

INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE  
DES PECHES MARITIMES  
rue de l'île d'Yeu  
B. P. n° 1049  
44037 NANTES CEDEX



IOH/d.1

Ifremer - Sète  
Fonds documentaire

-----  
IPM.3 Pollutions

ETUDE DES EFFETS D'EFFLUENTS DE FABRICATION DE DIOXYDE  
DE TITANE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE D'UN CRUSTACE  
DECAPODE : Palaemon serratus (PENNANT)

par Patrick LASSUS et Pierre MAGGI

-----  
Etude réalisée en collaboration avec le Centre National  
pour l'Exploitation des Océans (contrat n° 74/941).  
-----

Nantes, le 28 février 1977

6553

INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE  
DES PECHES MARITIMES  
rue de l'Ile d'Yeu  
B. P. n° 1049  
44037 NANTES CEDEX

-----  
IPM,3 Pollutions

ETUDE DES EFFETS D'EFFLUENTS DE FABRICATION DE DIOXYDE  
DE TITANE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE D'UN CRUSTACE  
DECAPODE : Palaemon serratus (PENNANT)

par Patrick LASSUS et Pierre MAGGI

-----  
Etude réalisée en collaboration avec le Centre National  
pour l'Exploitation des Océans (contrat n° 74/941).  
-----

Nantes, le 28 février 1977

- Le travail relaté ci-après a débuté en 1973. La partie expérimentale a duré 327 jours et a dû être intercalée entre les autres travaux en cours dans le laboratoire. De plus, elle nécessita pour chaque expérimentation l'obtention de femelles de crevettes grainées. D'où les délais qui nous ont été nécessaires pour publier ces résultats.

Nous nous étions proposé de rechercher les éventuelles actions, de l'acidité et de la charge en fer de trois effluents, sur le développement larvaire d'un Crustacé. Nous avons expérimenté sur chacun des effluents en utilisant celui dont nous disposions au moment de l'expérimentation sans chercher à refaire des essais rigoureusement identiques sur les trois, vu les similitudes qui permettent une certaine extrapolation. -

Nous avons expérimenté à des concentrations qui n'existent que pendant de très brèves durées, dans le milieu marin, lors des divers rejets et la probabilité, pour une même larve de retrouver, toutes les 48 heures pendant 60 jours, des conditions aussi sévères d'acidité et de teneurs en fer est infime. Mais nous devons retenir des conditions expérimentales très dures afin de bien mettre en évidence tout risque sérieux pour les larves de Crustacés qui ont une importance économique notable dans certaines régions de déversements.

On peut dire que dès qu'une dilution convenable de l'effluent (1/5000 à 1/10000) est obtenue, dans le milieu marin, tout risque est supprimé pour les larves de crustacés et par extension pour le plancton animal en général. Cependant les organismes planctoniques, contenus dans la masse d'eau de mer directement affectée avant la neutralisation de l'effluent, sont en majeure partie voués à une mort certaine. Le problème principal posé par ces effluents est donc celui de leur neutralisation jusqu'au moins pH 6.

./....

## S O M M A I R E

<u>I - INTRODUCTION</u> .....	1
<u>II - GENERALITES</u> .....	2
<u>A - LES TRANSFORMATIONS CHIMIQUES DES EFFLUENTS DANS LE MILIEU MARIN</u> .....	4
<u>B - LES EFFETS BIOLOGIQUES DES EFFLUENTS DANS LE MILIEU MARIN</u> .....	5
<u>III - METHODOLOGIE</u> .....	10
<u>A - CHOIX DES ANIMAUX D'EXPERIENCE</u> .....	10
1°) Préambule .....	10
2°) Ecologie de <u>P. serratus</u> .....	10
3°) Influence de différents facteurs sur le développement	13
<u>B - CONDITIONS D'ELEVAGE</u> .....	13
1°) Matériel et méthodes .....	13
a) Matériel .....	13
b) Changement de milieu .....	13
c) Nutrition .....	15
2°) Processus expérimentaux .....	15
<u>IV - RESULTATS ET DISCUSSIONS</u> .....	16
<u>A - TEST PRELIMINAIRE DE TOXICITE AIGUE - DETERMINATION DES SEUILS LETAUX</u> .....	16
1°) Méthode expérimentale .....	16
2°) Résultats .....	17
<u>B - MILIEUX NEUTRALISES - REJETS DE TYPE PONCTUEL - INFLUENCE DE L'EFFLUENT MONTEDISON SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE</u> .....	19
1°) Première expérience .....	19

./...

a) Protocole expérimental .....	19
b) Résultats .....	20
- Mues et mortalités .....	20
- Nombres cumulés de métamorphoses .....	21
- Nombres moyens de mues avant la métamorphose	21
c) Discussion .....	23
2°) Deuxième expérience .....	24
a) Protocole expérimental .....	24
b) Résultats .....	24
- Mues et mortalités .....	24
- Nombre cumulés de métamorphoses .....	26
- Nombre moyens de mues avant la métamorphose	26
c) Discussion .....	28
<u>C - MILIEUX RENOUVELES - REJETS DE TYPE CHRONIQUE</u> .....	29
1°) Effluent Montédison (3ème expérience) .....	29
a) Protocole expérimental .....	29
b) Résultats .....	31
- Mues et mortalités .....	31
- Nombres cumulés de métamorphoses .....	32
- Nombres moyens de mues avant la métamorphose	32
c) Discussion .....	34
2°) Effluents Montedison, Thann et Mulhouse et Tioxyde (4ème expérience) .....	35
a) Protocole expérimental .....	35
b) Résultats .....	35
- Mues et mortalités .....	35
- Nombres cumulés de métamorphoses .....	40
- Nombres moyens de mues avant la métamorphose	40
c) Discussion .....	44
3°) Effluent Tioxyde (5ème et 6ème expériences).....	46
a) Introduction .....	46
b) Cinquième expérience .....	46
- Protocole expérimental .....	46
- Résultats .....	47

./...

. Mues et mortalités .....	47
. Nombres cumulés de métamorphoses .....	53
. Nombres moyens de mues avant métamorphose	53
- Discussion .....	55
c) Sixième expérience .....	55
- Protocole expérimental .....	55
- Résultats .....	57
. Mues et mortalités .....	57
. Nombres cumulés de métamorphoses .....	61
. Nombres moyens de mues avant la métamorphose .....	61
- Discussion .....	64
 <u>D - INFLUENCE DE L'EFFLUENT TIOXIDE NEUTRALISE SUR LE DEVELOPPEMENT</u>	
<u>LARVAIRE (7ème expérience) .....</u>	65
a) Protocole expérimental .....	65
b) Résultats .....	65
- Pourcentages de mues et mortalités .....	65
- Nombres cumulés de métamorphoses .....	66
- Nombres moyens de mues avant la métamorphose	66
c) Discussion .....	68
 <u>E - DISCUSSION GENERALE</u> .....	
1°) L'effluent Montedison .....	70
2°) L'effluent Thann et Mulhouse .....	70
3°) L'effluent Tioxide .....	71
 <u>F - CONCLUSIONS GENERALES</u> .....	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	75

-----

ETUDE DES EFFETS D'EFFLUENTS DE FABRICATION DE DIOXYDE  
DE TITANE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE D'UN CRUSTACE  
DECAPODE : Palaemon serratus (PENNANT)

- - - - -

I - INTRODUCTION

Cette étude vient compléter les résultats obtenus lors d'une thèse présentée à la Faculté des Sciences de Marseille et intitulée : "Etude de la toxicité de solutions acides de sels de fer sur le plancton marin" (LASSUS, 1974). Un certain nombre de données concernant les toxicités directe et induite, de trois rejets industriels résultant de la fabrication du dioxyde de titane, sur des organismes planctoniques, y ont été rassemblées.

En ce qui concerne la toxicité à long terme, il nous a paru intéressant d'approfondir les premiers résultats obtenus sur des larves de décapodes, en augmentant la durée d'exposition aux différentes concentrations en effluent, et en recherchant la part relative de l'acidité et de la teneur en fer de ces effluents dans les effets observés.

Nous rappellerons brièvement avant la discussion des résultats, quelques généralités sur les effluents testés, les travaux effectués tant en France, qu'à l'étranger, et enfin la méthodologie utilisée dans la présente étude.

./....

## II - GENERALITES

Les effluents industriels chargés en sels de fer ont reçu jusqu'à présent la dénomination impropre de "boues rouges" ; en effet, on différencie les boues rouges vraies, composées principalement d'oxyde ferrique en milieu légèrement sodique et résultant du traitement alcalin de la bauxite en vue de la production d'aluminium, des rejets acides contenant une forte proportion de sulfate ferreux en solution dans l'acide sulfurique dilué, venant de la fabrication d'oxyde de titane.

Ce dernier type de rejet provoque, après dilution en mer, un précipité colloïdal composé essentiellement d'hydroxyde ferrique et dont la couleur varie du jaune au rouge-orangé.

Des effluents de ce type sont déversés en mer, aux Etats-Unis, en Allemagne, en Norvège, en Finlande, en Hollande, en Belgique, à Chypre....

Nous étudierons, dans ce travail, trois effluents déversés :

- en mer Tyrrhénienne, au moyen de navires-citernes, par la Société Montédison,
- en estuaire de Seine, au moyen d'émissaire, par les Fabriques de Produits Chimiques de Thann et de Mulhouse au Havre,
- en Mer du Nord, également au moyen d'émissaire, par la Tioxide S. A., à Calais.

La composition de ces effluents dépend des minerais utilisés, de l'acide sulfurique employé et du mode de traitement des déchets.

Nous avons déterminé, dans chacun des échantillons d'effluents reçus, les teneurs en acide sulfurique, en fer, en zinc, en cuivre, en cadmium et en mercure (tableau 1). La composition moyenne des effluents, telle qu'elle nous a été communiquée, est donnée dans le tableau 2.

./....

	Fe (mg/l)	Zn (mg/l)	Cu (mg/l)	Cd (mg/l)	Hg (mg/l)	Normalité (N)
MONTEDISON	44000	10	0,4	0,55	0,0004	3,00
THANN ET MULHOUSE	12500	102,5	2,3	0,40	<0,00005	0,71
TIOXIDE	4350	4,5	0,35	0,20	0,0004	1,05

TABLEAU 1 : Normalités et teneurs en différents métaux dosés dans les trois effluents.

	MONTEDISON	TIOXIDE	THANN ET MULHOUSE
pH	0,2	0,4	0,6
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110 g/l	56,7 g/l	33 g/l
Fe	48 g/l	4,8 g/l	8 g/l
Ti	2,6 g/l	Nd	0,55 g/l
Ti O <sub>2</sub> + solides	Nd	1,04 g/l	Nd
Na	70 mg/l	2566 mg/l	4855 mg/l
K	25 mg/l	Nd	Nd
Mg	3200 mg/l	Nd	Nd
Ca	265 mg/l	Nd	Nd
Al	385 mg/l	1401 mg/l	Nd
V	275 mg/l	190 mg/l	19 mg/l
Cr	40 mg/l	57 mg/l	7,5 mg/l
Mn	585 mg/l	67 mg/l	300 mg/l
Co	Nd	2,2 mg/l	Nd
Ni	Nd	2,2 mg/l	Nd
Cu	Nd	0,63 mg/l	Nd
Zn	Nd	19,5 mg/l	Nd
Cd	10 mg/l	< 0,06 mg/l	0,2 mg/l
Hg	Nd	0,033 mg/l	Nd
Sn	Nd	0,5 mg/l	Nd
Pb	10 mg/l	< 0,5 mg/l	1,2 mg/l
Si	2200 mg/l	57 mg/l	Nd
As	Nd	Nd	0,15 mg/l

TABLEAU 2 : Composition des 3 effluents d'après les données communiquées  
(Nd = non déterminé)

./...

A - LES TRANSFORMATIONS CHIMIQUES DES EFFLUENTS DANS LE MILIEU MARIN

Lorsque ces effluents sont rejetés, ils sont à la fois dilués, hydrolysés et neutralisés.

Rappelons que l'eau de mer est légèrement basique (pH = 8,0 à 8,2) ; les sels qui s'y trouvent dissous lui confèrent un certain pouvoir tampon.

Dans le but d'étudier la relation qui existe entre la précipitation de l'hydroxyde ferrique et la neutralisation de l'acidité par l'eau de mer, nous avons procédé à des dilutions d'une solution faiblement acide (1 % de  $H_2SO_4$  34 N) de sulfate ferreux (30 g/l de fer sous forme de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ).

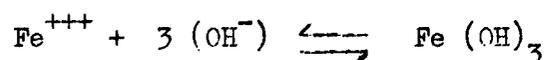
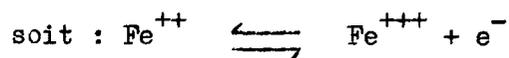
Les valeurs du pH de ces dilutions après 24 h ont été notées ainsi que l'apparition de fer précipité (tableau 3).

DILUTIONS EN EAU DE MER	TENEURS EN FER (g/l)	VALEURS DU pH APRES 24 HEURES
1/5	6,00	1,40
1/10	3,00	1,65
1/20	1,50	1,90
1/50	0,60	2,40
1/100	0,30	3,00
1/125	0,24	3,25
1/150	0,20	3,50
1/175	0,17	3,85
1/200	0,15	4,52
1/250	0,12	5,45
1/500	0,06	6,20
1/1000	0,03	6,65

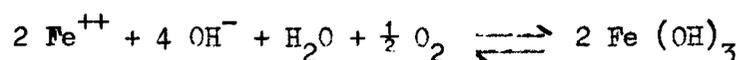
TABLEAU 3 : Valeurs du pH pour différentes dilutions d'une solution contenant 30 g/l de fer et 1 % de  $H_2SO_4$  34 N.

./...

On constate que pour des valeurs de pH inférieures à 3 les solutions restent limpides. En effet, l'équilibre fer précipité/fer soluble dépend d'une part de l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique et d'autre part des équilibres entre les ions  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}^+$ , et  $\text{SO}_4^{--}$ ,



la réaction globale d'équilibre s'écrivant :



Ces équilibres ont été très étudiés, notamment par DUURSMA et SEVENHUYSEN (1966) en ce qui concerne la solubilité du fer dans l'eau de mer. Il apparaît, d'après la courbe théorique d'apparition du  $\text{Fe} (\text{OH})_3$  calculée à partir d'un produit de solubilité =  $10^{-36}$  que le pH limite pour l'état particulaire est égal à 4,52.

Outre leurs concentrations élevées en fer et en acide sulfurique, ces effluents se caractérisent par la présence de quelques ppm de métaux lourds.

La dilution qui s'opère lors du rejet ramène rapidement ceux-ci au niveau des valeurs usuelles dans le milieu marin.

## B - EFFETS BIOLOGIQUES DES EFFLUENTS DANS LE MILIEU MARIN

Les effets de ces effluents sur des organismes marins ont été étudiés dans divers pays, notamment en Allemagne, aux Etats-Unis, en Italie et en France.

### . Allemagne

L'effluent rejeté en Mer du Nord par la Titan Gesellschaft a été testé sur des oeufs et des larves de Clupea harengus (KINNE et ROSENTHAL, 1967).

./...

Les embryons présentent une augmentation de la fréquence des battements cardiaques, ainsi que des anomalies dans leur développement. Le comportement nutritif et la motilité sont également touchés. Des effets comparables ont été notés à l'égard de Gobius pictus et Solea solea (KINNE et SCHUMANN, 1968).

KAYSER (1969, 1970) montre en laboratoire un effet nocif de l'effluent sur le phytoplancton (Prorocentrum micans, Ceratium furca, et Phaeocystis poucheti) jusqu'au 1/5000. Les cellules survivant à cette dilution ont une reproduction limitée.

"In situ", on n'a constaté que peu d'altération dans les populations benthiques pendant deux ans, en dépit des augmentations en fer de la couche superficielle des sédiments (WEICHART, 1972 ; RACHOR, 1972 ; BOKN et Coll., 1974). Il n'y a pas eu d'incorporation notable du fer dans les sédiments, et des études ultérieures entreprises par WEICHART (1975) ont montré qu'il n'y avait pas d'accroissement continu de la quantité de fer dans la zone étudiée.

L'influence des particules d'hydroxyde ferrique, sur le comportement de Mytilus edulis, a été étudiée par WINTER (1972). La filtration des flocculats d'hydrate de fer provoque une augmentation de la production des 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'hy-persécrétion de mucus a été également notée chez des Polychètes tubicoles (RACHOR, 1972).

#### . Etats-Unis

En ce qui concerne l'effluent américain, une synthèse de travaux, portant sur 22 ans pour un déversement total de 50 millions de tonnes en Baie de New-York par barges, aboutit aux résultats suivants :

./.....

- influence mineure de l'effluent sur la production primaire de la Baie,
- pas d'effets nocifs de concentrations quatre fois supérieures à celles trouvées dans la nature, sur des espèces phytoplanctoniques cultivées en laboratoire,
- gêne au niveau de la reproduction et retard dans le développement d'un copépode, Pseudotiaptomus coronatus,
- adsorption de particules de fer sur l'exosquelette des nauplii et des adultes de cette espèce. Mais des essais ultérieurs, utilisant des dilutions filtrées du rejet, montrent une persistance des troubles qui ne peuvent être entièrement imputés au fer (VACCARO et Coll., 1972).

Dans des essais en laboratoire, GRICE et Coll., (1973) ont procédé à des tests de toxicité à court terme en simulant les valeurs de pH rencontrées dans le sillage du navire-citerne. En dépit d'un comportement perturbé au moment de l'exposition au rejet déversé, les copépodes testés (Calanus finmarchicus, Temora longicornis et Pseudocalanus sp.) ne présentent plus aucun trouble aussitôt après l'augmentation de la dilution initiale.

Dans une expérimentation de plus longue durée (48 heures) utilisant des concentrations constantes d'effluent, seules celles de pH bas (de 2,8 à 6,8) provoquent une certaine mortalité ; les auteurs précisent toutefois que ces dilutions n'existent que pendant un temps très court dans le milieu naturel. 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.

