



Centre for Advanced Analytical Chemistry  
Energy Technology

# TOXICITÉ CHRONIQUE DU LIXIVIAT DE RESIDUS DE NICKEL SUR LE BIOTE MARIN ET DULCICOLE

par J.L. Stauber, M.T. Binet et M.S. Adams

Rapport No: ET/IR600R

Préparé pour  
Inco Australia Management Pty Ltd

Mai 2003

### **Avis de non-responsabilité**

Ce rapport a été préparé par le Centre for Advanced Analytical Chemistry (Centre de Chimie Analytique Avancée), CSIRO Energy Technology. Son contenu reflète le meilleur jugement professionnel des auteurs à la lumière des résultats de l'étude demandée des informations disponibles au moment de sa préparation. Toutefois, comme les auteurs et CSIRO ne peuvent pas contrôler les conditions sous lesquelles ce rapport pourra être utilisé, les auteurs et CSIRO ne seront tenus responsables d'aucun dommage résultant d'une mauvaise utilisation ou d'une confiance mal placée en ce rapport.

### **Circulation limitée**

Ce document ne fera pas l'objet d'une distribution supplémentaire, et ne sera cité dans aucun autre document sans l'accord du premier auteur ou du Directeur du Centre for Advanced Analytical Chemistry, CSIRO Energy Technology.

### **Copyright © CSIRO 2003**

Aucune partie individuelle de ce rapport ne peut être reproduite sans la permission écrite expresse du Centre for Advanced Analytical Chemistry, CSIRO Energy Technology.



## NOTE DE SYNTHÈSE

Inco Ltd Nouvelle Calédonie propose de miner et de traiter le gisement de minerai latéritique de nickel de Goro pour produire un produit de nickel et de cobalt. Le lixiviat résiduaire du processus de lavage acide sous pression sera neutralisé avec de la chaux à un pH de 7-7,5 et puis rejeté à plusieurs kilomètres au large via un pipeline muni d'un diffuseur. L'eau sera extraite des solides de résidus pour obtenir un résidu épaissi qui sera alors déposé dans une vallée avoisinante avant d'être utilisé comme remblai pour le puits de mine dans 3 à 5 ans. Dans le cadre de l'évaluation des risques pour l'environnement de l'installation de traitement du minerai de nickel proposée en Nouvelle Calédonie pour Inco Ltd, CSIRO a réalisé un certain nombre d'évaluations chimiques et écotoxicologiques de la toxicité de la fraction liquide des résidus de la mine de nickel.

L'objectif de cette série actuelle d'essais était d'évaluer la toxicité chronique du lixiviat de résidus en utilisant une variété d'espèces marines et dulcicoles sensibles. Les données de concentration sans effet observé (NOEC) des essais de toxicité furent alors combinées aux données de toxicité aiguë d'essais précédents sur la toxicité du lixiviat pour les coraux, pour calculer des dilutions 'sûres' de lixiviat dans les eaux côtières ainsi que dans les eaux douces susceptibles de subir l'impact des eaux souterraines contaminées.

Les essais chroniques marins couvraient l'inhibition de la croissance de la microalgue tropicale *Nitzschia closterium*, ainsi que des essais sur plusieurs espèces tempérées y compris la germination et la division cellulaire de la macro algue *Hormosira banksii*, le développement larvaire de la Coquille St Jacques *Mimachlamys asperima* et de l'huître *Saccostrea commercialis*, et la fertilisation de l'oursin comestible *Heliocidaris tuberculata*.

Pour les essais en eau douce, des essais chroniques mesurant l'inhibition de la croissance de trois espèces tropicales, la microalgue *Chlorella* sp 12, le coelentéré *Hydra viridissima* et la lentille d'eau *Lemna aequinoctialis* furent effectués. Pour obtenir des données suffisantes pour l'extrapolation des risques et le calcul de dilutions 'sûres', on ajouta à ces essais tropicaux deux essais chroniques sur des espèces tempérées, le cladocère *Ceriodaphnia dubia* et un (essai de croissance) de bactéries Gram-négatives. Toutes ces espèces sont susceptibles d'exister en Nouvelle Calédonie car elles ont une distribution mondiale en eaux de surface.

Le lixiviat de résidus contenait de hautes concentrations de sulfate, de magnésium, de calcium et de manganèse. Le lixiviat à salinité ajustée était de faible toxicité pour les invertébrés et les algues marines, avec des valeurs IC/EC50 (à savoir la concentration de lixiviat requise pour causer un effet de 50%) allant de 18 - >100%. Le développement larvaire de l'huître et de la Coquille St Jacques était l'essai le plus sensible, suivi de la fertilisation de l'oursin, la division cellulaire de la macro algue et la croissance de la microalgue. Le lixiviat était

moins toxique pour ces espèces que pour les coraux adultes et les zooxanthelles isolées soumises précédemment à l'essai.

En utilisant la méthode de distribution statistique pour calculer les dilutions 'sûres' de lixiviat pour la protection de 95% des espèces dans le milieu marin, des dilutions de lixiviat de 1:280 étaient requises pour produire un effet minimal sur le biote marin. Toutefois, vu la mauvaise correspondance des données au modèle, la fiabilité de cette dilution estimée est considérée comme faible.

Etant donné que des impacts sur les eaux douces risquent de se produire suite à la percolation de l'eau à travers la masse de résidus déposés dans le puits de mine et atteignant l'eau souterraine et éventuellement les eaux de surface, des essais de toxicité chronique utilisant des espèces dulcicoles furent également effectués. En raison de la haute conductivité du lixiviat, il fut impossible de tester sa toxicité pour le biote dulcicole à des concentrations supérieures à 5-10%. Même à ces concentrations, la conductivité contribuait partiellement à la toxicité du lixiviat pour la croissance de la microalgue et de *Hydra*. Il est également possible que la toxicité du lixiviat pour le biote dulcicole était due en partie à sa haute dureté, toutefois, les effets inhibiteurs dus au calcium et au magnésium étaient améliorés dans le lixiviat comparé aux témoins de dureté.

Le lixiviat de résidus était de faible toxicité pour les espèces dulcicoles, avec des valeurs IC/EC50 de lixiviat supérieures à 5%. La croissance de la lentille d'eau *Lemna aequinoctialis* était l'essai le plus sensible, suivi de *Hydra viridissima*, de la croissance microalguaire, et de la reproduction du cladocère. La bactérie était insensible au lixiviat de résidus.

En utilisant la méthode de distribution statistique pour calculer les dilutions 'sûres' de lixiviat pour la protection de 95% des espèces dulcicole, il fut estimé que des dilutions de lixiviat de 1:1100 seraient nécessaires pour avoir un impact minimal sur le biote dulcicole. La fiabilité de cette dilution calculée était considérée comme modérée.

## TABLE DES MATIERES

NOTE DE SYNTHÈSE	iii
TABLE DES MATIERES	v
1 INTRODUCTION	1
2 METHODES	3
2.1 Prélèvement et entreposage du lixiviat de résidus	3
2.2 Préparation du lixiviat de résidus	3
2.3 Préparation des témoins d'Assurance Qualité	3
2.4 Analyses chimiques	4
2.5 Essais de toxicité marine	4
2.5.1 Essai d'inhibition de la croissance de <i>Nitzschia closterium</i>	4
2.5.2 Essais de germination et d'inhibition de la croissance des macro algues	6
2.5.3 Essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques	7
2.5.4 Essai de développement larvaire de l'huître	10
2.5.5 Essai de fertilisation de l'oursin	10
2.6 Essais de toxicité d'eau douce	11
2.6.1 Essai d'inhibition de la croissance bactérienne	11
2.6.2 Essai d'inhibition de la croissance de <i>Chlorella sp. 12</i>	14
2.6.3 Essai d'inhibition de la croissance de la lentille d'eau tropicale	16
2.6.4 Essai d'inhibition de la croissance du coelentéré tropical	19
2.6.5 Essai de reproduction sur le cladocère tempéré	21
3 RESULTATS	24
3.1 Analyses chimiques	24
3.1.1 Lixiviat de résidus	24
3.1.2 Lixiviat de résidus au Jour 0 des essais de toxicité marine	26
3.1.3 Lixiviat de résidus au Jour 0 des essais de toxicité d'eau douce	27
3.2 Essais de toxicité marine	28
3.2.1 Essai d'inhibition de la croissance de <i>Nitzschia closterium</i>	28
3.2.2 Essai de germination et de division cellulaire macroalguaire	29
3.2.3 Essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques	31
3.2.4 Essai de développement larvaire de huître	32
3.2.5 Essai de fertilisation de l'oursin comestible	33

3.3	Essais de toxicité d'eau douce	34
3.3.1	Inhibition de la croissance bactérienne .....	34
3.3.2	Inhibition de la croissance de <i>Chlorella sp. 12</i> .....	35
3.3.3	Inhibition de la croissance de la lentille d'eau .....	37
3.3.4	Inhibition de la croissance de Hydra .....	39
3.3.5	Inhibition de la reproduction du cladocère .....	40
4	DISCUSSION	42
4.1	Calcul des dilutions "sûres" pour une décharge marine	43
4.2	Calcul d'une dilution sûre pour une décharge en eau douce	45
5	RESUME ET CONCLUSIONS <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
6	REMERCIEMENTS	51
7	REFERENCES	52

### Liste des tableaux

Tableau 1.	Résumé du protocole d'essai pour le bioessai d'inhibition de la croissance de <i>Nitzschia closterium</i>	6
Tableau 2	Résumé du protocole d'essai pour le bioessai de germination et de division cellulaire d' <i>Hormosira banksii</i>	7
Tableau 3.	Résumé des conditions d'essai pour l'essai de développement larvaire de 48 h sur la Coquille St Jacques <i>Mimachlamys (Chlamys) asperrima</i>	9
Tableau 4.	Résumé du protocole d'essai pour l'essai de fertilisation de l'oursin comestible <i>Heliocidaris tuberculata</i>	10
Tableau 5.	Résumé du protocole d'essai pour l'essai d'inhibition de la croissance bactérienne en eau douce	14
Tableau 6.	Résumé du protocole d'essai pour le bioessai d'inhibition de la croissance de <i>Chlorella sp.12</i>	15
Tableau 7.	Résumé du protocole d'essai pour l'essai d'inhibition de la croissance de <i>Lemna aequinoctialis</i>	18

Tableau 8. Résumé du protocole d'essai pour l'essai de croissance de la population de <i>Hydra viridissima</i>	21
Tableau 9. Résumé du protocole d'essai pour l'essai de toxicité chronique à 3 couvées de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	22
Tableau 10. Analyse physico-chimique du lixiviat de résidus à sa réception et après un entreposage de 15 mois à 4°C	24
Tableau 11. Analyses physico-chimiques du lixiviat de résidus non filtré et filtré avant et après l'ajustement de salinité et de pH	25
Tableau 12. Concentrations métalliques dans le lixiviat de résidus filtré et non filtré avant et après ajustement de salinité/pH	26
Tableau 13. Métaux présents dans le lixiviat de résidus au Jour 0 des essais de toxicité marine	27
Tableau 14. Métaux présents dans le lixiviat de résidus (10%) au Jour 0 des essais de toxicité d'eau douce	28
Tableau 15. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur la croissance de <i>Nitzschia closterium</i> pour une exposition de 72 h	29
Tableau 16. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur la germination et la division cellulaire de <i>Hormosira banksii</i> pour une exposition de 48 h et 72 h	30
Tableau 17. Résumé de la toxicité du lixiviat pour <i>Hormosira banksii</i>	30
Tableau 18. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur le développement larvaire de la Coquille St Jacques sur 48 h	31
Tableau 19. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur le développement larvaire de huître sur 48 h	32
Tableau 20. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur la fertilisation de l'oursin comestible sur 1 h	33
Tableau 21. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance bactérienne sur 48h	35

Tableau 22. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance de <i>Chlorella</i> sp. 12 pour une exposition de 72 h	37
Tableau 23. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance de la lentille d'eau tropicale <i>Lemna aequinoctialis</i> sur 96 h	38
Tableau 24. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance de <i>Hydra viridissima</i> sur 96 h	40
Tableau 25. Effet du lixiviat de résidus sur la survie et la reproduction du cladocère sur 7 jours	41
Tableau 26. Toxicité chronique du lixiviat de résidus pour le biote dulcicole et marin	42
Tableau 27. Dilutions sûres de lixiviat en eau de mer et en eau douce calculées à l'aide de la méthode de distribution statistique	45
ANNEXE E	58
ANNEXE F	59
Essai d'inhibition de la croissance de <i>Chlorella</i> sp 12 - Données brutes et rapports statistiques ToxCalc	59
ANNEXE G	60
<i>Rapport de l'essai sur Lemna aequinoctialis</i>	60
ANNEXE H	61
<i>Rapport de l'essai sur Hydra viridissima</i>	61
ANNEXE I	62
<i>Rapport de l'essai sur Ceriodaphnia dubia</i>	62

## Liste des Figures



Figure 1 Distribution de sensibilité des espèces pour calculer la dilution 'sûre' d'une décharge marine de lixiviat 46

Figure 2 Distribution de sensibilité des espèces pour calculer la dilution 'sûre' d'une décharge de lixiviat en eau douce 46

# 1 INTRODUCTION

Inco Ltd Nouvelle Calédonie propose de miner et de traiter le gisement de minerai latéritique de nickel de Goro pour produire un produit de nickel et de cobalt. Le lixiviat résiduaire du processus de lavage acide sous pression sera neutralisé avec de la chaux à un pH de 7-7,5 et puis rejeté à plusieurs kilomètres au large via un pipeline muni d'un diffuseur. L'eau sera extraite des solides de résidus pour obtenir un résidu épaissi qui sera alors déposé dans une vallée avoisinante avant d'être utilisé comme remblai pour le puits de mine dans 3 à 5 ans.

Dans le cadre d'une évaluation des risques pour l'environnement de l'installation de traitement du minerai de nickel proposée par Inco en Nouvelle Calédonie, CSIRO fut précédemment chargé d'effectuer une évaluation chimique et écotoxicologique de la toxicité de la fraction liquide des résidus de mine de nickel (Stauber et al. 2000). Cette étude montra que le lixiviat à salinité ajustée ne présentait pas de toxicité aiguë pour la crevette de mer ni pour les alevins de perche barramundi, mais qu'une toxicité chronique existait pour l'algue tropicale *Nitzschia closterium*, avec un EC50 de 12%. Un suivi d'essais de toxicité avec le lixiviat fut demandé par Inco.

Pour la décharge marine, on s'inquiétait des impacts éventuels sur un petit récif corallien à environ 4 km du canal de décharge. Un deuxième échantillon de lixiviat contenant des niveaux élevés de manganèse (160 mg/L) fut donc soumis à un essai de toxicité pour les coraux tropicaux et leurs algues symbiotiques, en utilisant la mortalité totale et partielle, la perte de dinoflagellés symbiotiques et les variations des paramètres de fluorescence chlorophylle comme critères d'évaluation de toxicité létale et sublétale (Stauber et al. 2002). Ni le manganèse, ni le lixiviat de résidus n'inhibaient le rendement quantique photosynthétique algaire, ni ne réduisaient les densités cellulaires algaires. Le manganèse et le lixiviat de résidus présentaient toutefois une toxicité aiguë pour le corail *Stylophora pistillata*, réduisant la survie sur 48 heures et provoquant une réponse physiologique inhabituelle se manifestant par la déconnexion ou le 'dépouillement' du tissu corallien du squelette. Les dilutions de lixiviat (>1000:1) furent toutefois considérées comme suffisantes pour garantir un impact minimal de la décharge sur les récifs coralliens adjacents.

Des impacts en eau douce peuvent se produire suite à la percolation de l'eau à travers la masse de résidus, atteignant l'eau souterraine et provoquant des niveaux élevés de sulfates, de magnésium et de manganèse. Bien qu'il n'existe pas de lignes directrices pour la protection de la microfaune en eaux souterraines, les impacts potentiels sur l'eau douce de surface devaient être examinés. Inco demanda notamment des essais de toxicité chronique supplémentaires utilisant des espèces dulcicoles de substitution. Des essais précédents avec le premier lixiviat indiquèrent qu'il présentait une toxicité aiguë pour le cladocère tropical *Moinodaphnia macleayi*, possiblement dû à la haute dureté et haute conductivité du lixiviat, plutôt qu'aux métaux (Stauber et al. 2000).

L'objectif de cette série actuelle d'essais était d'évaluer la toxicité chronique du lixiviat de résidus en utilisant une variété d'espèces marines et dulcicoles sensibles. Les données de concentration sans effet observé (NOEC) des essais

de toxicité furent alors combinées aux données de toxicité aiguë d'essais précédents sur la toxicité du lixiviat pour les coraux, pour calculer des dilutions 'sûres' de lixiviat dans les eaux côtières ainsi que dans les eaux douces susceptibles de subir l'impact des eaux souterraines contaminées.

