport, OR.

Legault, R. C. Blaise, D. Rokosh et R. Chong-Kit. 1994. Comparative assessment of the SOS Chromotest kit and the Mutatox test with the *Salmonella* plate incorporation (Ames test) and fluctuation tests for screening genotoxic agents. Environ. Toxicol. Water Qual. 9(1): 45-57.

Malueg, K.W., G.S. Schuytema et D.F. Krawwczyk. 1986. Effects of sample storage on a copper-spiked freshwater sediment. Environ. Toxicol. chem. 5: 245-253.

Maron, D.M. et B.N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215.

Marquenie, J.M. 1985. Bioavailability of micropollutants. Environ. Technol. Lett. 6(8): 351-358.

McCarthy, J.R. et M.C. Black. 1988. Partitioning between dissolved organic macromolecules and suspended particulates: effects on bioavailability and transport of hydrophobic organic chemicals in aquatic systems. Pp.233-246 In W.J. Adams, G.A. Chapman et W.G. Landis (éds). Aquatic toxicology and hazard assessment, 10^e vol. ASTM STP 971, American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA.

McDaniels, A.E., A.L. Reyes, L.J. Wymer, C.C. Rankin et G.N. Stelma. 1990. Comparison of the *Salmonella* (Ames) test, *Umu* test, and the SOS Chromotest for detecting genotoxins. Environ. Mol. Mutagen. 16: 204-215.

Means, J.C. 1985. Sediment-molecule interactions of hydrophobic organic compounds: implications for bioavailability. Proceedings of the Symposium on Fate and Effects of Pollution. University of Maryland, sea Grant Program, Pp. 17-20.

Microbics Corporation. 1992. Microtox® manual. A toxicity testing handbook, Vol. 2 - Detailed

protocols and Vol. 3 - Condensed protocols. Carlsbad, CA.

Microbics Corporation. Mutatox® manual. Carlsbad, CA.

Mix MC. 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature review. *Mar. Environ. Res.* 20: 1-141.

Munawar, M., I.F. Munawar, C. Mayfield et L.H. McCarthy. 1989. Probing ecosystem health: a multi-disciplinary and multitrophic assay strategy. In M. Munawar, G. Dixon, C. Mayfield, T. Reynoldson et M.H. Sadar, eds. *Environmental bioassay techniques and their application*. Hydrobiologia vol. 00.

Neff, J.M. 1985. Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. American Society for Testing and Materials, special technical publication 854: 155-183.

Oda, Y., S.-I. Nakamura, I. Oki, T. Kato et H. Shinagawa. 1985. Evaluation of the new system (Umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 147: 219-229.

Olsen, C.R., N.H. Cutshall et I.L. Larsen. 1982. Pollutant-particle associations and dynamics in coastal marine environments. A review. *Mar. Chem.* 11: 501-533.

Pavlou, S.P. 1987. The use of the equilibrium partitioning approach in determining safe levels of contaminants in marine sediments. Pp. 388-412 In K.L. Dickson, A.W. Maki et W.A. Brungs, eds. *Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems*. Pergamon Press.

Payne, J.F., L.L. Fancey, A.D. Rahimtula et E.L. Porter. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxic.* 86: 233-245.

Pesonen, M., A. Goksoyr et T. Anderson. 1992. Expression of P450I1A in a primary culture of Rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone and tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 228-233.

- Podoll, R.T., K.C. Irwin et S. Brendinger. 1987. Sorption of water-soluble oligomers on sediments. Environ. Sci. Technol. 21: 562-568.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'Ari, and M. Hofnung. 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. Natl. Acad. Sci. 79: 5971 - 5975.
- Quillardet, P., and M. Hofnung. 1985. The SOS Chromotest, a bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res. 147: 65 - 78.
- Ross, P. et M. Munawar. 1994. Development of regulations for managing contaminated sediments in Europe and North America. J. Aquat. Ecosys. Health 3: 221-225.
- SAS Institute. 1987. SAS/STAT® Guide for Personal Computers, Version 6 Edition. Cary, NC: SAS Institue Inc.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT® User's Guide. Release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS Institue Inc.
- Scheuhammer, A.M. et M.G. Cherian. 1986. Quantitation of metallothioneins by a silver saturation assay. Toxic. Appl. Pharmacol. 82: 417-421.
- Schiewe, M.H., E.G. Hawk, D.I. Actor et M.M. Krahn. 1985. Use of bacterial bioluminescence assay to assay toxicity of contaminated marine sediments. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 1244-1248.
- Shugart, L.R., S.M. Adams, B.D. Jimenez, S.S. Tamalge et J.F. McCarthy. 1989. Biological markers to study exposure in animals and bioavailability of environmental contaminants. Pp. 86-97 In R.G.M. Wang, C.A. Franklin, R.C. Honeycutt et J.C. Reinert (éds). Biological monitoring for pesticide exposure: measurement, estimation and risk reduction. ACS Symposium Seris No. 382, American Chemical Society, Washington, DC.
- Standard Methods. 1992. For the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation. Washington, D.C. 18è éd.