AKESSON (1970), étudiant l'influence de l'acidité de ces rejets sur le polychète Ophryotrocha labronica, trouve que les effets létaux, constatés aux pH inférieurs à 5 disparaissent au-delà de pH 6,5.

#### . Italie

L'effluent de l'usine Montedison a fait l'objet d'observations hydrologiques, biologiques et chimiques, lors des rejets par navires-citernes.

./.....

Au cours de missions conjointes entreprises par l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes et le Laboratoire Central d'Hydrobiologie de Rome (Rapports internes : ABBES, LEROY, MICHEL, 1972), il est apparu que des rejets entre la surface et - 15 m assuraient une dispersion amenant la dilution au voisinage du 1/50000. Rappelons que ces déversements se faisaient alors en surface avec brassage par les hélices du navire-citerne. Les modalités de rejet ont été modifiées ensuite.

Des observations effectuées dans les zones de décharge (campagne Emeraude du C.N.E.X.O., 1973) confirment la neutralisation rapide de l'acidité après dilution dans le milieu marin ; parallèlement, le sulfate ferreux se transforme en hydroxyde ferrique et donne une coloration rougeâtre au milieu marin.

Les flocculats ferriques, qui n'ont rien de comparables avec des boues insolubles, ont tendance à sédimenter et à s'adsorber sur les coquilles et téguments d'organismes sessiles.

Par ailleurs, au laboratoire, des expériences à court et long termes, exécutées par le CERBOM (rapport général n° 202), révèlent une toxicité de cet effluent sur différents organismes du phytoplancton, (Diogenes sp. et Asterionella japonica) et du zooplancton (Artemia salina) ainsi que sur des crustacés, des mollusques, des poissons et des invertébrés benthiques.

Les auteurs trouvent une toxicité évidente pour des dilutions inférieures au 1/2000 (phyto et zooplancton) et 1/16000 (poissons) après 9 jours d'expérimentation.

./.....

. France

Les effluents de Thann et Mulhouse ont fait l'objet d'une étude par le CERBOM en 1974. Les seuils toxiques sont de l'ordre - en dilution - de 1/640 pour Artemia salina, 1/400 pour Nereis diversicolor, et 1/640 pour Asterionella japonica.

Ces rejets et ceux de Tioxyde ont été étudiés également à l'I.S.T.P.M.

Il ressort d'une étude sur les larves de Palaemon serratus (16 jours de développement) et de Portunus puber (24 jours de développement) que l'hydroxyde ferrique pourrait gêner physiquement les organismes testés (LASSUS, 1974), tandis que l'acidité des effluents est le facteur primordial de la toxicité à l'égard des organismes (LASSUS et MAGGI, 1974), tant que le pH est bas.

En fait, l'acidité est très rapidement neutralisée grâce au pouvoir tampon de l'eau de mer. On calcule qu'un litre d'acide sulfurique concentré ( $d = 1,83$ ) est neutralisé par 15 m<sup>3</sup> d'eau de mer (Livre blanc concernant les rejets).

Il ressort, de l'ensemble des travaux que nous venons d'examiner, que ces résidus acides peuvent présenter une certaine toxicité directe lorsqu'ils sont insuffisamment dilués. Lors d'expérimentations en laboratoire, les stades larvaires apparaissent très sensibles, ainsi que les organismes du plancton.

"In situ", on constate que les rejets sont rapidement neutralisés du fait de la dilution, et on n'a pas mis en évidence d'effets biologiques appréciables.

Nous avons essayé de déterminer si les effets observés sur les larves de crustacés étaient imputables au fer seul ou bien s'il y avait synergie de l'acidité et de la charge en fer.

./.....

### III - METHODOLOGIE

#### A - CHOIX DES ANIMAUX D'EXPERIENCE

##### 1°) Préambule

Au cours de précédents travaux, il est apparu que le branchiopode Artemia salina ne pouvait être représentatif à lui seul de l'ensemble du plancton marin. En effet, c'est un animal eurytherme (4 à 37° C) et euryhalin (15 à 80 ‰) (DUTRIEU, 1960), qui, de plus, s'adapte parfaitement à un enrichissement du milieu en matière organique.

Vis-à-vis de l'acidité, A. salina résiste très bien dès que le pH est supérieur à 5,5 (MAGGI et LASSUS, 1974).

Tout ceci nous a conduit à envisager d'autres crustacés comme matériel d'étude.

Nos premiers essais ont porté sur des larves de brachyours : Maia squinado, Carcinus maenas et Macropipus puber ; les difficultés expérimentales nous ont conduit à rejeter l'utilisation de ces trois espèces.

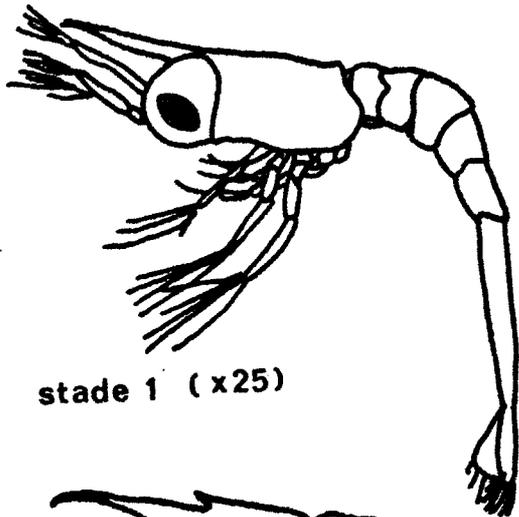
Nous avons finalement arrêté notre choix sur des larves d'un macroure : la crevette rose, Palaemon serratus, dont l'élevage en laboratoire est très pratiqué (SOLLAUD, 1923 ; REEVE, 1969 ; FIGUEIREDO, 1973 ; DEROUX, CAMPILLO et BRADBURY, 1975 ; CAMPILLO, 1975 a et b ; CAMPILLO et LUQUET, 1975). Il est relativement aisé d'obtenir toute l'année des femelles grainées et de les faire pondre en laboratoire.

##### 2°) Ecologie de P. serratus

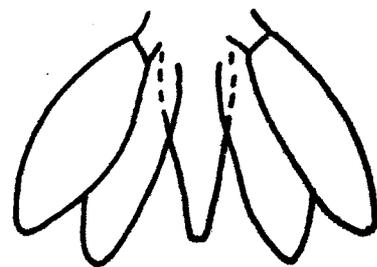
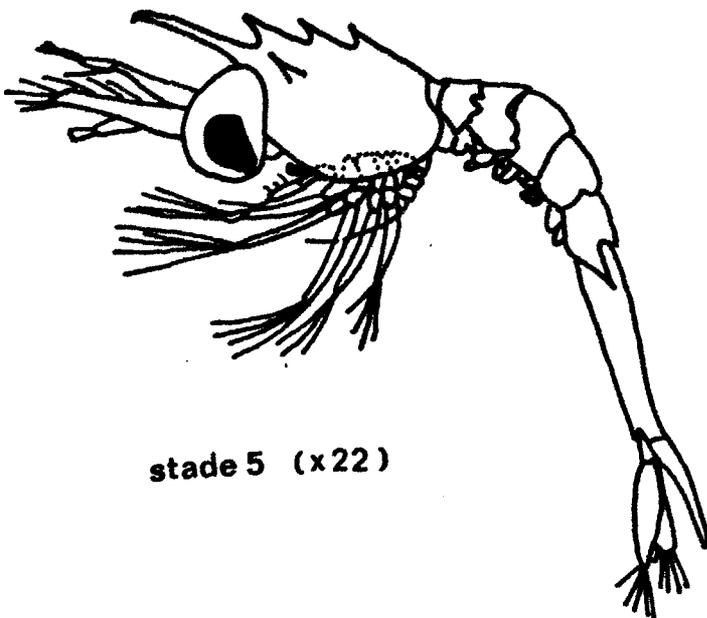
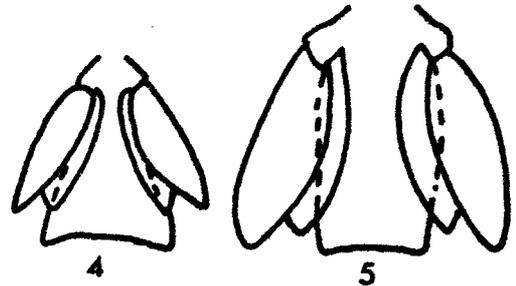
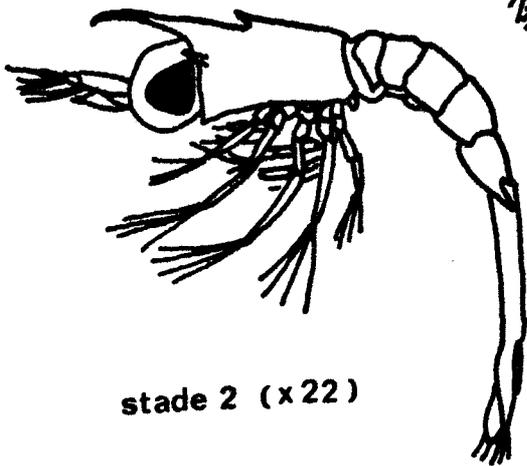
Les larves se trouvent toute l'année dans le plancton en Manche (GURNEY, 1923 ; LEBOUR, 1947) et en Méditerranée pendant une très longue période de l'année (BOURDILLON-CASANOVA, 1960).

Leur développement a été étudié par SOLLAUD (1923) et REEVE (1969). Le nombre de stades avant la métamorphose va de 5 à 9 selon les conditions climatiques et les modalités d'élevage (planches 1 et 2).

./.....



carapace thoracique du stade 3



6 et suivants

Evolution du telson et des uropodes

Planche 1 :

Stades larvaires de *Palaemon serratus* (d'après SOLLAUD\_1923 et REEVE\_1969)

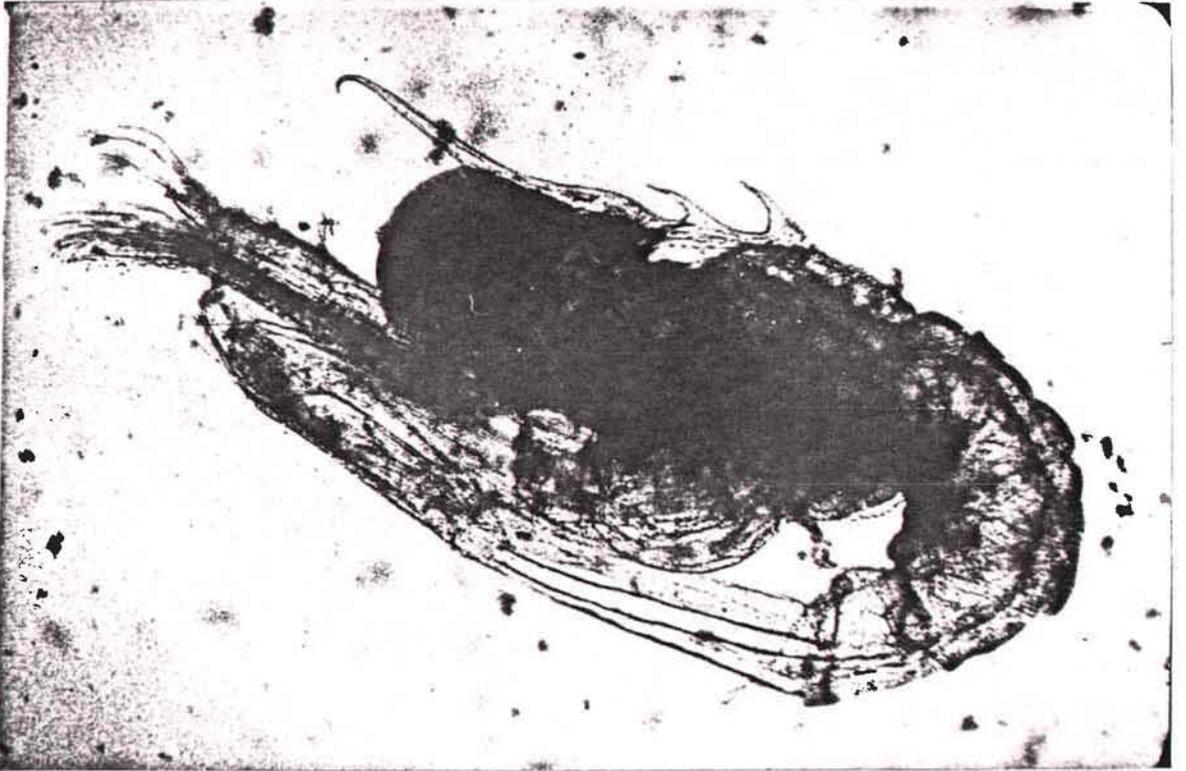


Photo 1 : Larve planctonique au stade 3. On distingue les deux épines sur le bord supérieur du rostre.

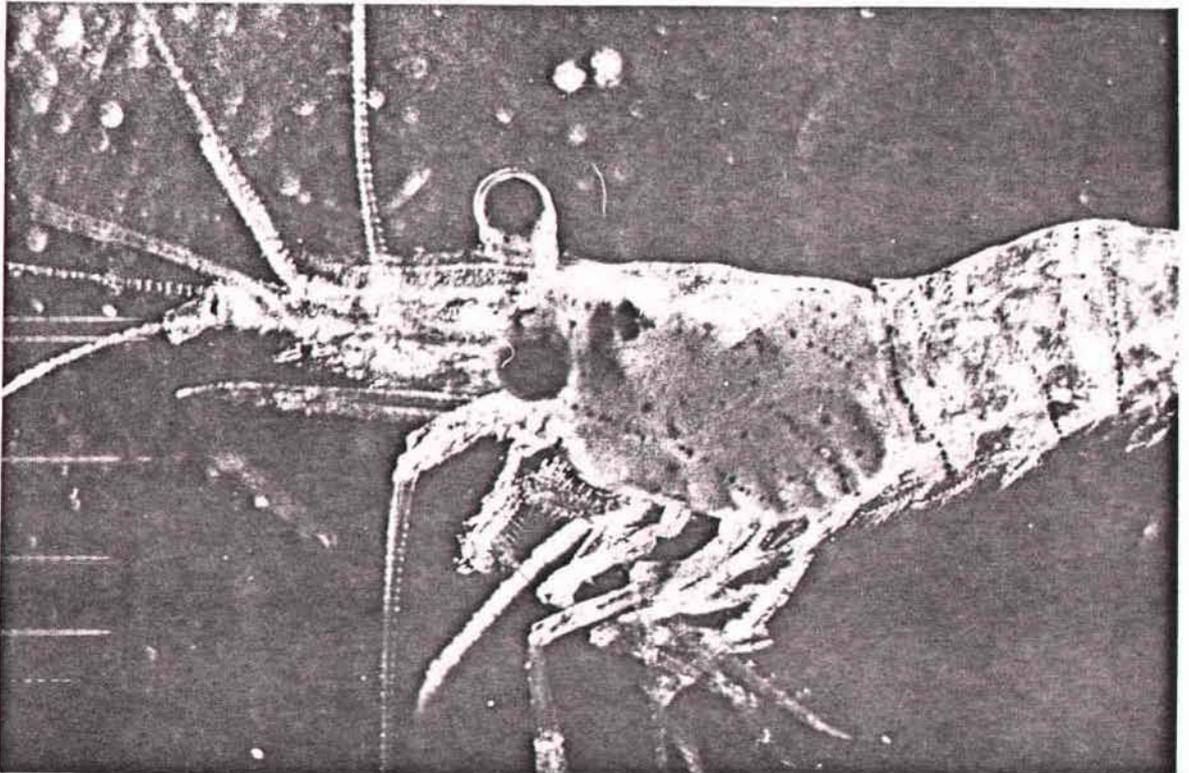


Photo 2 : Post-larve. On remarque l'absence de péréiopodes natatoires.

### 3°) Influence de différents facteurs sur le développement

a) La température : la durée du développement des larves est étroitement liée à la température - optimum 20° C, limite supérieure à 25° C - (REEVE, 1969).

Les larves testées dans ce travail ont été obtenues à partir de femelles grainées pêchées au large de Roscoff ou du Croisic. Les femelles ont été rapportées en eau de mer oxygénée au laboratoire de Nantes en moins de 6 heures et placées en aquariums dans une salle régulée à 16°C. Elles ont été ultérieurement placées à 20° C dans de petits volumes (2 à 4 l) d'eau de mer filtrée pour accélérer la maturation des oeufs.

Les larves ont été maintenues pendant la durée du développement à 18° C sauf pour l'expérience 4 qui a été conduite à 21° C.

b) Salinité : la salinité de l'eau de mer utilisée pour les élevages a été de 30 à 31 ‰ environ. On peut considérer qu'elle restait constante du fait des changements de milieux très fréquents.

## B - CONDITIONS D'ELEVAGE

### 1°) Matériel et méthodes

a) Matériel : nous avons utilisé des cristallisoirs pyrex de 15 ml contenant 10 ml de milieu, aux différentes dilutions, et recevant une larve chacun. Il est en effet nécessaire de séparer les larves de P. serratus, même aux premiers stades, en raison du cannibalisme intra-spécifique.

En général, les expériences ont porté sur des lots de 30 individus par milieux différents. Chaque lot était disposé sur des portoirs munis d'alvéoles permettant un transport aisé des cristallisoirs (planche 3).

b) Changement de milieu : dans les élevages en eau stagnante, ce qui est le cas lorsqu'il s'agit d'études sur des polluants, les risques de contamination bactérienne sont d'autant plus grands que le milieu est chargé en matières organiques (nourriture, cadavres en décomposition, boulettes fécales ...). Aussi, les milieux ont-ils été changés toutes les 48 h, les animaux morts et les exuvies étant prélevés et dénombrés tous les jours.

./....