Etant donné qu'une production supplémentaire du lixiviat de résidus était impossible, le lixiviat utilisé dans les essais de toxicité précédents sur le corail fut utilisé dans cette étude. Ce lixiviat avait été entreposé à 4°C au CSIRO pendant environ un an. Pour vérifier que des métaux tels que le manganèse ne s'étaient pas précipités pendant l'entreposage, des analyses chimiques préliminaires furent effectuées sur un lixiviat filtré et non filtré. Ces analyses ont confirmé que les concentrations métalliques du lixiviat n'avaient pas changé pendant l'entreposage.

Il existait peu d'essais chroniques marins sur des espèces tropicales indigènes à la Nouvelle Calédonie. Une seule espèce de la suite d'essai (la microalgue *Nitzschia closterium*) est susceptible d'exister dans les eaux côtières de la Nouvelle Calédonie. La plupart des autres bioessais tropicaux marins sur les poissons et les invertébrés ne sont que des essais aigus, par conséquent, cette étude nécessitait des essais chroniques de substitution sur des invertébrés tempérés. Ils couvraient la germination et la division cellulaire de la macro algue *Hormosira banksii*, le développement larvaire de la Coquille St Jacques *Mimachlamys asperima*, le développement larvaire de l'huître *Saccostrea commercialis* et la fertilisation de l'oursin *Heliocidaris tuberculata*. Ces espèces tempérées furent utilisées précédemment pour évaluer la toxicité des lixiviats de traitement du nickel en régions tropicales, y compris Ramu et Gag Island en Asie du sud-est, et Moa Nickel à Cuba. Les données générées par ces essais furent combinées aux données d'essai de toxicité sur le corail obtenues précédemment pour calculer des dilutions sûres de lixiviat de résidus de nickel dans l'eau de mer.

Pour les essais en eau douce, la réalisation d'essais chroniques mesurant l'inhibition de la croissance de trois espèces tropicales, la microalgue *Chlorella* sp 12, le coelentéré *Hydra viridissima* et la lentille d'eau *Lemna aequinoctialis*, fut proposée. Pour obtenir suffisamment de données pour l'extrapolation des risques et le calcul de dilutions 'sûres', ces essais tropicaux seraient complétés de deux essais chroniques sur des espèces tempérées – le cladocère *Ceriodaphnia dubia* et une bactérie Gram négative (essai de croissance). Toutes ces espèces sont susceptibles d'exister en Nouvelle Calédonie car elles ont une distribution mondiale dans les eaux de surface.

## 2 METHODES

### 2.1 Prélèvement et entreposage du lixiviat de résidus

Le lixiviat de résidus provenant d'une installation pilote en Nouvelle Calédonie fut initialement recueilli dans cinq bonbonnes propres en plastique de 20 L et expédié par avion au Centre for Advanced Analytique Chemistry de CSIRO (CAAC), à Sydney. Le lixiviat ne fut pas réfrigéré pendant cette période de temps. A l'arrive, des mesures physico-chimiques du lixiviat furent effectuées, avant que des sous-échantillons ne soient expédiés pour le programme d'essais sur le corail à l'Île Héron en décembre 2001. Le lixiviat résiduaire fut entreposé à 4°C.

Le 28/2/03, le pH, la salinité et les concentrations métalliques du lixiviat résiduaire furent déterminés pour vérifier que des métaux ne s'étaient pas précipité lors de l'entreposage. La salinité du lixiviat était de 12,3‰ et le pH de 7,4.

### 2.2 Préparation du lixiviat de résidus

Pour les essais de toxicité marine, le lixiviat (10 L) fut ajusté à une salinité de  $34 \pm 1$ ‰ en utilisant des sels marins GP-2 artificiels modifiés (Stauber et al., 1994), et à un pH de  $8,1 \pm 0,1$  en utilisant 1M NaOH. L'effluent ajusté fut remué pendant 30-60 minutes et les paramètres physico-chimiques furent mesurés une nouvelle fois. Des sous-échantillons furent expédiés à chaque laboratoire d'essai marin. Pour l'essai sur les microalgues, le lixiviat fut également filtré à travers un filtre membrane de 0,45 µm.

Pour les essais en eau douce, des échantillons de lixiviat non ajusté furent filtrés à travers un filtre membrane de 0,45 µm et expédiés (à 4°C) à chaque laboratoire d'essai. Tous les essais de toxicité (hormis l'essai sur la Coquille St Jacques) furent effectués en mars 2003,

### 2.3 Preparation des témoins d'Assurance Qualité

Des témoins de sels marins artificiels (25 L) furent préparés en diluant de l'eau de mer avec de l'eau Milli-Q à une salinité de 12,3‰ (identique à celle du lixiviat non ajusté) et puis en ajoutant des sels marins GP-2 pour obtenir une salinité finale de 34‰ et un pH final de 8,1. Les sels marins artificiels furent alors filtrés à travers un filtre membrane de 0,45 µm et expédiés à chaque laboratoire participant.

Pour les essais en eau douce, des témoins d'eau dure (mesurés à 650 mg CaCO<sub>3</sub>/L) furent préparés en dissolvant CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> et KCl dans de l'eau Milli-Q au CSIRO, et envoyés à chaque laboratoire participant. Cet échantillon fut dilué encore plus pour donner une plage de valeurs de dureté.

## 2.4 Analyses chimiques

Des sous-échantillons de:

- lixiviat de résidus (non ajusté, non filtré)
- lixiviat de résidus (filtré) et
- lixiviat de résidus à salinité ajustée (filtré)

furent soumis à des analyses d'alcalinité et de sulfate (au Laboratoires AGAL), et de métaux au CSIRO, par spectrophotométrie d'émission atomique à couplage inductif (ICP-AES). Le magnésium total et le calcium total, ainsi que les métaux dissous y compris aluminium, arsenic, cadmium, cobalt, chrome, cuivre, fer, manganèse, nickel, plomb et zinc, furent mesurés.

Le premier jour de l'essai (Jour 0), chaque laboratoire préleva des sous-échantillons de la plus haute concentration de lixiviat d'essai et du témoin. Ceux-ci furent filtrés/conservés selon le besoin et expédiés à CSIRO pour les analyses de métaux.

## 2.5 Essais de toxicité marine

### 2.5.1 Essai d'inhibition de la croissance de *Nitzschia closterium*

Ce bioessai mesure la réduction du taux de division cellulaire de l'algue unicellulaire *Nitzschia closterium* pour une exposition de 3 jours. Le protocole du bioessai (Stauber et al. 1994) est basé sur la Directive 201 de l'OECD (1984) et résumé au Tableau 1. L'essai fut effectué au CAAC, à Sydney.

#### *Cultures de souche*

La diatomée marine unicellulaire tropicale *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith (Strain CS 114) fut initialement isolée de la Mer de Corail, dans le Queensland, en Australie. La diatomée fut cultivée dans un milieu G titré à 50% (Loeblich et Smith, 1968). La culture fut soumise à un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (lumière du jour fluorescente 40 W Philips TL, 50  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) à 27°C.

#### *Procédure d'essai de toxicité*

Des témoins d'eau de mer naturelle, des témoins de sels marins artificiels, ainsi que cinq concentrations de lixiviat de résidus (100%, 50%, 25%, 12,5% et 6,3%) filtrés, à pH et à salinité ajustés, furent préparés en trois exemplaires. De l'eau de mer naturelle filtrée (membrane de 0,45  $\mu\text{m}$ ) fut utilisée pour les témoins et pour diluer le lixiviat ajusté. Cinquante millilitres de chaque furent versés dans des ballons Erlenmeyer silanisés (Coatasil, BDH) de 200 mL. Dans chaque ballon, 0,5 mL de nitrate de soude furent ajoutés à 26 mM et 0,5 mL de dihydrogénéphosphate de potassium à 1,3 mM.

Chaque ballon fut inoculé avec  $3,7 \times 10^4$  cellules/mL d'une suspension alguaire prélavée et incubée à 27°C sur un cycle lumière/obscurité de 12:12 h à 150  $\mu\text{mol}$

photons /m<sup>2</sup>/s pendant 72 h. Le pH de chaque ballon fut mesuré au Jour 0 et au Jour 3 du bioessai.

Les densités cellulaires dans chaque ballon furent déterminées quotidiennement pendant trois jours en comptant les cellules dans un analyseur de particules Multisizer II Coulter de 70 µm d'aperture. Des aliquotes de cellules provenant de chaque ballon furent homogénéisées dans un broyeur de tissu pour fragmenter les amas de cellules avant le comptage. Un comptage de particules ambiantes (eau de mer filtrée sans cellules) fut soustrait de toutes les numérations Coulter.

#### *Assurance qualité*

Six concentrations du cuivre toxique de référence (7,7 - 160 µg/L) furent préparées en trois exemplaires et incluses dans le bioessai pour garantir que les algues réagissaient à un produit toxique connu de façon reproductible. Le bioessai était acceptable si le cuivre provoquait une réduction significative de la croissance alguaire sur 72 h, et si le taux de division cellulaire des témoins d'eau de mer était de  $1,4 \pm 0,4$  redoublements/jour.

#### *Analyses statistiques*

Une droite de régression fut adaptée à un graphe log<sub>10</sub> de densité de cellule x temps (h) pour chaque ballon et le taux de division cellulaire (taux de croissance) par heure (µ) fut déterminé par la pente. Les taux de division cellulaire par jour ( $3,32 \times \mu \times 24$ ) furent calculés pour chaque concentration de lixiviat de résidus et pour les témoins.

Le IC50 sur 72 h (c.à d. la concentration inhibitrice de lixiviat de résidus provoquant une réduction de 50% du taux de division cellulaire alguaire comparé aux témoins) fut calculé en utilisant ToxCalc Version 5.0.23 (Logiciel Tidepool). Plus le IC50 était bas, plus l'échantillon était toxique. Le LOEC (la concentration de lixiviat la plus basse entraînant un effet significatif sur la croissance alguaire) et le NOEC (la concentration la plus haute n'entraînant aucun effet significatif sur la croissance alguaire comparé aux témoins) furent aussi déterminés en utilisant le logiciel ToxCalc conformément aux protocoles USEPA (1994).

**Tableau 1. Résumé du protocole d'essai pour le bioessai d'inhibition de la croissance de *Nitzschia closterium***

Type d'essai	Statique
Température	27 ± 1°C
Qualité de lumière	Eclairage fluorescent 'cool white'
Intensité de la lumière	150 µmol photons s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>
Photopériode	12 heures de lumière : 12 heures d'obscurité
Dimension de la chambre d'essai	200 mL
Volume de la solution d'essai	50 mL
Renouvellement des solutions d'essai	Aucun
Age des organismes d'essai	5-6 jours
Intensité cellulaire initiale dans les chambres d'essai	2 - 4 x 10 <sup>4</sup> cellules/mL
Nombre de chambres reproduites/concentration	3
Taux d'agitation	Une fois par jour à la main
Eau de dilution	Eau de mer filtrée naturelle de 0,45 µm
Concentrations d'effluents	Minimum de 5 et un témoin
Facteur de dilution	0,3 ou 0,5
Durée de l'essai	72 h
Critère d'évaluation	Croissance (division cellulaire)
Acceptabilité de l'essai	Taux de division cellulaire témoin 1,4 ± 0,4 redoublements par jour. Variabilité des témoins inférieure à 20%.

### 2.5.2 Essais de germination et d'inhibition de la croissance des macroalgues

Cet essai, effectué à l'Institut des Ressources Marines et Dulcicoles de Queenscliff, dans le Victoria, utilise l'algue brune tempérée *Hormosira banksii*, présente en abondance sur les plateformes rocheuses du littoral du sud est de l'Australie. L'algue fut cueillie à marée basse à Barwon Heads, dans le Victoria, un jour avant le commencement des essais. Les plantes furent placées dans des sacs en polyéthylène, transportées au laboratoire et conservées jusqu'à leur utilisation.

L'essai de germination et de division cellulaire de *H. banksii* est basé sur les procédures de Kevekordes et Clayton (1996). Des gamètes femelles furent prélevées de plantes *H. banksii* et 2000 oeufs/mL environ furent ajoutés à chaque solution d'essai (80 mL) vingt minutes avant l'ajout de sperme. Un Système Optique Visuel Interne (IVOS) fut utilisé pour calculer la densité de sperme dans la suspension de souches, et le volume de sperme requis pour obtenir un rapport

œuf / sperme de 1:200 fut alors déterminé. Le sperme fut introduit dans les solutions d'essai et incubé sous des conditions optimales.

La germination et la division cellulaire à 48 h et 72 h du développement subséquent des œufs fertilisés dans les solutions de lixiviat furent évaluées. Pour les critères de division cellulaire, les longueurs des rhizoïdes furent mesurées au microscope et les résultats comparés avec les longueurs de rhizoïdes témoins.

Sept concentrations de lixiviat furent testées (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 1%, 0,5%), avec des témoins de sels marins artificiels et d'eau de mer naturelle de 100%. A des fins d'assurance qualité, la toxicité d'un produit toxique de référence, l'ammoniac, fut aussi déterminé sur la plage de concentration 0 - 24 mg N/L. Température, pH, salinité et oxygène dissous (DO) furent mesurés dans chaque traitement sur l'ensemble des essais.

#### *Analyses statistiques*

Les valeurs IC50, LOEC et NOEC furent déterminées en utilisant des protocoles statistiques identiques à ceux de l'essai de croissance des microalgues.

**Tableau 2 Résumé du protocole d'essai pour le bioessai de germination et de division cellulaire d'*Hormosira banksii***

Type d'essai	Statique
Température	18 ± 1°C
Qualité de la lumière	Eclairage fluorescent de jour
Intensité de la lumière	< 1000 Lux
Photopériode	12 heures de lumière : 12 heures d'obscurité
Dimension de la chambre d'essai	100 mL
Volume de la solution d'essai	80 mL
Renouvellement des solutions d'essai	Aucun
Nombre de chambres reproduites /concentration	4
Eau de dilution	Eau de mer naturelle filtrée de 0,20 µm
Concentrations d'effluents	Minimum de 5 et un témoin
Durée de l'essai	48h et 72 h
Critère d'évaluation	Germination et division cellulaire
Acceptabilité de l'essai	> 80 % de germination dans le traitement témoin

### 2.5.3 Essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques

Les Coquilles St Jacques *Mimachlamys asperrima*, (nommées précédemment *Chlamys asperrima*) n'étaient pas disponibles de février à avril 2003, suite à l'été torride et sec qui a impacté sur l'état des gonades des Coquilles St Jacques.



Début mai, des Coquilles St Jacques d'élevage issues de naissains sauvages à Denial Bay, en Australie du Sud, devinrent disponibles et furent expédiées à Sydney par avion. A l'arrivée au laboratoire, les Coquilles St Jacques furent placées dans des aquarium à 18°C jusqu'à leur fraie le matin suivant. Les essais furent effectués par le Dr Rick Krassoi de Ecotox Services Australasia, à Sydney.

L'essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques *Mimachlamys asperima* mesure l'effet du lixiviat sur le développement normal des oeufs fertilisés jusqu'au stage larvaire D-véligère, Prodisoconch I sur 48 h. L'essai est basé sur le protocole cité dans Krassoi et al. (1996). Les conditions d'essai sont résumées au Tableau 3.

Les essais de toxicité furent effectués avec les échantillons et concentrations d'essai suivants:

Lixiviat de résidus ; 100, 50, 25, 12,5, 6,3 et 0 (témoin) %

Solution de sels marins artificiels GP-2; 100%

Cuivre toxique de référence; 20, 10, 5, 2,5, 1,3 et 0 (témoin) µg Cu/L

Les solutions d'essai furent préparées en diluant les solutions d'essai en série avec un diluant d'eau de mer pour obtenir 250 mL de chaque traitement. Cinq millilitres de chaque solution d'essai furent introduits à la pipette dans des tubes de culture tissulaire de 9 mL, avec 4 tubes reproduits par traitement. Les solutions d'essai résiduelles furent utilisées pour mesurer le pH, la température, la salinité et la concentration d'oxygène dissous.

Les Coquilles St Jacques furent sélectionnées pour la fraie sur la base d'un examen visuel de l'état des gonades. La fraie fut initiée en injectant les gonades de cinq Coquilles St Jacques de chaque sexe avec 0,1 mL de solution de sérotonine. Les Coquilles St Jacques injectées furent transférées dans des béciers de 1 L avec 0,5 L d'eau de mer filtrée, et conservées dans une enceinte environnementale à 18°C jusqu'à ce que la fraie soit complétée, généralement dans les 40 minutes suivant l'injection.