- Stegeman, J.J., B.R. Woodin et A. Snowberger. 1988. Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the Flounder (*Platichthys flesus*). Mar. Poll. Bull. 18(10): 359-364.
- Stumm, W. 1992. Chemistry of the solid-water interface. John Wiley and sons, Inc. N.Y.
- Swartz, R.C., G.R. Ditsworth, D.W. Schults et J.O. Lamberson. 1986. Sediment toxicity to a marine infaunal amphipod: cadmium and its interaction with sewage sludge. Marine Environ. Res. 18(2): 133-153.
- Tay, K.L., K.G. Doe, S. J. Wade, D.A. Vaughan, R.E. Berrigan et M.J. Moore. 1992. Sediment bioassessment in Halifax harbour. Environ. Toxicol. Chem. 11: 1567-1581.
- Tessier, A., P.G.C. Campbell et M. Bisson. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analyt. chem. 51: 844-851.
- Tessier, A. et P.G.C. Campbell. 1987. Partitioning of trace metals in sediments: relationships with bioavailability. Hydrobiol. 149: 43-52.
- Thomas, P. 1990. Molecular and biochemical responses in fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. Am. Fish. Soc. Symp. 8: 9-28.
- Thomas, P., R.S. Carr et J.M. Neff. 1987. Biochemical responses and alterations of tissue ascorbic acid and glutathione content. Pp. 155-180 In C.S. Giam et L.E. Ray (éds). Pollutant studies in marine animals. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Thomas, J.M., J.R. Skalski, J.F. Cline, M.C. McShane, J.C. Simpson, W.E. Miller, S.A. Peterson, C.A. Callahan et J.C. Greene. 1986. characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. Environ. Toxicol. Chem. 5: 487-501.
- Thompson, E.A., S.N. Luoma, D.J. Cain et c. Johansson. 1980. The effect of sample storage on the extraction of Cu, Zn, Fe, Mn and organic material from oxidized estuarine sediments. Water Air Soil Pollut. 14: 215-233.

- True, C.J. et A.A. Heyward. 1990. Relationships between Microtox test results, extraction methods, and physical and chemical compositions of marine sediment samples. *Toxicol. Assess.* 5: 29-45.
- Ulitzur, S., J. Weiser et S. Yanni. 1980. A new, sensitive and simple bioluminescence test for mutagenic compounds. *Mut. Res.* 74: 113-124.
- Ulitzer, S. et I. Weiser. 1981. Acridine dyes and other DNA-intercalating agents induce the luminescence system of luminous bacteria and their dark variants. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, 78: 3338-3342.
- Ulitzur, S. 1986. Bioluminescence test for genotoxic agents. *Methods Enzymol.* 133: 264-274.
- Ulitzur, S. et J. Kuhn. 1988. The transcription of bacterial luminescence is regulated by Sigma 32. *J. Biolumin. Chemilumin.* 2: 81-93.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean dumping. Testing manual. U.S. Environmental Protection Agency and U.S. Army Corps of Engineers. EPA-503/8-91/001. Washington, D.C.
- Venitt, S., C. Crofton-Sleigh et R. Forster. 1984. Bacterial mutation assays using reverse mutation. Pp. 45-98 In S. Venitt et J. M. Parry (éds). *Mutagenicity testing*. IRL Press, Washington, DC.
- Venitt, S., H. Bartsh, G. Becking, R.P.P. Fuchs, M. Hofnung, C. Malaveille, T. Matsushima, M.R. Rajewsky, M. Roberfroid et H.S. Rosenkrantz. 1986. Short-term assays using bacteria. IARC Scientific Publications, Lyon, Report 5, pp. 143-161.
- Voice, T.C. et W.J. Weber. 1983. Sorption of hydrophobic compounds by sediments, soils and suspended solids. I - Theory and background. *Water Res.* 17: 1433-1441.
- Walker, G. C. 1987. The SOS Response of *Escherichia coli*. Pp. 1346-357 In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, B. Magasanik, K. B. Low, M. Schaechter, and H E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology (Vol. 2), American Society for Microbiology, Washington, D.C..

Watson, P.G., P. Frickers et C. Goodchild. 1985. Spatial and seasonal variations in the chemistry of sediment interstitial waters in the Tamar Estuary. *Estuar. Coastal Shelf Sci.* 21: 105-119.

Wedemeyer, G.A. et D.J. McLeay. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. Pp. 247-275 In A.D. Pickering (éd.) *Stress and fish*. Academic Press, N.Y.

Welte, B., N. Bless et A. Montiel. 1983. A study of different methods of speciation in sediments. *Environ. Technol. Lett.* 4: 79-88.

Williams, L.G., P.M. Chapman et T.C. Ginn. 1986. A comparative evaluation of marine sediment toxicity using bacterial luminescence, oyster embryo and amphipod sediment bioassays. *Mar. Environ. Res.* 19: 25-249.

Zhuang, Y., H.B. Ellen et G. Fu. 1994. Effect of aeration of sediment on cadmium binding. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 717-724.

—