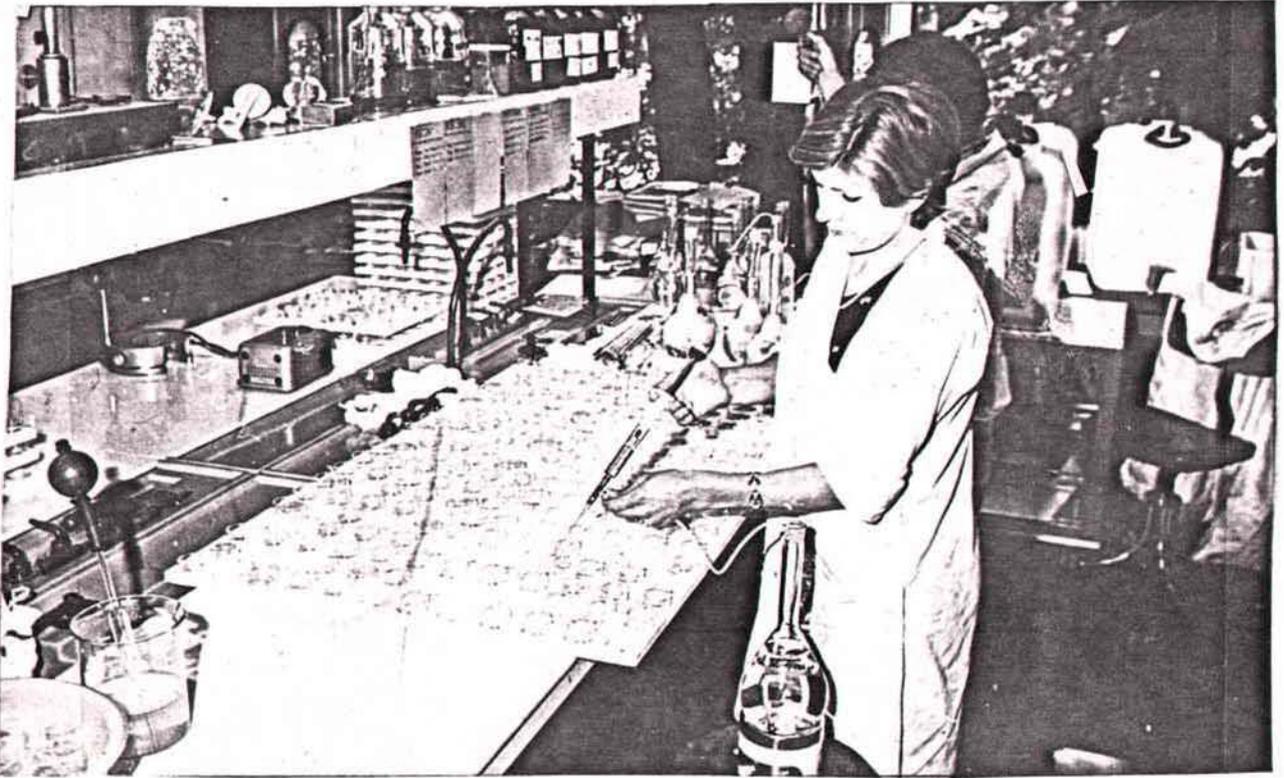
PLANCHE 3

Photo 3 : Renouvellements bi-journaliers des solutions essais et témoins  
contenant les larves de P.serratus.

L'eau de mer utilisée était filtrée sur membrane cellulosique 0,45  $\mu$ .

c) Nutrition : les larves de P. serratus ne peuvent être maintenues en conditions normales d'alimentation qu'avec une concentration limite de 10 nauplii d'Artemia salina juste éclos par ml. De cette façon, la fréquence des mues était comparable et le plus souvent meilleure que celle observée par REEVE (1969).

Néanmoins, après le 5ème stade, il semble que les nauplii d'artémies ne suffisent plus ; certains auteurs ajoutent des oeufs de Pénéidées. De toutes les façons, il semble qu'un léger apport organique rende la métamorphose plus précoce (WICKINS, 1970 ; FIGUEIREDO, 1973). C'est pourquoi nous avons ajouté 0,01 à 0,02 ml de cultures phytoplanctoniques (mélange de Phaeodactylum tricornutum et Dunaliella tertiolecta), à ce stade du développement, dans chaque cristallisoir contenant 10 ml de milieu et une larve.

## 2°) Processus expérimentaux

Nous avons effectué sept expérimentations de durées variant entre 32 et 60 jours.

Les milieux et la nourriture ont été renouvelés toutes les 48 heures pour chaque larve.

Les trois premières expérimentations ont porté sur l'effluent Montédison, la quatrième sur les trois effluents Montédison, Tioxide et Thann et Mulhouse et enfin les trois dernières sur l'effluent Tioxide.

Dans les deux premières expériences les changements bi-journaliers de milieu ont été effectués à partir de dilutions préparées au début de l'expérimentation pour toute la durée des essais.

Nous avons utilisé pour la dernière expérience des dilutions de l'effluent Tioxide préparées quelques jours auparavant et présentant alors une stabilité du pH. Notre but était de supprimer l'effet propre à l'acidité des dilutions.

./.....

Les autres expériences ont porté sur des dilutions reparamétrées, tous les deux jours, immédiatement avant les changements de milieux ; nous avons voulu nous situer ainsi dans des conditions de rejets cycliques.

Des mesures de pH des différentes dilutions ont été effectuées journalièrement afin de suivre l'évolution de l'acidité des milieux.

La métamorphose des larves commence généralement à partir du 20ème jour, c'est-à-dire après 8 à 9 mues successives. Nous avons exprimé, pour chaque expérience, les pourcentages de mues, de mortalités et les nombres cumulés de métamorphoses. En outre, nous avons estimé, pour chaque dilution, le nombre moyen de mues précédant la métamorphose.

Le pourcentage de mues et de mortalités ont été exploités et représentés en utilisant une table traçante couplée avec une calculatrice HEWLETT-PACKARD modèle 9830 A.

Antérieurement aux tests sur le développement larvaire, nous avons réalisé des essais de toxicité directe, sur des larves de P. serratus au stade 1, dans le but de préciser les concentrations létales limites.

#### IV - RESULTATS ET DISCUSSIONS

##### A - TEST PRELIMINAIRE DE TOXICITE AIGUE - DETERMINATION DES SEUILS LETAUX

###### 1°) Méthode expérimentale

Immédiatement après éclosion des oeufs d'une femelle graine de P. serratus à 20° C, nous avons récupéré les larves qui se trouvaient donc toutes au stade I.

Elles ont été réparties dans les différents milieux testés, à raison de 25 pour 2 l de milieu. Le test a été effectué en cristallisoirs d'une contenance de 4 l.

./.....

Nous avons testé :

- l'effluent Montédison (44 g/l de fer et 8,8 % de  $H_2SO_4$ ) aux dilutions 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000,
- une solution de sulfate ferreux (44 g/l de fer et 2 % de  $H_2SO_4$ ) aux dilutions 1/250, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 et 1/3000,
- une solution à 2 % d'acide sulfurique aux dilutions 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 et 1/3000.

La normalité de l'acide utilisé était de 34 N pour une densité de 1,83.

Une aération constante a été maintenue à l'intérieur des cristallisoirs.

La nourriture, sous forme de nauplii vivants d'Artemia salina a été fournie journellement.

L'évolution du pH a été suivie chaque jour. La mortalité a été évaluée, à 48 et 96 h, sur deux lots de 25 individus pour chacune des dilutions.

## 2°) Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau 4. Afin de faciliter l'appréciation synoptique des résultats, nous avons adopté les symboles suivants :

- M = effluent Montédison,
- RAM = solution de référence acide,
- RFM = solution de référence fer.

Il ressort de ces résultats que les mortalités sont totales lorsque le pH reste inférieur à 6,0 pendant les quatre jours d'expérience.

Si le pH est de 6,0 au temps 0, il s'élève progressivement et aucune mortalité notable n'est enregistrée.

Ces résultats nous ont servi à établir les dilutions pour les expérimentations portant sur l'ensemble du développement larvaire.

		Evolution du pH en 4 jours					Pourcentage de mortalité à		
		T0	T1	T2	T3	T4	48 h	96 h	
Témoins		8,0	8,0	8,0	8,1	8,1	0	0	
M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,8 % Fe 44 g/l	1/3000	6,3	7,5	7,6	7,7	7,7	0	0	
	1/2500	6,2	7,2	7,5	7,6	7,6	0	0	
	1/2000	6,0	6,8	7,0	7,1	7,1	0	16	
	1/1500	5,4	6,2	5,6	5,2	5,0	100	100	
	1/1000	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100	100	
	R A M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 %		1/3000	7,1	7,9	8,0	8,1	8,1	0
		1/2500	7,0	7,8	8,0	8,1	8,1	0	0
		1/2000	6,9	7,8	8,0	8,1	8,1	0	0
		1/1500	6,8	7,8	8,0	8,1	8,1	0	0
		1/1000	6,6	7,8	7,9	8,0	8,0	0	0
		1/500	5,9	7,2	7,6	7,7	7,7	0	0
		1/250	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100	100
		1/100	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	100	100
R F M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 % Fe 44 g/l	1/3000	7,0	7,7	7,9	8,0	8,0	0	0	
	1/2500	6,9	7,6	7,8	7,9	7,9	0	0	
	1/2000	6,8	7,6	7,8	7,9	7,9	0	0	
	1/1500	6,7	7,4	7,7	7,7	7,8	0	0	
	1/1000	6,6	7,0	7,1	7,1	7,1	0	10	
	1/500	5,9	6,7	4,9	4,8	4,7	100	100	
	1/250	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	100	100	

TABLEAU 4 : Evolution du pH en 4 jours et pourcentages de mortalité, à 48 et 96 heures, pour des stades I de *P. serratus* soumis à des dilutions de l'effluent Montédison (M), d'une solution acide (RAM) et d'une solution de fer (RFM).

./....

B - MILIEUX NEUTRALISES - REJETS DE TYPE PONCTUEL - INFLUENCE DE L'EFFLUENT  
MONTEDISON SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE :

1°) Première expérience

Dans cette expérimentation nous avons voulu reproduire un rejet sporadique du type de celui de la Société Montédison : l'effluent est rapidement dilué et le pH s'approche de celui de l'eau de mer. Ces conditions devraient permettre la mise en évidence de l'action de fortes concentrations en fer sur le développement des larves de P. serratus.

a) Protocole expérimental

Nous avons testé les dilutions 1/3000, 1/5000 et 1/10000 de :

- l'effluent Montédison (M), qui contient 44 g/l de fer et 8,8 % d'acide sulfurique,
- la référence acide (RAM) : 2 % d'acide sulfurique,
- la référence fer (RFM) : 2 % d'acide sulfurique et 44 g/l de fer.

Dix litres de chacune des dilutions ont été préparés de manière à renouveler le milieu tous les deux jours dans les cristallisoirs contenant les crevettes. Le pH a été mesuré pendant 5 jours (tableau 5).

L'expérience a duré 32 jours.

			Evolution du pH en 5 jours					
			T0	T1	T2	T3	T4	T5
Témoins			8,05	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10
M		1/100000	7,10	7,80	7,95	8,00	8,05	8,00
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,8 %	1/5000	6,90	7,60	7,85	7,95	8,00	8,00
Fe	44 g/l	1/3000	6,50	7,10	7,65	7,75	7,80	7,80
R A M			7,90	8,05	8,05	8,05	8,10	8,10
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 %	1/5000	7,80	8,00	8,05	8,05	8,10	8,10
		1/3000	7,60	7,80	8,05	8,05	8,10	8,05
R F M			7,70	7,90	8,00	8,00	8,10	8,10
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 %	1/5000	7,55	7,75	7,95	8,00	8,10	8,10
Fe	44 g/l	1/3000	7,35	7,65	7,90	8,00	8,05	8,05

TABEAU 5 : Evolution du pH en 5 jours pour des dilutions de l'effluent Montédison (M), d'une solution de fer (RFM) et d'une solution acide (RAM).

./.....

## b) Résultats

- Mues et mortalités : Les pourcentages de mues ont été représentés sous la forme d'histogrammes et les pourcentages de mortalité correspondants sous la forme de graphiques (Annexes 1 à 6).

Afin de faciliter l'interprétation des histogrammes des pourcentages de mues, nous avons détaillé, dans l'annexe A<sub>0</sub>, la succession des stades larvaires en prenant comme exemple le témoin correspondant à la durée d'expérimentation la plus longue (60 jours).

La régularité des mues jusqu'au quatrième stade du développement est liée essentiellement à un déterminisme génétique, alors que par la suite les facteurs nutritionnels et ambiants, prennent une importance accrue (FIGUEIREDO, 1973).

Chaque histogramme des dilutions de l'effluent (M) de la référence en fer (RFM) et de la référence acide (RAM) est comparé à l'histogramme témoin.

. L'effluent Montédison (Annexes 1 et 2) : les pourcentages maximums de mues dans les dilutions de l'effluent sont en retard d'un jour par rapport au témoin.

La mortalité a été comparable dans tous les cas, excepté dans la dilution 1/5000 où elle a été plus importante ; néanmoins, elle n'a jamais dépassé 30 % pendant la majeure partie du développement.

. La référence fer (Annexes 3 et 4) : on ne remarque aucun décalage dans les maximums de mue entre le témoin et les dilutions testées.

Il n'y a pas de différence notable non plus dans l'importance des valeurs maximales de pourcentages de mues.

La mortalité, enfin, reste faible dans tous les cas et ne dépasse jamais 20 % pendant la majeure partie du développement.

./.....

. La référence acide (Annexes 5 et 6) : on ne note pas de décalage dans les maximums de mues.

Par ailleurs, on observe une légère diminution de l'amplitude des histogrammes pour les dilutions 1/5000 et 1/3000.

Enfin, les pourcentages de mortalités restent inférieurs à 20 % exception faite pour la dilution 1/10000 où l'on observe une mortalité importante à partir du 20ème jour.

- Nombres cumulés de métamorphoses

L'ensemble de nos expériences montre l'apparition des premières métamorphoses à partir du 20ème jour. La représentation graphique des nombres cumulés de métamorphoses (fig. 1) met en évidence le phénomène.

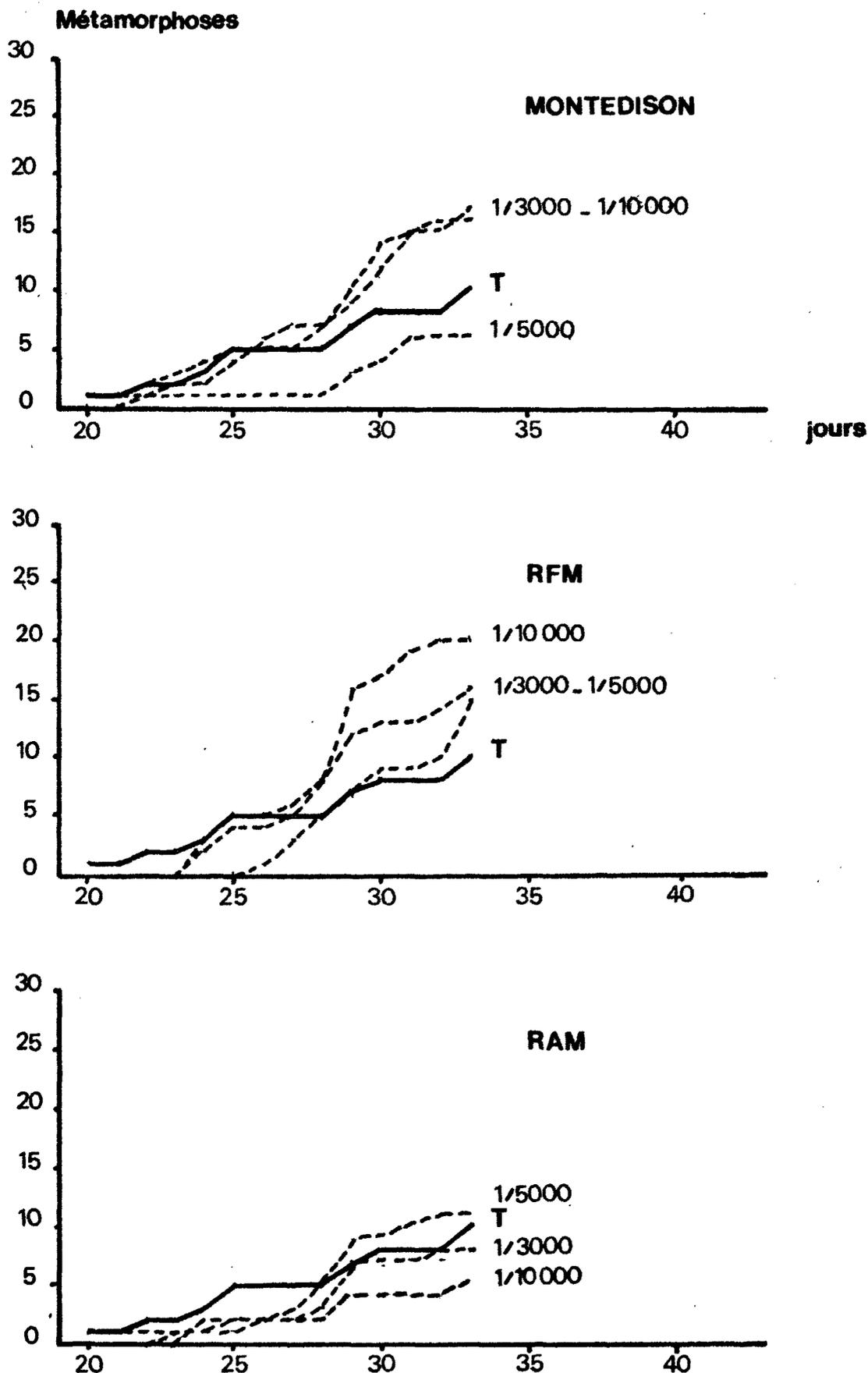
Le nombre de post-larves augmente de façon très comparable entre le 20ème et le 32ème jour du développement, excepté pour M 1/5000 et RAM 1/10000 où il est relativement faible ; ce dernier point est probablement en rapport avec les mortalités plus importantes constatées avec ces deux dilutions.

- Nombres moyens de mues avant la métamorphose

Il nous a paru utile de calculer le nombre moyen de mues avant la métamorphose afin d'avoir une idée de l'état physiologique de la population car une fréquence accrue des mues, avant métamorphose, résulte généralement d'un déséquilibre des différents facteurs ambiants (tableau 6).