Les gamètes furent prélevés en transférant des masses d'œufs et de sperme à l'aide d'une pipette Pasteur dans des béciers propres de 250 mL contenant 200 mL d'eau de mer filtrée. Les densités des solutions d'œufs et de sperme furent énumérées à l'aide d'une lame de Sedgwick-Rafter et d'une chambre de comptage des globules sanguins, respectivement. Une solution de sperme suffisante fut ajoutée à la suspension d'œufs pour obtenir un rapport oeuf:sperme de 1:100. La suspension d'œufs fut alors placée dans une chambre à ambiance variable à 18°C pendant 30 minutes pour permettre la fertilisation.

Après 30 minutes, une suspension d'œufs suffisante fut ajoutée à chaque récipient d'essai pour donner une densité d'œufs terminale de  $30 \pm 5$  oeufs/mL. Les récipients d'essai furent couverts de film plastique et transférés dans une chambre à ambiance variable où ils furent incubés à 18°C pendant 48 h. Les récipients d'essai furent soumis à un cycle lumière:obscurité 16:8 avec un éclairage fluorescent 'cool white' de 600-800 Lux. La température d'essai fut surveillée quotidiennement.

Les essais furent terminés au bout 48 h en ajoutant 0,2 mL de formaline tamponnée 4% à chaque tube d'essai et les larves furent examinées dans les 24 h suivant la fin de l'essai. Les larves s'étaient concentrées au fond de chaque tube. Une pipette Pasteur fut utilisée pour soutirer environ 0,2-0,4 mL de solution contenant des larves concentrées. Les suspensions larvaires furent alors placées dans une lame de Sedgwick-Rafter et examinées sous un grossissement de 100X au moyen d'un microscope optique. Les 100 premières larves furent examinées. Les larves furent comptées en tant que larves D-véligères normales, ou en tant que larves anormales si elles ne s'étaient pas développées à partir du stade zygote ou trochopore, ou étaient difformes.

**Tableau 3. Résumé des conditions d'essai pour l'essai de développement larvaire de 48 h sur la Coquille St Jacques *Mimachlamys (Chlamys) asperrima***

Type d'essai	Statique
Température	18 ± 1°C
Salinité	34 ± 1 ‰
Qualité de la lumière	Eclairage fluorescent (lumière du jour) 'cool-white'
Intensité de la lumière	< 1000 Lux
Photopériode	16 h de lumière: 8 h d'obscurité
Dimension de la chambre d'essai	Tube de culture tissulaire de 9 mL
Volume de la solution d'essai	5 mL
Renouvellement des solutions d'essai	Aucun
Nombre de reproductions par traitement	4
Densité larvaire	30 ± 5 /mL
Eau de dilution	Eau de mer filtrée (0,45 µm)
Durée de l'essai	48 h
Critère d'évaluation	Développement normal au stade D-véligère
Acceptabilité de l'essai	> 70% de larves normalement développées dans le traitement témoin, EC50 du produit toxique de référence dans les limites de la carte de contrôle

#### *Analyses statistiques*

Les estimations EC50 (concentration effective donnant un effet de 50%) sur 48h ainsi que leurs limites de confiance respectives de 95% furent calculées non paramétriquement en utilisant la méthode Trimmed Spearman-Kärber avec logiciel USEPA. Une proportion transformée arc-sinus de données de larves fut utilisée pour déterminer les estimations NOEC et LOEC par analyse de variance à un critère de classification et Test Dunnett suite à la confirmation de l'homoscédasticité par Test Bartlett utilisant TOXSTAT 3,3,

#### 2.5.4 Essai de développement larvaire de l'huître

Cet essai, semblable à l'essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques résumé ci-dessus, fut effectué par le Dr Rick Krassoi de Ecotox Services Australasia à Sydney. L'huître *Saccostrea commercialis* fut obtenue dans un parc à huîtres de Wallis Lakes, en Nouvelles-Galles du Sud. L'essai consistait à exposer des oeufs d'huître fertilisés au lixiviat de résidus et à évaluer le développement normal jusqu'au stade larvaire D-véligère au bout de 48 heures. Cet essai fut effectué à 25°C.

Les essais de toxicité furent effectués avec les échantillons et les concentrations d'essai suivants:

Lixiviat de résidus : 100, 50, 25, 12,5, 6,3 et 0 (témoin) %

Solution de sels marins artificiels GP-2: 100%

Cuivre toxique de référence: 20, 10, 5, 2,5, 1,3 et 0 (témoin) µg Cu/L

Les analyses statistiques furent identiques à celles utilisées dans l'essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques.

#### 2.5.5 Essai de fertilisation de l'oursin

L'essai de fertilisation de l'oursin utilisant des gamètes de *Heliocidaris tuberculata* est basé sur les méthodes décrites par USEPA (1994) et ASTM (1995) et adapté pour être utilisé avec *H. tuberculata* by Simon et Laginestra (1997). Les conditions de ces essais sont résumées au Tableau 4. Cet essai fut effectué par le Dr Rick Krassoi de Ecotox Services Australasia, à Sydney.

Des oursins *Heliocidaris tuberculata* adultes furent recueillis à Lurline Bay, Sydney, et transportés dans des installations d'entreposage au Laboratoire ESA. Des gamètes furent obtenus en injectant les oursins avec une solution KCl 0,5M.

Le lixiviat de résidus fut essayé à cinq concentrations (100, 50, 25, 12,5 et 6,25%), avec un témoin de sels marins artificiels et un témoin d'eau de mer naturelle. Le sperme fut exposé à chaque traitement d'essai pendant 1 h, suite à quoi des oeufs furent introduits dans chaque récipient d'essai (100-200 spermatozoaires par oeuf). Au bout de 20 minutes, de la formaline tamponnée fut ajoutée pour terminer l'essai et 100 oeufs furent examinés pour déterminer le nombre d'oeufs fertilisés et non fertilisés. Un cuivre toxique de référence fut aussi essayé aux fins d'assurance qualité. Les valeurs EC50, LOEC et NOEC furent calculées en utilisant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour les essais sur la Coquille St Jacques et l'huître.

**Tableau 4. Résumé du protocole d'essai pour l'essai de fertilisation de l'oursin comestible *Heliocidaris tuberculata***

Type d'essai	Statique
Température	20 ± 1°C

Qualité de la lumière	Eclairage fluorescent de jour
Intensité de la lumière	Ambiante laboratoire (<800 Lux)
Photopériode	12 heures de lumière: 12 heures d'obscurité
Dimension de la chambre d'essai	Tube de culture tissulaire boraté de 9 mL
Volume de la solution d'essai	5 mL
Salinité des solutions d'essai	35‰
Renouvellement des solutions d'essai	Aucun
Source des organismes d'essai	Prélèvement sur le terrain, littoral de Sydney
Nombre de chambres reproduites /concentration	4
Eau de dilution	Eau de mer filtrée naturelle de 0,45 µm
Concentrations d'effluents	Minimum de 5 et un témoin
Facteur de dilution	1:2 ou 1:3
Durée de l'essai	1 h (plus exposition des œufs de 20 min)
Critère d'évaluation	Pourcentage d'œufs dont la fertilisation a réussi
Acceptabilité de l'essai	>70% de fertilisation dans les témoins, EC50 du produit toxique de référence dans les limites de la carte à somme cumulée prescrite

## 2.6 Essais de toxicité d'eau douce

Comme la salinité du lixiviat de résidus non dilué était de 12,3 ‰, équivalente à une conductivité de 21 mS, elle était en dehors de la plage optimale convenable aux organismes d'essai chronique d'eau douce. Il s'avéra nécessaire de diluer le lixiviat à au moins 1:10 avec un diluant approprié pour chaque essai chronique d'eau douce. Des témoins de conductivité et des témoins de dureté furent également inclus dans chaque essai.

### 2.6.1 Essai d'inhibition de la croissance bactérienne

L'essai d'inhibition de la croissance bactérienne utilise une bactérie tempérée d'eau douce (bâtonnet gram-négatif), désignée WR1, isolée de la Rivière Woronora, en Nouvelles-Galles du Sud. Le bioessai mesure la réduction de la division cellulaire (croissance) sur 48 h dans diverses dilutions de lixiviat de résidus, comparée aux témoins. Cet essai fut effectué au CSIRO et est résumé au Tableau 5.

#### *Conditions de culture bactérienne*

Les bactéries furent entreposées, surgelées, à -20 °C dans un milieu à la gélose Casein Peptone Starch (CPS) (Jones, 1970) avec 15% (v/v) de glycérol. Les cultures de travail de l'isolat furent maintenues par sous-culture hebdomadaire

sur gélose CPS et utilisées pour inoculer un milieu T Modifié à utiliser dans le bioessai.

#### *Préparation des réactifs et des témoins*

Une concentration X 10 de milieu T Modifié (Davies *et al.* 1998) fut fraîchement préparée en dissolvant les réactifs de qualité analytique suivants dans 100 ml d'eau Milli Q: glycérophosphate de sodium, 0,45 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0,025 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g; KCl, 0,3 g; glucose, 1,0 g et glycérol, 1,0 g. Le pH fut ajusté à  $7,0 \pm 0,2$  par l'ajout au goutte à goutte de 1 M NaOH.

Des témoins d'eau dure ( $640 - 720 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) correspondant à la dureté de l'échantillon le plus concentré soumis à l'essai furent préparés et contenaient les réactifs de qualité analytique suivants dans 1 L d'eau Milli Q:  $\text{NaHCO}_3$ , 0,768 g;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,48 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,984g et KCl, 0,032 g. Le pH fut ajusté à  $7,0 \pm 0,2$ . Des témoins de dureté modifiés ( $320 - 360 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  et  $163 - 180 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) furent préparés par dilution appropriée avec de l'eau Milli Q.

Les témoins de salinité furent préparés en ajoutant, goutte à goutte,  $0,45 \mu\text{m}$  d'eau de mer filtrée à de l'eau Milli Q pour obtenir une conductivité finale de 2,1mS. Le pH fut ajusté à  $7,0 \pm 0,2$  et la conductivité réajustée selon le besoin. Ceci refléta la conductivité de l'échantillon de lixiviat le plus concentré utilisé dans l'essai. Un témoin de salinité modifié à une conductivité finale de 1,0 mS fut aussi inclus.

Tous les milieux, réactifs et solutions d'essai furent stérilisés par filtration à travers des filtres seringues jetables (grosseur de pore  $0,2 \mu\text{m}$ , Millipore Corp., Bedford, MA, USA), sauf la gélose CPS qui fut stérilisée à l'autoclave à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 min.

#### *Procédure de l'essai de toxicité*

Les échantillons suivants furent soumis à l'essai:

- témoins milieu T Modifiés
- témoins de salinité (2,1 et 1 mS)
- témoins de dureté ( $640 - 720 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  et  $320 - 360 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ )
- cuivre toxique de référence ( $5 \mu\text{g Cu/L}$ )
- lixiviat de résidus, dilué avec de l'eau Milli Q 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,63% et 0,1%.

Une culture starter de l'isolat bactérien WR1 fut préparée en inoculant une colonie de bactéries dans un milieu T Modifié de concentration normale et en l'incubant à  $30^\circ\text{C}$  pendant 24 h jusqu'à obtention d'une densité optique à 420nm ( $\text{OD}_{420}$ ) = 0,1. Les cellules furent centrifugées aseptiquement à 2500 rpm, lavées deux fois avec un milieu T Modifié et suspendues à  $\text{OD}_{420} = 0,2 \pm 0,01$ .

Des solutions expérimentales en trois exemplaires furent préparées comme suit: tampon PIPES (0,3 mL d'une souche 0,5 M, pH 7,0) et milieu T Modifié (3 mL) de concentration 10 X furent ajoutés à des récipients stériles en polystyrène avec des volumes appropriés d'un témoin ou de lixiviat de résidus selon le besoin. De l'eau dés ionisée fut ajoutée à chaque récipient pour obtenir un volume final de 30 mL.

Les solutions d'essai furent inoculées avec 0,5 mL de cellules de culture starter lavées. Une aliquote de 1 mL fut immédiatement prélevée ( $t = 0$ ) au moyen d'une technique aseptique et la densité optique à 420 nm fut mesurée. Les récipients expérimentaux furent incubés à 30°C pendant 48 heures, une deuxième aliquote de 1 mL fut prélevée aseptiquement ( $t = 48$  h) et l'absorbance à 420 nm fut mesurée une nouvelle fois. La croissance nette pendant l'expérience fut calculée en soustrayant l'absorbance initiale ( $t = 0$ ) de l'absorbance finale ( $t = 48$  h). La croissance significativement réduite (test de Student) dans l'échantillon d'essai comparé au témoin indiquait la toxicité.

Les critères d'acceptabilité de l'essai incluaient une densité optique finale à 420 nm de  $0,20 \pm 0,05$  pour les échantillons témoins, une réduction significative de la croissance en présence du cuivre toxique de référence, et moins de 20% de coefficient de variation dans les témoins.

**Tableau 5. Résumé du protocole d'essai pour l'essai d'inhibition de la croissance bactérienne en eau douce**

Type d'essai	Statique
Température	30 ± 1°C
Récipients d'essai	Polycarbonate irradié aux rayons gamma
Milieu de l'essai	Milieu T Modifié
Eau de dilution	Eau douce artificielle
Volume de la solution d'essai	30 mL
Age des organismes d'essai	24 h
Densité cellulaire initiale	1 – 2 x 10 <sup>6</sup> CFU mL <sup>-1</sup>
No. de reproductions par concentration	3
Durée de l'essai	48 h
Critère d'évaluation	Croissance (densité optique)
Critères d'acceptabilité	Témoin OD <sub>420</sub> = 0,20 ± 0,05, témoin CV < 20%

### 2.6.2 Essai d'inhibition de la croissance de *Chlorella sp. 12*

Ce bioessai mesure la réduction du taux de division cellulaire de l'algue unicellulaire tropicale *Chlorella sp. 12* dans une exposition de 3 jours à un lixiviat de résidus. Le bioessai suit la Directive 201 de l'OECD (1984) et le protocole de Stauber et al. (1994) et est résumé au Tableau 6. L'essai fut effectué au CSIRO, à Sydney.

#### *Cultures de souches*

L'algue unicellulaire tropicale verte *Chlorella sp. 12*, isolée du Lac Aesake, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, fut soumise à une culture axénique dans un milieu de Jaworki à 1/5 de concentration (Thompson et al. 1988). La culture fut maintenue à un cycle lumière/obscurité 12:12 h (Eclairage fluorescent 'cool white', 100 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) à 27°C. Les cellules en phase de croissance logarithmique furent utilisées dans les bioessais alguaire après avoir été lavées et centrifugées trois fois pour enlever le milieu de culture.

#### *Préparation des témoins*

Un diluant (dureté d'eau douce synthétique 80-90 mg CaCO<sub>3</sub>/L, pH 7,3) fut préparé par ajout de 0,48 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 g CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0,3 g MgSO<sub>4</sub> et 0,02 g KCl à 5 L d'eau Milli-Q, et remué pendant la nuit. L'eau douce fut alors filtrée (0,45µm) et utilisée comme eau témoin et de dilution dans l'essai de toxicité. Les témoins d'eau dure (163-651 mg CaCO<sub>3</sub>/L) furent préparés comme indiqué à la Section 2,3.

Des témoins de conductivité furent préparés en ajoutant de l'eau de mer à de l'eau Milli-Q pour obtenir une conductivité de 1,9 mS et 3,5 mS, identique aux plus hautes concentrations de lixiviat de résidus essayées (5 et 10% respectivement).

### *Procédure d'essai de toxicité*

Les échantillons suivants (chacun en trois exemplaires) furent préparés pour l'essai:

- témoins d'eau douce synthétique (dureté 80-90 mg CaCO<sub>3</sub>/L)
- témoins d'eau calcaire synthétique (163, 326 et 651 mg CaCO<sub>3</sub>/L)
- témoins de conductivité (1,9 et 3,5 mS)
- cuivre toxique de référence (8,3 µg Cu/L) dans l'eau douce synthétique
- six concentrations de lixiviat de résidus filtrés (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,6% et 0,1%) diluées dans de l'eau douce synthétique

Cinquante millilitres de chaque furent dispensés dans des ballons Erlenmeyer silanisés (Coatasil, BDH) de 200 mL.

Dans chaque ballon 0,5 mL de nitrate de sodium furent ajoutés à 26 mM et 0,05 mL de dihydrogène-phosphate de potassium à 1,3 mM. Chaque ballon fut inoculé avec  $3,6 \times 10^4$  cellules/mL d'une suspension alguaire prélavée, et incubé à 27°C sur un cycle lumière/obscurité 12:12 h à 100 µmol photons/m<sup>2</sup>/s pendant 72 h. Le pH de chaque ballon fut mesuré au Jour 0 et au Jour 3 du bioessai.

Les densités cellulaires de chaque ballon furent déterminées quotidiennement pendant trois jours en comptant les cellules dans un analyseur de particules Multisizer II Coulter de 70 µm d'aperture. Des aliquotes des cellules de chaque ballon furent homogénéisées dans un broyeur de tissu pour fragmenter les masses de cellules avant le comptage. Un comptage de particules ambiantes (eau douce synthétique sans cellules) fut soustrait de tous les comptages Coulter.

