

INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
DES PECHES MARITIMES
La Noë - Route de la Jonelière

B. P. n° 1049

44037 NANTES CEDEX

IPM.3 Pollutions

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'EFFLUENT THANN ET MULHOUSE

VIS-A-VIS D'ORGANISMES MARINS

par

Patrick LASSUS et Pierre MAGGI

Nantes, le 31 décembre 1973

69 (0.3.1)

INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
DES PECHES MARITIMES
La Noë - Route de la Jonelière

B. P. n° 1049

44037 NANTES CEDEX

IPM.3 Pollutions

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'EFFLUENT THANN ET MULHOUSE

VIS-A-VIS D'ORGANISMES MARINS

par

Patrick LASSUS et Pierre MAGGI

Nantes, le 31 décembre 1973

S O M M A I R E

- - - -

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'EFFLUENT THANN ET MULHOUSE

VIS-A-VIS D'ORGANISMES MARINS

- - - - -

I - GENERALITES	1
II - ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE	4
A - Toxicité directe sur différents organismes benthiques et nectoniques	4
1 - Méthode expérimentale	4
2 - Résultats et discussion	5
a) Mollusques	5
b) Crustacés et poissons	7
B - Toxicité directe sur quelques organismes zooplanctoniques	8
1 - <u>Artemia salina</u>	8
2 - Larves de <u>Carcinus maenas</u> au stade I	10
3 - Larves de <u>Palaemon serratus</u> au stade II	12
C - Toxicité directe sur 4 espèces phytoplanctoniques ..	13
1 - Choix des espèces	14
2 - Résultats et discussion	15
a) <u>Phaeodactylum tricornutum</u>	15
b) <u>Skeletonema costatum</u>	17
c) <u>Isochrysis galbana</u>	17
d) <u>Dunaliella tertiolecta</u>	17
3 - Conclusion	19

./.....

III - ETUDE DE LA TOXICITE A L'EGARD DU DEVELOPPEMENT LARVAIRE	20
A - Action de dilutions de l'effluent sur le développement larvaire de <u>Palaemon serratus</u>	20
1 - Expérience préliminaire	20
2 - Expérimentation sur des larves isolées	23
B - Action de dilutions de l'effluent sur le développe- ment larvaire de <u>Portunus puber</u>	25
IV - ETUDE DE LA TOXICITE INDUITE	27
A - Accumulation de métaux par le phytoplancton	28
1 - Accumulation du fer	28
a) Méthode générale de séparation des formes chimiques du fer	30
b) Résultats et discussion	31
2 - Accumulation du zinc, du cuivre et du cadmium	32
B - Accumulation de métaux par l'intermédiaire d'une chaîne pélagique	34
1 - Mode opératoire	34
a) Echelon phytoplanctonique	35
b) Echelon zooplanctonique	35
c) Echelon nectonique	35
2 - Résultats et discussion	36
a) <u>Artemia salina</u>	36
b) <u>Gasterosteus aculeatus</u>	37
3 - Conclusion	38
V - CONCLUSIONS GENERALES	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45

=====

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'EFFLUENT THANN ET MULHOUSE

VIS-A-VIS D'ORGANISMES MARINS

par

Patrick LASSUS et Pierre MAGGI

I - GENERALITES

L'échantillon reçu se présente sous forme d'une liqueur acide (pH = 0,6) composée, après 30 minutes de décantation, d'un surnageant vert olive et d'une boue insoluble.

Nous avons réalisé, lors de nos expériences, une série de dilutions en eau de mer qui sont reproduites dans le tableau 1, accompagnées des teneurs en fer correspondantes ainsi que des valeurs initiales du pH.

DILUTIONS	TENEURS EN FER (mg/l)	pH INITIAUX
1/3 000	4,4	7,0
1/2 000	6,3	6,7
1/1 000	12,5	6,3
1/ 500	25,0	5,7
1/ 250	50,0	3,4

Tableau 1 : Concentrations en fer et pH initiaux correspondant aux différentes dilutions de l'effluent en eau de mer.

./...

Afin de faire la part entre la toxicité propre au pH bas et celle pouvant être attribuée à la charge en métaux, nous avons testé lorsque c'était possible les effets d'une solution acide de référence aux mêmes pH que l'effluent dilué.

Nous avons évalué la neutralisation progressive de l'effluent et d'une solution d'acide sulfurique diluée dans l'eau de mer. Ces résultats sont exprimés dans les tableaux 2 et 3.

		DILUTIONS DE L'EFFLUENT				
		1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000
EVOLUTION DU pH EN 4 JOURS	0	3,4	5,7	6,3	6,7	7,0
	1	3,4	6,5	7,3	7,5	7,7
	2	3,4	7,2	7,7	7,8	7,9
	3	3,4	7,3	7,8	7,9	7,9
	4	3,4	7,4	7,8	7,9	7,9

Tableau 2 : Evolution du pH au cours du temps pour les différentes dilutions de l'effluent en eau de mer.

		DILUTIONS D'UNE SOLUTION N DE H ₂ SO ₄				
		N/100	N/200	N/300	N/400	N/500
EVOLUTION DU pH EN 4 JOURS	0	2,5	3,4	5,5	5,8	6,1
	1	2,5	3,4	6,5	6,8	7,2
	2	2,5	3,4	7,3	7,4	7,6
	3	2,5	3,4	7,4	7,6	7,7
	4	2,5	3,4	7,5	7,7	7,8

Tableau 3 : Evolution du pH au cours du temps pour les différentes dilutions d'une solution d'acide sulfurique 1 N, en eau de mer.

Les taux de mortalité enregistrés dans les différents organismes testés pourront être attribués à différents facteurs. Nous retiendrons principalement les suivants :

- l'acidité initiale dont la neutralisation est plus ou moins rapide,
- la charge en sulfate ferreux,
- la teneur en autres métaux.

Les organismes testés sont issus de divers biotopes marins, tels que le benthos et le pelagos, ce dernier comprenant des individus représentant le plancton et le necton.

Nous avons ainsi utilisé :

des mollusques :

Mytilus edulis (moule)
Cardium edule (coque)
Gibbula umbilicalis (gibbule)
Purpura lapillus (pourpre)
Littorina littorea (bigorneau)

des crustacés :

Palaemonetes varians (crevette)
Clinabarius misanthropus (bernard l'ermite)

des poissons :

Gasterosteus aculeatus (épineche)
Anguilla anguilla (anguille)

des organismes zooplanctoniques :

Artemia salina (artémie)
 larves de Carcinus maenas (crabe vert)
 larves de Palaemon serratus (crevette bouquet)
 larves de Portunus puber (crabe étrille)

des espèces phytoplanctoniques :

Phaeodactylum tricornutum
Skeletonema costatum
Isochrysis galbana
Dunaliella tertiolecta

L'ensemble de ce travail se décompose en trois parties :

L'étude de la toxicité aiguë

- A - Toxicité directe sur différents organismes benthiques et nectoniques
- B - Toxicité directe sur quelques organismes zooplanctoniques
 - 1 - Artemia salina
 - 2 - Larves de Carcinus maenas au stade I
 - 3 - Larves de Palaemon serratus au stade II
- C - Toxicité directe sur quatre espèces phytoplanctoniques
 - 1 - Phaeodactylum tricornutum
 - 2 - Skeletonema costatum
 - 3 - Isochrysis galbana
 - 4 - Dunaliella tertiolecta

L'étude de la toxicité à l'égard du développement larvaire

- A - Action sur le développement de Palaemon serratus
- B - Action sur le développement de Portunus puber

L'étude de la toxicité induite

- A - Accumulation de métaux par le phytoplancton
- B - Accumulation de métaux par l'intermédiaire d'une chaîne pélagique

II - ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE

A - Toxicité directe sur différents organismes benthiques et nectoniques

1 - Méthode expérimentale

Les animaux testés ont été récoltés dans le milieu marin en des endroits non pollués. Ils ont été utilisés après 24 heures de stabulation.

Pour chaque dilution d'effluent nous avons utilisé 10 animaux placés dans 2 l de milieu contenus dans des cristallisoirs en verre de 4 l. Aucune nourriture n'était ajoutée au milieu pendant les 4 jours d'expériences.

Une aération constante était assurée en permanence à l'intérieur des cristallisoirs.

Chaque jour les individus morts étaient prélevés ; ils étaient comptabilisés après 48 et 96 heures.

2 - Résultats et discussion

a) Mollusques : les pourcentages de mortalité exprimés après 48 et 96 heures sont réunis dans le tableau 4

		DILUTIONS DE L'EFFLUENT				
		1/3000	1/2000	1/1000	1/500	1/250
Cardium edule	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	50
Mytilus edulis	48 h	0	0	0	0	50
	96 h	0	0	0	0	60
Purpura lapillus	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	0
Littorina littorea	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	0
Gibbula umbilicalis	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	100

Tableau 4 : Pourcentages de mortalité à 48 et 96 heures pour différents mollusques exposés à des dilutions de l'effluent.

La mortalité a été également relevée pour les mêmes espèces exposées à différents taux d'acidité. Nous avons pour cela réalisé des dilutions, en eau de mer, d'acide sulfurique 1 N afin de retrouver des valeurs de pH comparables à celles de l'effluent dilué. Les résultats sont exprimés dans le tableau 5 (page 6).

./.....

		DILUTIONS D'UNE SOLUTION N DE H ₂ SO ₄				
		N/500	N/400	N/300	N/200	N/100
Cardium edule	48 h	0	0	0	0	30
	96 h	0	0	0	20	60
Mytilus edulis	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	0
Purpura lapillus	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	20
Littorina littorea	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	0
Gibbula umbilicalis	48 h	0	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0	10

Tableau 5 : Pourcentage de mortalité à 48 et 96 heures pour différents mollusques exposés à des dilutions d'une solution 1 N d'acide sulfurique.

Les tableaux 4 et 5 montrent que les mollusques résistent bien à l'acidification du milieu sauf pour les valeurs les plus basses qui manifestent une certaine nocivité. Des pH aussi bas que 3,4 pour l'effluent ne montrent qu'une faible mortalité pour la plupart des espèces testées. Dans le cas des dilutions de la solution sulfurique, pour des valeurs comparables de l'acidité, les mortalités sont moindres.

Il faut cependant remarquer, pour les faibles dilutions que, si les valeurs de pH restent stables en eau de mer (cf. tableaux 2 et 3, page 2), ce n'est pas le cas lorsqu'on y ajoute des mollusques : on constate alors, en 4 jours, une évolution vers des valeurs voisines de 7,6. On comprend ainsi pourquoi ces animaux, qui peuvent momentanément s'isoler d'un milieu hostile, parviennent à supporter de telles variations. Nous verrons qu'il n'en est pas de même avec des crustacés et des poissons qui, à l'opposé, sont très affectés par des pH acides.

b) Crustacés et poissons : le protocole expérimental reste identique, de même que l'expression des résultats. Nous avons groupé dans le tableau 6 les pourcentages de mortalité obtenus tant pour l'effluent dilué que pour la référence-acide.

Nous notons tout d'abord que le bernard l'ermite ne montre aucune mortalité pour les dilutions les plus faibles de l'effluent et de sa référence.

En ce qui concerne les autres animaux testés la mortalité est totale aux dilutions 1/250 de l'effluent et 1/200 de la référence-acide, soit pour un pH de 3,4 dans les deux cas.

		E S P E C E S T E S T E E S							
		Palaemonetes		Clinabarius		Gasterosteus		Anguilla	
		varians		misanthropus		aculeatus		anguilla	
		48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
THANN ET MULHOUSE	1/3000	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/2000	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/1000	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/500	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/250	100	100	0	0	100	100	100	100
H ₂ SO ₄ 1 N	N/500	0	0	0	0	0	0	0	0
	N/400	0	0	0	0	0	0	0	0
	N/300	0	0	0	0	0	0	0	0
	N/200	100	100	0	0	100	100	100	100

Tableau 6 : Pourcentages de mortalité à 48 et 96 heures pour 2 crustacés et 2 poissons exposés à des dilutions de l'effluent et d'une référence-acide.