La comparaison des moyennes relatives aux différentes dilutions et la dispersion du nombre des mues observées dans chacune d'elles ne permettent pas de déceler des différences notables dans l'état physiologique des lots de larves par rapport au témoin.

./.....



**Figure 1 : *P. serratus* Expérience 1**

**Nombres cumulés de métamorphoses en post-larves**

		MOYENNES	ECARTS-TYPES	NOMBRE DE MESURES
Témoins		7,4	1,25	22
M	1/10000	6,9	0,97	23
	1/5000	7,5	0,96	19
	1/3000	6,9	0,95	24
R F M	1/10000	6,9	0,63	23
	1/5000	7,7	0,73	20
	1/3000	7,3	0,98	23
R A M	1/10000	7,6	1,11	15
	1/5000	7,4	0,95	22
	1/3000	7,8	0,98	21

TABLEAU 6 : Moyennes du nombre de mues, avant la métamorphose, relative à chaque milieu testé.

c) Discussion

Ces résultats ne montrent pas de différence significative entre le témoin et l'effluent Montédison aux trois dilutions testées en ce qui concerne la mortalité et la fréquence des mues ; il en est de même pour les solutions de référence en fer et en acide.

Il faut cependant remarquer que, dès la 4ème mue, les maximums de mues dans les dilutions de l'effluent Montédison sont en retard d'un jour par rapport à ceux du témoin.

En ce qui concerne le nombre de mues antérieures à l'apparition des post-larves il n'y a aucune variation significative entre les différents lots de crevettes.

./....

En revanche, les nombres cumulés de métamorphoses font apparaître une maturation plus rapide des individus soumis aux dilutions de l'effluent et de la solution de sulfate ferreux.

En conclusion il est difficile, d'après ces résultats, d'apprécier la part relative du fer ou de l'acidité dans une éventuelle toxicité puisque, pour les valeurs maximales de 14,6 mg/l de fer et 0,0029 % d'acide sulfurique (M 1/2000) on ne note aucun effet nocif.

De tels résultats ne permettant pas de définir un mode d'action nous avons repris l'expérimentation en utilisant des concentrations un peu plus élevées.

## 2°) Deuxième expérience

### a) Protocole expérimental

- Nous avons testé les dilutions 1/2000, 1/3000 et 1/5000 de :
- l'effluent Montédison (M) : 44 g/l de fer et 8,8 % d'acide sulfurique,
  - la référence acide (RAM) : 2 % d'acide sulfurique,
  - la référence fer (R F M) : 2 % d'acide sulfurique et 44 g/l de fer.

L'expérimentation a duré 34 jours à la température de 18° C. Le pH, mesuré quotidiennement, évolue rapidement vers celui de l'eau de mer (tableau 7).

### b) Résultats

Les pourcentages de mues et de mortalités sont figurés dans les Annexes 7 à 12.

#### - Mues et mortalités

. L'effluent Montédison (Annexes 7 et 8) : les amplitudes maximales des pourcentages de mues des trois dilutions testées sont comparables à celles des témoins.

Jusqu'au 6ème stade larvaire on ne note pas de décalage entre les maximums de mues ; par contre à partir du 7ème un léger retard apparaît, entre ces maximums par rapport aux témoins. Ceci a déjà été noté dans l'expérience précédente.

./....

		Evolution du pH en 5 jours					
		T0	T1	T2	T3	T4	T5
Témoïn		8,00	8,05	8,00	8,00	8,10	8,10
M	1/5000	6,65	7,30	7,80	7,90	8,00	8,00
	1/3000	6,30	6,90	7,60	7,70	7,80	7,80
	1/2000	6,10	6,70	7,30	7,50	7,60	7,60
R A M	1/5000	7,55	7,85	8,00	8,00	8,10	8,10
	1/3000	7,30	7,80	8,00	8,00	8,10	8,10
	1/2000	7,15	7,75	8,00	8,00	8,10	8,10
R F M	1/5000	7,35	7,65	7,95	8,00	8,05	8,10
	1/3000	7,20	7,35	7,85	7,90	8,00	8,05
	1/2000	7,05	7,25	7,80	7,90	7,95	8,00

**TABLEAU 7** : Evolution du pH en 5 jours pour des dilutions de l'effluent Montédison (M), d'une solution de fer (R F M) et d'une solution d'acide (R A M).

La mortalité pratiquement nulle en début d'expérimentation, devient importante à partir du 19ème jour et ceci pendant trois à quatre jours essentiellement ; elle dépasse 50 % en fin d'expérience.

Cette importante mortalité, étalée sur une courte période, se retrouve d'ailleurs pour tous les lots d'animaux de cette expérience. Elle est imputable à un déficit alimentaire accidentel dû à une mortalité subite des nauplii d'artémies ajoutés lors du changement de milieu, le 19ème jour. Ces conditions sont revenues à un état normal dès le 21ème jour, mais les larves de P. serratus ont plus ou moins bien résisté individuellement à ce traumatisme. De ce fait la mortalité s'est accrue dans les jours suivants et s'est répercutée dans l'importance des amplitudes maximales des pourcentages de mue dans la suite de l'expérience.

./.....

. La référence fer (Annexes 9 et 10) : on retrouve le même décalage des maximums de mues, par rapport aux témoins, à partir du 7ème stade larvaire. De plus, pour chacune des périodes de mues (2 à 3 jours), le nombre d'individus muant en retard s'accroît parallèlement à l'augmentation de la teneur en fer. Progressivement, ce processus se traduit par des pics de plus en plus importants mais cependant décalés, dans le temps, de deux à trois jours par rapport aux témoins.

Quant aux pourcentages de mortalité ils deviennent importants vers le 19ème jour pour les raisons que nous avons précédemment indiquées.

. La référence acide (Annexes 11 et 12) : en ce qui concerne la dilution 1/5000 on ne note pas de décalage des maximums de mues par rapport aux témoins ; notons que la forte amplitude des pics relative à cette même dilution, est liée à une mortalité très élevée (plus de 60 % dès le 23ème jour).

Pour les autres dilutions, la mortalité est comparable à celle des témoins ; l'uniformité de la seconde partie du développement ne permet pas de discerner des amplitudes maximales prononcées.

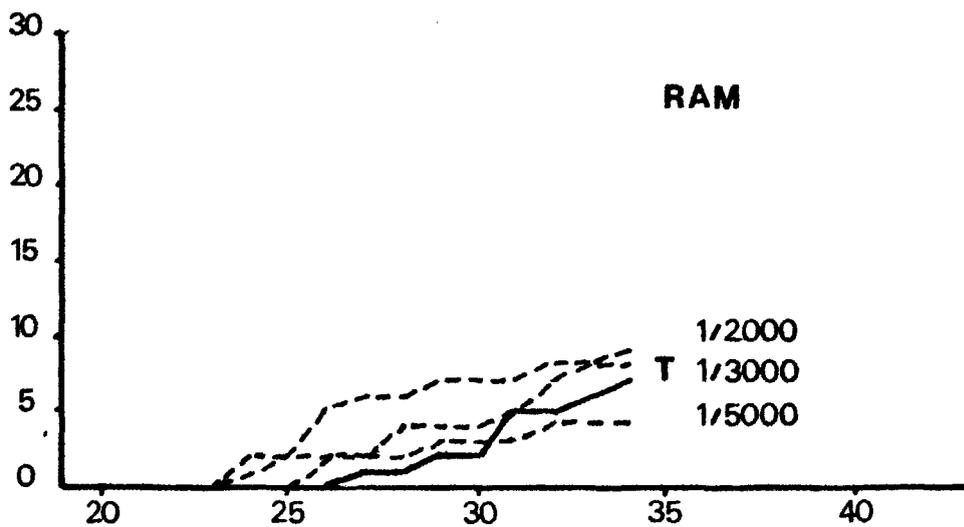
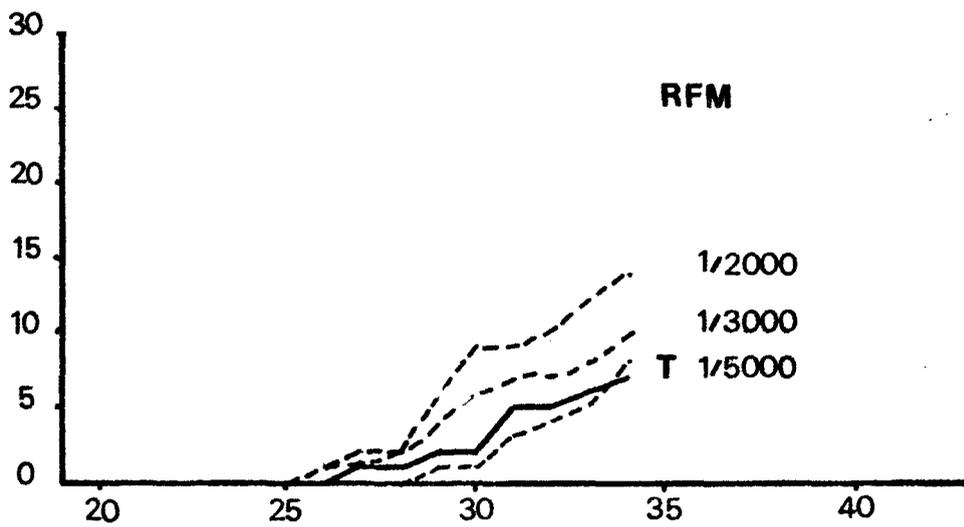
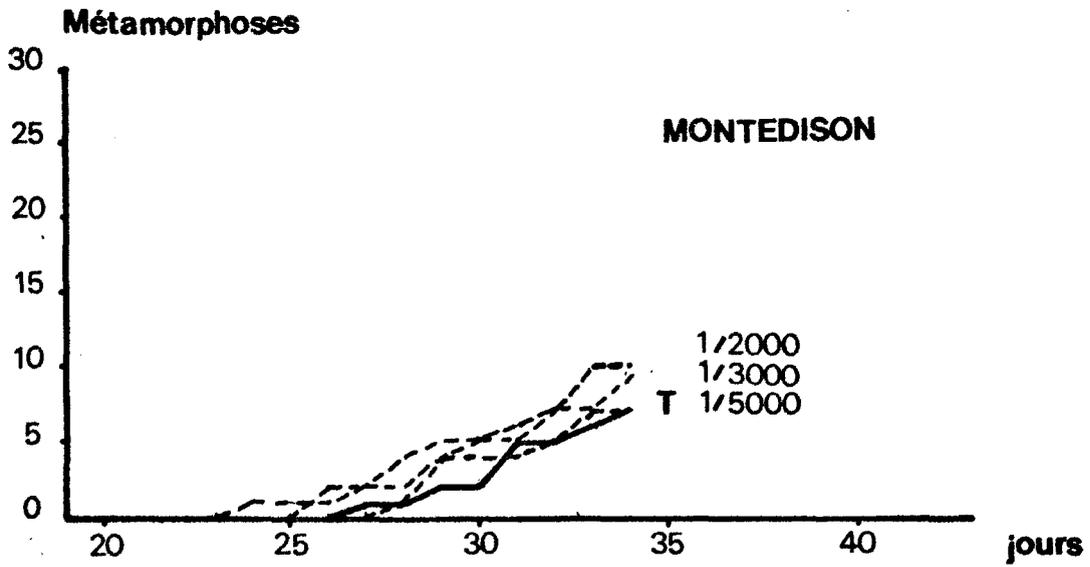
- Nombres cumulés de métamorphoses

Quelles que soient les dilutions, l'évolution du nombre de métamorphoses est comparable à celle des témoins, mais lorsque la dilution diminue, les nombres de métamorphoses semblent légèrement supérieurs à ceux des témoins. Ce résultat est difficilement explicable (fig. 2).

- Nombres moyens de mues avant la métamorphose

On ne remarque pas de différence significative dans le nombre de mues avant métamorphose des divers lots d'individus (tableau 8).

./.....



**Figure 2 : P.serratus Experience 2**

**Nombres cumulés de métamorphoses en post-larves**

		Moyennes	Ecart-types	Nombre de mesures
Témoin		8,1	1,01	17
M	1/5000	7,8	0,71	16
	1/3000	7,8	1,02	16
	1/2000	8,0	1,02	21
RFM	1/5000	8,0	0,73	14
	1/3000	8,1	1,03	22
	1/2000	7,8	1,03	22
RAM	1/5000	8,0	1,16	12
	1/3000	8,0	0,99	16
	1/2000	7,7	1,24	19

TABLEAU 8 : Moyennes du nombre de mues, avant la métamorphose, pour chaque milieu testé.

c) Discussion

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que, hormis un décalage de un à deux jours observé dans l'apparition des maximums de mues pour l'effluent Montédison et la référence fer, il n'y a pas d'incidence nette des milieux sur le développement larvaire de P. serratus. Même la dilution 1/2000 de l'effluent, où le pH initial est égal à 6,1, évolue rapidement jusqu'à un pH très proche de celui de l'eau de mer.

Pour ce qui est de la part relative du fer ou de l'acidité dans l'action de ce type de polluant, on constate qu'une solution ferreuse à peine acide (22 mg/l de fer et 0,0044 % d'acide sulfurique 34 N) est sans effet pendant la première moitié de l'expérimentation ; par la suite les mortalités importantes, dues à un déficit alimentaire, ne permettent pas une interprétation valable.

./....

Rappelons que dans les deux dernières expériences nous étions dans le cas d'un rejet unique subissant une neutralisation rapide en eau de mer. Dans les expériences suivantes, nous avons cherché à reproduire un déversement cyclique. Nous avons donc réitéré l'expérience précédente en utilisant les mêmes milieux et les mêmes dilutions, mais en préparant les dilutions à chaque changement de milieu.

C - MILIEUX RENOUVELES - REJETS DE TYPE CHRONIQUE :

1°) Effluent Montédison (3ème expérience)

a) Protocole expérimental

Les conditions expérimentales restent les mêmes que celles de l'expérience précédente ; nous avons testé les dilutions 1/2000, 1/3000 et 1/5000 de :

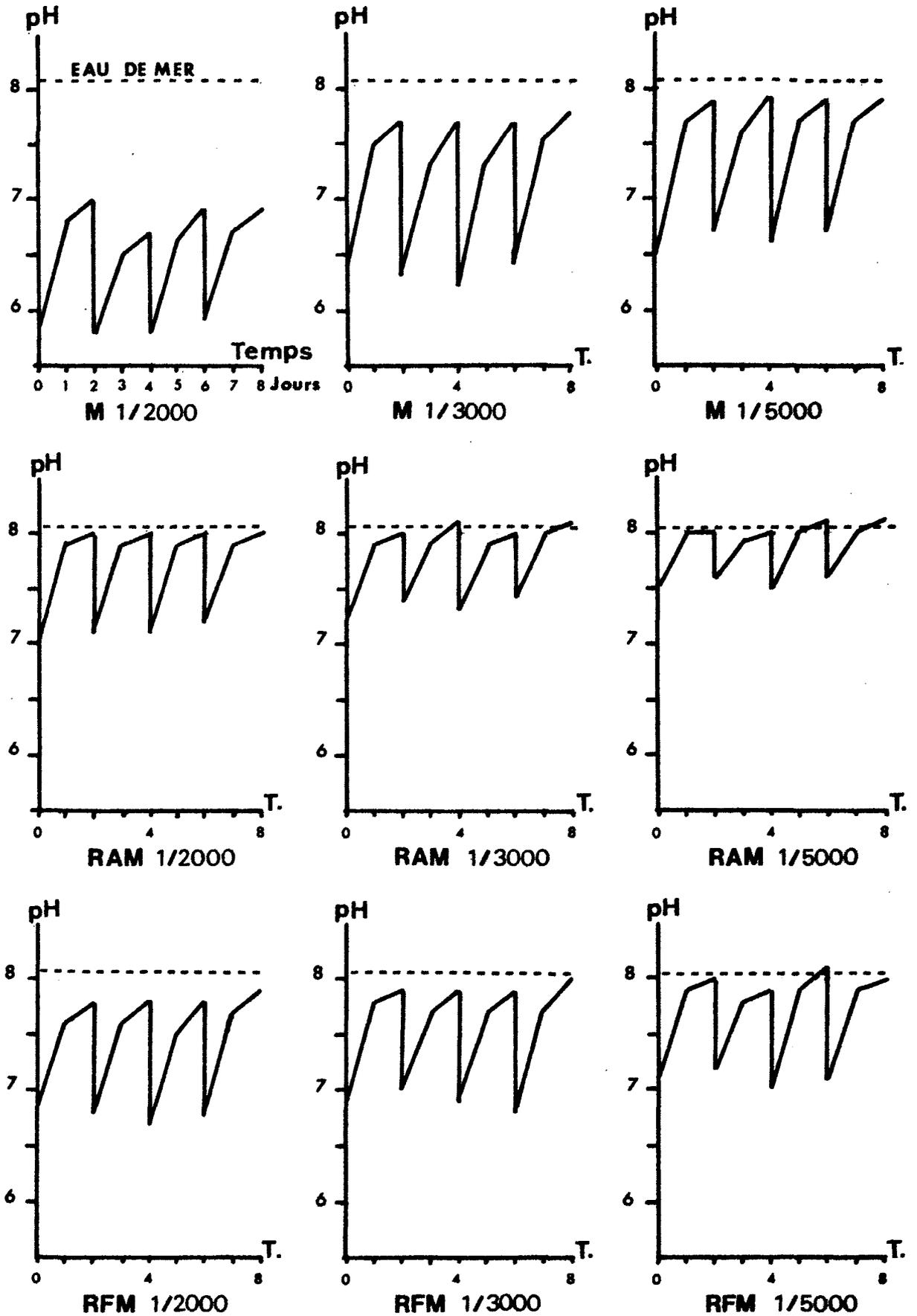
- l'effluent Montédison (M) : 44 g/l de fer et 8,8 % d'acide sulfurique,
- la référence acide (RAM) : 2 % d'acide sulfurique 34 N,
- la référence fer (RFM) : 2 % d'acide sulfurique et 44 g/l de fer.