### *Assurance qualité*

L'essai était jugé acceptable si le taux de division cellulaire alguaire des témoins d'eau douce était de  $1,4 \pm 0,4$  dédoublements/Jour et la variabilité des témoins de <20%.

Une concentration du cuivre toxique de référence (8,3 µg Cu/L) fut incluse dans le bioessai pour garantir que les algues réagissaient à un produit toxique connu de manière reproductible. Le bioessai était acceptable si le cuivre provoquait une réduction significative de la croissance alguaire sur 72 h.

Les analyses statistiques furent identiques à celles utilisées pour l'essai microalguaire marin de la Section 2.5.1.

**Tableau 6. Résumé du protocole d'essai pour le bioessai d'inhibition de la croissance de *Chlorella sp.*<sup>12</sup>**

---

Type d'essai

Statique



Température	27 ± 1°C
Qualité de la lumière	Eclairage fluorescent 'cool white'
Intensité de la lumière	100 µmol photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
Photopériode	12 heures lumière : 12 heures obscurité
Dimension de la chambre d'essai	200 mL
Volume de la solution d'essai	50 mL
Renouvellement des solutions d'essai	Aucun
Age des organismes d'essai	5-6 jours
Intensité cellulaire initiale dans les chambres d'essai	2 - 4 x 10 <sup>4</sup> cellules/mL
Nombre de chambres reproduites /concentration	3
Taux d'agitation	Une fois par jour à la main
Eau de dilution	Eau douce synthétique
Concentrations d'effluents	Minimum de 5 et un témoin
Facteur de dilution	0,3 ou 0,5
Durée de l'essai	72 h
Critère d'évaluation	Croissance (division cellulaire)
Acceptabilité de l'essai	Taux de division cellulaire de témoin 1,4 ± 0,4 dédoublements par jour, <20% de variabilité dans les témoins

### 2.6.3 Essai d'inhibition de la croissance de la lentille d'eau tropicale

*Lemna aequinoctialis*, généralement connu sous le nom de lentille d'eau, est une espèce de plante d'eau douce à croissance rapide qui flotte à la surface de masses d'eau lentes ou de masses d'eau lenticulaires en Australie tropicale. L'essai d'inhibition de la croissance de *L. aequinoctialis* consiste à exposer un nombre standard de plantes *Lemna* à multiplication végétative à diverses concentrations de lixiviat pendant 96 h en milieu contrôlé. Le nombre de frondes est dénombré à la fin de l'essai et à partir de là, l'augmentation de la biomasse est calculée et comparée à celle d'un témoin approprié pour déterminer le pourcentage d'inhibition de la croissance de chaque traitement (Reithmuller et al. 2003). Cet essai fut effectué au Environmental Research Institute of the Supervising Scientist (eriss) du Territoire du Nord, en Australie, et est résumé au Tableau 7.

#### *Cultures des souches*

*L. aequinoctialis* fut cultivé dans des milieux de croissance E (Cleland et Briggs, 1969) et K (Maeng & Khudari, 1973) de Hoagland à 50% de concentration et à 29 ± 1°C sur un cycle lumière:obscurité 12:12 h avec une intensité de lumière de 100–150 µmol photons/m<sup>2</sup>/s. Les cultures furent renouvelles chaque semaine dans des milieux frais en transférant 5 - 10 plantes saines au moyen de

techniques aseptiques. La santé de la culture fut évaluée en vérifiant la couleur, la taille, le taux de croissance et la contamination fongique de la plante.

#### *Diluant de l'essai*

Le diluant de l'essai fut préparé en ajoutant 88,5 mg/L  $\text{NO}_3$  et 18,4 mg/L  $\text{PO}_4$  à de l'eau de ruisseau naturelle filtrée de Magela Creek. L'eau de ruisseau fut prélevée de la station de contrôle de Georgetown Billabong (latitude 12° 40' 28" longitude 132° 55' 52") dans des bidons en plastique de 20 L lavés à l'acide. Elle fut maintenue fraîche pendant le transport au laboratoire où elle fut filtrée à travers du papier filtre Whatman #42 et entreposée à 4°C jusqu'à son utilisation 5 jours plus tard.

#### *Préparation de la solution d'essai*

Cet essai fut effectué sous des conditions stériles, par conséquent, le lixiviat de résidus et l'eau dure synthétique furent stérilisés par filtration à travers un filtre à cartouche 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius ministart NML, Gottingen, Allemagne). Le diluant, les témoins de conductivité et les solutions de produit toxique de référence furent autoclavées. Toutes les autres dilutions furent alors effectuées dans une chambre à flux laminaire à l'aide d'instruments stériles.

Les solutions préparées pour l'essai incluaient un témoin d'eau de ruisseau de Magela Creek et un lixiviat de résidus de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 et 10%. Des témoins de conductivité et de dureté furent aussi inclus pour tenir compte de la salinité de 12,3 ‰ du lixiviat et d'une dureté de 25385 mg/L  $\text{CaCO}_3$ . Les témoins de conductivité furent préparés en ajoutant, goutte à goutte, 0,45  $\mu\text{m}$  d'eau de mer naturelle filtrée jusqu'à ce que la conductivité électrique atteigne celle des concentrations de lixiviat de résidus de 1% et 10%. Les témoins de dureté furent réalisés en diluant la solution d'eau dure synthétique pour qu'elle corresponde à la dureté des concentrations de résidus de 0,1, 0,3 et 1% (25, 83 et 250 mg/L  $\text{CaCO}_3$ ). Les calculs des témoins de dureté de cet essai furent basés sur une concentration d'eau dure de 560 mg/L  $\text{CaCO}_3$  et, par conséquent, les concentrations effectives furent recalculées comme étant 29, 96 et 290 mg/L  $\text{CaCO}_3$ . Il ne fut pas possible de préparer un témoin de 2500 mg/L de  $\text{CaCO}_3$  (équivalent aux résidus à 10%) en raison de l'insolubilité des sels de calcium et de magnésium à cette concentration. Une concentration de produit toxique de référence de 24,5 mg/L  $\text{MgSO}_4$  fut aussi incluse, sur la base des essais  $\text{MgSO}_4$  précédents sur l'eau de ruisseau de Magela Creek (Wagner, inédit).

#### *Procédure d'essai de toxicité*

Quatre plantes à trois frondes furent ajoutées à chaque concentration de traitement (trois répliquats de chaque) en utilisant des techniques aseptiques. Les ballons d'essai furent placés au hasard dans une chambre à ambiance variable (conditions identiques à celles de la culture) et re-randomisées à des intervalles de 24 h. Les ballons d'essai furent observés pour détecter tout signe de contamination fongique pendant la durée de l'essai. Au bout de 96 h, chaque plante fut retirée des ballons d'essai et examinées sous une lampe grossissante. Le nombre de plantes et de frondes dans chaque ballon fut enregistré. Une fronde était comptée, même très petite, quand elle était visible au-delà de la marge de la

fronde mère. Des sous-échantillons (70 mL) de chaque solution de traitement furent prélevés au début et à la fin de l'essai pour les mesures des paramètres de qualité de l'eau.

#### *Analyse statistique*

Les données de l'essai furent analysées pour en déterminer la normalité (Test de Shapiro Wilk) et la variance (Test de Bartlett), et transformées selon le besoin de sorte qu'un Test de Dunnnett ou Test-T Ajusté de Bonferoni puisse être utilisé pour déterminer NOEC et LOEC. Un essai Spearman-Karber écrêté fut effectué pour calculer l'EC50 sur 96 h en utilisant ToxCalc™ Version 5.0.23.

**Tableau 7. Résumé du protocole d'essai pour l'essai d'inhibition de la croissance de *Lemna aequinoctialis***

Type d'essai	Statique
Température	29 ± 1°C
Qualité de la lumière	Eclairage fluorescent 'cool white'
Intensité de la lumière	100 - 150 µmol photons/m <sup>2</sup> /s
Photopériode	12 heures lumière : 12 heures obscurité
Dimension de la chambre d'essai	200 mL
Volume de la solution d'essai	50 mL
Renouvellement des solutions d'essai	Aucun
Age des organismes d'essai	5-6 jours
Nombre de plantes initial	4 x 3 plantes à frondes
Nombre de chambres reproduites / concentration	3
Taux d'agitation	Une fois par jour à la main
Eau de dilution	Eau de ruisseau naturelle de Magela Creek
Concentrations d'effluents	Minimum de 5 et un témoin
Facteur de dilution	0,3
Durée de l'essai	96 h
Critère d'évaluation	Croissance (nombre de frondes)
Acceptabilité de l'essai	≥ 60 frondes/ ballon témoin

#### *Assurance qualité*

Les données de l'essai furent considérées comme acceptables si la température enregistrée dans l'enceinte de croissance restait dans les limites prescrites (29 ± 1°C); le nombre de frondes dans un ballon témoin quelconque à la fin de l'essai était au moins cinq fois celui au début de l'essai (c.à d. 60 frondes/ballon);

le pH enregistré était dans les limites prescrites de 0,5 unités et la conductivité de chaque solution d'essai était de l'ordre de  $\pm 10\%$  des valeurs obtenues au début de l'essai.

#### 2.6.4 Essai d'inhibition de la croissance du coelentéré tropical

*Hydra viridissima* est un coelentéré dulcicole (Coelenterata, Cnidaria, Hydrazoa) qui abonde dans les eaux lentes de l'Australie tropicale. Les parents les plus proches de ce taxa incluent les méduses, les anémones de mer et les coraux, dont la plupart sont marins. Comme les autres membres des Hydrazoa, *H. viridissima* est en forme de polype et consiste en un corps en forme de tige avec un pied adhésif, un viscère muni d'une seule ouverture et des tentacules munies de cellules urticantes. Sa couleur verte provient des algues symbiotiques vertes dans les cellules gastrodermales.

L'essai de toxicité chronique *H. viridissima* est un essai du taux de croissance de la population qui est effectué sur 96 h. Des *Hydra* à reproduction asexuée (bourgeonnement) sont exposés à diverses concentrations de toxicant, le taux de croissance étant déterminé par le nombre d'hydroïdes intacts à la fin de l'essai comparé aux témoins (Reithmuller et al., 2003). Cet essai fut effectué par Eriss, dans le Territoire du Nord en Australie et est résumé au Tableau 8.

##### *Cultures de souches*

Des cultures de souches de *H. viridissima* furent maintenues dans des bols en verre de 2 L contenant de l'eau naturelle de ruisseau de Magela Creek. Les conditions environnementales furent maintenues à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , sur un cycle lumière:obscurité 12:12 h avec une intensité de lumière de 30–100  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ . Les cultures furent aérées continuellement et nourries un jour sur deux de crevettes *Artemia* âgées d'1 jour. Les bols furent nettoyés 3 h après chaque alimentation. Environ une semaine avant l'essai, les cultures furent élargies sur 3 bols et puis nourries quotidiennement pendant 45 jours pour encourager une production régulière de bourgeons.

##### *Diluant d'essai*

De l'eau de ruisseau de Magela Creek non modifiée fut utilisée comme diluant d'essai. Les méthodes de prélèvement et de maniement étaient identiques à celles décrites pour l'essai sur *L. aequinoctialis* (Section 2.6.3).

##### *Préparation des solutions d'essai*

Des solutions d'essai furent préparées en volumes de 1 L comme décrit pour l'essai sur *L. aequinoctialis*. Noter qu'il n'était pas nécessaire que ces solutions demeurent stériles et une solution de toxicant de référence de 50 mg/L  $\text{MgSO}_4$  fut préparée.

##### *Procédure d'essai de toxicité*

Des *Hydra* appropriées pour l'essai, portant chacune un bourgeon nouvellement tentaculé, furent prélevées dans des bols de culture au moyen d'un microscope de dissection et transférées dans 3 plaques de Pétri en plastique. Trente *Hydra* (10 *Hydra* x 3 répliquats) furent utilisés dans chaque traitement. Les récipients

d'essai furent alors placés au hasard dans une chambre à ambiance variable sous les conditions décrites pour la culture.

Une solution d'essai fraîche fut dispensée chaque jour et réchauffée pendant au moins trois heures dans la chambre à ambiance variable. Les *Hydra* furent dénombrés et leur aspect (rigidité, groupement, coloration) notée. Chacun fut nourri de 3-4 crevettes âgées d'un jour et retourné à l'incubateur pendant 4 h pour permettre la digestion. Après ce temps, les récipients d'essai furent nettoyés et la solution renouvelée. Des sous-échantillons (70 mL) de l'eau nouvellement dispensée et de l'eau âgée de 24 h furent prélevés quotidiennement pour les mesures des paramètres de qualité de l'eau.

Les comptages du jour final furent utilisés pour calculer le taux relatif de croissance de la population (K) au moyen de la formule suivante:

$$K = \frac{\ln(n_4) - \ln(n_0)}{T}$$

Où  $n_4$  = nombre de *Hydra* à la fin de la période d'essai de 4 jours

$n_0$  = nombre de *Hydra* au début de la période d'essai ( $n_0 = 10$ )

T = longueur de la période d'essai en jours (T = 4)

#### *Analyse statistique*

Les valeurs K furent utilisé pour calculer les valeurs NOEC et LOEC au moyen des méthodes décrites pour les essais sur *L. aequinoctialis*.

#### *Assurance qualité*

Les données de l'essai furent considérées comme acceptables si la température enregistrée de l'incubateur restait dans les limites prescrites; plus de 30 hydroïdes sains demeurèrent dans chaque plaque témoin à la fin de la période d'essai; le pH enregistré était dans les limites prescrites ( $\pm 0,5$  unité de valeurs au Jour 1); la concentration d'oxygène dissous était supérieure de 70% à la valeur de saturation de l'air pendant la durée de l'essai à 27°C; et la conductivité pour chaque solution d'essai était dans les 10% des valeurs obtenues au Jour 1.

**Tableau 8. Résumé du protocole d'essai pour l'essai de croissance de la population de *Hydra viridissima***

Type d'essai	Renouvellement statique
Durée de l'essai	96 h
Température	27± 1 °C
Intensité de la lumière	30–100 µmol photons/m <sup>2</sup> /s
Photopériode	12 h lumière : 12 h obscurité
Dimension de la chambre d'essai	70 mL
Volume de la solution d'essai	30 mL
Renouvellement de la solution d'essai	Quotidiennement
Nombre d'organismes par chambre (début de l'essai)	10
Nombre de chambres reproduites par traitement	3
Alimentation	Crevettes <i>Artemia</i> âgées d'un jour
Aération	Aucune
Eau de dilution	Eau de ruisseau naturelle de Magela Creek
Concentrations d'essai	Minimum de 5 plus témoin
Série de dilution	0,3
Critère d'évaluation	Croissance de la population
Critères d'acceptabilité de l'essai	≥ 30 de Hydra dans chaque répliquat témoin à la fin de l'essai

### 2.6.5 Essai de reproduction sur le cladocère tempéré

Cet essai de cycle biologique partiel (trois couvées) de 7 jours consistait à exposer des néonates (âgés <24 h) de la puce d'eau tempérée *Ceriodaphnia dubia* dans un système à renouvellement statique pendant sept jours à une série de concentrations de lixiviat de résidus (USEPA, 1994). Un résumé des conditions d'essai est donné au Tableau 9. Cet essai fut effectué à SKM, Sydney.

**Tableau 9. Résumé du protocole d'essai pour l'essai de toxicité chronique à 3 couvées de *Ceriodaphnia dubia***

Type d'essai	Renouvellement statique
Durée de l'essai	Jusqu'à ce que 60% des organismes témoins survivants aient eu 3 couvées (généralement 7 jours, maximum de 8 jours)
Température	25± 1 °C
Intensité de la lumière	<800 Lux
Photopériode	16 h lumière : 8 h obscurité
Dimension de la chambre d'essai	20 mL (minimum)
Volume de la solution d'essai	18 mL (15 mL minimum)
Renouvellement de solution d'essai	Quotidiennement
Age des organismes d'essai	< 24 h
Nombre d'organismes par chambre d'essai	1
Nombre de chambres reproduites par traitement	10 (minimum)
Nombre d'organismes par traitement	10 (minimum)
Alimentation	Suspension alguaire et 'trout chow' quotidiennement
Aération	Aucune
Eau de dilution	Eau Minérale Diluée (DMW) préparée par osmose inverse ou eau désionisée (RO/DI) et 20% d'eau minérale Perrier
Concentrations d'essai	Minimum de 5 plus témoin
Série de dilution	Série de dilution ≥ 0,5
Critère d'évaluation	Survie et reproduction
Volume d'échantillon requis	5 L
Critères acceptabilité de l'essai	≥ 80% de survie parmi les témoins et une moyenne de 15 juvéniles ou plus par femelle survivante parmi les témoins. 60% des organismes témoins survivants doivent produire 3 couvées.