Il ressort de tout ceci que, pour les poissons et les crustacés testés, le seuil faisant apparaître 50 % de mortalité est compris entre les dilutions 1/500 et 1/250 de l'effluent et est induit de façon prépondérante par l'acidité.

•/.....

B - Toxicité directe sur quelques organismes zooplanctoniques

1 - Artemia salina

Le processus expérimental reste le même, excepté le volume de solution : on comptait 2 récipients contenant 500 ml de milieu contaminé par dilution et 12 artémies adultes chacun.

Les résultats sont exprimés à la fois pour l'effluent dilué et pour la référence-acide, en pourcentages de mortalité à 48 et 96 heures. C'est ce qui est représenté dans les tableaux 7 et 8 (pages 8 et 9).

		DILUTIONS DE L'EFFLUENT				
		1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000
Teneurs en fer (mg/l)		50,0	25,0	12,5	6,3	4,4
Pourcentage de mortalité	48 h	100	56	16	12	2
	96 h	100	80	16	12	2
Evolution du pH en 4 jours	0	3,4	5,7	6,3	6,7	7,0
	1	3,4	6,5	7,3	7,5	7,7
	2	3,4	7,2	7,7	7,8	7,9
	3	3,4	7,3	7,8	7,9	7,9
	4	3,4	7,4	7,8	7,9	7,9

Tableau 7 : Pourcentages de mortalité d'Artemia salina en fonction de la dilution de l'effluent Thann et Mulhouse.

On constate que les dilutions minimales, pour lesquelles aucune nocivité n'est observée, correspondent au 1/1000 (pH 6,3 au temps 0 et 7,8 au 4ème jour) et N/400 (pH 5,8 au temps 0 et 7,7 au 4ème jour).

Il ressort de l'ensemble des résultats que l'acidité seule est moins néfaste, pour la survie d'Artemia salina, que la même acidité obtenue par dilution de l'effluent ; en effet pour des pH très voisins (5,7 et 5,8) la mortalité est nulle pour la solution d'acide sulfurique alors qu'elle est de 16 et 38 % dans le cas de l'effluent.

./.....

		DILUTIONS D'UNE SOLUTION N DE H ₂ SO ₄				
		N/100	N/200	N/300	N/400	N/500
Pourcentage de mortalité	48 h	100	100	25	0	0
	96 h	100	100	34	0	0
Evolution du pH en 4 jours	0	2,5	3,4	5,5	5,8	6,1
	1	2,5	3,4	6,5	6,8	7,2
	2	2,5	3,4	7,3	7,4	7,6
	3	2,5	3,4	7,4	7,6	7,7
	4	2,5	3,4	7,5	7,7	7,8

Tableau 8 : Pourcentages de mortalité d'Artemia salina en fonction de la dilution d'une solution normale d'acide sulfurique.

Ainsi donc, l'examen de ces résultats démontrerait l'intervention d'un facteur supplémentaire dans les mortalités constatées ; ce facteur pourrait être le fer particulaire présent dans le milieu. Le rôle du fer en tant que gêne physique est confirmé par l'examen des individus morts qui présentent des particules ferriques sur leurs appendices ainsi que dans leur tractus digestif.

Par ailleurs, des tests de toxicité sur Artemia salina réalisés par WISELY et BLICK (1967) tendent à montrer d'une part une certaine tolérance aux pH bas (5,0) et, d'autre part une grande résistance à des métaux lourds (mercure, cuivre et zinc).

Notons que les teneurs correspondant aux DL₅₀ trouvées par ces auteurs, pour ces différents éléments, sont très supérieures à celles que nous obtenons dans les dilutions les plus faibles de l'effluent testé.

Il semble donc que, dans l'état actuel de nos travaux, nous ne puissions pas affirmer l'influence des métaux lourds dans les mortalités d'Artemia salina et que nous soyons conduits à envisager une certaine importance du fer particulaire en tant que gêne physique.

Par ailleurs des effets synergiques, entre les divers métaux et l'acidité de l'effluent, ne sont pas à écarter.

2 - Larves de Carcinus maenas au stade I

Les larves ont été séparées dès l'éclosion et groupées dans des cristallisoirs de 4 l contenant de l'eau de mer filtrée.

Les individus étaient ensuite pipetés séparément et placés, à raison de 5 pour 10 ml de milieu, dans des cristallisoirs de 20 ml contenant les différentes dilutions de l'effluent ; on comptait 5 cristallisoirs par dilution.

Les tests sur Carcinus maenas étant les premiers que nous ayons menés sur des larves de décapodes, les conditions expérimentales diffèrent légèrement de celles des tests suivants ; le milieu est resté inchangé pendant 3 jours.

Chaque jour, les zoés mortes étaient comptées et prélevées. On ajoutait alors au milieu des oeufs d'artémies deshydratés ainsi que 0,2 à 0,5 ml de cultures phytoplanctoniques centrifugées à 2500 tours/mn pendant 10 minutes. De cette façon, la dilution du milieu n'était pratiquement pas modifiée.

Nous avons testé ainsi des dilutions de l'effluent ainsi que celles d'une solution faiblement acide renfermant la même concentration en fer (12,5 g/l).

Les valeurs du pH au temps 0, pour chaque dilution, sont données dans le tableau 9.

	D I L U T I O N S					
	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000
THANN ET MULHOUSE	3,4	5,7	6,3	6,7	7,0	7,2
REFERENCE EN FER	3,7	6,6	6,8	7,1	7,3	7,7

Tableau 9 : Valeur du pH au temps 0 pour les différentes dilutions, en eau de mer, de l'effluent et de sa référence en fer.

La figure 1 (page 11) donne les pourcentages de survie des stades I de Carcinus maenas exposés aux différentes dilutions des solutions testées pendant 3 jours. ./.....

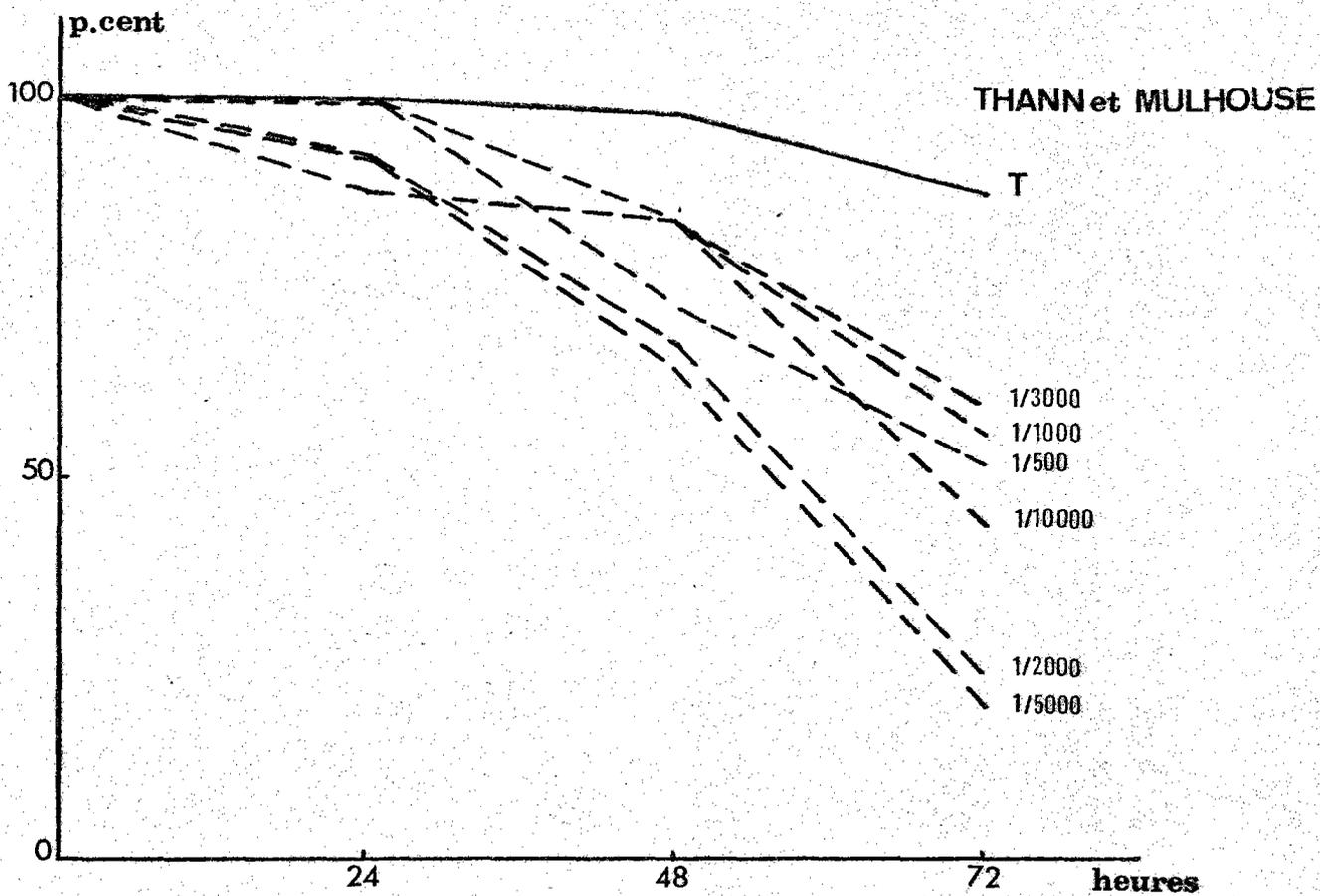
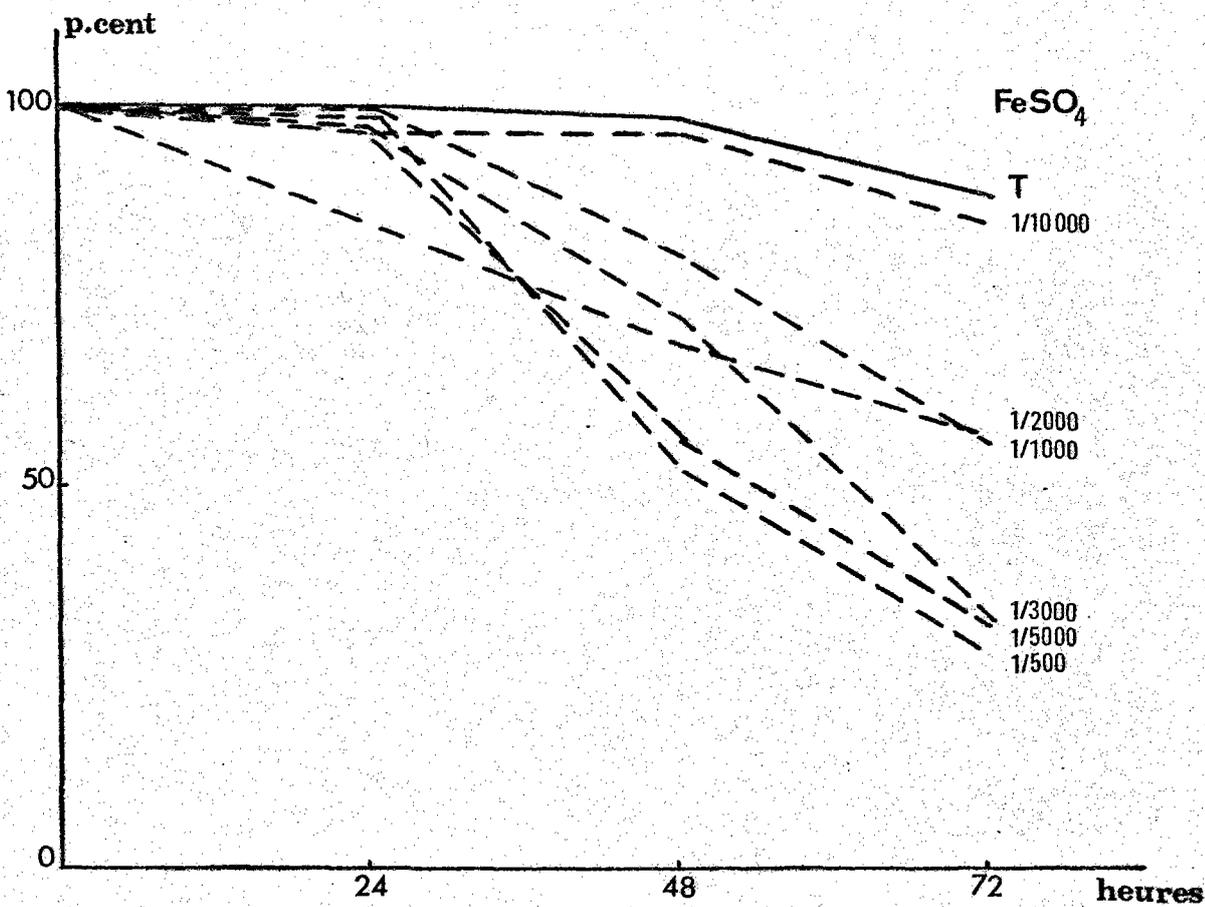


Fig.1: Carcinus maenas : pourcentages de survie des Zoés I



On peut remarquer tout d'abord qu'au bout de 72 heures la survie du témoin n'est pas totale puisque l'on constate une faible mortalité, soit 12 % de l'ensemble des individus. Néanmoins, pour toutes les dilutions testées les pourcentages de survie sont inférieurs au témoin, aussi bien pour le rejet que pour sa solution de référence.