Comme dans les deux expériences précédentes, les milieux dans lesquels se trouvent les larves de P. serratus sont changés tous les deux jours. Toutefois, ce renouvellement est effectué avec des dilutions renouvelées tous les deux jours, lors des changements de milieu.

Ainsi, tous les deux jours, les larves de P. serratus ont été soumises à de variations plus ou moins brusques du pH, suivant la dilution considérée.

La durée d'expérience a été de 39 jours à la température de 18° C. Nous avons suivi, journallement, l'évolution du pH pendant toute la durée de l'expérimentation (figure 3).

./....



**EXPERIENCE 3**

**Figure 3: Variations du pH pour les différentes dilutions.**

b) Résultats- Mues et mortalités

. L'effluent Montédison (Annexes 13 et 14) : Les maximums de mues ne sont pas décalés par rapport à ceux des témoins dans les dilutions 1/5000 et 1/3000 ; on constate même une meilleure individualisation des périodes de mues.

En revanche dans la dilution 1/2000 les maximums <sup>de</sup> mues sont bien individualisés du fait de la mortalité très élevée :

50 % dès le 11<sup>ème</sup> jour,

80 % au 23<sup>ème</sup> jour,

90 % au 31<sup>ème</sup> jour.

Ceci implique donc une exagération de l'amplitude des pics de mues par rapport à ceux de la population témoin.

Pour les dilutions 1/5000 et 1/3000, les mortalités sont très comparables à celles enregistrées chez les témoins.

. La référence fer (Annexes 15 et 16) : pour les trois dilutions on ne constate aucun décalage dans les maximums de mues qui sont également mieux individualisés que ceux des témoins.

Les mortalités sont aussi assez comparables à celles des témoins.

. La référence acide (Annexes 17 et 18) : il est difficile d'analyser la fréquence des mues car les maximums sont peu marqués pour les trois dilutions.

La mortalité est, ici encore, très comparable aux témoins.

./....

- Nombres cumulés de métamorphoses

Il y a peu de différence entre le témoin et les dilutions de la solution acide (fig. 4).

En ce qui concerne l'effluent Montédison, on remarque une absence totale d'individus métamorphosés après 39 jours d'expérience dans la dilution 1/2000, tandis que les courbes relatives aux deux autres dilutions se rapprochent de la courbe témoin.

Enfin, dans les trois dilutions de la référence fer, le nombre des métamorphoses est nettement inférieur à celui observé chez les témoins.

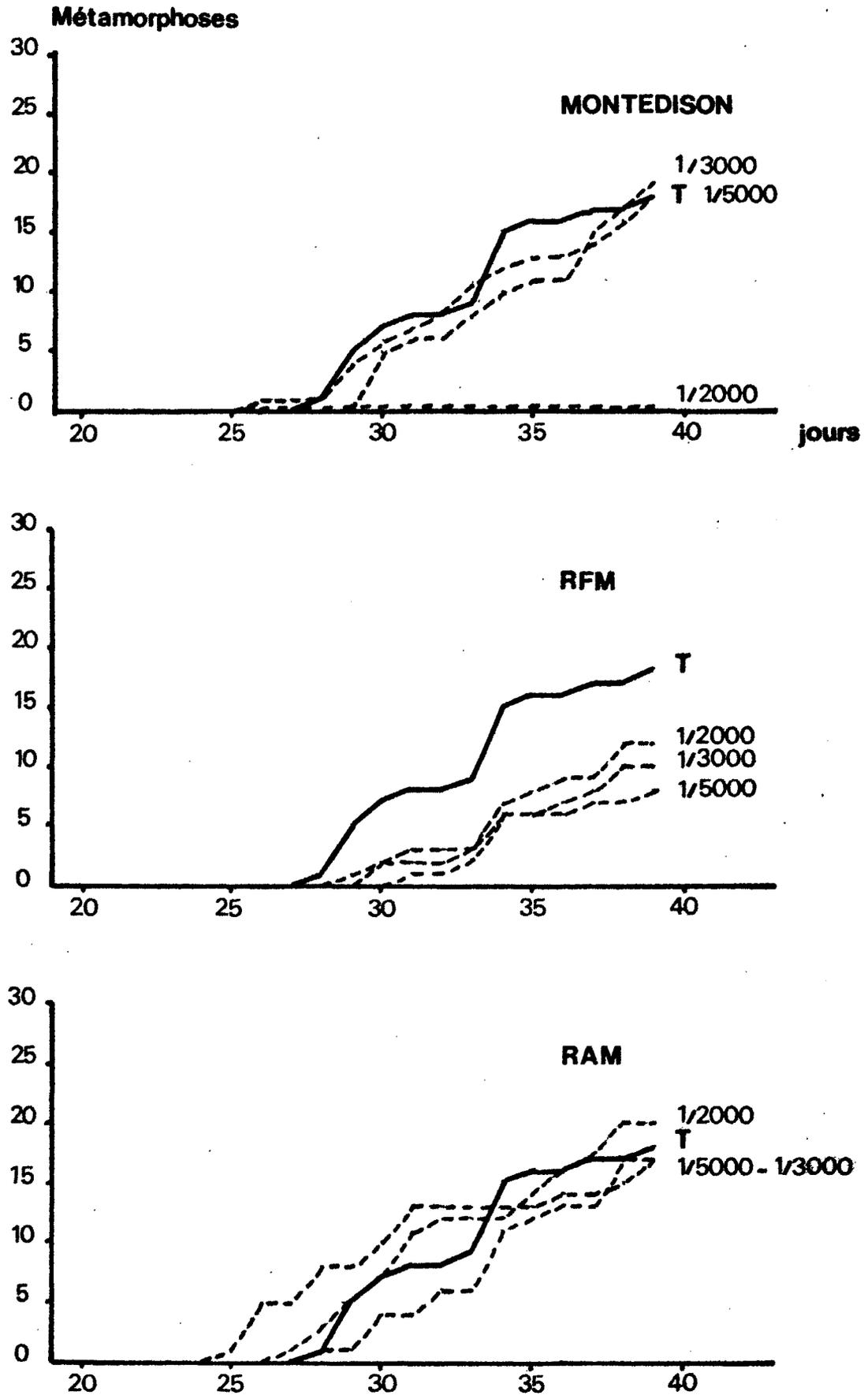
- Nombres moyens de mues avant la métamorphose

On ne note aucune différence significative dans le nombre moyen de mues entre les différents lots d'animaux (tableau 9).

	Moyennes	Ecart-types	Nombre de mesures
Témoin	8,0	1,17	24
M	1/5000	8,6	1,28
	1/3000	8,6	1,11
	1/2000	-	-
RFM	1/5000	9,2	0,94
	1/3000	9,0	1,10
	1/2000	8,7	1,02
RAM	1/5000	8,2	1,13
	1/3000	7,9	1,69
	1/2000	7,9	1,31

TABLERAU 9 : Moyennes du nombre de mues, avant la métamorphose, pour chaque milieu testé.

./...



**Figure 4: P. serratus Experience 3**

**Nombres cumulés de métamorphoses en post-larves**

c) Discussion

La mortalité observée avec la dilution M 1/2000 semble due à l'acidité seule, car il n'y a pas de mortalité dans la solution correspondante contenant autant de fer, mais peu d'acide (RFM 1/2000) (tableau 10 et annexes 14 et 16).

		: Pourcentages en volumes :	
		: de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 34 N :	: Fer (mg/l) :
		: ajouté à l'eau de mer :	:
R A M	1/2000	0,0010	0
	1/3000	0,0006	0
	1/5000	0,0004	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 %	1/2000	0,0010	22,0
	1/3000	0,0006	14,6
	1/5000	0,0004	8,8
R F M	1/2000	0,0044	22,0
	1/3000	0,0029	14,6
	1/5000	0,0017	8,8
M	1/2000	0,0044	22,0
	1/3000	0,0029	14,6
	1/5000	0,0017	8,8
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,8 % Fe 44 g/l	1/2000	0,0044	22,0
	1/3000	0,0029	14,6
	1/5000	0,0017	8,8

TABLEAU 10 : Pourcentages d'acide sulfurique et teneurs en fer pour les différentes dilutions étudiées.

Si l'on se rapporte aux variations du pH au cours du temps (cf. figure 3), on note que, pour M 1/2000 où le pH oscille entre : 5,8 et 7, la mortalité est très élevée alors que pour une dilution très voisine (M 1/3000) dont les variations de pH sont légèrement supérieures, la mortalité est comparable à celle du témoin.

Il semble donc que le seuil léthal d'acidité se situerait très près de pH 6 comme nous l'avons déjà signalé lors de l'expérience préliminaire de toxicité aiguë.

Notons enfin que RAM et RFM 1/2000, dont l'acidité théorique est semblable, ont des cinétiques de neutralisation légèrement différentes : la présence de fer produit un abaissement relatif du pH.

./...

2°) Effluents Montédison, Thann et Mulhouse et Tioxyde (1<sup>ère</sup> expérience)

L'expérience d'exposition à des rejets cycliques, a été reprise avec les 3 effluents dont la composition moyenne a été donnée précédemment (tableau 2).

a) Protocole expérimental

Nous avons conservé des conditions expérimentales de la troisième expérience, avec les dilutions suivantes :

- Montédison (M), 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/10000,
- Thann et Mulhouse (T et M), 1/500, 1/750, 1/1000, 1/3000,
- Tioxyde (T), 1/750, 1/1000, 1/1500, 1/5000.

Par contre, nous avons modifié la température d'expérimentation (21° C) ainsi que la composition de nos solutions de référence :

- 8 % d'acide sulfurique pour la solution acide ( $H_2SO_4$  8 %) employée au 1/10000, 1/4000, 1/3000 et 1/2000,
- 30 g/l de fer dans une solution d'acide sulfurique à 1 % (FER) employée au 1/6000, 1/2000 et 1/1000.

Par ailleurs, nous avons doublé le nombre des animaux témoins.

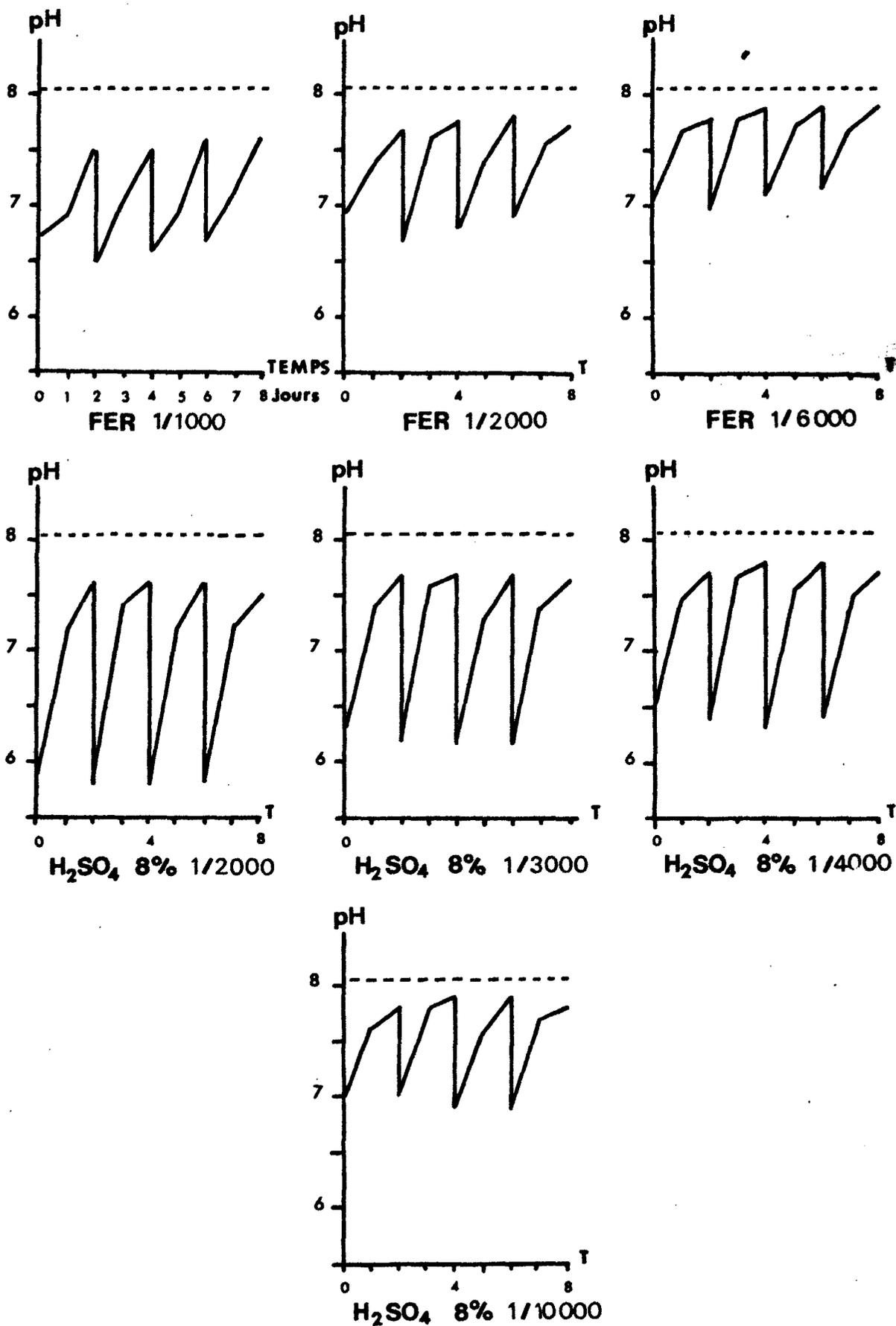
Le pH a été mesuré journalièrement pendant les 42 jours d'expérimentation (figures n° 5, 6, 7).

b) Résultats

- Mues et mortalités

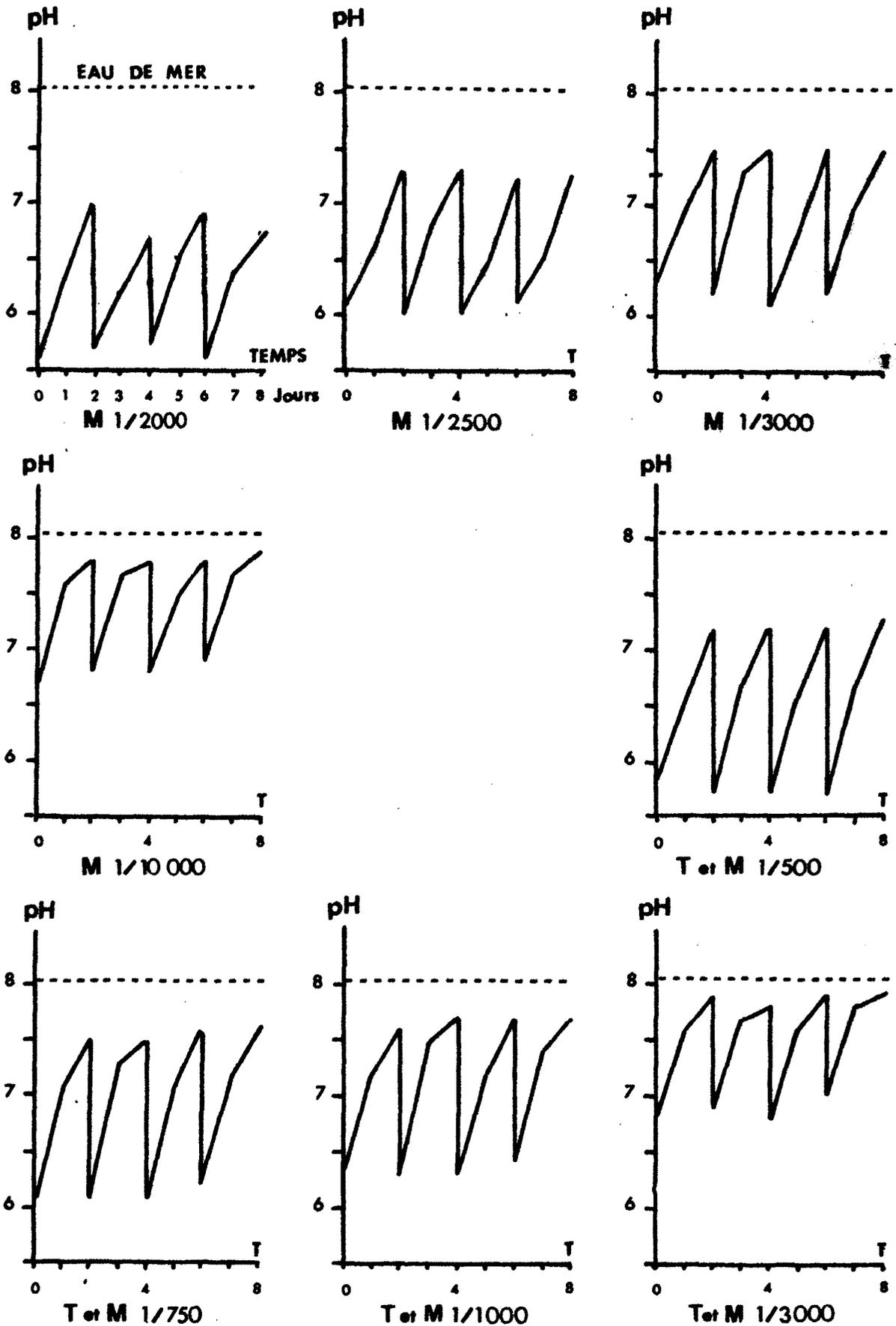
. Les témoins (Annexes 19 et 20) : Dans les deux lots d'animaux, une mortalité assez importante s'est manifestée à partir du 10<sup>ème</sup> jour. Elle a été plus conséquente, et plus étalée dans le temps pour le témoin 1. Ceci illustre la variabilité qui peut exister entre deux lots d'individus d'une même génération élevés dans des conditions identiques.

Quant aux maximums de mues, ils sont moins accentués, en fin d'expérience, dans le lot témoin 2. ./....