Les échantillons suivants furent soumis à l'essai:

- Témoins d'eau douce
- Témoins de dureté (60, 186 et 560 mg.L)
- Témoin de conductivité (1,9 mS)
- Six concentrations de lixiviat de résidus (5, 1,7, 0,56, 0,19, 0,06, 0,02%) diluées dans de l'eau douce

- KCl toxique de référence

La survie des cladocères et le nombre de néonates par femelle survivante furent déterminés sur 7 jours. Conductivité, DO, pH et température furent mesurés pendant la durée de l'essai.



## 3 RESULTATS

### 3.1 Analyses chimiques

#### 3.1.1 Lixiviat de résidus

Les propriétés physico-chimiques et les concentrations métalliques du lixiviat de résidus, après entreposage au CSIRO pendant 15 mois à 4°C, étaient similaires à ces propriétés et concentrations à son arrivée (Tableau 10). La seule exception était l'alcalinité totale (cet échantillon), qui était environ le double de alcalinité au pH 4,5 mesuré en décembre 2001.

**Tableau 10. Analyse physico-chimique du lixiviat de résidus à sa réception et après un entreposage de 15 mois à 4°C**

Paramètre	Lixiviat de résidus non filtré A l'arrivée	Lixiviat de résidus non filtré Après 15 mois d'entreposage
pH	7,04	7,4
Conductivité (mS)	20,1	20,3
Oxygène dissous (% saturation)	94	115
Salinité (‰)	12,8	12,3
Alcalinité (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	28	60
TSS (mg/L)	38	-
TDS (mg/L)	52000	-
Turbidité (NTU)	0,9	-
Ammoniac (mg-N/L)	<0,1	-
Nitrate (mg-N/L)	0,97	-
Nitrite (mg-N/L)	0,03	-
Phosphore total (mg/L)	1,5	-
Sulfate (mg/L)	19000	23000
Manganèse (mg/L)	160	160
Nickel (mg/L)	0,071	0,050
Chrome (mg/L)	0,037	0,059

Les concentrations de manganèse total et dissous du lixiviat étaient les mêmes que celles observées précédemment, par conséquent, il ne fut pas nécessaire d'ajouter du manganèse au lixiviat avant l'essai. Ceci contrastait avec les bouteilles supplémentaires de lixiviat qui furent expédiées par Inco, Canada au CSIRO en février

2003. Les concentrations de manganèse de ces échantillons étaient très variables (0,1 – 404 mg/L) par conséquent, ces échantillons ne furent pas utilisés dans le programme d'essai actuel.

Le lixiviat de résidus filtré, à utiliser dans les bioessais en eau douce, avait un pH de 7,6, une salinité de 12,3‰, une conductivité de 20 mS et un DO de 99% de saturation (Tableau 11). Après avoir subi un ajustement de salinité et une filtration pour être utilisé dans les bioessais marins, le lixiviat avait un pH de 8,1 et une salinité de 34‰. Le lixiviat de résidus avait aussi une très haute concentration de sulfate (23000 mg/L) et une grande dureté (24400 mg CaCO<sub>3</sub>/L).

**Tableau 11. Analyses physico-chimiques du lixiviat de résidus non filtré et filtré avant et après l'ajustement de salinité et de pH**

Paramètre	Lixiviat non filtré	Lixiviat filtré	Lixiviat filtré à salinité ajustée
PH	7,4	7,6	8,1
Salinité (‰)	12,3	12,3	34
Conductivité (mS)	20	20	-
Alcalinité totale (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	60	47	79
Dureté <sup>a</sup> (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	24400	24900	26400
Sulfate (mg/L)	23000	23000	24000

<sup>a</sup> Calculé en tant que  $4,11 \times [\text{Mg}] + 2,47 \times [\text{Ca}]$ .

Les concentrations métalliques du lixiviat non filtré, du lixiviat filtré et du lixiviat filtré à salinité ajustée sont indiquées au Tableau 12. Le lixiviat contenait de hautes concentrations de calcium, de magnésium et de manganèse. Les concentrations de chrome et de nickel étaient plus basses, tandis que l'arsenic, le cadmium, le plomb et le cuivre étaient en dessous des limites de détection. En général, les concentrations de métal total et dissous étaient similaires, hormis celles de l'aluminium et du fer qui étaient plus basses dans le lixiviat filtré.

**Tableau 12. Concentrations métalliques dans le lixiviat de résidus filtré et non filtré avant et après ajustement de salinité/pH**

<b>Métal (mg/L)</b>	<b>Lixiviat non filtré</b>	<b>Lixiviat filtrée</b>	<b>Lixiviat filtré à salinité ajustée</b>
Aluminium	0,025	<0,002	<0,002
Arsenic	<0,02	<0,02	<0,02
Cadmium	<0,002	<0,002	<0,002
Calcium	400	420	530
Chrome	0,038	0,038	0,043
Cobalt	0,007	0,006	0,005
Cuivre	<0,002	<0,002	<0,002
Fer	0,01	<0,002	0,009
Plomb	<0,003	<0,003	<0,003
Magnésium	5600	5800	6100
Manganèse	152	155	146
Nickel	0,044	0,047	0,047
Zinc	0,02	0,02	0,01

### **3.1.2 Lixiviat de résidus au Jour 0 des essais de toxicité marine**

Les concentrations métalliques du lixiviat de résidus non dilué au Jour 0 de chaque essai de toxicité marine sont indiquées au Tableau 13. Les concentrations métalliques étaient similaires pour tous les essais et similaires au lixiviat à salinité ajustée expédié à tous les laboratoires (Tableau 12).

**Tableau 13. Métaux présents dans le lixiviat de résidus au Jour 0 des essais de toxicité marine**

Métal	Métal (mg/L) présent dans le lixiviat de résidus (100%) au Jour 0				
	Essai de croissance microalguaire	Essai de germination microalguaire	Essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques	Essai de développement larvaire de huître	Essai de fertilisation de l'oursin comestible
Al	<0,002	<0,002		<0,002	<0,002
As	<0,02	0,017		0,018	0,016
Ca	540	550		550	550
Cd	<0,002	<0,002		<0,002	<0,002
Co	0,006	0,007		0,007	0,005
Cr	0,041	0,040		0,039	0,040
Cu	<0,002	<0,002		<0,002	<0,002
Fe	0,006	0,007		0,010	0,007
Mg	6200	6200		6300	6200
Mn	144	146		148	148
Ni	0,045	0,048		0,048	0,044
Pb	<0,003	<0,003		<0,003	<0,003
Zn	0,01	0,02		0,01	0,01

### 3.1.3 Lixiviat de résidus au Jour 0 des essais de toxicité d'eau douce

Les concentrations métalliques du lixiviat de résidus de 10% (5% pour les cladocères) au Jour 0 des essais de toxicité d'eau douce sont indiquées au Tableau 14. Les concentrations métalliques étaient similaires pour tous les essais et similaires à celles du lixiviat non ajusté expédié à tous les laboratoires (Tableau 12).

**Tableau 14. Métaux présents dans le lixiviat de résidus (10%) au Jour 0 des essais de toxicité d'eau douce**

Métal	Métal (mg/L) dans le lixiviat de résidus (10%) au Jour 0				
	Essai de croissance bactérienne	Essai de croissance microalguaire	Essai de croissance de la lentille d'eau	Essai de croissance de Hydra	Essai de reproduction <sup>a</sup> du cladocère
Al	<0,002	<0,002	0,076	0,091	<0,002
As	<0,02	<0,003	<0,003	<0,003	<0,02
Ca	46	57	26	45	50
Cd	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Co	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Cr	0,005	0,005	0,003	0,004	<0,002
Cu	<0,002	<0,002	0,002	<0,002	<0,002
Fe	<0,002	<0,002	0,15	0,17	<0,002
Mg	600	600	330	580	293
Mn	15,1	16	8,7	15,6	7,7
Ni	0,006	0,006	0,004	0,006	0,003
Pb	<0,02	<0,003	<0,003	<0,003	<0,02
Zn	0,004	0,004	0,010	0,020	0,002

<sup>a</sup> Lixiviat à 5%

## 3.2 Essais de toxicité marine

### 3.2.1 Essai d'inhibition de la croissance de *Nitzschia closterium*

La croissance de l'algue à diverses concentrations de lixiviat de résidus comparée à des témoins de sels marins artificiels ou d'eau de mer est indiquée au Tableau 15. Les données brutes et les rapports statistiques ToxCalc sont indiqués à Annexe A.

#### *Assurance qualité*

Les taux de croissance des les témoins d'eau de mer naturelle et des témoins de sels de mer artificiels étaient similaires (1,49 et 1,33 respectivement) et dans la plage normale de croissance de  $1,4 \pm 0,4$  redoublements par jour. La variabilité des témoins d'eau de mer naturelle était de 5%, indiquant acceptabilité de l'essai.

Les variations du pH sur le bioessai de 72 h étaient inférieurs à 1 unité pH, sauf pour les témoins de sels marins artificiels dans lesquels le pH augmenta de 8,0 à 9,6. Une telle augmentation n'est pas insolite car les témoins de sels marins artificiels sont mal tamponnés comparés aux échantillons naturels. Cette variation du pH n'avait aucun effet sur le taux de croissance alguaire, qui n'était pas significativement différent des témoins d'eau de mer naturelle.

Le cuivre était toxique pour l'algue, donnant un IC50 sur 72 h de 33 µg/L (95% CL de 29-37 µg/L). Ceci était similaire à la toxicité du cuivre pour les espèces tempérées (36 µg/L) dans une culture à 27°C.

#### *Essai de toxicité*

Le lixiviat de résidus était de faible toxicité pour l'algue sur 72 h, un effet significatif sur le taux de croissance étant seulement observé dans le lixiviat non dilué (inhibition de 32%). Le IC50 sur 72 h était >100% lixiviat. Des effets significatifs sur les taux de croissance ne furent pas détectables à des concentrations de 50% lixiviat et en dessous, autrement dit, le NOEC était de 50%.

Il est peu probable que la cause de cette légère toxicité ait été attribuable aux métaux, car tous les métaux étaient en dessous des concentrations connues pour causer individuellement des effets toxiques pour *Nitzschia*. L'exception était le manganèse, qui, avec le sulfate, était présent dans le lixiviat à de hautes concentrations.

**Tableau 15. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur la croissance de *Nitzschia closterium* pour une exposition de 72 h**

Echantillon/Concentration (%)	Taux de croissance alguaire		CV (%)
	Redoublements/jour	% du témoin	
Témoin	1,49	100	5,1
Témoin de sels marins artificiels	1,33	89	16
6,25	1,32	88	13
12,5	1,47	99	1,2
25	1,50	101	3,4
50	1,46	98	1,1
100 <sup>a</sup>	1,01	68	2,3
IC50 sur 72 h (%)		>100	
LOEC(%)		100	
NOEC(%)		50	

<sup>a</sup> Significativement différent du témoin à alpha=0,05 par test de Dunnett'

### 3.2.2 Essai de germination et de division cellulaire macroalguaire

L'effet du lixiviat de résidus sur la germination et la division cellulaire macroalguaire sur 48 et 72 h est indiqué au Tableau 16 et à l'Annexe B.

#### *Assurance qualité*

La germination moyenne dans les témoin d'eau de mer naturelle était de 87 et 83% dans des essais de 48 h et 72 h respectivement, indiquant acceptabilité de l'essai. La germination dans les témoins de sels marins artificiels était similaire

sur 48 h (92%) tandis que la germination après 72 h était significativement plus élevée (94%) que les témoins d'eau de mer naturelle. Tous étaient conformes aux critères acceptabilité de l'essai.

L'ammoniac toxique de référence donnait des valeurs IC50 sur 48 h et 72 h pour la germination de 1,6 mg N/L et de 1,9 mg/L respectivement, dans la plage acceptable de  $1,6 \pm 0,3$  mg N/L et  $1,9 \pm 0,3$  mg N/L sur 48 h et 72 h. Les valeurs IC50 de division cellulaire étaient similaire (1,8 et 1,3 mg N/L respectivement) sur 48 et 72 h et dans la plage acceptable de  $1,4 \pm 0,4$  mg N/L et  $1,1 \pm 0,2$  mg N/L respectivement.

Les paramètres de qualité de l'eau, y compris pH, salinité, DO et température, étaient dans les plages acceptables pour l'essai (Annexe B).

**Tableau 16. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur la germination et la division cellulaire de *Hormosira banksii* pour une exposition de 48 h et 72 h**

Echantillon/ Concentration (%)	% du témoin			
	Germination sur 48 h	Germination sur 72 h	Division cellulaire sur 48 h	Division cellulaire sur 72 h
0 (Témoin d'eau de mer naturelle)	87	83	100	100
0 (Témoin de sels marins artificiels)	92	94	95	109
0,5	85	79	113	95
1	88	68 <sup>a</sup>	101	88
6,25	84	77	83	111
12,5	82	69 <sup>a</sup>	77	96
25	78 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>	67 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>
50	68 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>
100	61 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>	41 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significativement inférieur au témoin

### *Essai de toxicité*

Le lixiviat était de faible toxicité pour la germination et la division cellulaire macroalguaire (mesurés par la longueur des rhizoïdes). Les valeurs IC50, LOEC et NOEC sont indiquées au Tableau 17. La division cellulaire était un critère d'évaluation plus sensible que la germination. Un NOEC et un LOEC fiables ne pouvaient pas être déterminés pour la germination sur 72 h en raison de la courbe concentration-réponse interrompue (Tableau 17).

**Tableau 17. Résumé de la toxicité du lixiviat pour *Hormosira banksii***

Critère d'évaluation	IC50 (%)	LOEC (%)	NOEC (%)
Germination sur 48 h	>100	25	12,5
Germination sur 72 h	>100	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
Division cellulaire sur 48 h	61 (45-77) <sup>a</sup>	25	12,5
Division cellulaire sur 72 h	80 (3-86)	25	12,5

<sup>a</sup> Limites de confiance de 95%

<sup>b</sup> NOEC et LOEC pas calculés en raison de la courbe concentration-réponse interrompue

### 3.2.3 Essai de développement larvaire de la Coquille St Jacques

L'effet du lixiviat de résidus sur le développement larvaire de la Coquille St Jacques sur 48 h est indiqué au Tableau 18 et à l'Annexe C.

**Tableau 18. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur le développement larvaire de la Coquille St Jacques sur 48 h**

Echantillon/Concentration (%)	% Larves normales
0 (Témoin d'eau de mer)	85 ± 2
0 (Témoin de sels marins artificiels)	85 ± 3
6,25	85 ± 3
12,5	85 ± 2
25	6,5 ± 5,2 <sup>a</sup>
50	0 <sup>a</sup>
100	0 <sup>a</sup>
EC50 sur 48 h	19 (18-19) <sup>b</sup>
LOEC	25
NOEC	12,5

<sup>a</sup>Significativement inférieur au témoin à p= 0,05

<sup>b</sup>Limites de confiance de 95%

#### *Assurance qualité*

Le % moyen de larves normales dans les témoins d'eau de mer naturelle et les témoins de sels marins artificiels était de 85%, >70% indiquant acceptabilité de l'essai. Les paramètres de qualité de l'eau étaient dans la plage acceptable pour l'essai.

Le cuivre toxique de référence donna un EC50 de 4 µg Cu/L sur 48 h, dans la plage 2,8-9,4 µg Cu/L, indiquant acceptabilité de l'essai.



### *Essai de toxicité*

Le lixiviat de résidus était modérément toxique pour le développement larvaire de la Coquille St Jacques, avec une inhibition complète sur 48 h à des concentrations de 50 et 100% de lixiviat. L'EC50 sur 48 h pour le développement larvaire (% normal par larve survivante) était de 19% (95% des limites de confiance de 18-19%), avec aucun effet à un lixiviat de 12,5%.

### **3.2.4 Essai de développement larvaire de huître**

L'effet du lixiviat de résidus sur le développement larvaire de huître sur 48 h est indiqué au Tableau 19 et à l'Annexe D.

#### *Assurance qualité*

Le % moyen de survie larvaire dans les témoins d'eau de mer naturelle et les témoins de sels marins artificiels était de 94% et 89% respectivement, c.à d. >70%, indiquant acceptabilité de l'essai. Le % moyen de larves normales dans les témoins d'eau de mer naturelle et les témoins de sels marins artificiels était de 81% et 86%, >70% indiquant acceptabilité de l'essai. Les paramètres de qualité de l'eau étaient dans la plage acceptable pour l'essai, avec une température de 25,5°C pendant la durée de l'essai.

Le cuivre toxique de référence donna un EC50 de 17 µg/L sur 48 h, dans la plage 13-26 µg/L, indiquant acceptabilité de l'essai.