Notons que l'on obtient, pour toutes les dilutions des deux solutions, une mortalité supérieure au témoin mais non proportionnelle à la teneur en effluent.

Les larves prélevées après 3 jours montraient presque toutes une forte adsorption d'hydrate de fer en particulier sur les épines rostrales et au niveau des appendices ; cette adsorption est très variable d'un individu à l'autre pour une même dilution.

Ainsi il semble que l'état physique des particules intervienne, soit en interférant avec la nutrition des organismes, soit en entravant leur mobilité, puisque les résultats obtenus avec l'effluent et sa solution en sulfate ferreux sont pratiquement identiques.

On peut donc envisager, pour ce type de milieu chargé en fer particulaire, des réponses très variables d'un individu à l'autre, ce qui ne permet pas de situer de façon précise le niveau de toxicité du polluant.

3 - Larves de Palaemon serratus au stade II

Les mêmes dilutions de l'effluent et de sa référence en fer ont été testées pour les stades II de Palaemon serratus. Les milieux étaient renouvelés tous les deux jours, et la nourriture consistait en nauplii d'artémies fraîchement éclos.

Les pourcentages de survie sur quatre jours sont indiqués dans le tableau 10 (page 13).

./.....

	24 h	48 h	72 h	96 h
1/5000	100	100	90	90
1/3000	95	95	85	85
1/2000	100	100	95	80
THANN ET MULHOUSE				
1/1000	100	100	80	70
1/500	100	100	85	70
1/250	0	0	0	0
1/5000	100	100	89	80
1/3000	100	100	100	85
1/2000	100	100	100	85
REFERENCE EN FER				
1/1000	100	100	100	85
1/500	100	100	94	70
1/250	0	0	0	0

Tableau 10 : Pourcentage de survie des larves de Palaemon serratus pour les différentes dilutions de l'effluent et sa référence en fer.

Les mortalités, à la dilution 1/250, sont dues à l'acidité du milieu ; en ce qui concerne les autres dilutions, les réductions de survie enregistrées sont probablement dues à des facteurs dépendant des conditions expérimentales, en l'occurrence le cannibalisme intraspécifique des larves ; lorsque les mues ne sont pas synchrones, l'individu physiologiquement affaibli sert de proie à ses congénères.

C - Toxicité directe sur 4 espèces phytoplanctoniques

Nous avons suivi la multiplication cellulaire de cultures entreposées dans une salle isotherme dont la température ambiante est $20^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.

Elles sont soumises à des périodes alternées, d'éclairement et d'obscurité, égales à 12 heures.

./....

Les dilutions sont effectuées en eau de mer filtrée sur membrane "Millipore" de 0,22 μ et enrichie en milieu E. S. de PROVASOLI.

On ensemence 10 ml de dilution d'effluent par 0,5 ml d'un inoculum prélevé en cours de croissance exponentielle sur une souche stérile.

Le nombre de cellules présentes dans le milieu après ensemencement est voisin de 250 000 par ml.

Pour chaque expérimentation, on prépare 4 tubes par dilution et 6 tubes témoins.

La densité optique des cultures est mesurée à 530 nm tous les deux jours pendant huit jours.

La croissance cellulaire est exprimée par l'augmentation de la densité optique des cultures en fonction du temps.

On en déduit, pour les différentes dilutions d'effluent, les pourcentages de réduction de croissance par rapport aux cultures témoins, au bout de huit jours.

1 - Choix des espèces

Les quatre espèces phytoplanctoniques testées ont des caractères biologiques communs. Elles sont généralement euryhalines, thermophiles, et présentent une aire de répartition assez large. Nous avons retenu :

2 flagellés :

- Isochrysis galbana : classe des Haptophyceae, ordre des Isochrysidales,
- Dunaliella tertiolecta : classe des Chlorophyceae, ordre des Volvocales,

2 diatomées :

- Phaeodactylum tricornutum : classe des Bacillariophyceae,
ordre des Bacillariales,
- Skeletonema costatum : classe des Bacillariophyceae.

2 - Résultats et discussion

Les dilutions testées étaient de : 1/3000 - 1/2000 - 1/1000 et 1/500.

La proportion d'effluent dans le milieu est exprimée en terme de dilution dans du milieu de culture E. S. de PROVASOLI qui contient certains sels influant à la fois sur la valeur du pH et sur la teneur en fer. Ce milieu inclut en effet, sous forme de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,68 mg/l de fer supplémentaire.

Les teneurs en fer ainsi que les valeurs initiales du pH sont données, pour chaque dilution, dans le tableau 11.

		pH INITIAL	TENEURS EN FER (mg/l)
	1/250	4,1	50,0 + 0,68
	1/500	6,1	25,0 + 0,68
DILUTIONS	1/1000	6,7	12,5 + 0,68
	1/2000	7,4	6,3 + 0,68
	1/3000	7,9	4,4 + 0,68

Tableau 11 : Concentrations en fer et pH initiaux correspondent aux différentes dilutions de l'effluent dans le milieu E. S. de PROVASOLI.

a) Phaeodactylum tricornutum (fig. 2 page 16)

Aux dilutions 1/3000 et 1/2000, on note peu de différence de croissance par rapport au témoin. Au 1/1000, la réduction est faible (9 %) ; au 1/500 elle est de 32 %.

La DL_{50} est donc inférieure à la dilution 1/500 ; il faut cependant remarquer que le pH, voisin de 6 au temps 0, évolue rapidement vers la neutralité.

./.....

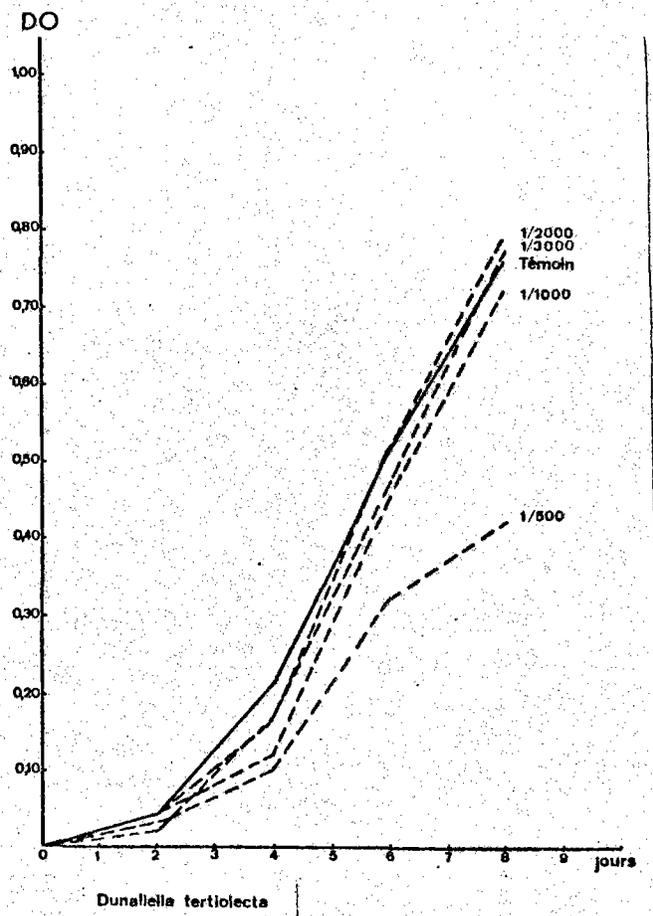
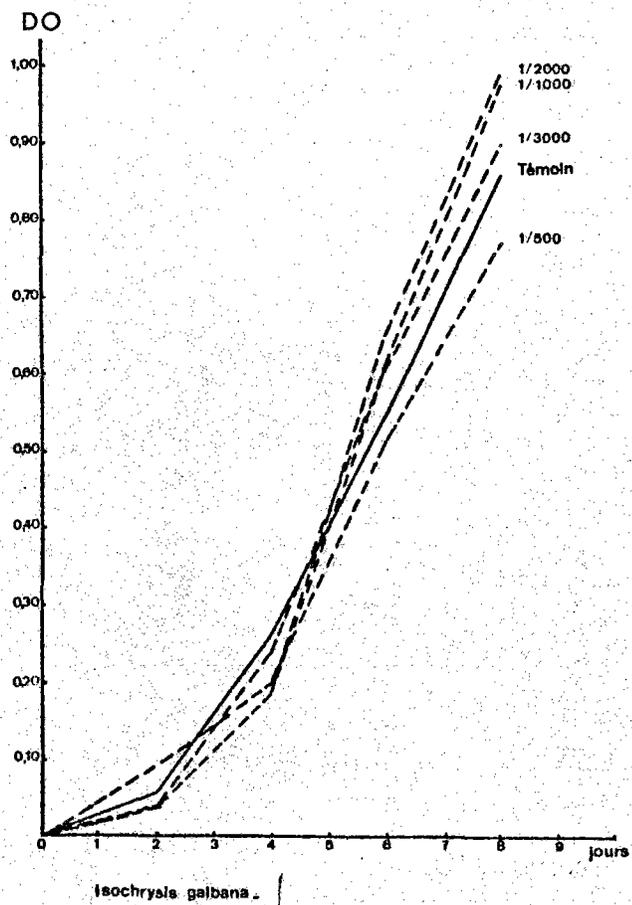
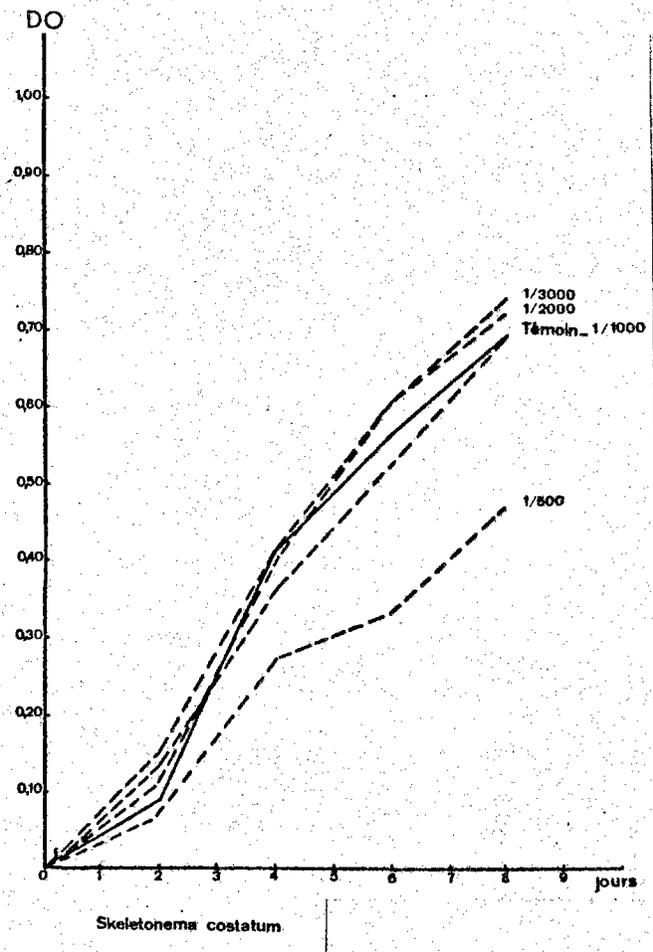
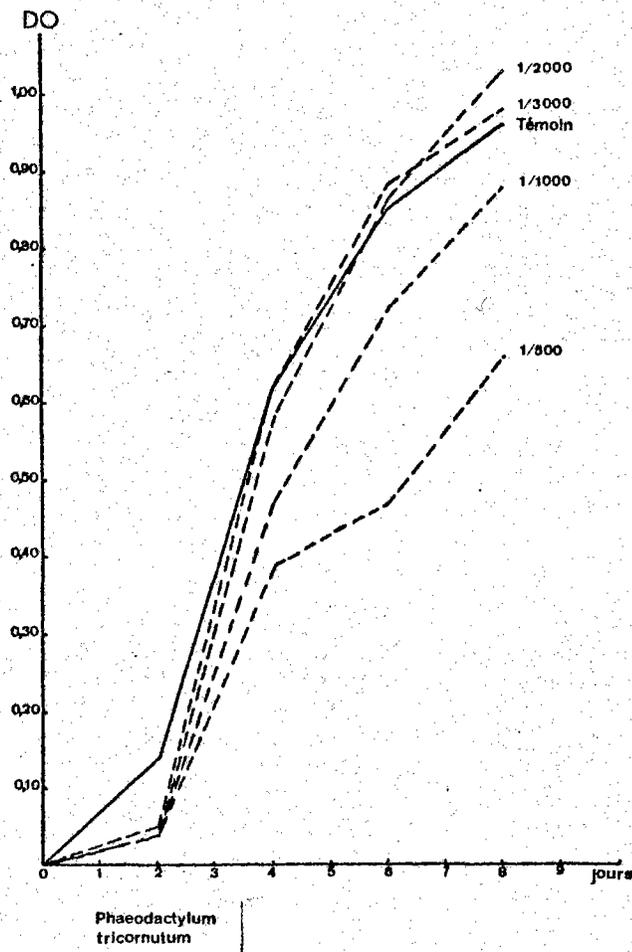