#### EXPERIENCE 4

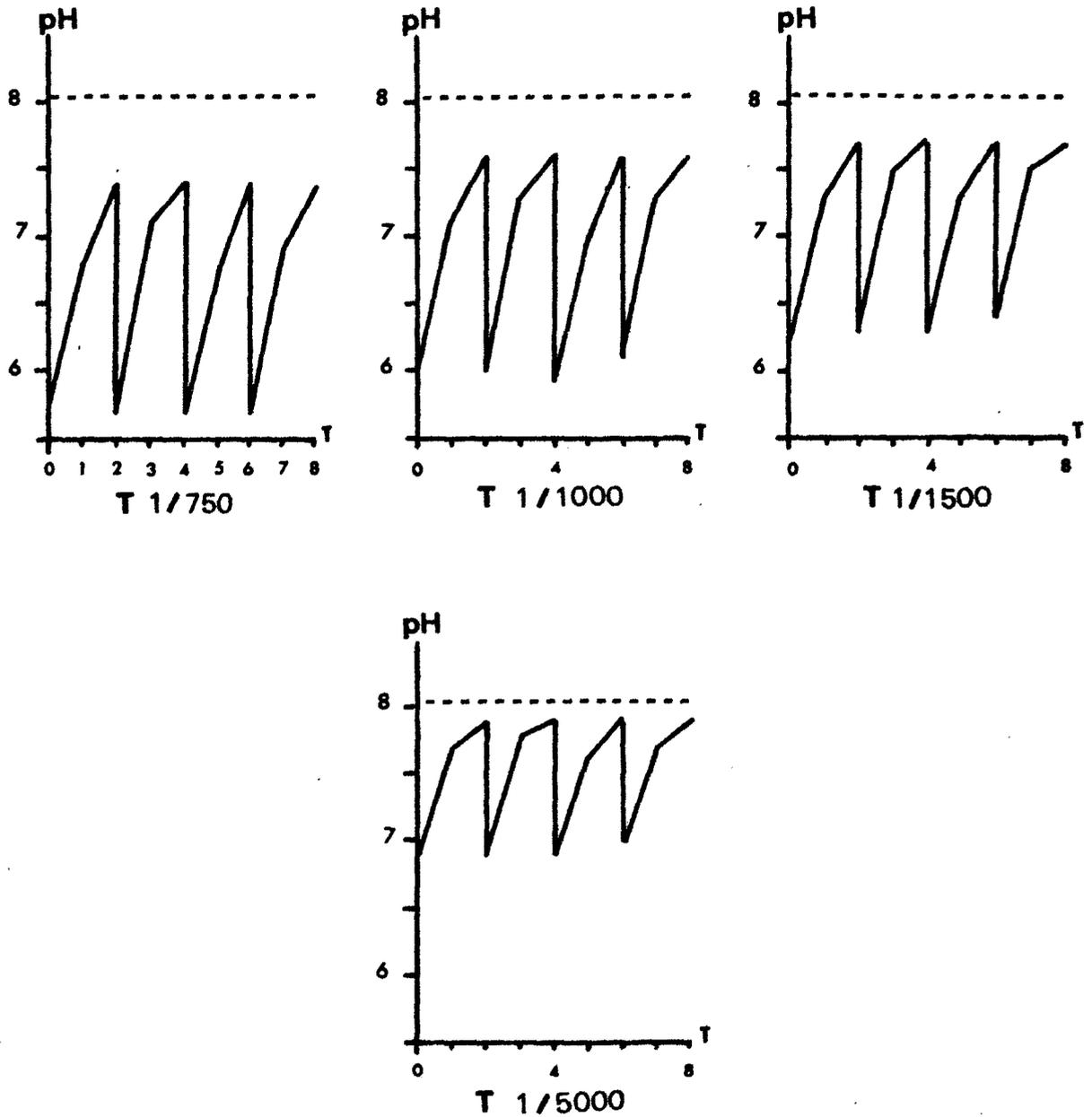
**Figure 5 :** Variations du pH pour les dilutions des solutions de fer et d'acide.



**EXPERIENCE 4**

**Figure 6 : Variations du pH pour les dilutions des effluents**

**Montedison et Thann et Mulhouse.**



#### EXPERIENCE 4

Figure 7 : Variations du pH pour les dilutions de l'effluent TiO<sub>2</sub>.

. L'effluent Montédison (Annexes 21 et 22) : Dès le 10ème jour, il y a 100 % de mortalité dans la dilution 1/2000 ; avec les trois autres dilutions les mortalités sont importantes et presque comparables à celles des témoins. D'ores et déjà nous remarquons que la mortalité enregistrée dans cette expérience est nettement supérieure à celle rencontrée avec des dilutions identiques, lors d'expérimentation précédente. Des différences d'état physiologique d'une éclosion à une autre d'une part, la température d'expérimentation plus élevée d'autre part, pourraient en être la cause.

. L'effluent Thann et Mulhouse (Annexes 23 et 24) : On ne remarque pas de différence dans la fréquence des mues par rapport aux témoins.

Les mortalités enregistrées sont inférieures à celles des témoins dans les dilutions 1/750 et 1/1000 ; elles sont supérieures au 1/500 et au 1/3000.

. L'effluent Tioxide : Nous avons arrêté l'expérimentation au 11ème jour, en raison d'une importante mortalité. Les pourcentages de mortalité sont indiqués dans le tableau ci-dessous. Notons enfin que tous les individus survivants ont mué de façon synchrone pendant cette période.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
Témoin 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	20
Témoin 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	13
1/5000	0	0	0	0	0	0	13	23	30	36	50
1/1500	0	0	0	0	0	0	10	73	76	80	83
1/1000	0	0	0	0	6	6	23	53	53	56	60
1/750	0	0	10	10	26	36	46	73	76	76	80

TABLEAU 11 : Pourcentages de mortalité des larves de P. serratus pour les témoins et différentes dilutions de l'effluent Tioxide.

./.....

Ces résultats s'opposant à ceux obtenus avec les autres effluents, pour des pH et des teneurs en fer voisins, nous avons tenu à réitérer cette expérience.

. La solution d'acide sulfurique à 8 % (annexes 25 et 26) :  
 les mortalités enregistrées restent faibles avec les dilutions 1/3000 et 1/4000 et sont un peu plus importantes avec les deux autres ; dans tous les cas elles demeurent inférieures à celles constatées pour les larves témoins. La fréquence des mues reste très voisine de celle des témoins.

. La solution à 30 g/l de fer (annexes 27 et 28) : les mortalités sont beaucoup plus faibles que celles des témoins dans les dilutions 1/1000 et 1/2000 ; dans la dilution 1/6000 elles sont plus élevées mais restent toutefois inférieures à celles des témoins. Les fréquences des mues restent comparables à celles des témoins, cependant avec la dilution 1/1000 on assiste à un nivellement des maximums de mues, dès le passage au 6ème stade.

- Nombres cumulés de métamorphoses

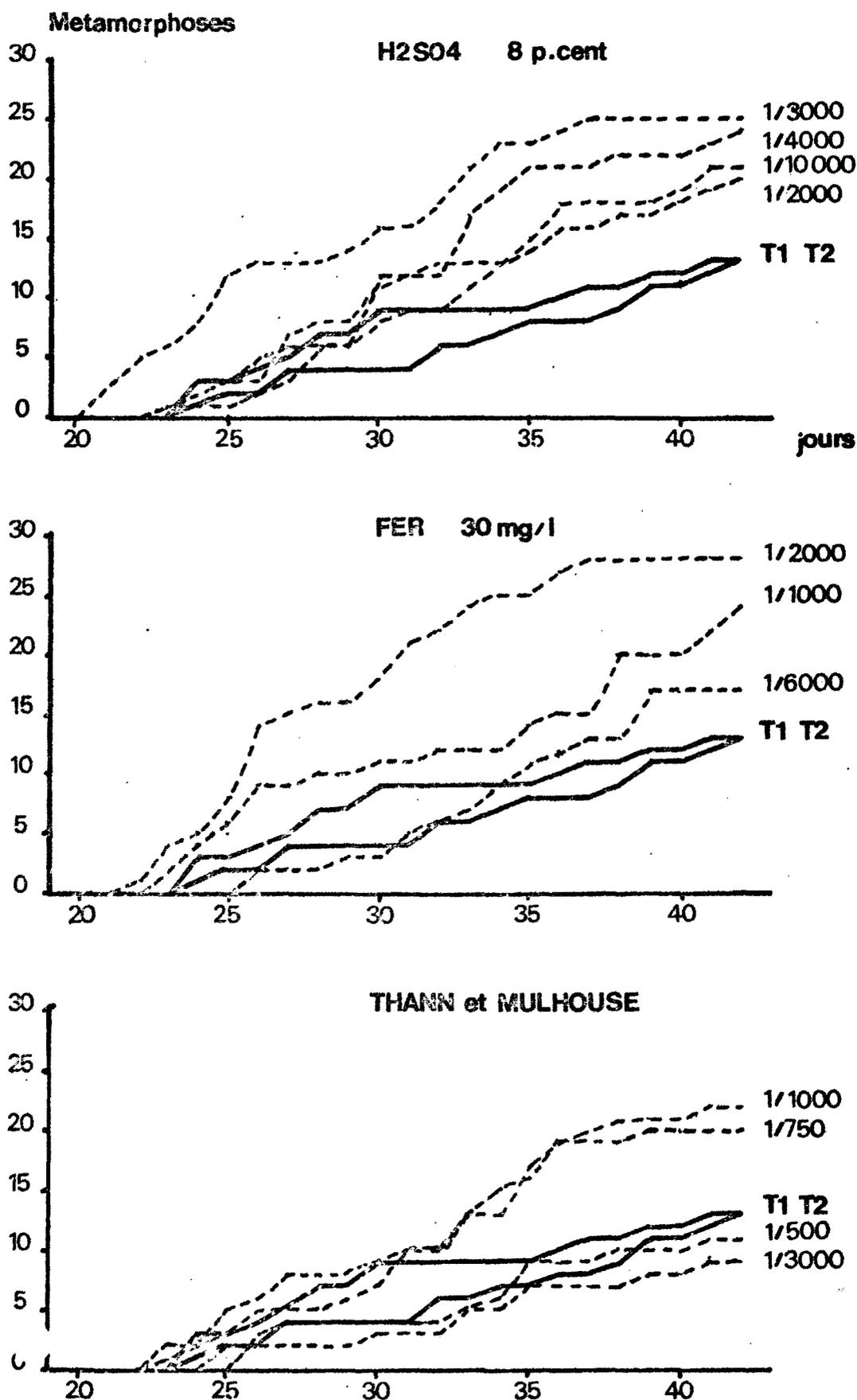
Nous retrouvons ici, comme précédemment, des résultats supérieurs à ceux des témoins (figures 8 et 9). Ainsi toutes les dilutions des solutions d'acide et de fer montrent plus de métamorphoses que les témoins : il en est de même avec les dilutions 1/2500 et 1/10000 de Montédison et 1/750 et 1/1000 de Thann et Mulhouse.

- Nombres moyens de mues avant la métamorphose

On ne note pas de très grandes différences dans les nombres moyens de mues avant métamorphose, exception faite pour la dilution fer 1/2000 (tableau 12). Toutefois, la dispersion des valeurs, reflétée par l'importance des écarts-types, ôte toute signification au résultat .

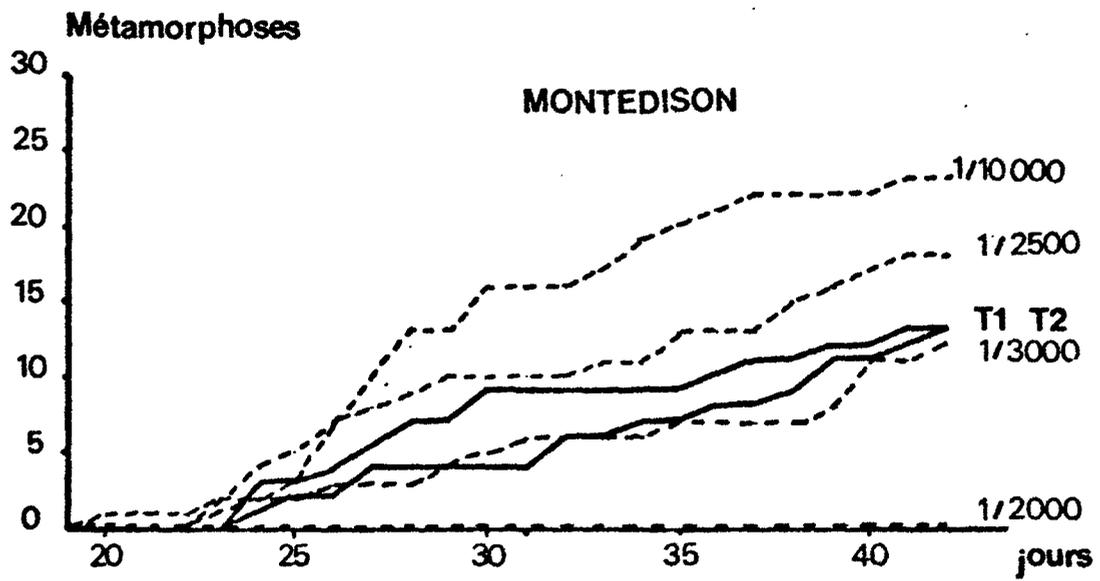
Néanmoins, on peut remarquer que le nombre des mues a été ici systématiquement plus élevé que dans les précédentes expériences.

./....



**Figure 8 : P. serratus Experience 4**

**Nombres cumulés de métamorphoses en post-larves**



**Figure 9 : P.serratus Experience 4**

**Nombres cumulés de métamorphoses en post-larves**

		Moyennes	Ecart-types	Nombre de mesures
	Témoin 1	10,6	2,24	16
	Témoin 2	10,5	2,54	21
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8 %	1/10000	9,8	2,05	23
	1/4 000	9,9	1,95	27
	1/3 000	8,5	1,82	25
	1/2 000	9,5	2,31	23
	1/6 000	10,3	2,01	21
FER 30g/l	1/2 000	7,6	1,56	28
	1/1 000	9,3	2,36	28
M	1/10000	8,5	1,90	24
	1/3 000	10,3	2,97	17
	1/2 500	9,8	2,64	22
	1/2 000	-	-	-
T et M	1/3 000	10,2	2,20	10
	1/1 000	9,3	1,79	23
	1/750	9,5	2,41	24
	1/500	10,4	2,09	16

**TABEAU 12** : Moyennes du nombre de mues avant la métamorphose, pour chaque milieu testé.

Les observations effectuées en cours d'expérimentation révélaient d'ailleurs des stades intermédiaires avant la métamorphose complète : transformation progressive de la morphologie thoracique, des antennes et des péréiopodes avec persistance des appendices natatoires caractéristiques des stades planctoniques.

./.....

c) Discussion

Il apparaît nettement que les mortalités enregistrées chez les animaux sont importantes et masquent les effets dus aux différentes dilutions étudiées. De même les mortalités constatées dans la dilution 1/3 000 de Thann et Mulhouse peuvent difficilement être expliquées.

Le rôle prépondérant de l'acidité, mis en relief dans l'expérience 3, apparaît également ici. En effet, dans les essais relatifs aux solutions Fer 1/1 000 et M 1/2 000, la mortalité est infime dans la première qui est riche en fer, mais peu acide, beaucoup plus forte dans la deuxième presque aussi riche en fer, mais plus acide (Tableau 13).

La comparaison des mortalités constatées pour une même acidité, fait apparaître une mortalité importante dans M 1/2 000 par rapport à  $H_2SO_4$  1/2 000, ce qui laisserait supposer un effet néfaste du fer, mais en fait elle peut s'expliquer par une différence dans la vitesse de neutralisation (cf. figures 5 et 6). Dans le cas de la dilution de l'effluent Montedison, la présence de fer contribue à abaisser davantage le pH du milieu. De même la mortalité moyenne notée pour T et M 1/500, dont la teneur en fer et l'acidité sont très proches de celles de M 1/2 000, peut s'expliquer par une plus rapide neutralisation de l'acidité du milieu (cf. figure 6).

Enfin un dernier argument est fourni par la comparaison des deux dilutions T et M 1/750 et  $H_2SO_4$  1/3 000 qui présentent des acidités et des vitesses de neutralisation (cf. figures 5 et 6) analogues mais des teneurs en fer très différentes (0 et 16,6 mg/l) ; malgré cela les pourcentages de mortalités restent faibles et identiques.

Ainsi apparaît-il que le rôle prépondérant, dans les effets nocifs constatés, est joué par l'acidité du milieu et la vitesse de neutralisation de ce dernier. Quoi qu'il en soit, il ne faut pas perdre de vue que, dans certaines conditions de pH, le fer présent peut agir en retardant cette neutralisation et, par conséquent, accroître la nocivité du milieu.

./....

L'ensemble des résultats ci-dessus ne permettant pas de déterminer l'influence des constituants chimiques de l'effluent Tioxide sur le développement de P; serratus, nous avons monté une dernière expérience dans des conditions plus favorables de température.

		Pourcentages en volume de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 34 N ajouté à l'eau <sup>1</sup> de mer	Fer (mg/l)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8 %	1/2 000	0,0010	0
	1/3 000	0,0026	0
	1/4 000	0,0020	0
	1/10000	0,0008	0
FER 30g/l	1/1 000	0,0010	30,0
	1/2 000	0,0005	15,0
	1/6 000	0,0001	5,0
M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,8 %	1/2 000	0,0011	22,0
	1/2 500	0,0035	17,6
Fe 14 g/l	1/3 000	0,0029	11,6
	1/10000	0,0008	1,1
T et M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,1 %	1/500	0,0012	25,0
	1/750	0,0028	16,6
	1/1 000	0,0021	12,5
Fe 12,5 g/l	1/3 000	0,0007	1,1
	1/750	0,0011	5,8
TO H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3,1 %	1/1 000	0,0031	1,35
	1/1 500	0,0020	2,9
	1/3 000	0,0010	1,45
	1/5 000	0,0006	0,81
	1/10000	0,0003	0,43

TABLEAU 13 : Pourcentages d'acide sulfurique et teneurs en fer pour les différentes dilutions étudiées.

./....