**Tableau 19. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur le développement larvaire de huître sur 48 h**

Echantillon/Concentration (%)	% de survie larvaire	% de larves normales	% de larves normales/survivantes
0 (Témoin d'eau de mer)	94 ± 4	81 ± 6	76 ± 6
0 (Témoin de sels marins artificiels)	89 ± 4	86 ± 3	76 ± 3
6,25	87 ± 7	91 ± 2	78 ± 5
12,5	94 ± 4	81 ± 7	76 ± 4
25	81 ± 5	6,4 ± 5,8 <sup>a</sup>	5,1 ± 4,7 <sup>a</sup>
50	58 ± 5 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
100	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
EC50 48 h	52 (48-55) <sup>b</sup>	18 (17-18)	18 (17-19)
LOEC	50	25	25
NOEC	25	12,5	12,5

<sup>a</sup>Significativement inférieur au témoin à p= 0,05

<sup>b</sup> Limites de confiance de 95%

### *Essai de toxicité*

Le lixiviat de résidus était de toxicité similaire pour le développement larvaire de huître et pour le développement larvaire de la Coquille de la St Jacques, avec une inhibition complète sur 48 h à des concentrations de lixiviat de 50 et 100% . L'EC50 sur 48 h pour le développement larvaire de huître (% normal par larve survivante) était de 18% (95% des limites de confiance de 17-19%), avec aucun effet avec un lixiviat 12,5%.

### **3.2.5 Essai de fertilisation de l'oursin comestible**

L'effet du lixiviat de résidus sur la fertilisation de l'oursin comestible sur 1h est indiqué au Tableau 20 et à l'Annexe E.

#### *Assurance qualité*

Le % moyen de succès de la fertilisation dans les témoins d'eau de mer naturelle ainsi que les témoins de sels marins artificiels était de 90%, c.à d. >70%, indiquant acceptabilité de l'essai. Les paramètres de qualité de l'eau étaient dans la plage acceptable pour l'essai, avec une température de 19,5°C pendant la durée de l'essai.

Le cuivre toxique de référence donna un EC50 de 44 µg/L sur 1 h, dans la plage 25-48 µg/L, indiquant acceptabilité de l'essai.

**Tableau 20. Effet du lixiviat de résidus à salinité ajustée sur la fertilisation de l'oursin comestible sur 1 h**

<b>Concentration (%)</b>	<b>% Fertilisé</b>
0 (Témoin d'eau de mer)	90 ± 1
0 (Témoin de sels marins artificiels)	90 ± 1
6,25	91 ± 2
12,5	90 ± 2
25	91 ± 2
50	30 ± 3 <sup>a</sup>
100	0 ± 0 <sup>a</sup>
EC50 sur 1 h	45 (43-46) <sup>b</sup>
LOEC	50
NOEC	25

<sup>a</sup>Significativement inférieur au témoin à p= 0,05

<sup>b</sup> Limites de confiance de 95%

### *Essai de toxicité*

Le lixiviat de résidus était de faible toxicité pour la fertilisation de l'oursin , avec une inhibition complète à la plus haute concentration (lixiviat à 100%). L'EC50 sur

1 h était de 45% (95% des limites de confiance de 43-46%), sans aucun effet avec un lixiviat de 25%.

### **3.3 Essais de toxicité d'eau douce**

Comme la salinité du lixiviat de résidus était de 12‰, il fut impossible d'essayer un lixiviat non dilué (100%). Pour tous les essais, le lixiviat fut dilué à 10% pour le placer dans la plage admissible pour les espèces de l'essai.

#### **3.3.1 Inhibition de la croissance bactérienne**

L'effet du lixiviat de résidus sur la croissance bactérienne sur 1 h est indiqué au Tableau 21.

##### *Assurance qualité*

La densité optique moyenne à 420 nm des témoins était de 0,206, dans la plage  $0,20 \pm 0,05$  pour acceptabilité de l'essai. Le coefficient de variation des témoins était de 10%. Le cuivre toxique de référence (5 µg Cu/L) provoqua une réduction significative de la croissance des bactéries sur 48 h (54% du témoin).

La croissance bactérienne dans les témoins de conductivité (1 et 2,1 mS) n'était pas significativement différente du témoin La croissance bactérienne dans le témoin de dureté (163 mg CaCO<sub>3</sub>/L) n'était pas significativement différente du témoin doux, tandis que la croissance dans les témoins dont la dureté était la plus élevée (325 et 650 mg CaCO<sub>3</sub>/L) était stimulée de manière significative.

##### *Essai de toxicité*

Le lixiviat de résidus n'était pas toxique pour les bactéries, avec aucun effet sur la croissance bactérienne à la plus haute concentration essayée (10%). L'EC50 sur 48 h était >10%.

**Tableau 21. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance bactérienne sur 48h**

Echantillon/Concentration	Absorbance moyenne à 420nm	% du témoin	CV(%)
0 (Témoin)	0,206	100	10
<i>Témoins de dureté</i>			
163 mg CaCO <sub>3</sub> /L	0,238	116	2,2
325 mg CaCO <sub>3</sub> /L	0,272 <sup>a</sup>	132	7,7
650 mg CaCO <sub>3</sub> /L	0,345 <sup>a</sup>	167	1,6
<i>Témoins de conductivité</i>			
1,05 mS	0,219	106	0,26
2,1 mS	0,211	102	6,5
<i>Lixiviat de résidus (%)</i>			
0,1	0,233	113	7,9
0,63	0,209	101	3,8
1,25	0,215	104	4,4
2,5	0,214	104	2,6
5	0,197	96	3,3
10	0,202	98	5,1
EC50 sur 48 h		>10%	
LOEC		>10%	
NOEC		10%	

<sup>a</sup>Significativement supérieur au témoin à p= 0,05

### 3.3.2 Inhibition de la croissance de *Chlorella sp.* 12

L'effet du lixiviat de résidus sur le taux de croissance microalguaire sur 72 h est indiqué au Tableau 22 et à l'Annexe F.

#### *Assurance qualité*

Le taux de croissance moyen dans le témoins d'eau douce synthétique était de 1,54 redoublements par jour, dans la plage de croissance normale de  $1,4 \pm 0,4$  redoublements par jour, indiquant acceptabilité de l'essai. La variabilité dans le témoin d'eau douce était de 3,9%. Le cuivre toxique de référence (8,3 µg/L) provoqua une inhibition de la croissance alguaire de 24% pour une exposition de 72 h, confirmant que l'algue réagissait normalement au toxicant de référence

Le pH des témoins augmenta de 1,3 unités pH pendant la durée de l'essai. Des augmentations similaires allant jusqu'à 1 unité pH se produisirent également dans les traitements de lixiviat de résidus.

### *Essai de toxicité*

Le lixiviat de résidus était de faible toxicité pour le taux de croissance alguaire, des effets significatifs (65 - 86% des témoins) étant seulement observés à des concentrations égales ou supérieures à 2,5%. Il n'y avait aucun effet avec un lixiviat à 1,3% et le IC50 sur 72 h était >10%.

La croissance alguaire dans les témoins de conductivité était significativement inférieure aux témoins (81-87% des témoins), suggérant que la haute conductivité de échantillon aurait pu contribuer en partie à la toxicité observée du lixiviat. Les taux de croissance alguaire dans le lixiviat de résidus furent donc corrigés pour les effets de conductivité. Avec cette correction, une réduction de 20% du taux de croissance alguaire (c.à d. 80% des témoins) fut observée à la plus haute concentration de lixiviat essayée (10%).

Les taux de croissance alguaire dans les témoins de haute dureté de 163 et 326 mg CaCO<sub>3</sub>/L étaient identiques à ceux des témoins d'eau douce. Le taux de croissance était toutefois réduit dans le témoin dont la dureté était la plus élevée (651 mg CaCO<sub>3</sub>/L) à 76% du témoin. La dureté du lixiviat de résidus à 10% était toutefois beaucoup plus haute (de l'ordre de 2500 mg CaCO<sub>3</sub>/L). Avec un lixiviat à 5% de lixiviat, et une dureté de l'ordre de 1250 mg CaCO<sub>3</sub>/L, il n'y avait aucun effet significatif sur le taux de croissance alguaire, suggérant que tout effet inhibitoire potentiel dû à la haute dureté était amélioré dans le lixiviat. Il est donc peu probable que la haute dureté de échantillon ait contribué de manière significative à la toxicité du lixiviat.

**Tableau 22. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance de *Chlorella sp.* 12 pour une exposition de 72 h**

Echantillon/Conc	Cond. (mS)	Dureté <sup>a</sup> (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	Taux de croissance alguaire			CV(%)
			Doub/jour	% Témoin	% Cond. Témoin	
Témoin	0,33	80-90	1,54	100	-	3,9
Témoin de conductivité	1,9	80-90	1,33 <sup>b</sup>	87 <sup>b</sup>	-	1,5
Témoin de conductivité	3,5	80-90	1,25 <sup>b</sup>	81 <sup>b</sup>	-	0,57
Témoin de dureté	0,59	163	1,51	98	-	3,6
Témoin de dureté	1,1	326	1,55	101	-	4,6
Témoin de dureté	1,9	651	1,16 <sup>b</sup>	76 <sup>b</sup>	-	4,2
<i>Lixiviat de résidus (%)</i>						
0,1	0,34	26	1,42	93	93	7,8
0,6	0,59	156	1,53	100	101	9,3
1,3	0,81	311	1,41	92	95	7,4
2,5	1,3	622	1,33 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>	93	2,8
5	2,0	1244	1,23 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	92	2,2
10	3,5	2488	1,00 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	6,7
IC50 sur 72 h (%)			>10			
LOEC <sup>c</sup> (%)			2,5			
NOEC <sup>c</sup> (%)			1,25			

<sup>a</sup> Calculé à partir de la dureté mesurée du lixiviat à 100%

<sup>b</sup> Significativement différent du témoin à alpha=0,05 par Test de Dunnett

<sup>c</sup> Utilisant les données sans correction de conductivité

### 3.3.3 Inhibition de la croissance de la lentille d'eau

L'effet du lixiviat de résidus sur la croissance de la lentille d'eau sur 96 h est indiqué au Tableau 23 et à l'Annexe G.

#### *Assurance qualité*

Le nombre moyen de frondes dans le témoin au bout de 96 h était de 80, supérieur au critère de validité de 60 frondes. Les paramètres de qualité de l'eau étaient dans les limites normales de l'essai pour tous les traitements de lixiviat.

La croissance des frondes dans le sulfate de magnésium toxique de référence (24,5 mg/L) était 48% des témoins, indiquant acceptabilité de l'essai.

#### *Essai de toxicité*

La croissance des frondes dans les témoins de conductivité (0,75 et 3,6 mS, pour correspondre aux concentrations de lixiviat de 1% et 10%) n'était pas significativement différente du témoin normal, par conséquent, une correction de conductivité des données de lixiviat ne fut pas nécessaire

La croissance des frondes dans tous les témoins de dureté (29, 96 et 290 mg CaCO<sub>3</sub>/L) était significativement plus faible que le témoin d'eau douce, toutefois, cet effet aurait pu être influencé par le pH plus élevé des témoins de haute dureté (7,3-8,5) comparé aux témoins d'eau douce (pH 6,2).

**Tableau 23. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance de la lentille d'eau tropicale *Lemna aequinoctialis* sur 96 h**

Echantillon/Conc	Cond. (mS)	Dureté <sup>a</sup> (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	Croissance de la lentille d'eau		CV(%)
			Nombre de frondes	% Témoin	
Témoin	0,236	6	80	100	6,3
Témoin de conductivité	0,749	-	81	102	7,5
Témoin de conductivité	3,6	-	74	93	1,4
Témoin de dureté	0,367	29	68 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	3,7
Témoin de dureté	0,553	96	62 <sup>b</sup>	78 <sup>b</sup>	9,8
Témoin de dureté	1,09	290	49 <sup>b</sup>	62 <sup>b</sup>	6,2
<i>Lixiviat de résidus (%)</i>					
0,01	0,244	3,1	87	110	1,3
0,03	0,256	9,1	85	107	5,9
0,1	0,296	28	92	116	8,6
0,3	0,413	83	72	90	7,2
1	0,726	248	52 <sup>b</sup>	66 <sup>b</sup>	2,9
10	3,2	2488	32 <sup>b</sup>	41 <sup>b</sup>	15
EC50 sur 96 h (%)			5,2 (3,1 - 7,9)		
LOEC (%)			1		
NOEC (%)			0,3		

<sup>a</sup> Pour le lixiviat de résidus, la dureté fut calculée à partir de la dureté mesurée du lixiviat à 100%

<sup>b</sup> Significativement inférieur au témoin à alpha=0,05 par Test de Dunnett

Le lixiviat de résidus était de toxicité modérée pour la croissance de *Lemna*, avec un EC50 de 5,2% sur 96 h (95% des limites de confiance de 3,1 - 7,9%). Le LOEC était un lixiviat 1%, avec aucun effet sur la croissance (NOEC) avec un lixiviat à 0,3%.

### 3.3.4 Inhibition de la croissance de Hydra

L'effet du lixiviat de résidus sur la croissance de *Hydra* sur 96 h est indiqué au Tableau 24 et à l'Annexe H.

#### *Assurance qualité*

Le nombre hydroïdes intacts au bout de 96 h dans les témoins était de 47, au-dessus du critère de validité de 30 pour cet essai. Les paramètres de qualité de l'eau étaient dans les limites normales de l'essai pour tous les traitements de lixiviat.

La croissance des hydroïdes dans le sulfate de magnésium (50 mg /L) toxique de référence était 69% des témoins, légèrement supérieure à l'effet anticipé de 50%, mais dans les limites de variation normale pour une concentration d'essai.

#### *Essai de toxicité*

La croissance des hydroïdes dans les témoins de conductivité (0,48 mS, pour correspondre à la concentration de lixiviat de résidus de 1%) n'était pas significativement différente du témoin normal, toutefois, la croissance du témoin de plus haute conductivité (3,2mS pour correspondre à la conductivité du lixiviat à 10%) était significativement réduite (85% du témoin). Les données de lixiviat de résidus (10%) furent donc corrigées pour cette inhibition en raison de la conductivité (Tableau 24).

La croissance des frondes dans le témoin ayant la plus haute dureté (250 mg CaCO<sub>3</sub>/L) était légèrement mais significativement inférieure au témoin d'eau douce (89% du témoin), bien que le pH ait été similaire dans chaque traitement.

Le lixiviat de résidus était de toxicité modérée pour la croissance de *Hydra*, avec un EC50 sur 96 h de >10%. Le LOEC était un lixiviat à 0,3%, avec aucun effet sur la croissance (NOEC) avec un lixiviat à 0,1% (avec ou sans correction de conductivité).



**Tableau 24. Effet du lixiviat de résidus sur la croissance de *Hydra viridissima* sur 96 h**

Echantillon/Conc	Cond. (mS)	Dureté <sup>a</sup> (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	Taux de croissance de <i>Hydra</i>		CV(%)
			Taux de croissance	% Témoin	
Témoin	0,010	6	0,39	100	4,9
Témoin de conductivité	0,479	-	0,41	105	2,8
Témoin de conductivité	3,2	-	0,33 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	6,2
Témoin de dureté	0,111	25	0,40	105	0,71
Témoin de dureté	0,391	83	0,37	96	7,7
Témoin de dureté	0,938	250	0,34 <sup>b</sup>	89 <sup>b</sup>	3,1
<i>Lixiviat de résidus (%)</i>					
0,01	0,016	3,1	0,38	99	8,8
0,03	0,029	9,1	0,38	99	1,4
0,1	0,070	28	0,37	95	3,9
0,3	0,175	83	0,34 <sup>b</sup>	88 <sup>b</sup>	3,2
1	0,485	248	0,33 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	1,2
10	3,2	2488	0,20 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup> (62) <sup>c</sup>	14
EC50 sur 96 h (%)			>10		
LOEC (%)			0,3		
NOEC (%)			0,1		

<sup>a</sup> Calculé à partir de la dureté mesurée d'un lixiviat à 100%

<sup>b</sup> Significativement différent du témoin à alpha=0,05 par Test de Dunnett

<sup>c</sup> Avec correction pour le témoin de conductivité correspondant

### 3.3.5 Inhibition de la reproduction du cladocère

L'effet du lixiviat de résidus sur la survie et la reproduction du cladocère sur 7 jours est indiqué au Tableau 25 et à l'Annexe I.

#### *Assurance qualité*

La survie moyenne du témoin était de 90%, >80% de survie indiquant acceptabilité de l'essai. La survie moyenne dans le témoin de conductivité était de 100%. Le nombre moyen de juvéniles par femelle survivante était de 15,5 pour le témoin et 18 pour le témoin de conductivité, >15 indiquant acceptabilité de l'essai. Les paramètres de qualité de l'eau étaient dans les limites de l'essai (Annexe I).

Le KCl toxique de référence donna un EC50 de 221 µg/L, dans la plage 215-243 µg /L, indiquant acceptabilité de l'essai.

### Essai de toxicité

La survie et la reproduction du cladocère étaient légèrement supérieures dans le témoin de conductivité (1,9 mS) comparé au témoin de diluant, et les données de lixiviat de résidus furent corrigées pour cette stimulation.