Fig. 2 : Courbes de croissance de 4 espèces phytoplanctoniques aux différentes dilutions de l'effluent Thann et Mulhouse.

b) Skeletonema costatum (fig. 2 page 16)

Les dilutions 1/3000, 1/2000 et 1/1000 ne présentent pas de variations significatives de croissance par rapport à la culture témoin. Au 1/500 la réduction de croissance est de 32 % comme pour Phaeodactylum tricorutum.

c) Isochrysis galbana (fig. 2 page 16)

Pour les dilutions supérieures au 1/1000 on ne constate pas d'effet toxique mais, au contraire, une multiplication cellulaire plus importante que celle du témoin.

La réduction de croissance, au 1/500, est de 11 %.

d) Dunaliella tertiolecta (fig. 2 page 16)

Les résultats sont ici comparables à ceux obtenus avec les diatomées : aux 1/3000, 1/2000 et 1/1000, il n'y a pas de différence notable avec le témoin ; au 1/500 la réduction de croissance est de 45 %.

Ces résultats font apparaître une légère amélioration de la croissance pour les dilutions maximales. La DL_{50} n'est pas atteinte au 1/500 où la réduction de croissance varie entre 11 et 45 %.

Les résultats obtenus pour les 4 espèces testées ont été rassemblés dans la figure 3 (page 18). Pour plus de commodité les différentes dilutions de l'effluent ont été exprimées par leurs concentrations en fer ; à ces dernières ont été associés les pourcentages de réduction de croissance et les valeurs des pH initiaux correspondants.

L'examen de ces diagrammes nous permet de constater que l'augmentation du pourcentage de réduction de croissance est en relation étroite avec l'abaissement des valeurs du pH.

Les DL_{50} ne sont jamais atteintes mais semblent très proches des dilutions pour lesquelles le pH initial est voisin de 6 et les teneurs en fer supérieures à 25 mg/l.

./.....

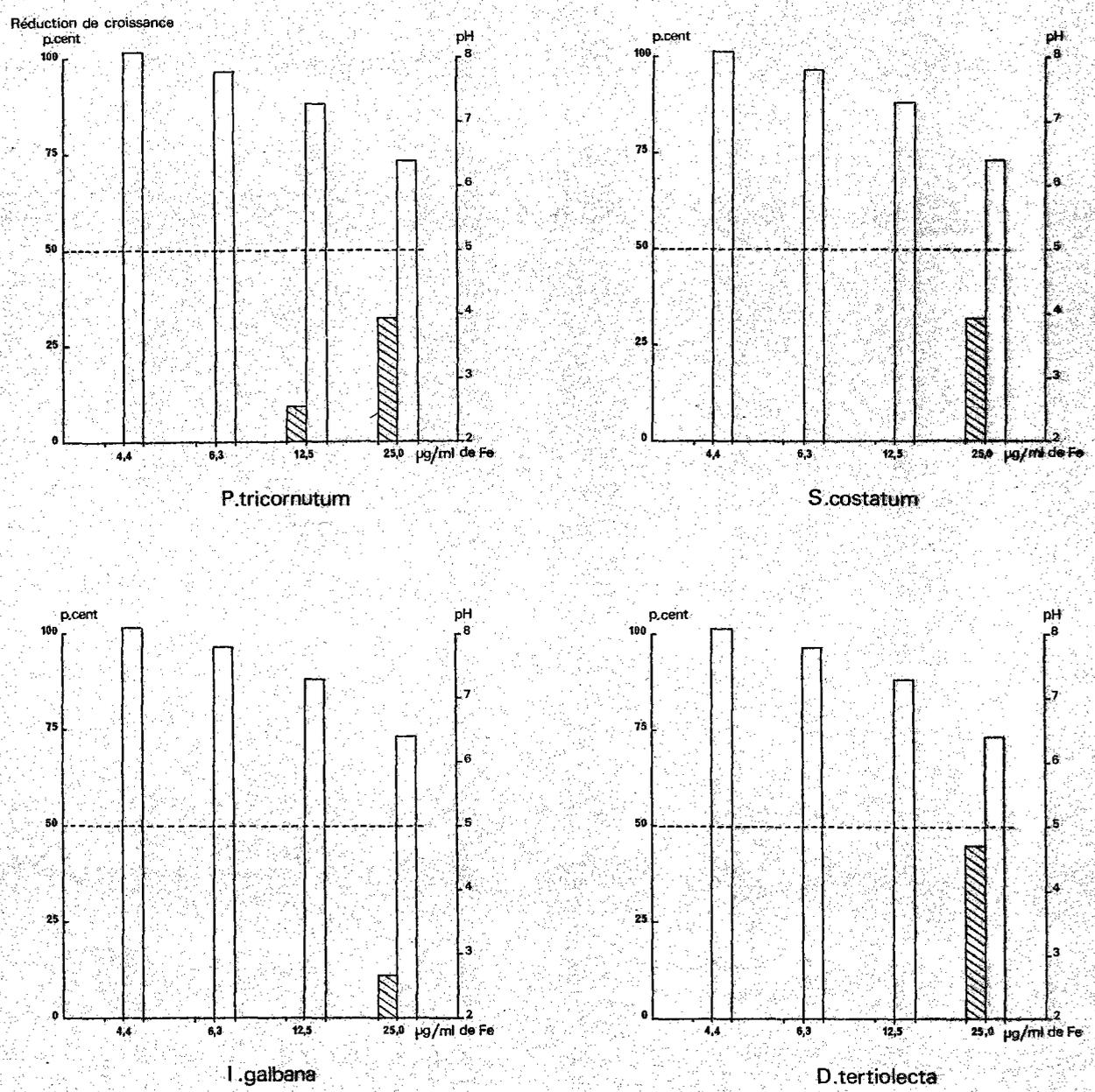


Fig. 3 : THANN et MULHOUSE. Pourcentages de réduction de croissance (hachures) et valeur pH au temps 0 (blanc) correspondants aux différentes teneurs en fer de l'effluent dilué. La DL_{50} est indiquée en pointillés.

Ainsi donc les réductions de croissance des cultures phyto-
planctoniques seraient soumises à deux facteurs :

- l'acidité initiale et sa vitesse de neutralisation pendant la durée de la culture,
- la charge en sulfate ferreux aux fortes concentrations.

3 - Conclusion

Le facteur prépondérant, intervenant dans la toxicité des rejets, vis-à-vis des algues testées, semble être l'acidité ; cependant, dans la mesure où l'hydroxyde ferrique précipite à un pH encore bas, la turbidité doit intervenir pour une part en perturbant la croissance cellulaire.

Pour des dilutions supérieures au 1/2000 on constate une amélioration de la croissance ; des résultats similaires ont été obtenus par KAYSER (1970) avec Phaeocystis poucheti.

Notons que, dans le milieu naturel, les dilutions observées se font en un délai assez court et sont suffisamment élevées pour que l'on puisse négliger, en dehors de la zone immédiate des déversements, la nocivité due à l'acidité de l'effluent.

En revanche, on peut supposer que le phytoplancton, par ses hautes capacités d'accumulation, peut concentrer et transporter certains métaux lourds contenus à l'état de traces dans l'effluent. C'est ce que nous étudierons dans le dernier chapitre.

On peut aussi se demander si l'hydrate de fer rejeté en grande quantité ne perturbera pas le développement des nombreuses larves que l'on rencontre dans le plancton marin. C'est ce que nous allons examiner.

./....

III - ETUDE DE LA TOXICITE A L'EGARD DU DEVELOPPEMENT LARVAIRE

A - Action de dilutions de l'effluent sur le développement larvaire de Palaemon serratus

1 - Expérience préliminaire

Les larves de Palaemon serratus ont été placées dans des cristallisoirs de 20 ml contenant 10 ml de milieu, aux différentes dilutions de l'effluent et de sa référence en fer. Le milieu était renouvelé tous les deux jours et les observations (mues et mortalités) effectuées quotidiennement, pendant 15 jours.

Cette première expérimentation, à raison de 4 larves par cristallisoir et 5 cristallisoirs par dilution, nous a montré que la mortalité était imputable, le plus souvent, au cannibalisme intraspécifique et ne pouvait signifier une influence du rejet au cours du développement. Aussi nous n'en avons pas tenu compte.

En revanche, les pourcentages de mues, exprimés par le nombre d'exuvies par rapport au nombre d'individus vivants, indiqueraient, dans l'ensemble un décalage des périodes de mues comparativement aux témoins. C'est ce qui ressort des tableaux 12 et 13 (pages 21 et 22).

On remarque, pour les dilutions de l'effluent Thann et Mulhouse, un décalage notable de la période de mue aux 10ème et 14ème jours par rapport au témoin. Cet écart existe également pour la solution de référence en fer.

Enfin au 15ème jour, les pourcentages de mues sont encore inférieurs à 100 pour toutes les dilutions ; ceci supposerait un allongement de la période de mue pour les stades les plus âgés.

Afin de faire la part entre la mortalité due au rejet et la mortalité accidentelle nous avons réalisé une deuxième expérimentation portant sur des larves isolées.

JOURS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15									
STADES	I	I	I	II	II	II	II	III	III	III	III	IV	III	IV	III	IV	IV	IV	V	IV	V	IV	V	
TEMOINS	100	100	5	95	100	100	86	14	9	91	100	90	10	0	100	0	100	100	67	33	0	100	0	100
1/5 000	100	100	6	94	100	100	100	0	7	93	100	100	0	72	28	10	90	100	100	0	64	36	50	50
1/3 000	100	100	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	55	45	0	100	100	100	0	89	11	12	88
1/2 000	100	100	0	100	100	100	100	0	16	84	100	100	0	42	58	0	100	100	100	0	90	10	13	87
1/1 000	100	100	0	100	100	100	100	0	17	83	100	100	0	20	80	0	100	100	100	0	78	22	23	77
1/500	100	100	0	100	100	100	100	0	10	90	100	100	0	15	85	0	100	100	100	0	50	50	34	66

Tableau 12 Expression journalière des pourcentages des différents stades larvaires de P. serratus pour les dilutions de l'effluent Thann et Mulhouse.