3°) Effluent Tioxide (5ème et 6ème expériences)a) Introduction

Ces expériences n'ayant pu être mises en route que plus tard, nous n'avions à notre disposition qu'un résidu de fabrication industrielle vieilli. Deux autres prélèvements nous sont alors parvenus : d'une part un échantillon de 10 l prélevé à l'usine de Calais par un chercheur de l'ISTPM, et d'autre part un échantillon expédié par les bons soins des responsables de l'usine.

Des dosages effectués sur ces différents échantillons nous ont permis de choisir la solution mère pour nos travaux. Les résultats sont figurés dans le tableau 14.

	FER	CUIVRE	CADMIUM	ZINC	PLOMB	MERCURE	NORMALITE	% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH
Effluent vieilli	4350	0,35	0,20	4,5	Nd	0,0004	1,11	3,0	0,40
Effluent prélevé	4700	<0,10	0,10	11	1,1	<0,0004	2,08	5,7	0,30
Effluent reçu	4950	0,40	<0,05	10	1,2	<0,0004	1,52	4,2	0,35

TABLEAU 14 : Teneurs en ppm de métaux lourds et acidité de 3 effluents bruts de l'usine Tioxide.

D'après ce tableau, il apparaît que l'effluent prélevé est le plus acide. Les teneurs en différents métaux sont intermédiaires. Cette solution a été choisie de façon à envisager les effets les plus

quatrième expérience- Protocole expérimental

Ons repris les mêmes conditions, c'est-à-dire celles de la première expérience, mais la température a été fixée à 18° C, de

./....

sorte que le rythme des mues s'en trouve allongé.

Nous avons testé les dilutions :

1/500 ; 1/750 ; 1/1 000 ; 1/3 000 ; 1/5 000 de Tioxide

1/750 ; 1/1 000 ; 1/2 000 ; 1/2 500 ; 1/3 000 et 1/10 000 d'une solution à 8 % d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  8 %)

1/500 ; 1/750 ; 1/1 000 ; 1/1 500 ; 1/10 000 d'une solution de sulfate ferreux à 30 grammes par litre (Fer 30 g/l).

Parallèlement, le développement de deux témoins a été suivi. L'évolution des valeurs du pH a été enregistrée pendant les 60 jours d'expérimentation (figures 10, 11 et 12).

#### - Résultats

Les pourcentages de mues et de mortalités sont donnés dans les annexes 29 à 34.

##### Mues et mortalités

Les témoins - Les mortalités des deux témoins sont comparables et restent basses (de l'ordre de 10 à 20 % en 58 jours).

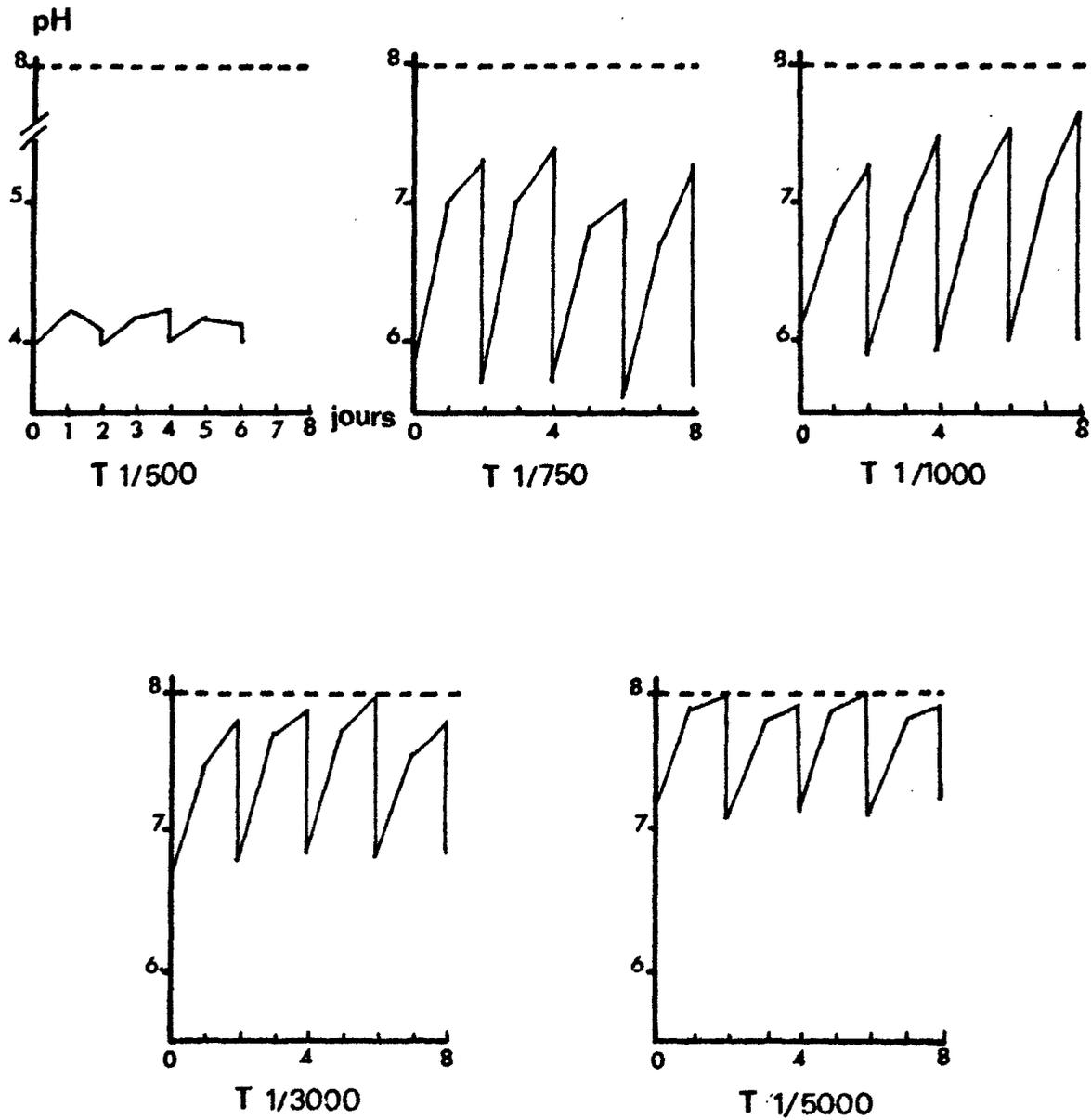
Les pourcentages de mues ont des maximums correspondants jusqu'au 26ème jour et s'estompent ensuite à partir du stade 7, les larves s'étant nettement individualisées.

L'enregistrement des mues s'arrête au 45ème jour du fait d'un accident de manipulation.

Tioxide - La dilution 1/500 de l'effluent a provoqué la mortalité de tous les individus en 2 jours sans qu'il y ait mue en stade 2. Au 1/750 la mortalité est totale au 11ème jour, après obtention du stade 3 (annexes 29 et 30).

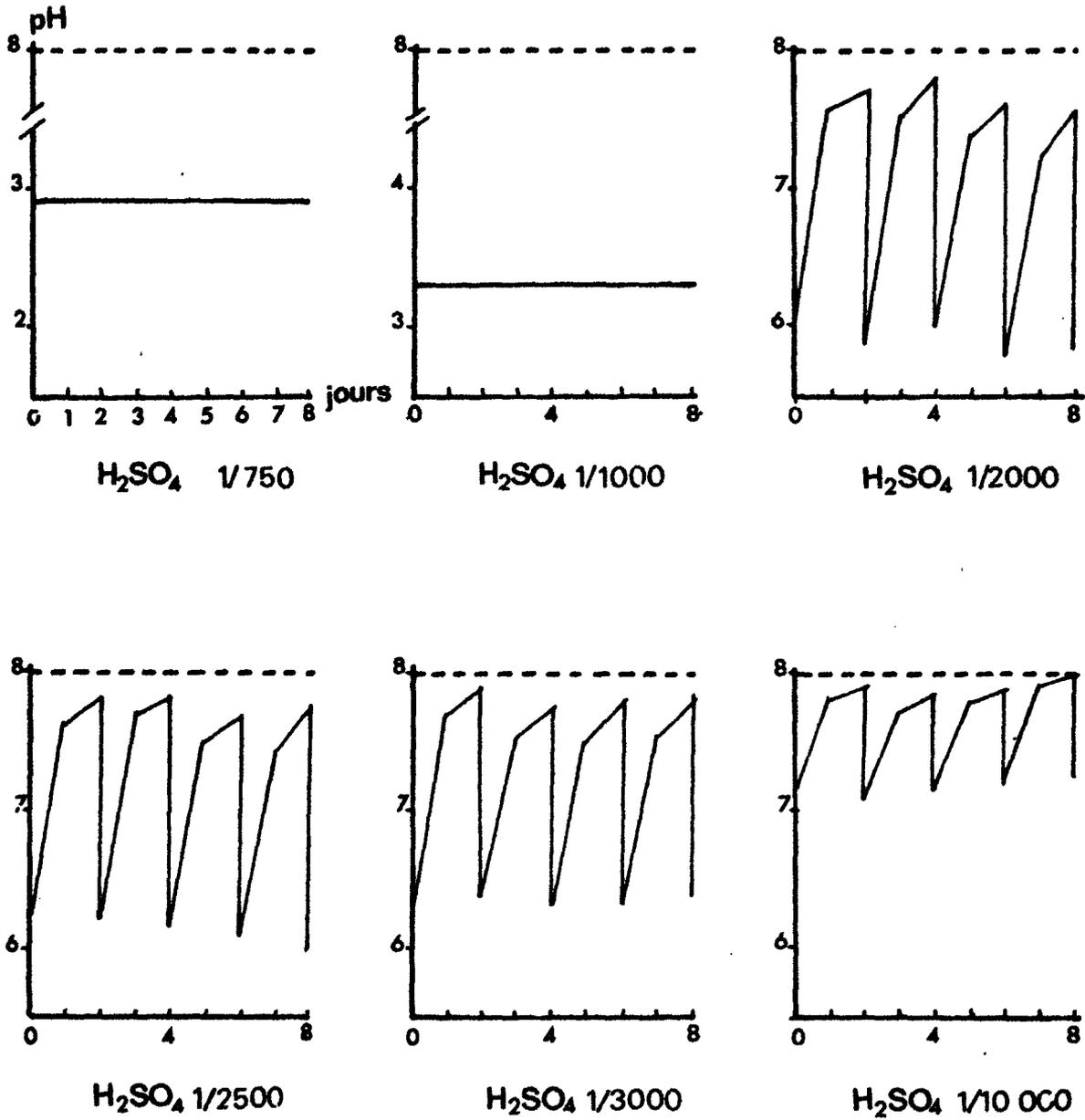
Les maximums de mues sont concomitants dans les témoins et dans les dilutions 1/5 000, 1/3 000 et le 1/1 000 jusqu'au stade 5. Par la suite, l'individualisation des pics est de plus en plus mauvaise lorsque la concentration augmente.

./....



### EXPERIENCE 5

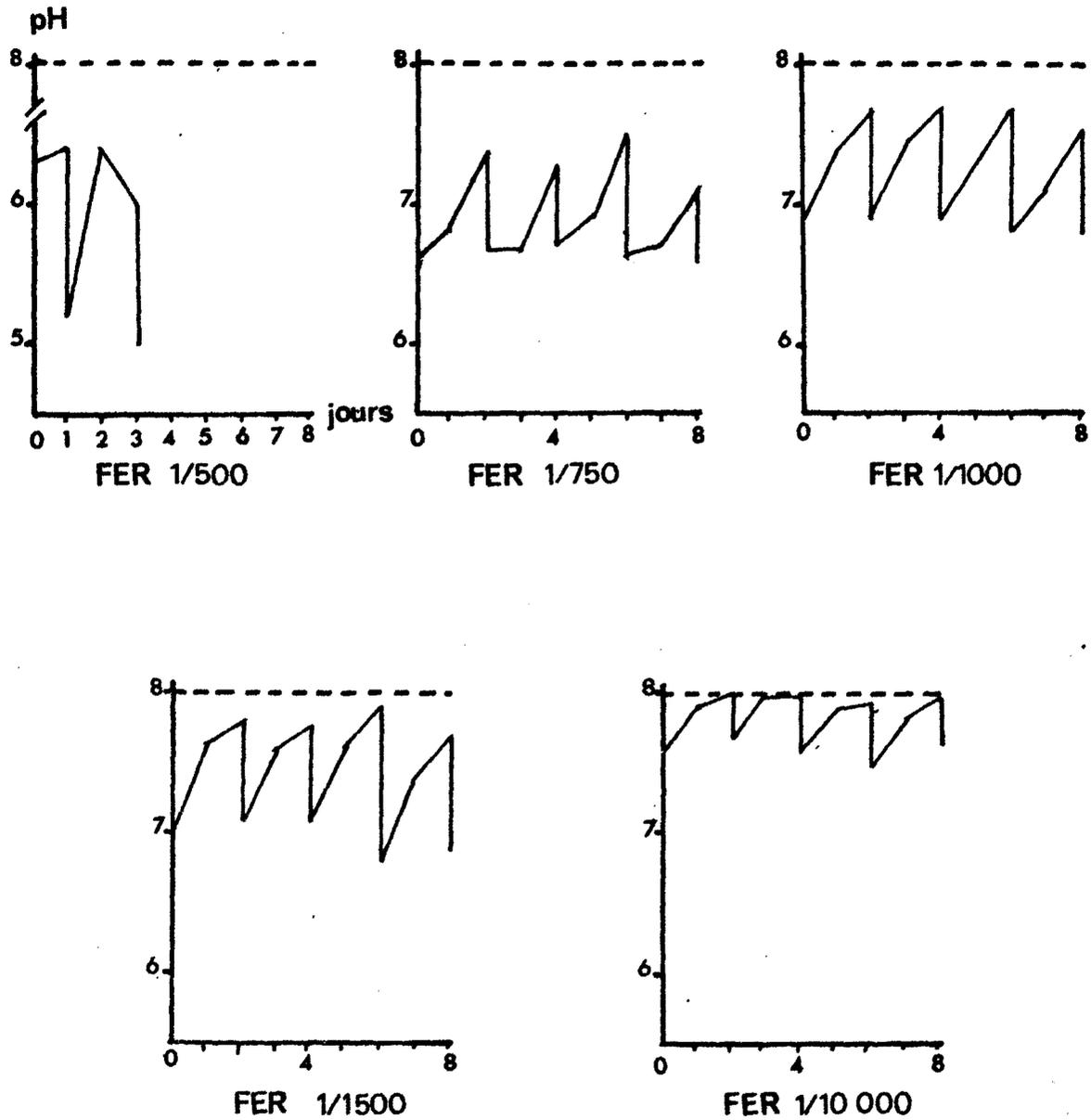
**Figure 10 :** Variations du pH pour les dilutions de l'effluent Tioxide



EXPERIENCE 5

Figure :11

Variations du pH pour les dilutions de la solution acide à 8%



### EXPERIENCE 5

Figure : 12 Variations du pH pour les dilutions de la solution de sulfate ferreux (30g/l)

La mortalité est comparable à celle du témoin, excepté dans les dilutions 1/1000 (50 % au 39ème jour) et au 1/750.

Fer à 30 g/l - Les résultats sont représentés dans les annexes 31 et 32. La mortalité augmente régulièrement avec la concentration, mais il semble que les variations d'acidité dues à la précipitation de l'hydroxyde ferrique interfèrent notablement.

Un suivi, heure par heure, de l'acidité relative des différentes dilutions, a été réalisé ; nous constatons une diminution brève de pH dont la durée s'accroît lorsque le pourcentage d'acide initial augmente (fig. 13). En effet les enregistrements de pH, dans la solution au 1/500 varient entre 5 et 6,3 et la mortalité est totale dès le 4ème jour. De plus aucune larve n'a mué en stade 2. En revanche, les variations dans la solution au 1/750 ne font pas apparaître de valeurs réellement basses de pH et la neutralisation (7 - 7,5) par l'eau de mer a lieu rapidement.

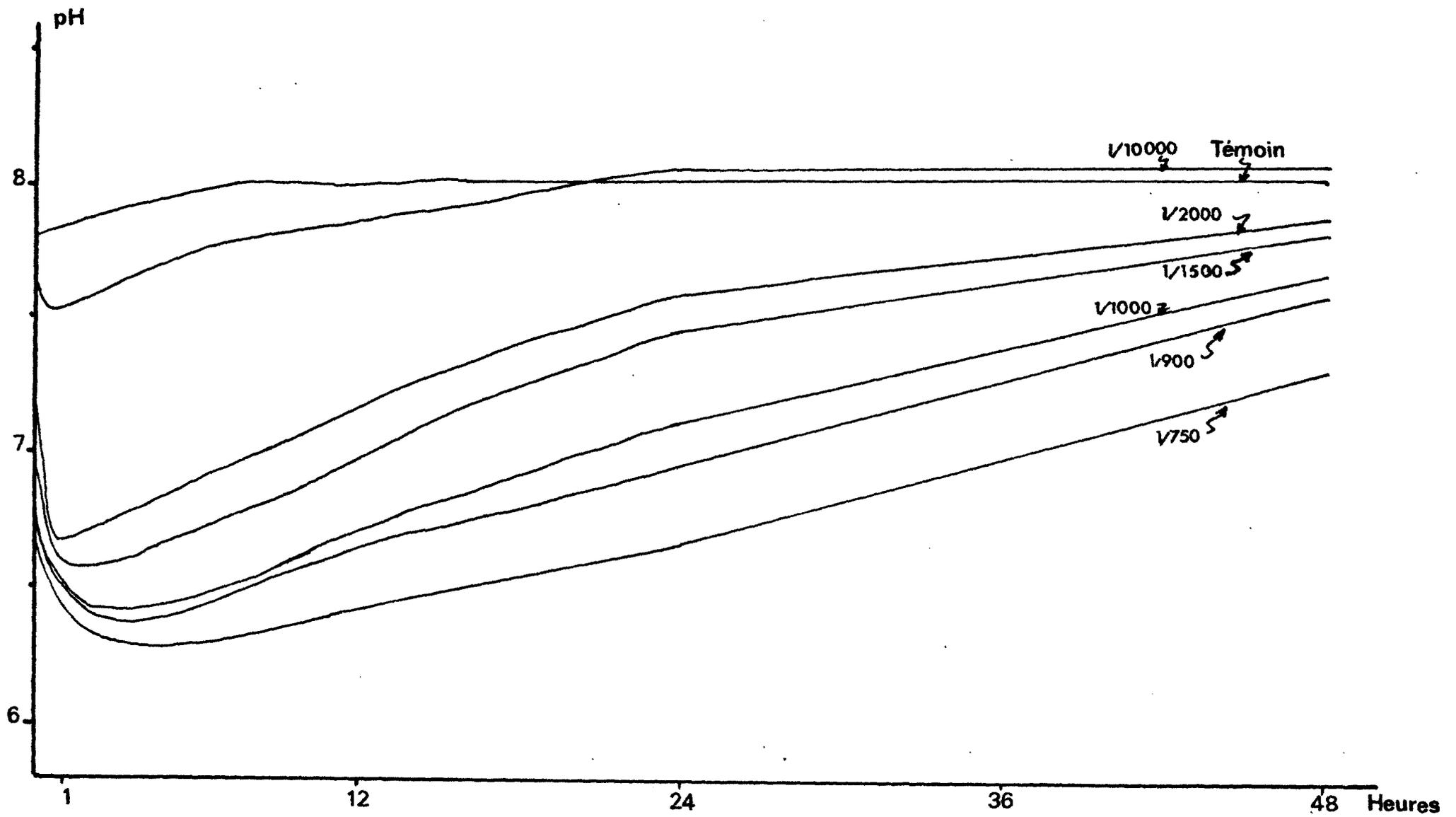
Ce phénomène peut expliquer en partie le taux élevé de mortalité dans les dilutions 1/750 (50 % le 14ème jour).