La survie et la reproduction du cladocère étaient réduites à haute dureté (186 et 560 mg CaCO<sub>3</sub>/L). Cet effet était toutefois amélioré dans le lixiviat .

Le lixiviat de résidus était de toxicité aiguë modérée pour le cladocère, avec un l'EC50 de 7 jours aigu pour la survie de 5% de lixiviat. Il n'y avait aucun effet sur la survie du cladocère sur 7 jours avec un lixiviat à 1,7%.

La reproduction du cladocère, exprimée comme nombre de juvéniles par femelle survivante, n'était affectée (69% du témoin) qu'à la plus haute concentration de lixiviat de résidus testée (5%). Cette inhibition n'était pas due à la haute conductivité du lixiviat (2 mS) car le témoin de conductivité correspondant n'était pas toxique. Une fois corrigée pour tenir compte de la conductivité du lixiviat, la reproduction à cette concentration était 60% du témoin, autrement dit, l'EC50 était >5% lixiviat. Un lixiviat à 1,7% ne produisait aucun effet

**Tableau 25. Effet du lixiviat de résidus sur la survie et la reproduction du cladocère sur 7 jours**

Concentration (%)	% Survie	Nombre moyen de juvéniles/femelle survivante	Nombre moyen de juvéniles (% témoin)	% témoin de conductivité
0 (Témoin)	90	16 ± 2	100	-
0 (Témoin de conductivité 1,9 mS)	100	18 ± 3	112	100
Témoin de dureté (60 mg CaCO <sub>3</sub> /L)	89	14 ± 3	88	-
Témoin de dureté (186 mg CaCO <sub>3</sub> /L)	100	10 ± 3 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>	-
Témoin de dureté (560 mg CaCO <sub>3</sub> /L)	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	-
0,02	100	18 ± 2	112	115
0,06	100	17 ± 4	106	110
0,19	100	17 ± 4	106	109
0,56	90	16 ± 4	100	104
1,7	100	17 ± 2	106	104
5,0 (conductivité de 2 mS)	50	11 ± 3 <sup>a</sup>	69 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>
EC50 sur 48 h (%)	5	>5	>5	>5
LOEC(%)	5	5	5	5
NOEC (%)	1,7	1,7	1,7	1,7

<sup>a</sup>Significativement inférieur au témoin à p= 0,05

## 4 DISCUSSION

Un résumé de la toxicité chronique du lixiviat de résidus pour les espèces tropicales et tempérées dulcicoles et marines est donné au Tableau 26.

**Tableau 26. Toxicité chronique du lixiviat de résidus pour le biote dulcicole et marin**

Espèces	Critère d'évaluation de l'essai	Durée d'exposition (h)	LC/EC50 (%)	LOEC (%)	NOEC (%)
<b>Marines</b>					
<i>Nitzschia closterium</i>	Taux de croissance	72	>100	100	50
<i>Hormosira banksii</i>	Division cellulaire	48	61 (45-77)	25	12,5
<i>Mimachlamys asperima</i>	Développement larvaire	48	19 (18-19)	-	12,5
<i>Saccostrea commercialis</i>	Développement larvaire	48	18 (17-19)	-	12,5
<i>Heliocidaris tuberculata</i>	Fertilisation	1	45 (43-46)	-	25
<b>Dulcicoles</b>					
Bactérie non identifiée	Croissance	48	>10	>10	10
<i>Chlorella</i> sp 12	Taux de croissance	72	>10	2,5	1,3
<i>Lemna aequinoctialis</i>	Croissance	96	5,2 (3,1-7,9)	1	0,3
<i>Hydra viridissima</i>	Croissance	96	>10	0,3	0,1
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Reproduction	7 jours	>5	5	1,7

Le lixiviat à salinité ajustée était de faible toxicité pour les algues et les invertébrés marins. Sur la base des valeurs IC/EC50, le développement larvaire de huître et de la Coquille St Jacques constituaient les essais les plus sensibles, suivis par la fertilisation de l'oursin comestible et la division cellulaire macroalguaire. L'essai d'inhibition de la croissance microalguaire, le seul essai tropical marin, était l'essai le moins sensible au lixiviat de résidus.

La cause de la faible toxicité du lixiviat pour le biote marin ne fut pas identifiée, toutefois, les concentrations métalliques du lixiviat, à l'exception de manganèse, du calcium et du magnésium, étaient trop basses pour être préoccupantes du point de vue écotoxicologique. On ne sait pas si les hautes concentrations de sulfate du lixiviat auraient pu contribuer à sa toxicité, car la toxicité du sulfate pour ces espèces n'a pas été déterminée.

Le lixiviat de résidus était également de faible toxicité pour les espèces dulcicoles, avec des valeurs IC/EC50 supérieures à 5%. La croissance de la lentille d'eau

*Lemna aequinoctialis* constituait l'essai le plus sensible, suivie par la croissance de *Hydra viridissima* et la croissance microalguaire, et la reproduction du cladocère. La bactérie était insensible au lixiviat de résidus.

Vu la haute conductivité du lixiviat, il fut impossible de tester sa toxicité pour le biote dulcicole à des concentrations supérieures à 5-10%. Les conductivités du lixiviat à 10% et 5% étaient de l'ordre de 3,2mS et 1,9 mS respectivement. En utilisant des témoins de conductivité, correspondant à la conductivité du lixiviat à 5 et 10%, tout effet inhibitoire du lixiviat seulement dû à la conductivité pouvait être séparé des effets toxique éventuels des autres composantes du lixiviat.

La haute conductivité du lixiviat à 10% n'était pas responsable de l'effet inhibitoire du lixiviat sur croissance de la lentille d'eau (59% d'inhibition), ni de la toxicité du lixiviat à 5% pour la survie du cladocère (50% de mortalité) et sa reproduction (31% d'inhibition), autrement dit, certaines autres composantes du lixiviat étaient responsables de la toxicité observée. Par contraste, une partie de la toxicité observée du lixiviat à 10% pour la croissance microalguaire et la croissance de *Hydra* était due à une haute conductivité. Pour la croissance de *Chlorella* sp., environ 15% de l'inhibition de 35% observée était due à la conductivité du lixiviat, les autres 20% étant dus à un autre ou à d'autres toxicant(s). Pour la croissance de *Hydra*, environ 10% de l'inhibition de 47% observée dans le lixiviat à 10% était due à la haute conductivité du lixiviat.

Il est possible que la toxicité du lixiviat pour le biote dulcicole ait été aussi due en partie à sa haute dureté plutôt qu'à un toxicant chimique spécifique. Il s'avéra impossible de préparer suffisamment de témoins durs pour égaler la dureté du lixiviat (environ 2500 mS à un lixiviat de 10%) car les sels de calcium et de magnésium ne se dissoudraient pas à la concentration requise. Bien que des effets toxiques aient été observés dans les témoins de haute dureté (650 mg CaCO<sub>3</sub>/L), la toxicité ne fut pas observée à une dureté équivalente dans le lixiviat de résidus, suggérant que la toxicité due au calcium et au magnésium était améliorée dans le lixiviat. A l'exception du manganèse, du calcium, du magnésium et du sulfate, les concentrations d'autres inorganiques mesurés dans le lixiviat étaient en dessous des concentrations considérées préoccupantes du point de vue écotoxicologique.

#### 4.1 Calcul des dilutions "sûres" pour une décharge marine

L'ultime objectif des programmes d'essais de toxicité en laboratoire est de fournir des données permettant la prédiction des impacts dans les eaux réceptrices au-delà d'une zone de mélange définie. Deux méthodes sont utilisées ci-dessous pour extrapoler les données de bioessai (valeurs NOEC) afin de prédire les niveaux NOEC effectifs sur le terrain.

Pour la décharge du lixiviat de résidus en milieu marin, un facteur de sécurité de 10 (US EPA, 1984) peut être appliqué au NOEC (12,5%) de l'essai chronique le plus sensible (développement larvaire de huître). En utilisant cette approche, il faudrait diluer le lixiviat environ 80 fois pour être en dessous de cette valeur NOEC. Si les données de corail aiguës de l'étude précédente (Stauber et al, 2002) sont incluses, les critères d'évaluation les plus sensibles étaient la mortalité, le dépouillement tissulaire et le rendement quantique chez le corail adulte *Stylophora pistillata*, avec un NOEC de 1%. En divisant ce NOEC par un

facteur de sécurité de 10, on obtient 0,1%, autrement dit, une dilution de 1000 serait nécessaire pour minimiser l'impact sur le milieu marin.

Une telle approche est très conservatrice, dans ce sens qu'elle ne tient compte que des espèces d'essai les plus sensibles et surestime généralement le risque. Les limitations inhérentes à l'utilisation de facteurs de sécurité sont discutées en détail dans une révision de Chapman et al. (1998). Ils suggèrent que les facteurs de sécurité utilisés pour les extrapolations laboratoire-à-terrain ne devraient pas excéder 10 et pourraient même être inférieurs

Une autre technique de plus en plus utilisée pour dériver des niveaux 'sûrs' pour des produits chimiques individuels est la technique d'extrapolation des risques d'Aldenberg et Slob (1993). De telles approches statistiques basées sur le risque ont été développées au cours des dix dernières années et appliquées au développement de critères de qualité de l'eau aux Etats Unis, aux Pays Bas, en Afrique du Sud, au Danemark, en Australie et en Nouvelle Zélande. Cette approche a été également recommandée par l'OECD et a été utilisée pour dériver des valeurs guides de déclenchement pour des contaminants individuels dans les Directives ANZECC/ARMCANZ (2000) australiennes et néo-zélandaises pour la qualité de l'eau de mer et de l'eau douce, récemment révisées. La technique est basée sur les calculs d'une distribution statistique de données d'écotoxicité de laboratoire et utilise un niveau de protection prédéterminé, généralement 95%. ANZECC/ARMCANZ (2000) contient des détails supplémentaires sur la justification de cette approche.

Cette méthode utilise les données NOEC d'au moins 5 espèces (pas seulement les espèces les plus sensibles) provenant d'au moins 4 groupes taxonomiques différents et fait correspondre les données à une distribution type III Burr. Le meilleur ajustement pour les données est alors sélectionné pour calculer la concentration nocive estimée moyenne qui protégera 95% des espèces (HC5). HC5(50) est la dilution de lixiviat requise pour protéger 95% des espèces avec une confiance de 50%, autrement dit, il est 50% certain que la valeur réelle pour un effet nul ne sera pas inférieure à la valeur calculée. Cette valeur a été utilisée dans la révision des directives régissant la qualité aquatique et sédimentaire pour protéger le biota dans des milieux légèrement à modérément perturbés (ANZECC/ARMCANZ, 2000).

Il est à noter que cette technique d'extrapolation des risques est plus souvent utilisée pour calculer les valeurs des produits chimiques individuels et n'est pas encore pleinement validée pour être utilisée avec des effluents complexes. L'évaluation directe de la toxicité (DTA) des effluents (et des eaux naturelles), toutefois, est devenue de plus en plus prévalente au cours des dernières années et a été incorporée dans les règlements et dans les procédures d'agences réglementaires dans un certain nombre de pays (ANZECC/ARMCANZ, 2000). En outre, ANZECC/ARMCANZ(2000) recommande l'utilisation d'un minimum de 8 points de données pour calculer HC5. Toutefois, en l'absence de 8 essais chroniques marins appropriés en Australie, cette méthode d'extrapolation des risques est utilisée avec un minimum de 5 essais de toxicité. Si des essais chroniques et aigus sont utilisés, les valeurs aiguës doivent être d'abord ajustées aux valeurs chroniques en utilisant un rapport aigu à chronique (ACR) de 10. Malgré cela, les dilutions 'sûres' calculées par cette méthode sont généralement moins conservatrices que l'approche des facteurs de sécurité utilisée ci-dessus.

En utilisant cette procédure d'extrapolation des risques et les valeurs NOEC chroniques provenant de tous les essais marins effectués avec ce lixiviat, nous pouvons calculer HC5(50), à savoir la concentration de lixiviat qui aura un impact minimal sur 95% des espèces (avec 50% de confiance). Les valeurs NOEC des essais marins au Tableau 26 furent utilisées, ainsi que les valeurs NOEC obtenues précédemment par les essais de toxicité sur les zooxanthelles coralliennes et les colonies coralliennes adultes (Stauber et al., 2002). Celles-ci incluaient un NOEC aigu de 100% pour les dinoflagellates isolées du corail *Heliofungia actiniformis* (le critère d'évaluation était le rendement quantique photosynthétique) et un NOEC aigu de 1% pour le corail *Stylophora pistillata* adulte (les critères d'évaluations étant la mortalité, le dépouillement tissulaire et le rendement quantique). Ces deux NOEC aigus furent divisés par un ACR de 10, avant d'être utilisés avec les valeurs NOEC chroniques de l'étude actuelle dans l'extrapolation des risques.

La distribution statistique des données est indiquée à la Figure 1. Le HC5(50) était de 0,36, autrement dit, il faut diluer le lixiviat 280 fois pour produire un impact minimal sur le biote marin (95% de protection des espèces). Si l'on exclut les données de corail aiguës, une dilution 'sûre' de 1:10 est estimée dans le modèle. Noter que, comme la distribution ne s'ajuste pas très bien aux données, ces dilutions sûres devraient être considérées comme peu fiables.

#### 4.2 Calcul d'une dilution sûre pour une décharge en eau douce

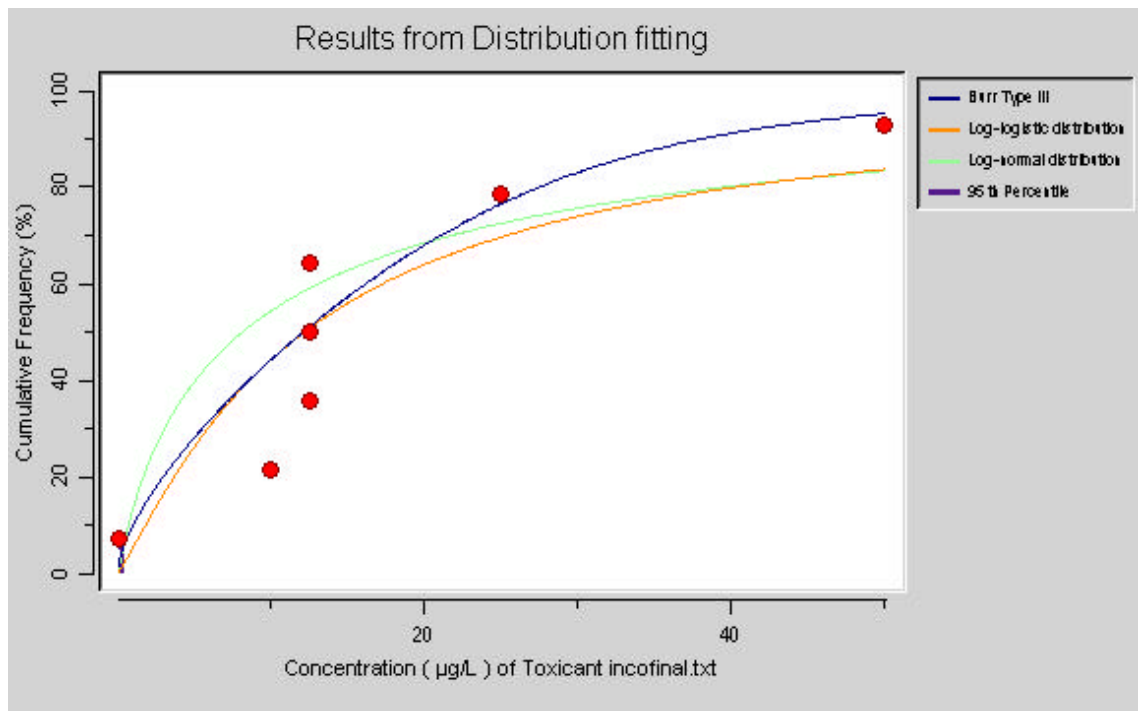
En utilisant l'approche conservatrice du facteur de sécurité et le NOEC de l'espèce dulcicole la plus sensible (*Hydra* 0,1%) du Tableau 26, une dilution de 1:10,000 est calculée comme ayant un impact minimal au cas où le lixiviat atteindrait la surface d'un plan d'eau douce. Toutefois, en utilisant méthode de distribution statistique la plus basée sur le risque (Section 4.1), une dilution plus faible est requise (Figure 2). Le HC5(50) était de 0,09, autrement dit, une dilution de lixiviat de 1:1100 est requise pour produire un impact minimal dans un milieu d'eau douce récepteur. Noter que dans ce cas d'eau douce, une excellente correspondance des données à la distribution du modèle était obtenu, par conséquent, la fiabilité de ces dilutions sûres devraient être considérée comme étant modérée