JOURS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15								
STADES	I	I	I	II	II	II	II	III	III	III	III	IV	III	IV	IV	IV	V	IV	V	IV	V		
TEMOINS	100	100	5	95	100	100	86	14	9	91	100	90	10	0	100	100	100	67	33	0	100	0	100
1/5000	100	100	11	89	100	100	100	0	20	80	100	100	0	100	0	100	100	100	0	100	0	25	75
1/3000	100	100	0	100	100	100	100	0	10	90	100	100	0	100	0	100	100	100	0	100	0	25	75
1/2000	100	100	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	100	0	100	100	100	0	86	14	0	100
1/1000	100	100	5	95	100	100	100	0	0	100	100	100	0	100	0	100	100	100	0	91	9	64	36
1/500	100	100	6	94	100	100	100	0	0	100	100	100	0	100	0	100	100	100	0	100	0	100	0

Tableau 13 Expression journalière des pourcentages des différents stades larvaires de P. serratus pour les dilutions de la référence-fer de Thamm et Mulhouse.

2 - Expérimentation sur des larves isolées

Nous avons choisi la concentration la plus forte qui ne manifeste pas de mortalité notable soit la dilution 1/500 ainsi que sa référence en fer.

Nous avons utilisé des cristallisoirs de 20 ml contenant 10 ml de milieu et une larve. Pour chaque dilution, 20 cristallisoirs ont été employés.

Ainsi pensions-nous caractériser de façon certaine la réalité d'une influence des rejets, et en particulier du sulfate ferreux, sur la survie et la fréquence des mues pour les 5 premiers stades larvaires de Palaemon serratus.

Les résultats sont illustrés dans la figure 4 (page 24).

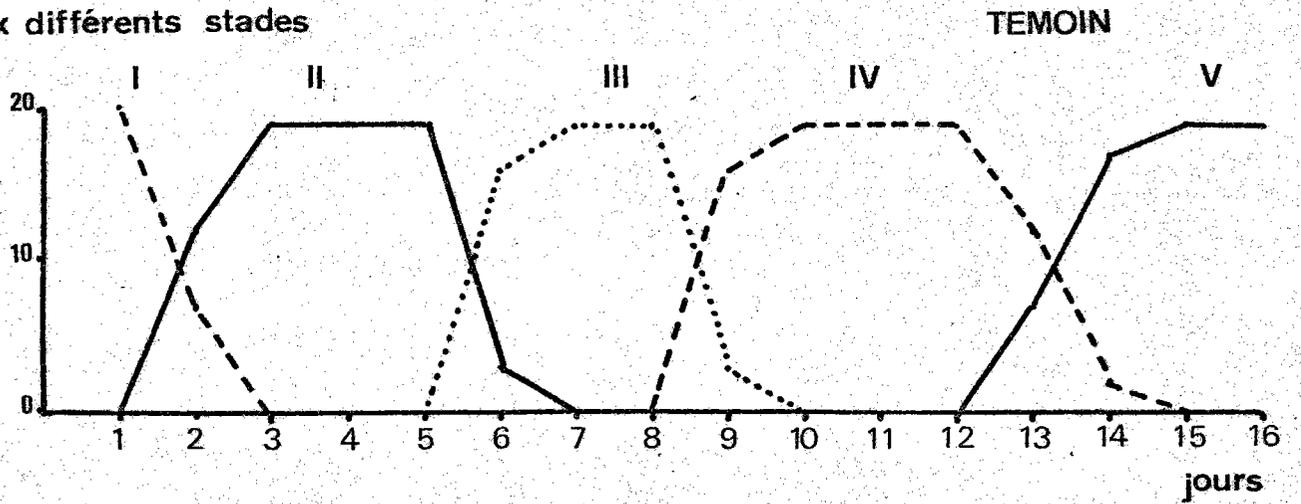
On note, qu'en regard du témoin, le plus grand nombre d'individus contaminés ayant mué n'est observé qu'après un temps de latence d'un à deux jours. Enfin on observe une persistance d'individus n'ayant pas mué, bien après obtention du maximum de mues pour le stade suivant.

On observe une diminution de la survie pour les derniers stades contaminés par la référence-fer, ce qui ne peut être expliqué que par un facteur indépendant de la toxicité elle-même.

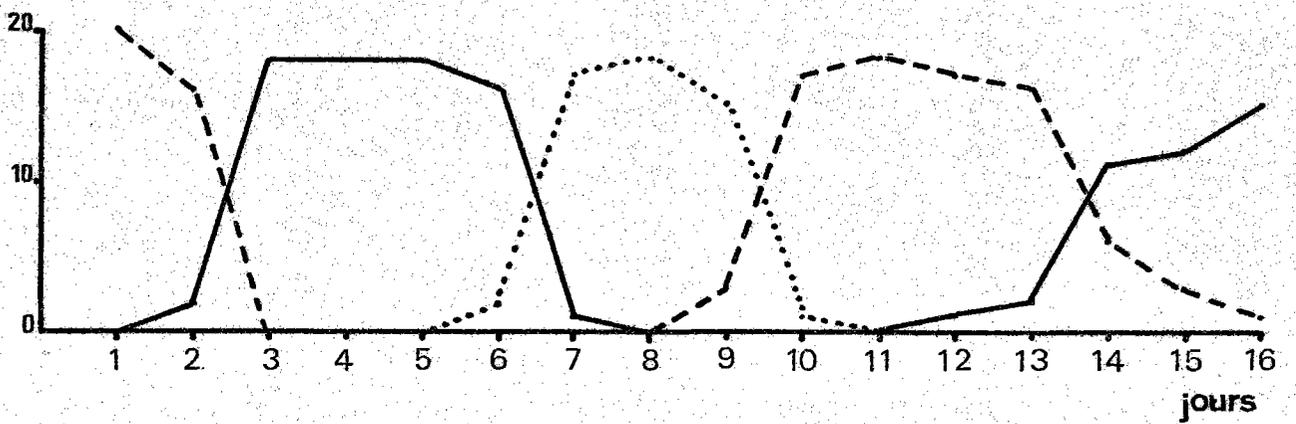
Bien que ces résultats ne soient pas très nets, il semble que la présence de l'effluent, ou de sa correspondance en sulfate ferreux, entraîne un certain blocage de la mue qui se traduirait par un allongement de la durée normale de chaque stade larvaire par rapport au témoin. D'autre part, l'impossibilité pour les larves de se métamorphoser, après les 4 premiers stades, entraînait dans la plupart des cas la mort des individus.

./....

Nombre de larves
aux différents stades



THANN et MULHOUSE 1/500



REFERENCE 1/500

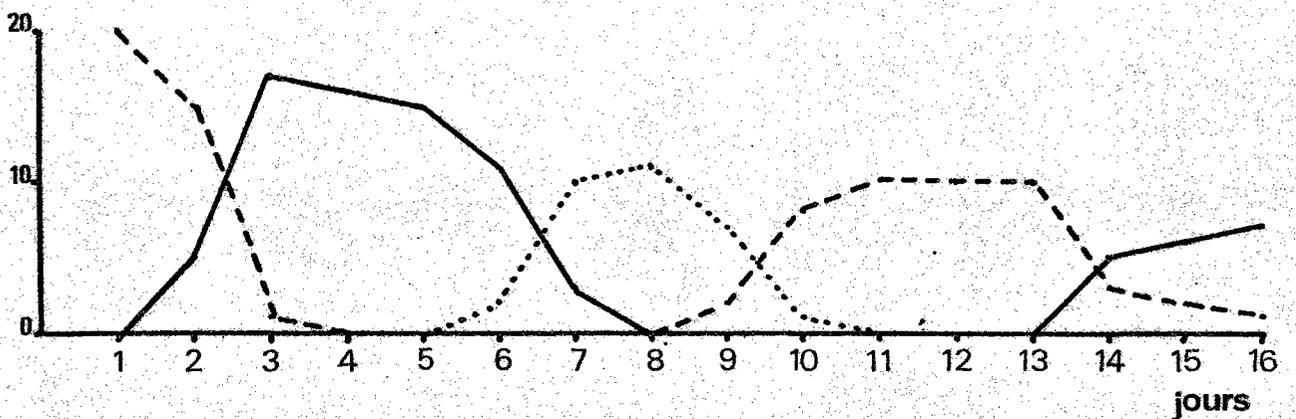


Fig. 4 Evolution du nombre de stades larvaires de Palaemon serratus au cours du temps.

Comparaison des résultats obtenus pour Thann et Mulhouse 1/500 et sa référence fer par rapport à un témoin.

B - Action de dilutions de l'effluent sur le développement larvaire de Portunus puber.

Les larves de Portunus puber ont été mises en expérimentation, 4 jours après l'éclosion, pour une durée de 20 jours ; le niveau de développement correspondait alors au stade II.

Nous avons utilisé des cristallisoirs de 20 ml contenant 10 ml de milieu et 4 larves. On comptait 20 cristallisoirs par dilution.

Les dilutions testées correspondent à des teneurs assez faibles (1/3000 et 1/5000) et de ce fait les pourcentages de survie sont peu affectés par rapport à celui des témoins.

Les résultats sont exprimés dans la figure 5 (page 26).

En dépit de conditions expérimentales identiques à celles employées pour Palaemon serratus (changement de milieu tous les deux jours), nous n'avons pu éviter une mortalité naturelle importante au moment de la métamorphose en zoé V et en mégalope.

L'observation journalière des larves a montré une forte tendance à l'adsorption d'hydroxyde ferrique, en particulier sur les épines du tégument et les appendices. Ce fait avait déjà été remarqué pour Carcinus maenas ; en revanche, on ne l'a pas observé chez Palaemon serratus.

La figure 5 ne montre aucune modification importante au niveau des stades II, III et IV ; par contre le pourcentage de mues au stade V est inférieur, pour les deux dilutions, à celui des témoins.

Enfin on observe une régression dans l'apparition des mégalopes, parallèlement à l'augmentation de la concentration en effluent.

En conclusion il semble que les larves de Portunus puber se montrent encore plus sensibles que celles de Palaemon serratus ; en effet, pour des dilutions plus importantes, des perturbations identiques de la mue larvaire planctonique sont observées.

./.....

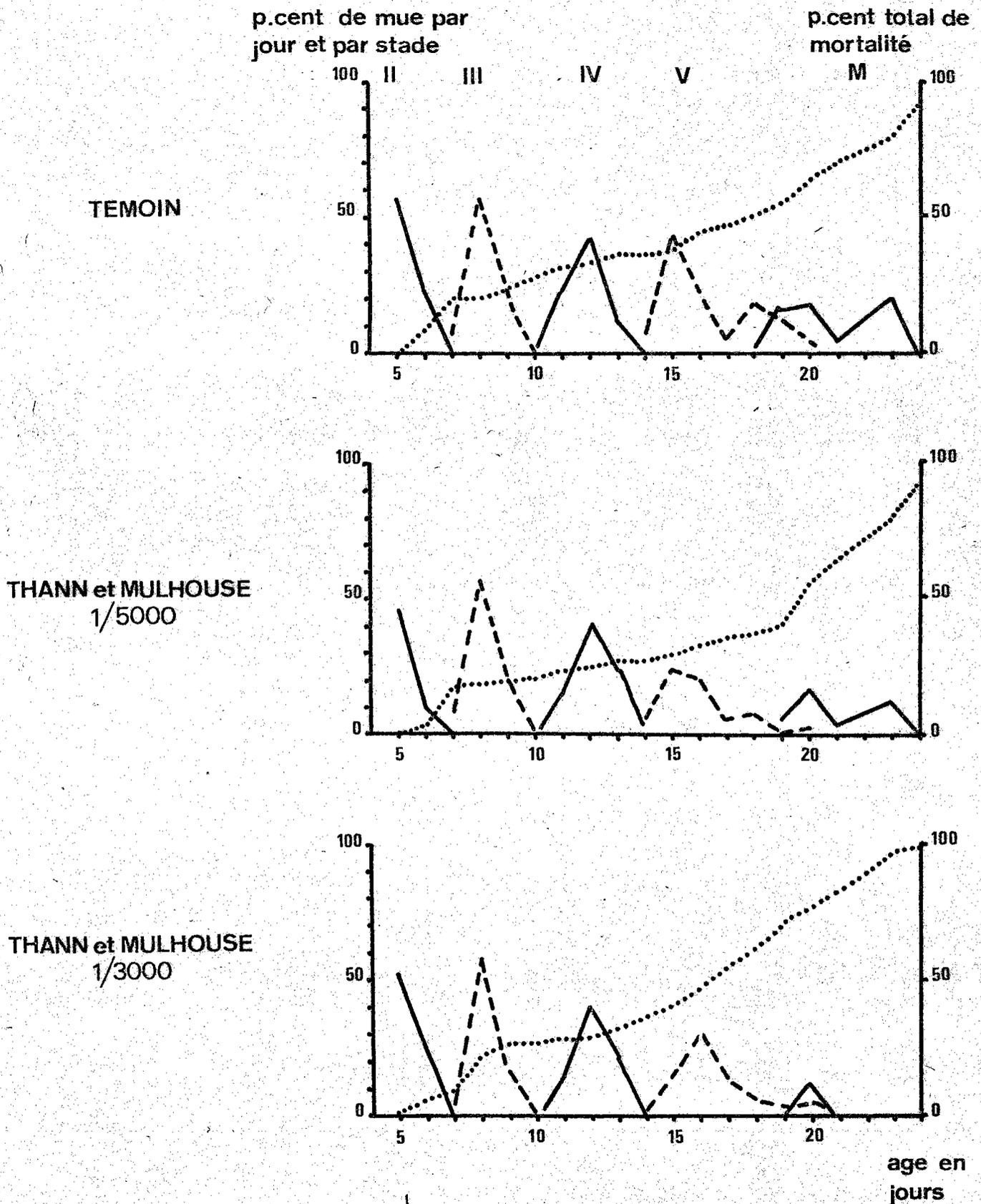


Fig. 5 : Pourcentages quotidiens de mue pour les différents stades de Portunus puber et pourcentages de survie totale pendant 20 jours. Comparaison des résultats obtenus pour l'effluent Thann et Mulhouse au 1/5 000 et 1/3 000 par rapport au témoin.

D'après les observations effectuées chaque jour, le ramollissement des téguments et la baisse d'activité, des individus au moment de la mue, paraissent propices à la fixation de particules d'hydroxyde ferrique. Cet état doit gêner considérablement l'animal au moment de se défaire de son exuvie.

Les dilutions testées étaient toutes proches de la neutralité (pH = 6,3 à 7,4). Aussi les résultats obtenus permettent d'envisager l'intervention de l'hydroxyde ferrique dans le processus de la mue larvaire.

IV - ETUDE DE LA TOXICITE INDUITE

Nous nous sommes proposés de déterminer une éventuelle toxicité par accumulation des métaux contenus dans le rejet étudié, aux différents niveaux d'une chaîne alimentaire.

En effet, on sait depuis la découverte du transfert et de l'accumulation d'éléments radio-actifs par les organismes marins, que les métaux lourds peuvent être assimilés par le plancton et le necton, sans qu'il y ait par la suite un retour intégral au milieu par excrétion. Dans ces conditions, les teneurs très faibles en certains métaux seraient susceptibles d'induire, chez les animaux placés en fin de chaîne trophique, une concentration élevée présentant un caractère toxique. Des expériences de ce type ont déjà été réalisées (AUBERT et coll., 1972).

Pour notre part, nous étudierons l'accumulation du fer et des traces de métaux contenus dans l'effluent Thann et Mulhouse. Ces essais se rapportent au phytoplancton, à un crustacé planctonique et à deux représentants du necton.

./.....

A - Accumulation de métaux par le phytoplancton

1 - Accumulation du fer

Etant donné le rôle important du fer comme facteur limitant pour la croissance des diatomées et son pouvoir d'adsorption sous sa forme hydratée, il était intéressant de connaître dans quelles proportions l'hydroxyde ferrique était "fixé" et "assimilé" par le phytoplancton.

Cependant, les teneurs rencontrées étant très fortes, nous nous sommes heurtés à des problèmes de séparation et de filtration déjà cités par d'autres auteurs. HAYWARD (1969), dans une étude sur le rôle du fer dans la croissance de Phaeodactylum tricornutum, mentionne la forme colloïdale prise par le fer présent dans le milieu ASP₂, et son adsorption sur les cellules. Il en résulte, après centrifugation, une majoration des teneurs trouvées par dosage : l'hydroxyde ferrique présent dans le milieu est entraîné avec les diatomées alors que les autres métaux, sous forme ionique, restent dans le surnageant. Des constatations identiques ont été faites par DAVIES (1970).

L'examen de cultures contaminées de Dunaliella tertiolecta et de Phaeodactylum tricornutum, nous a conduit à faire les remarques suivantes :

- quelques minutes après dilution du rejet testé dans l'eau de mer enrichie en E. S. de PROVASOLI, le milieu se colore en jaune ocre, de façon relativement homogène. Environ 2 heures plus tard, un flocculat brun rouge commence à se déposer. Ce précipité reste à peu près constant en volume pendant la croissance des diatomées,

- après décantation des cultures et filtration du surnageant sur membrane "Millipore" 5 μ on recueille un liquide également coloré en jaune foncé,

- une deuxième filtration à 0,45 μ (limite de l'état particulaire) nous donne un filtrat limpide dont le dosage colorimétrique révèle des teneurs en fer inférieures à 0,10 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont exprimés dans le tableau 14 (page 29).

ESPECES CONTAMINEES	FER DOSE APRES FILTRATION à 0,45 µ
<u>Isochrysis galbana</u>	0,056 mg/l
	0,008 mg/l
	0,028 mg/l
	0,010 mg/l
<u>Phaeodactylum tricornutum</u>	0,092 mg/l
	0,096 mg/l
	0,052 mg/l

Tableau 14 : Teneurs en fer dans les filtrats de cultures contaminées (pH = 7,6 ; concentration en fer = 4,4 mg/l).

Il est manifeste que cette fraction restante caractérise le fer soluble ou complexé par l'EDTA présent dans le milieu.

En résumé nous avons, présentes dans les cultures, diverses formes de fer qui sont énumérées dans le tableau 15.

MILIEU	CELLULES
- Fer soluble sous forme ionique et complexé par l'EDTA.	- Fer adsorbé, sous forme de $Fe(OH)_3$.
- Fer particulaire : $Fe(OH)_3$ formant un précipité en équilibre avec une pseudo-solution colloïdale.	- Fer absorbé, sous forme complexée, ionique ou particulaire.

Tableau 15 : Différentes formes de fer présentes dans le milieu et les cellules d'une culture contaminée.

Nous avons donc tenté, pour l'ensemble des dosages, d'éliminer la plus grande partie du fer précipité et de ne garder que les cellules avec leur charge en fer absorbé et adsorbé. La méthode employée consistait essentiellement en filtrations sur membrane "Millipore".

a) Méthode générale de séparation des formes chimiques du fer

Pour chaque dosage les cultures ont été réalisées en deux exemplaires aussi bien pour le témoin que pour les échantillons contaminés.

La dilution testée a été l'effluent dilué au 1/3000 ce qui correspond à une teneur en fer égale à 4,4 mg/l.

L'expérience a porté sur le flagellé Dunaliella tertiolecta et le temps de culture a été fixé à 10 jours afin d'obtenir une densité cellulaire maximale. Chaque échantillon représentait 1 l de milieu renfermant environ 10^6 cellules par ml.

Le 11ème jour, les cultures étaient transvasées dans des éprouvettes graduées de même contenance. Après 30 mn de décantation le précipité d'hydroxyde ferrique se trouvait sédimenté dans un faible volume.

Le surnageant était alors récupéré et filtré sur "Millipore" 5 μ . Le filtre était ensuite lavé avec une solution isotonique à base de formiate d'ammonium 0,5 N amené à pH 5, par de l'acide citrique, afin de favoriser l'entraînement et la solubilisation du fer adsorbé sur les cellules.

Nous avons procédé à une deuxième filtration sur "Millipore" 0,45 μ , mais l'examen microscopique du filtrat nous a montré que dans ce cas on recueillait principalement de l'hydroxyde excédentaire et quelques cellules de faible diamètre.

L'essentiel de la culture était retenu au cours de la première filtration avec élimination du fer particulaire excédentaire.

Les dosages ont été effectués :

- sur les solutions de lavage,
- sur les filtres supportant les cellules.

./.....

b) Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont exprimés en ppm du poids sec (non calciné) de Dunaliella tertiolecta. Les valeurs sont représentées dans le tableau 16.

	TEMOINS	EFFLUENT 1/3000
Fer cellulaire après lavage	2 056 1 658	5 492 4 411
Fer de la solution de lavage	-	3 030 3 361

Tableau 16 : Dosage du fer cellulaire, soluble et adsorbé, dans des cultures de Dunaliella tertiolecta. Les teneurs sont exprimées en ppm du poids sec.

Le fer dosé dans les cellules témoins provient essentiellement de l'assimilation du fer soluble présent dans le milieu de culture. On peut donc considérer que le dosage donne uniquement les teneurs en fer absorbé. Par contre le fer dosé dans les solutions de lavage représente le fer particulaire adsorbé sur les cellules.

En retranchant, des teneurs trouvées dans les cellules filtrées après lavage, les valeurs rencontrées dans les témoins, on peut avoir une estimation grossière du surplus de fer dans les flagellés contaminés. Les calculs, réalisés en fonction de la moyenne des valeurs du tableau 16, donnent une teneur excédentaire moyenne égale à 3094 ppm. Cette majoration, comparée aux 1857 ppm de fer contenu dans le poids sec des cultures témoins, ne met en évidence qu'un faible enrichissement des cellules de D. tertiolecta en relation avec la teneur en fer plus élevée dans le milieu contaminé ; en effet si l'on observe au niveau de ces organismes, des teneurs 2 à 3 fois supérieures à celles trouvées pour les témoins, il faut remarquer que la concentration en fer du milieu est environ 8 fois moins élevée pour les témoins que pour les cultures contaminées. Les teneurs dans les milieux de culture et les organismes sont regroupées dans le tableau 17 (page 32).

	TEMOINS	EFFLUENT
		1/3000
Fer total du milieu (Effluent + ESP)	0,68 (0 + 0,68)	5,08 (4,40+0,68)
Fer intracellulaire	1 857	4 951

Tableau 17 : Teneurs moyennes en fer, en ppm, dans les cellules (en poids sec) et dans les milieux de culture.

Remarquons toutefois que les teneurs en fer, dans le milieu océanique, sont plus faibles (0 à 0,04 ppm) que dans le milieu de culture utilisé (0,68 ppm). De ce fait le dosage du fer dans les cellules témoins ne tient pas compte des conditions rencontrées en mer où le fer constitue un facteur limitant la croissance phytoplanctonique.

Nous constatons une adsorption de fer particulaire à la surface des cellules. Cette adsorption est comparable à ce qui a été observé pour les organismes zooplanctoniques. Pour les dilutions de l'effluent inférieures au 1/500 les particules d'hydrate de fer, nous l'avons vu (fig. 2, page 16), constituent un facteur important agissant sur la multiplication cellulaire ; par contre, pour les dilutions plus fortes, il apparaît que le fer favorise nettement la croissance, ce qui confirme les résultats obtenus par HAYWARD (1969) et DAVIES (1970).

En ce qui concerne les divers métaux, présents à l'état de traces dans l'effluent, on peut craindre une éventuelle accumulation par les organismes marins ; c'est ce que nous allons envisager pour le zinc, le cuivre et le cadmium.