#### 4.3 Résumé - dilutions "sûres"

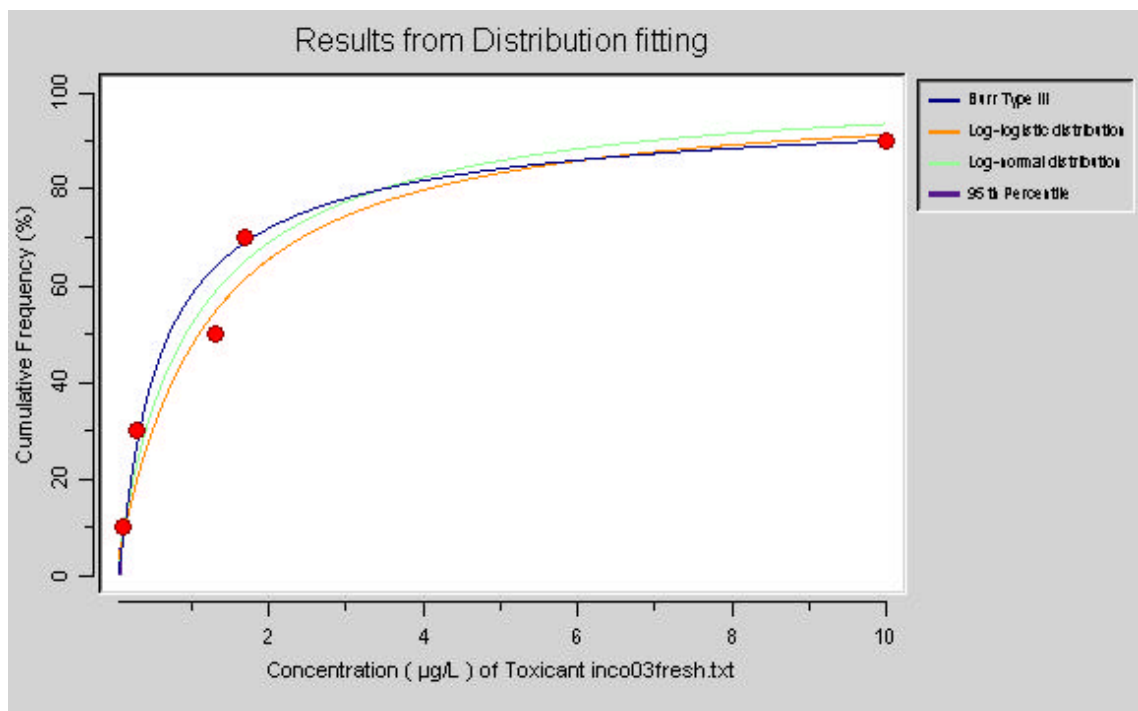
Un résumé des calculs de dilution "sûre" pour l'eau de mer et l'eau douce est donné au Tableau 27.

**Tableau 27. Dilutions sûres de lixiviat en eau de mer et en eau douce calculées à l'aide de la méthode de distribution statistique**

Milieu récepteur	Dilution de lixiviat pour une protection des espèces de 95%
Marin	280
Eau douce	1100



**Figure 1. Distribution de sensibilité des espèces pour calculer la dilution 'sûre' d'une décharge marine de lixiviat**



**Figure 2. Distribution de sensibilité des espèces pour calculer la dilution 'sûre' d'une décharge de lixiviat en eau douce**

#### 4.4 Toxicité potentielle du lixiviat de résidus sur le biote dulcicole en raison des ions majeurs

Inco avait précédemment détecté que le lixiviat contenait de fortes concentrations de sulfate de magnésium, de sulfate de calcium et de sulfate de manganèse résultant du procédé d'extraction de nickel. Certaines inquiétudes veulent que l'infiltration de ces composés dans les eaux souterraines et par conséquent dans les eaux de surface pourrait provoqué un effet néfaste sur le biote aquatique dulcicole. Les travaux de Mount et al. (1997) concernant la toxicité des ions majeurs en eaux douces notamment sur le cladocère, (*Ceriodaphnia dubia*), la puce d'eau (*Daphnia magna*) et le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), indique que la toxicité des ions majeurs est la suivante, (de la plus forte toxicité à la plus basse):



Le sodium et le calcium ne se sont pas révélés toxiques, c'est-à-dire que la toxicité des sels de calcium et de sodium était due aux anions accompagnateurs plutôt que le  $Na^+$  ou le  $Ca^+$ .

Ainsi, la concentration de sulfate, de calcium, de magnésium et de manganèse dans le lixiviat a été comparée ci-dessous avec les données de la documentation disponible concernant les effets de ces composés sur les algues, les poissons et les invertébrés d'eau douce, (Tableau 28).

**Tableau 28 Dilutions de lixiviat requises pour être au-dessous des valeurs sans effet aigu pour les ions majeurs**

Ion	Concentration dans le lixiviat en (mg/L)	Estimation NOEC pour la majorité des espèces sensibles (mg/L)	Dilution de lixiviat requise pour les valeurs sans effet aigu
Sulfate	23,000	2,000 <sup>a</sup>	1:12
Magnésium	5,600	500 <sup>a</sup>	1:11
Calcium	400	2,000 <sup>b</sup>	0
Manganèse	160	17 <sup>c</sup>	1:9

<sup>a</sup> Les valeurs NOEC estimées à partir de modèles indiquant un % de survie du cladocère (*Ceriodaphnia dubia*), de la puce d'eau (*Daphnia magna*) et du tête-de-boule (*Pimephales promelas*) à différentes concentrations ioniques.

<sup>b</sup> Estimation de la base de données USEPA Ecotox pour le sulfate de calcium.

<sup>c</sup> Valeur de déclenchement aiguë pour le biote dulcicole (Stauber et al., 2001).

Le **Sulfate** représente l'un des ions majeurs comptant parmi les moins toxiques (Mount et al., 1997). La division de la concentration de sulfate par un NOEC aigu suggère qu'une dilution de lixiviat de 1:12 suffit pour ne pas produire d'effet aigu sur le biote dulcicole. Même en autorisant un facteur de sécurité de 10, des dilutions de 1:120 devraient suffire pour empêcher toute toxicité chronique du sulfate. En outre, les travaux de Mount et al., (1997) ont démontré que la toxicité



du sulfate diminuait dans les solutions contenant d'autres cations. Ceci signifie que la toxicité du sulfate de lixiviat pourrait être encore inférieure aux estimations prévues à partir de la concentration de sulfate de lixiviat. Si de telles dilutions peuvent être obtenues dans les rivières et les cours d'eau susceptibles de recevoir des eaux interstitielles via des eaux souterraines contaminées, le sulfate n'aura probablement aucun impact sur le biote dulcicole.

Le **Magnésium** s'est révélé peu toxique pour le biote dulcicole avec des valeurs CL50 aiguës supérieures à 2,000 mg/L. En utilisant le modèle Mount, un NOEC d'environ 500 mg/L est obtenue pour les espèces les plus sensibles (*Daphnia magna*), conduisant à une dilution requise de lixiviat de 1:11 pour prévenir toute toxicité aiguë sur le biote dulcicole. Avec l'inclusion d'un facteur de sécurité de 10, une dilution du lixiviat de 1:110 devrait suffire pour ne pas produire d'effet chronique sur le biote dulcicole. Cette dilution est similaire à celle du sulfate.

Le sulfate de magnésium, utilisé comme toxicant de référence dans l'essai d'inhibition de la croissance de la lentille d'eau, provoqua un effet de 50% à 50 mg/L. Ceci pourrait être dû aux conditions très douces, légèrement acides dans les témoins en comparaison des autres espèces documentées. Toutefois, une dilution de lixiviat de 1:10, contenant de bien plus fortes concentrations (2,300 mg/L de sulfate et 580 mg de Mg/L), a donné une inhibition similaire (59%), ce qui suggère que la toxicité du sulfate de magnésium peut être améliorée dans un lixiviat de haute dureté.

Le **Calcium** ne s'est pas révélé toxique dans l'étude de Mount, avec des valeurs CL50 de sulfate de calcium (base de données de toxicité US EPA) de >2,000 mg/L, probablement en raison de la toxicité du cation de sulfate. Les concentrations de calcium dans le lixiviat sans dilution préalable étaient nettement au-dessous des concentrations susceptibles de produire un effet toxique, c'est-à-dire que le calcium ne pose pas de préoccupation potentielle au plan environnemental.

Le **Manganèse** s'était précédemment révélé peu toxique pour le biote dulcicole, (Stauber et al., 2001). Une analyse en profondeur de la documentation et du calcul d'une valeur de déclenchement en utilisant l'approche d'Aldenberg et Slob a démontré qu'une concentration Mn de 17mg/L ne produira probablement aucun effet aigu sur les organismes d'eau douce. Les effets chroniques seraient minimaux à 1.9 mg/L (Stauber et al., 2001). La base de données écotoxicologique USEPA ne propose pas de données sur la toxicité du sulfate de manganèse.

Les données ci-dessus indiquent que les dilutions de lixiviat d'environ 1:10 suffisent pour supprimer toute toxicité potentielle aiguë sur le biote dulcicole à partir des composés de sulfate de magnésium, de calcium ou de manganèse. Des dilutions d'environ 1:100 permettraient aussi de prévenir toute toxicité chronique de ces ions. A cette dilution (1:100) les concentrations de calcium, de magnésium et de manganèse seraient proches de la concentration de base de ces ions en milieu dulcicole, tandis que les concentrations de sulfate seraient d'environ 5 fois la concentration de base, (Inco Australie, pers com.) Toutefois, la toxicité du sulfate devrait diminuer en présence d'autres ions. En utilisant les données ci-dessus, en conjonction avec un contrôle régulier du sulfate et des autres ions dans les eaux souterraines et les écosystèmes dulcicoles, devrait

fournir un système de détection rapide fiable pour tout impact potentiel sur le biote dulcicole.

## 5 RESUME ET CONCLUSIONS

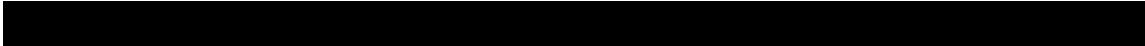
Le lixiviat de résidus était de faible toxicité pour le biote marin, et il fut estimé que des dilutions de 1:280 avaient un impact minimal sur le milieu marin. Malgré la mauvaise correspondance des données au modèle, des dilutions encore plus élevées sont généralement possibles dans les systèmes marins. Cette dilution est inférieure à la dilution plus conservatrice de 1:1000 estimée précédemment en utilisant uniquement les données coralliennes aiguës et la méthode des facteurs de sécurité (Stauber et al., 2002). En général, la fiabilité de la dilution sûre prédite augmente parallèlement au nombre de données d'essai de toxicité utilisé.

Le lixiviat de résidus était également de faible toxicité pour le biote dulcicole, toutefois, des effets toxiques subtils mais significatifs furent observés à des concentrations relativement basses de lixiviat, donnant lieu aux valeurs NOEC basses du Tableau 26. En cas d'infiltration du lixiviat (équivalent à l'eau interstitielle des résidus) dans les eaux souterraines et, par la suite, en eaux douces, une dilution substantielle (1:1100) serait nécessaire pour n'avoir aucun impact sur le biote dulcicole.

L'identification des causes de la toxicité du lixiviat pour le biote dulcicole ne rendrait pas dans le cadre de ce projet. La haute conductivité du lixiviat à pleine concentration, probablement due à sa haute concentration de sulfate, a certainement contribué partiellement à sa toxicité pour les espèces utilisées dans les essais d'eau douce. Inco Pty Ltd a indiqué précédemment que le lixiviat contenait de hautes concentrations de sulfate de magnésium, de sulfate de calcium et de sulfate de manganèse. Le sulfate de magnésium, utilisé comme toxicant de référence dans l'essai d'inhibition de la croissance de la lentille d'eau, provoqua un effet de 50% à 50 mg/L. Toutefois, une dilution de lixiviat de 1:10, qui contenait de bien plus hautes concentrations (2,300 mg/L de sulfate et 580 mg de Mg/L), provoqua une inhibition similaire (59%), ce qui suggère que la toxicité du sulfate de magnésium peut être améliorée dans un lixiviat de haute dureté.

*Comparison of the liquor sulphate, magnesium, calcium and manganese concentrations with those known to cause effects on freshwater biota, showed that dilutions of liquor of about 1:10 and 1:100 would remove potential acute and chronic toxicity due to these ions. The calculated dilutions for the liquor itself from this current round of toxicity testing of 1:1000, may be due to uncertainties in the derivation of the NOEC values or in the statistical distribution of the data used to generate the 'safe dilution'. Alternatively, the toxicity of the liquor may be due to unidentified toxicants or due to additive effects of the major ions, although amelioration rather than toxicity enhancement is usually seen in waters of high ion content.*

Il est peu probable que des essais de toxicité ultérieurs sur des espèces tropicales aiguës ou chroniques (si disponibles) changeraient sensiblement les dilutions 'sûres' estimées. L'étude actuelle, ainsi que les essais aigus précédents sur les coraux adultes, les zooxanthelles isolées, les invertébrés et les poissons dulcicoles ainsi que crevettes et alevins de perche barramundi, indiquent tous que le lixiviat est de faible toxicité pour les espèces tropicales.



## 6 REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier David Spadaro pour son assistance en matière de bioessais alguaire, Rick Krassoi et Chris Doyle (Ecotox Services Australasia) pour les bioessais sur l'huître, la Coquille St Jacques et l'oursin comestible, Christine Rees et Susan Duda (MAFRI) pour les bioessais macroalguaire, Nicola Rogers (CSIRO) pour le bioessai bactérien, Alicia Hogan et Caroline Camilleri (eriss) pour les bioessais sur la lentille d'eau et *Hydra*, et Owen Farrell (CSIRO) pour les analyses chimiques.

## 7 REFERENCES

- Aldenberger, T. and Slob, W. (1993). Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotox. Environ. Safety* 25, 48-63.
- ANZECC/ARMCANZ (2000). Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality. Australian and New Zealand Environment Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand.
- ASTM (1995). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. ASTM E-1563, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.04. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- Cleland, C.F. and Briggs, W.R. (1967). Gibberellin and CCC effects on flowering and growth in the long-day plant *Lemna gibba* G3. *Plant Physiol.* 44: 503–507.
- Davies, C.M., Apte, S.C. and Johnstone, A.L. (1998). A bacterial bioassay for the assessment of copper bioavailability in freshwaters. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 263-271.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Jones, J.G. (1970). Studies on freshwater bacteria: effect of medium composition and method of estimates of bacterial population. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 679-686.
- Kevekorde, K. & Clayton, M.N. (1996). Using developing embryos of *Hormosira banksii* (Phaeophyta) as a marine bioassay system. *Inter. J. Plant Sci.* 157, 582-585.
- Krassoi, R., Everett, D. and Anderson, I. (1996). Protocol for using doughboy scallop *Chlamys asperrima* (Mollusca:Pectinidae) L. to test the sublethal toxicity of single compounds and effluents. National Pulp Mills Research Program Technical Report 17, Canberra: CSIRO, 56 pp
- Loeblich, A.R. and Smith, V.E. (1968). *Lipids* 3, 5-13.
- Maeng, J. & Khudari, A.K. (1973). Studies on the flowering mechanism in *lemna*. I. Amino acid changes during flowering induction. *Physio. Plant* 28: 264–270.
- OECD (1984). Guideline for testing of chemicals. Alga, growth inhibition test. Test Guideline No. 201. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France, pp 1-14.
- Riethmuller, N., Camilleri, C., Hogan, A.C., Koch, A., Turley, C., King, A. and Markich, S.J. (2003). Ecotoxicological testing protocols for assessment of risks and threats to tropical Australian wetlands. Supervising Scientist Report 173, Supervising Scientist, Darwin NT.
- Simon, J. and Laginestra, E. (1997). Bioassay for testing sublethal toxicity of effluents using gametes of sea urchin *Heliocidaris tuberculata*. National Pulp Mills Research Program Technical Report No. 20, 30 pp
- Stauber, J.L., Binet, M.T. and Adams, M.S. (2000). Toxicity of tailings liquor to tropical marine and freshwater biota. CSIRO Energy Technology Investigation Report No. ET/IR 327R, 33 pp.

- Stauber, J.L., Jones, R.J., Binet, M.T. and King, C.K. (2002). The effect of nickel processing waste liquor on corals and their symbiotic dinoflagellates. CSIRO Energy Technology Investigation Report No. ET/IR474R, 34 pp.
- Stauber, J.L., Tsai, J., Vaughan, G.T., Peterson, S.M. and Brockbank, C.I. (1994). Algae as indicators of toxicity of effluent from bleached eucalypt pulp mills. National Pulp Mills Research Program Technical Report 3, Canberra: CSIRO, 146 pp.
- Thompson, A.S., Rhodes, J.C. and Pettman, I. (1988). Culture collection of algae and protozoa catalogue of strains. Natural Environmental Research Council, Swindon, UK.
- USEPA (1994). Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. 3rd edition, EPA-600-4-91-002. US Environmental Protection Agency.