2 - Accumulation du zinc, du cuivre et du cadmium

Le procédé de filtration reste le même que pour le fer et les dosages ont été effectués directement sur les cellules récupérées, sans lavage préalable par une solution complexante.

La dilution d'effluent testée reste la même : 1/3000.

./.....

Si l'on tient compte des teneurs en différents métaux dosées dans l'effluent et le milieu E. S. de PROVASOLI (tableau 18) ainsi que des teneurs moyennes rencontrées dans l'eau de mer (tableau 19) on obtient, pour le rejet dilué et les cultures témoins, les concentrations données dans le tableau 20.

	FER (ppm)	ZINC (ppm)	CUIVRE (ppm)	CADMIUM (ppm)
E. S. de PROVASOLI	340	20	0,15	0,15
THANN et MULHOUSE	12500	102,5	2,30	0,40

Tableau 18 : Teneurs en fer, zinc, cuivre et cadmium trouvées, par dosage spectrophotométrique d'absorption atomique, dans le milieu E. S. de PROVASOLI et l'effluent Thann et Mulhouse.

	FER (mg/l)	ZINC (mg/l)	CUIVRE (mg/l)	CADMIUM (mg/l)
EAU DE MER	0,01	0,01	0,003	0,00011

Tableau 19 : Teneurs moyennes en fer, zinc, cuivre et cadmium rencontrées dans l'eau de mer (d'après RILEY et SKIRROW, 1965).
(La densité de l'eau de mer étant très voisine de 1, le mg/l équivaut pratiquement au ppm).

	ZINC (ppm)	CUIVRE (ppm)	CADMIUM (ppm)
TEMOINS	0,050	0,00330	0,00041
THANN et MULHOUSE 1/3000	0,0841	0,00406	0,00054

Tableau 20 : Teneurs en zinc, cuivre et cadmium dans les milieux de cultures témoins et contaminés.

Le dosage du zinc, du cuivre et du cadmium a été effectué sur les cultures contaminées ainsi que sur les cultures témoins. Les résultats sont regroupés dans le tableau 21.

	ZINC (ppm)	CUIVRE (ppm)	CADMIUM (ppm)
TEMOINS	268	49,6	ND (*)
THANN et MULHOUSE 1/3000	328	54,6	ND (*)

Tableau 21 : Teneurs en zinc, cuivre et cadmium, exprimées en ppm de poids sec, dans différentes cultures de D. tertiolecta.

(*) ND = Teneurs inférieures au seuil de détection de l'appareil (0,25 ppm).

Les valeurs rapportées dans le tableau 21 ne permettent pas de mettre en évidence une accumulation des trois métaux pour D. tertiolecta par rapport aux cultures témoins. Remarquons d'ailleurs que les concentrations en ces métaux, présents à l'état de traces dans l'effluent brut, sont ramenées jusqu'à des teneurs ne modifiant guère celles rencontrées naturellement dans le milieu marin, après dilution au 1/3000.

Ainsi, dans les conditions expérimentales précédemment citées, nous observons un accroissement modéré de la teneur en fer et une absence d'accumulation significative des trois autres métaux étudiés.

B - Accumulation de métaux par l'intermédiaire d'une chaîne pélagique

1 - Mode opératoire

Nous avons recréé en laboratoire une chaîne alimentaire simple permettant d'évaluer, à trois niveaux essentiels du monde marin, la concentration de plusieurs métaux.

./...

Cette "chaîne pélagique" est composée de la façon suivante :

a) Echelon phytoplanctonique : Différentes espèces sont cultivées, d'une part en eau de mer enrichie par du milieu E. S. de PROVASOLI diluant le rejet au 1/3000, et d'autre part en eau de mer enrichie seulement en milieu.

Nous avons choisi : Phaeodactylum tricornutum, Dunaliella tertiolecta, Gyrosigma spencerii et Platymonas suesica.

Les cultures étaient conduites dans des barils de 25 l comportant une importante aération. Elles étaient utilisées au bout de 10 à 20 jours.

b) Echelon zooplanctonique : Il est représenté par Artemia salina, petit crustacé de l'ordre des Anostracés, sous-classe des Branchiopodes.

Les élevages étaient pratiqués en aquariums de 30 l avec une concentration en artémies adultes atteignant 100 individus par litre.

Chaque aquarium recevait journalièrement 2 l de cultures témoins ou contaminées.

Après 45 jours, les artémies sont regroupées en lots de 100 à 200 individus et préparées en vue de la minéralisation.

c) Echelon nectonique : Il est représenté par Gasterosteus aculeatus (épineche). 60 individus, par aquarium de 30 l, recevaient journalièrement pendant un mois 180 artémies adultes témoins ou contaminées. Un appoint alimentaire, constitué de daphnies séchées, était adjoint afin d'éviter une carence nutritive.

L'ensemble des individus était pesé en début et en fin d'expérimentation. Les poissons morts étaient prélevés et pesés afin de corriger les estimations sur la perte ou le gain de poids total.

./...

2 - Résultats et discussion

a) Artemia salina

Dans une première expérimentation, nous avons nourri des artémies avec des cultures phytoplanctoniques réalisées dans une dilution au 1/3000 de l'effluent Thann et Mulhouse.

Nous avons dosé le fer, le zinc, le cuivre et le cadmium contenus dans ces crustacés. Les résultats, exprimés en ppm du poids sec, sont donnés dans le tableau 22.

	TENEURS EN PPM			
	FER	ZINC	CUIVRE	CADMIUM
Artémies témoins	760	108	34,7	13,04
Artémies contaminées	1136	56	18,8	15,90
	1063	63	17,0	19,10

Tableau 22 : Teneurs en fer, zinc, cuivre et cadmium dans les deux séries d'A. salina.

On remarque seulement pour les artémies une concentration en fer assez nette. D'autres expérimentations nous ont montré que, lorsque les artémies étaient remises en milieu sain et nourries de phytoplancton non contaminé, le dosage du fer révélait des teneurs toujours inférieures à celles obtenues avant la décontamination.

Ceci tient au fait que le contenu du tube digestif des organismes intervient de façon non négligeable dans les dosages.

En effet, les artémies absorbent non seulement les diatomées contaminées mais également de l'hydroxyde ferrique précipité sur le fond des aquariums.

Il y a tout lieu de penser que l'assimilation intra-tissulaire du fer n'est pas significative, ou du moins pas suffisante pour induire une rétention importante chez les épinoches.

Ainsi lorsqu'on utilise des animaux qui ne sont pas à jeun, les teneurs trouvées sont nettement supérieures aux taux réels de fer contenu dans les tissus d'artémies.

b) Gasterosteus aculeatus

Après 30 jours d'expérimentation, les épinoches témoins présentent une légère augmentation du poids total, alors que les individus contaminés à partir de la dilution au 1/3000 de l'effluent montrent une perte de poids.

Les résultats figurent dans le tableau 23.

	TEMOINS	THANN ET MULHOUSE 1/3000
Poids total en début d'expérience (g)	12,80	14,42
Variation du poids après 30 jours (g)	+ 0,015	- 0,562

Tableau 23 : Variation de poids des lots de G. aculeatus.

Nos dosages ont porté sur le fer, le zinc, le cuivre et le cadmium. Les résultats, exprimés en ppm du poids sec, figurent dans le tableau 24.

	TENEURS EN PPM			
	FER	ZINC	CUIVRE	CADMIUM
Epinoches témoins	209	188	6,8	2,5
Epinoches contaminées	359	203	7,18	1,9
	281	197	10,2	

Tableau 24 : Teneurs en fer, zinc, cuivre et cadmium dans les deux lots de G. aculeatus.

Des dosages ont également été effectués sur la nourriture d'appoint (daphnies séchées) apportée aux épinoches. Ils ont donné les résultats suivants :

Fer	2 091 ppm
Zinc	51 ppm
Cuivre	0 ppm
Cadmium	0 ppm

On peut donc considérer comme négligeable l'apport en métaux lourds de la nourriture d'appoint. Seule la teneur en fer des daphnies est quelque peu élevée (2 091 ppm). Mais la part, prise par cette nourriture d'appoint dans l'alimentation des animaux, est si faible que l'apport en métaux lourds dans le milieu est négligeable.

Par ailleurs, il est à noter que les animaux témoins recevaient également ce complément alimentaire.

On remarque donc une absence d'accumulation décelable, du fer et des trois autres métaux testés, au niveau du 3ème échelon de la chaîne pélagique utilisée. L'ordre de grandeur des teneurs rencontrées, pour les espèces nectoniques, est comparable aux résultats trouvés par d'autres auteurs (JAULMES et HAMELLE, 1971 ; SEGAR et coll., 1971).

3 - Conclusion

On n'a donc enregistré, dans les expériences décrites plus haut, que des résultats négatifs. Il convient cependant de remarquer qu'une durée d'un mois d'expérimentation représente un court moment dans la vie d'organismes nectoniques.

En effet, des expériences canadiennes rapportent l'action de solutions d'hydroxyde ferrique totalement neutralisées sur des animaux dulçaquicoles (SYKORA et coll., 1972 a ; 1972 b ; SMITH et coll., 1973). Ces auteurs ont mis en évidence l'incidence des particules ferriques sur la croissance lors d'expérience portant sur une année. Bien que des experimen-

tations portant sur des dilutions faibles d'effluent, comme celles que nous avons testées, ne montrent aucune accumulation pour les différents métaux, il reste néanmoins que le fer peut transiter sous forme d'hydroxyde dans le tractus digestif de planctontes. Cependant, la durée de ce transit reste très courte et n'apporte qu'une dispersion supplémentaire des rejets puisque l'on ne trouve pas d'accumulation dans les tissus.

Ceci semble confirmer l'hypothèse d'un recyclage du fer particulaire dans l'océan, tel que le conçoit COOPER (1935).

V - CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de cette étude nous avons délibérément fixé un plan de travail se rapportant uniquement aux effets biologiques de l'effluent Thann et Mulhouse.

L'évaluation de la toxicité à court terme nous a amené à tester l'influence du rejet sur un certain nombre d'espèces marines. Il s'en suit une certaine disproportion dans l'importance des chapitres ; en effet, avant d'entreprendre l'étude de la toxicité sur le développement larvaire ou de l'accumulation de métaux le long d'une chaîne pélagique, il était nécessaire de fixer d'une part les seuils subléthaux, et d'autre part les facteurs prépondérants intervenant dans le caractère nocif des rejets testés.

Outre la détermination des pourcentages de mortalité ou, selon le cas, de réduction de croissance, nous avons procédé à des examens biologiques journaliers pendant toute la durée des expérimentations, c'est-à-dire pour des périodes de 4 à 8 jours en ce qui concerne la toxicité directe, de 15 à 20 jours dans le cas des développements larvaires, et enfin de 1 à 2 mois pour les chaînes alimentaires.

Les concentrations en métaux dans les tissus des organismes ont fait l'objet de nombreux dosages utilisant une méthode analytique aisément reproductible.

La synthèse des constatations relevées au cours de cette étude nous amène à formuler un certain nombre de conclusions :

1 - Au niveau de la toxicité directe sur différents organismes benthiques et nectoniques il apparaît que l'acidité a un rôle primordial ; il faut cependant souligner que certains animaux parviennent à s'isoler du milieu hostile et résistent.

Parmi les organismes planctoniques, Artemia salina accuse l'influence de l'acidité du rejet mais il semble qu'un autre facteur interviene : le fer particulaire semble occasionner une gêne physique notable.

Des résultats comparables sont rencontrés au cours d'expériences de toxicité aiguë sur les larves de décapodes (Carcinus maenas et Palaemon serratus).

Le rôle de l'acidité, dans les mortalités constatées, est confirmé pour les zoés de C. maenas et les larves de P. serratus.

L'adsorption de particules d'hydrate de fer est également observée sur les téguments et les appendices des larves de C. maenas. L'influence de l'hydroxyde ferrique adsorbé est mis en relief car les mêmes effets se retrouvent en présence de l'effluent dilué et de sa référence en fer.

L'influence des particules d'hydroxyde ferrique, sur le comportement de Mytilus edulis, a été étudié par WINTER (1972). La filtration des floculats d'hydrate de fer provoque une augmentation de la production de pseudofèces et, corrélativement, une perte de poids des individus due à une élévation de la sécrétion de mucus. En dehors de ces effets mécaniques, aucun effet toxique aigu du fer n'a été mis en évidence. L'hypersécrétion de mucus a été également notée chez les Polychètes tubicoles (RACHOR, 1972).

Au niveau des effets sur le phytoplancton, on constate que le pourcentage de réduction de croissance augmente avec la diminution des valeurs du pH. La DL₅₀ n'est jamais atteinte pour les dilutions testées (1/500 à 1/3000) mais elle semble proche de pH 6 et de 25 mg de fer par litre.

./....

Les réductions de croissance observées, pour les espèces phytoplanctoniques, seraient la résultante de 3 facteurs :

- la valeur initiale du pH,
- la vitesse de neutralisation de l'acidité,
- la charge en sulfate ferreux aux fortes concentrations.

Il faut cependant noter que, pour de fortes dilutions de l'effluent, on note une amélioration de la croissance. Nous retrouvons là le rôle du fer dans le milieu marin où il représente un facteur limitant.

2 - En ce qui concerne les effets sur le développement larvaire nous notons pour P. serratus un décalage de la période de mue pour les dilutions 1/500 de l'effluent et de sa référence en fer. Au 15ème jour le pourcentage de mue est encore très inférieur à celui des témoins pour toutes les dilutions testées ; ceci supposerait donc un allongement de la période des stades les plus âgés.

Pour les larves de Portunus puber, comme pour Artemia salina et les zoés de C. maenas, on retrouve l'adsorption d'hydrate de fer sur les téguments et les appendices. Des perturbations importantes de la mue apparaissent pour les dilutions 1/3000 et 1/5000.

Il semblerait que le fer particulaire gêne l'animal au moment de se défaire de son exuvie.

Il est à souligner que toutes ces perturbations ont été observées pour des acidités réduites ce qui permet d'envisager l'intervention de l'hydrate de fer dans le processus de la mue larvaire.

Des résultats similaires sur les larves de harengs ont été trouvés par KINNE et ROSENTHAL (1967) en ce qui concerne un effluent comparable ; ces auteurs ont observé des modifications du développement, du comportement alimentaire et de la motilité des larves.

Des effets identiques ont été notés à l'égard de Gobius pictus et de Solea solea par KINNE et SCHUMANN (1968).

Avant de conclure sur les résultats de la toxicité de l'effluent pour le développement larvaire, il semble intéressant de citer les travaux de GRICE et coll. (1973). En effet, à la suite de rejets en Baie de New York de résidus identiques de la fabrication du dioxyde de titane, des études en laboratoire, portant sur des copépodes et des échantillonnages de zooplancton en mer, sont venues compléter les résultats de VACCARO et coll. (1972).

En ce qui concerne les essais en laboratoire, les dilutions de l'effluent étaient de 1/500, 1/1000 et 1/3000, pour des pH respectivement de 3,0 - 5,5 et 6,5. Les copépodes testés (Calanus finmarchicus, Temora longicornis et Pseudocalanus sp.) sont très représentatifs du plancton marin. Les auteurs ont procédé à des tests de toxicité à court terme simulant les valeurs de pH rencontrées par le zooplancton dans le sillage du navire citerne. Ils ont montré, qu'en dépit d'un comportement perturbé au moment de l'exposition au rejet concentré, les individus testés ne montraient plus aucun trouble aussitôt après la dilution initiale.

Dans une expérimentation de plus longue durée (48 heures), pour des concentrations constantes de l'effluent, seules les dilutions 1/400 (pH = 2,8) à 1/4000 (pH = 6,8) provoquaient une certaine mortalité ; les auteurs précisent toutefois que ces dilutions n'existent que pendant un temps très court dans le milieu naturel.

Pour des expériences à long terme (18 jours), ces auteurs ont trouvé une inhibition de la reproduction à la dilution 1/4000 ; au 1/5000 seuls les nauplii étaient affectés. Les adultes ne montraient aucun trouble en dépit des flocons d'hydroxyde ferrique présents dans leur tractus digestif.

Enfin l'utilisation, d'une part de solutions acides de référence et d'autre part d'effluent préalablement neutralisé avec de la soude, a montré que seule l'acidité intervenait dans la mortalité observée.

./...

L'examen des planctontes, prélevés dans la zone de rejet, confirme les résultats obtenus en laboratoire. Les espèces trouvées correspondent à celles enregistrées lors d'études préalables dans cette région. Par ailleurs les observations ne montrent aucun abaissement numérique des populations ou de la biomasse des zones polluées par rapport à des zones témoins.

Enfin aucune tendance significative des indices de diversité ne vient suggérer un effet inhibiteur de la décharge vis-à-vis des communautés planctoniques présentes.

Nos conclusions confirment l'ensemble de ces résultats tant au niveau de la toxicité directe qu'à celui de l'action sur le développement larvaire.

Ainsi, pour des pH égaux ou inférieurs à 5,5, lorsque la concentration en rejet reste constante, nous avons pu mettre en évidence une certaine mortalité chez Artemia salina.

Par la suite, nous avons vu que le développement des stades larvaires de décapodes peut être inhibé par blocage de la mue.

Enfin, l'utilisation de références acides nous a montré le rôle primordial du pH dans les expériences de toxicité directe.

Notons néanmoins que, si les adultes d'A. salina ne présentaient aucun trouble après absorption d'hydroxyde ferrique de même que les copépodes adultes de GRICE et coll., il semble que les stades larvaires de Palaemon serratus souffrent du déséquilibre ionique dû à la seule présence du fer, puisque les références fer aux mêmes dilutions que les rejets testés entraînent elles aussi un décalage de la période de mue.

3 - Enfin nous n'avons pas mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, une quelconque toxicité induite le long d'une chaîne pélagique : phytoplancton - artémies - épinoches.

./....

A aucun niveau de ces maillons il n'est apparu d'accumulation notable du zinc, du cuivre et du cadmium.

Les artémies ne semblent pas accumuler de fer complexé ou soluble, mais servent de facteurs de transfert, si l'on considère la charge en $\text{Fe}(\text{OH})_3$ des contenus intestinaux ; ces résultats confirment les hypothèses de COOPER (1935), au sujet du cycle du fer dans le milieu marin.

L'observation des artémies montre des boulettes fécales chargées de fer particulaire ; les expériences de "décontamination" ne font que vérifier cette constatation.

Ainsi, l'élément majeur de ces rejets, le sulfate ferreux, reste probablement sous forme particulaire de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ après hydrolyse, et ne subit qu'un transfert par l'intermédiaire des organismes planctoniques, sans phénomènes de concentration.

Ce comportement différencie le fer de certains métaux connus pour leurs facteurs élevés d'accumulation par le phytoplancton et le zooplancton.

Remarquons toutefois que les traces des trois métaux étudiés sont contenues dans l'effluent en quantités ne dépassant guère quelques ppm. Par la suite elles sont diluées jusqu'à des teneurs ne modifiant guère celles rencontrées naturellement dans le milieu marin.

En ce qui concerne l'influence de l'acidité et des traces de métaux, des dilutions immédiates supérieures au 1/5000 sont souhaitables et même indispensables pour écarter tout risque de toxicité directe vis-à-vis des biocénoses marines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUBERT (M.), BITTEL (R.), LAUMOND (F.), ROMEO (M.), DONNIER (B.) et BARELLI (M.), 1972. - Utilisation d'une chaîne trophodynamique du type pélagique pour l'étude des transferts des pollutions métalliques. - Rev. int. Océanogr. méd., 28, p. 27-52.
- COOPER (L.H.N.), 1935. - Iron in the sea and in marine plankton. - Proc. roy. Soc., London, 118 B, p. 419-438.
- DAVIES (A.G.), 1970. - Iron, chelation and the growth of marine phytoplankton. I - Growth kinetics and chlorophyll production in cultures of the euryhaline flagellate Dunaliella tertiolecta under iron-limiting conditions. - J. mar. biol. Assoc. U.K., 50, p. 65-86.
- GRICE (G.D.), WIEBE (P.H.) et HOAGLAND (E.), 1973. - Acid-iron waste as a factor affecting the distribution and abundance of zooplankton in the New York Bight. I - Laboratory studies on the effects of acid waste on copepods. - Estu. Coast. mar. sci., 1, p. 45-50.
- HAYWARD (J.), 1969. - Studies on the growth of Phaeodactylum tricornutum. V - The relation ship to iron, manganese and zinc. - J. mar. biol. Assoc. U.K., 49.
- JAULMES (P.) et HAMELLE (G.), 1971. - Présence et taux des oligo-éléments dans les aliments et les boissons de l'homme. - Ann. Nutr. Alim., 25 (6), p. 133-203.
- KAYSER (H.), 1970. - Experimental-ecological investigations on Phaeocystis poucheti (Haptophyceae) : cultivation and waste water test. - Helgoländer wiss. Meeres., 20, p. 195-212.
- KINNE (O.) et ROSENTHAL (H.), 1967. - Effects of sulfuric water pollutants on fertilization, embryonic development and larvae of the herring, Clupea harengus. - Mar. Biol., 1, p. 65-83.
- KINNE (O.) et SCHUMANN (K.H.), 1968. - Biologische konsequenzen schwefelsäure und eisensulfathaltiger Industrieabwässer. Mortalität junger Gobius pictus und Solea solea. - Helgoländer wiss. Meeres., 17, p. 141-155.
- PROVASOLI (L.) McLAUGHLIN (J.J.A.) et DROOP (M.R.), 1957. - The development of artificial media for marine algae. - Arch. Mikrobiol., 25, p. 392-428.
- RACHOR (E.), 1972. - On the influence of industrial waste containing H_2SO_4 and $FeSO_4$ on the bottom fauna off Helgoland (German bight). - F. A. O. Technical conference on marine Pollution and its effects on living resources and fishing. Rome, Italie, 9-18 décembre 1970 FIR : MP/70/E 101, 25 novembre 1970.
- RILEY (J.P.) et SKIRROW (G.), 1965. - Analytical chemistry of sea-water, in : Chemical Oceanography ed. RILEY et SKIRROW, 2 p. 295-424.

- SEGAR (D.A.), COLLINS (J.D.) et RILEY (J.P.), 1971. - The distribution of the major and some minor elements in marine animals, part II. - J. mar. biol. Assoc. U.K., 51, p. 131-136.
- SMITH (E.J.) SYKORA (J.L.) et SHAPIRO (M.A.), 1973. - Effect of lime neutralized iron hydroxide suspensions on survival, growth and reproduction of the fathead minnow (Pimephales promelas). - J. Fish. Res. Bd Canada, 30, p. 1147-1153.
- SYKORA (J.L.), SMITH (E.J.), SHAPIRO (M.A.) et SYNAK (M.), 1972 a. - Chronic effects of ferric hydroxyde on certain aquatic animals. - Symposium on coal mine drainage research 4e Abstracts (Pittsburgh, April 26-27 1972) 11 p.
- SYKORA (J.L.), SMITH (E.J.), et SYNAK (M.), 1972 b. - Effect of lime neutralized iron hydroxide suspensions on juvenile brook trout (Salvelinus fontinalis, Mitchill). - Water Res., Pergamon Press, 6, p. 935-950.
- VACCARO (R.F.), GRICE (G.D.) et ROWE (G.T.), 1972. - Acid-iron waste disposal and the summer distribution of standing crop in the New York bight. - Water Res., 6, p. 231-256.
- WINTER (J.E.), 1972. - Long terme laboratory experiment on the influence of ferric hydroxyde flasks on the filter-feeding behavior, growth, iron content and mortality in Mytilus edulis L.- Mar. Poll. and sea Life, F. A. O. p. 392-396.
- WISELY (B.) et BLICK (R.A.P.), 1967. - Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper and zinc solution. - Austr. J. mar. freshw. Res., 18, p. 63-72.
-