Les maximums de fréquence des mues sont avancés par rapport aux témoins dès le stade 5 avec les dilutions 1/1500 et 1/1000. Par la suite, l'individualisation des périodes de mues s'estompe progressivement.

Au 1/750, la mortalité importante rend peu interprétable les fréquences de mues observées.

Acide sulfurique à 8 % - Les résultats sont représentés dans les annexes 33 et 34. En dehors de la mortalité accidentelle survenue le 16ème jour au 1/10000, les taux observés sont croissants avec l'augmentation d'acidité : dans la dilution 1/3000 la mortalité ne dépasse pas 30 %, mais aux 1/2500 et 1/2000, elle atteint 50 % entre le 30ème et le 40ème jour de développement, les pH respectifs étant : 6,2 ; 7,8 et 5,8 ; 7,5. Dans les dilutions 1/1000 et 1/750 (pH 3,3 et 2,9), la mortalité est totale en deux jours, sans qu'il y ait mue en stade 2.

./....



**Figure 13** Evolution du pH des différentes dilutions de la solution de sulfate ferreux

Nombres cumulés de métamorphoses

Ces résultats sont représentés dans la figure 15. Le nombre de métamorphoses diminue dans le cas de l'effluent Tioxide lorsque la concentration augmente ; il devient nul dans la dilution 1/750. Il en est de même avec le Fer à 30 g/l ; il y a également absence de métamorphose dans la dilution 1/750.

Enfin, avec la solution d'acide aux 1/2500 et 1/2000 (pH de départ : 6,2 et 5,9), le nombre de métamorphoses diminue très nettement.

Nombres moyens de mues avant la métamorphose

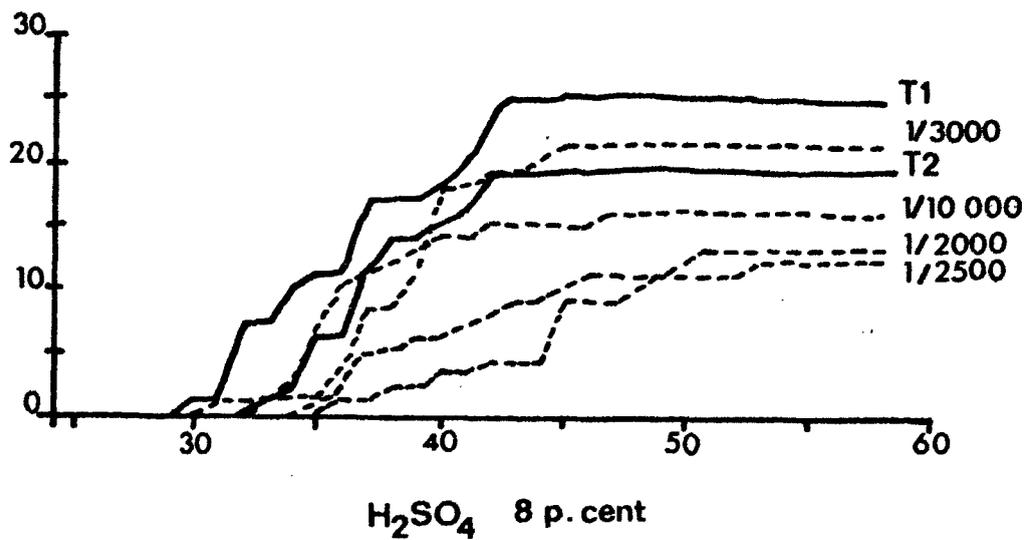
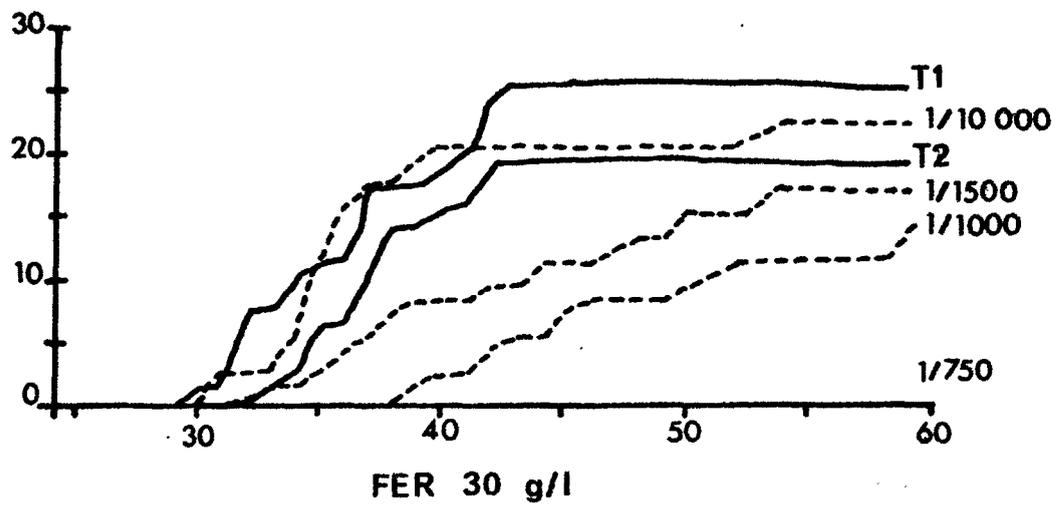
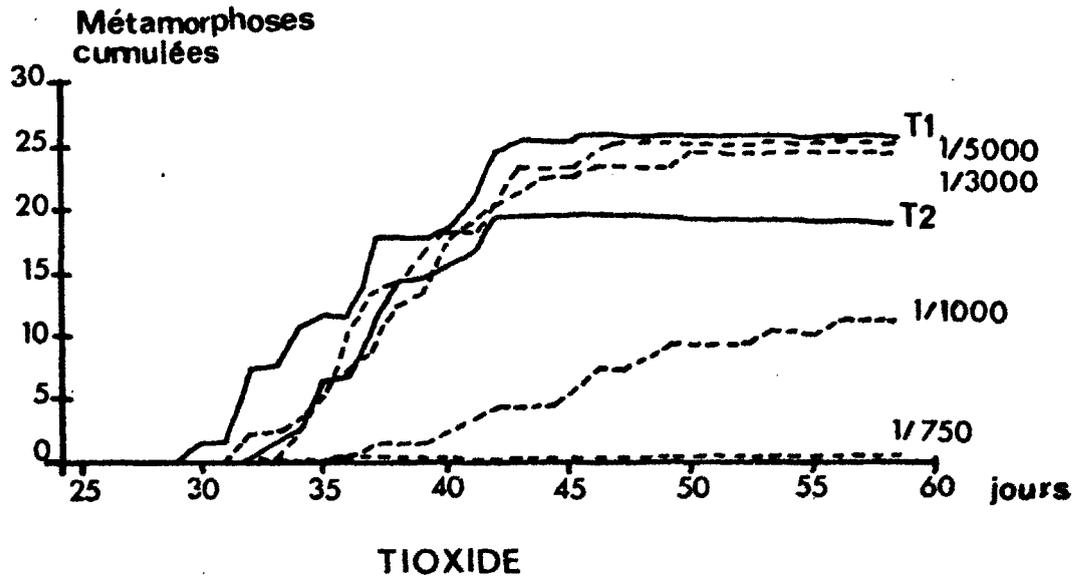
Les résultats sont exprimés dans le tableau 15.

		Moyennes	Ecart types	Nombres de mesures
Témoin 1		7,2	1,03	27
Témoin 2		7,4	0,93	22
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8 %	1/2000	8,7	0,95	14
	1/2500	7,8	0,98	12
	1/3000	7,6	0,72	21
	1/10000	7,3	0,68	16
FER 30 g/l	1/1000	9,6	1,54	14
	1/1500	8,5	1,33	17
	1/10000	7,4	1,11	22
TIOXIDE	1/1000	9,0	1,18	12
	1/3000	7,4	0,86	24
	1/5000	7,5	0,75	25

TABEAU 15 : Moyennes du nombre de mues avant la métamorphose, pour Tioxide et les solutions d'acide et de sulfate ferreux.

Quelle que soit la solution testée, le nombre moyen de mues augmente avec la concentration. Ce résultat est particulièrement net dans le cas de la solution de sulfate ferreux à 30 g/l.

./.....



**Figure 14: Expérience 5**

Métamorphoses cumulées en fonction du temps

De même, l'écart type est généralement croissant en fonction de la concentration.

Ces augmentations du nombre de mues larvaires confirment une désorganisation physiologique des populations en fonction des concentrations.

#### - Discussion

Ces résultats sont tout à fait semblables à ceux obtenus avec les effluents de Thann et Mulhouse ou de Montedison. Les taux de mortalité sont presque superposables dans les dilutions 1/1 000 de Tioxide et 1/ 2000 de la solution acide dont les variations de pH en 3 jours sont pratiquement les mêmes (annexes 30 et 31). Dans ces solutions, la teneur en sulfate ferreux est très faible (4,35 ppm) et le pH est proche de celui de l'eau de mer.

En revanche, la mortalité totale obtenue dans la dilution au 1/750 de Tioxide en 11 jours ne peut être due qu'à l'acidité (pH 5,5 au temps 0), la concentration en fer étant faible : 5,8 ppm, en regard de 40 ppm dans la dilution au 1/750 de la solution de sel de fer.

Notons que le fer n'est pas toxique en tant qu'élément. Il n'est pas certain non plus que le bref abaissement de pH noté dans la figure 13, soit le seul élément sur lequel on puisse tabler.

Cependant on peut remarquer que, à long terme, des concentrations un peu élevées en fer influent sur le nombre de métamorphoses (fig. 14), ainsi que sur le nombre de mues préalables à la métamorphose (tableau 15).

#### c) Sixième expérience

##### - Protocole expérimental

Les conditions adoptées sont les mêmes que précédemment, les dilutions testées étant cette fois plus nombreuses et resserrées de façon à mieux cerner les limites des effets enregistrés.

./....

Nous avons expérimenté sur les dilutions :

1/800 ; 1/900 ; 1/1 000 ; 1/1 200 ; 1/1 500 ; 1/3 000 ; 1/5 000 de l'effluent Tioxide.

1/1 600 ; 1/1 800 ; 1/2 500 ; 1/ 3 000 ; 1/10 000 de la solution acide à 8 %.

1/900 ; 1/1 000 ; 1/1 500 ; 1/2 000 ; 1/10 000 de la solution de fer à 30g/l.

Les concentrations en fer et en acide sont représentées dans le tableau 16.

		Pourcentages en volume de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 34 N ajouté à l'eau de mer	Fer (mg/l)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8 %	1/1 600	0,0050	0
	1/1 800	0,0044	0
	1/2 000	0,0040	0
	1/2 500	0,0032	0
	1/3 000	0,0026	0
	1/10000	0,0008	0
	FER 30 g/l	1/500	0,0020
1/750		0,0013	40
1/900		0,0011	33,3
1/1 000		0,0010	30
1/1 500		0,0006	20
1/2 000		0,0005	15
1/10000		0,0001	3
TIOXIDE	1/500	0,011	9,10
	1/750	0,0076	6,26
	1/800	0,0071	5,87
	1/900	0,0063	5,22
	1/1 000	0,0057	4,70
	1/1 200	0,0047	3,91
	1/1 500	0,0038	3,13
	1/3 000	0,0019	1,56
1/5 000	0,0011	0,91	

TABLEAU 16 : Pourcentages d'acide sulfurique et teneurs en fer pour les dilutions étudiées dans la 5ème et la 6ème expérience.

- Résultats

Ils sont représentés dans les annexes 35 à 40. Les variations de pH en 48 heures sont consignées dans les figures 15, 16 et 17.

Mues et mortalité

L'effluent Tioxide

Les résultats sont représentés dans les annexes 35 et 36. Les mues successives et la mortalité ont été pratiquement les mêmes dans les deux témoins. Les pourcentages des maximums de mues sont comparables à ceux des témoins, au même moment, pour toutes les dilutions supérieures à 1/900.

Les mortalités observées jusqu'au 45ème jour sont du même ordre que celles des témoins. Elles sont plus fortes dans les dilutions 1/900 (50 % le 23ème jour) et 1/800 (50 % le 11ème jour, 100 % en 41 jours) en raison de l'acidité (pH respectivement de 5,8 à 7,5 et de 5,7 à 7,4).

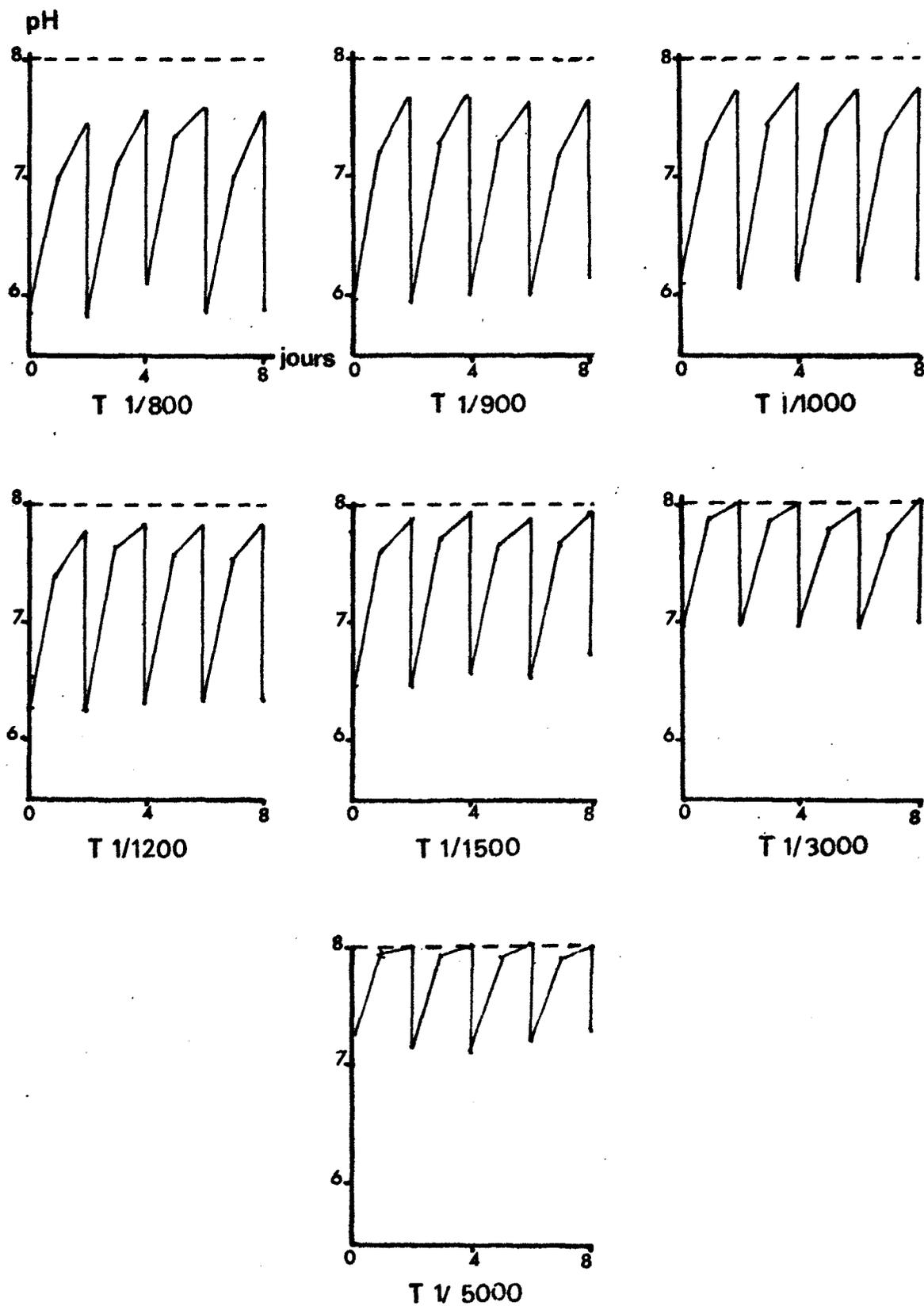
De même que dans les expériences précédentes, les maximums de mue élevés observés au 1/800 ne sont dus qu'à la mortalité importante obtenue.

La solution de fer à 30 g/l

Les stades larvaires restent individualisés dans l'ensemble jusqu'au stade 9 et les maximums à chaque stade coïncident avec ceux des témoins (annexe 37).

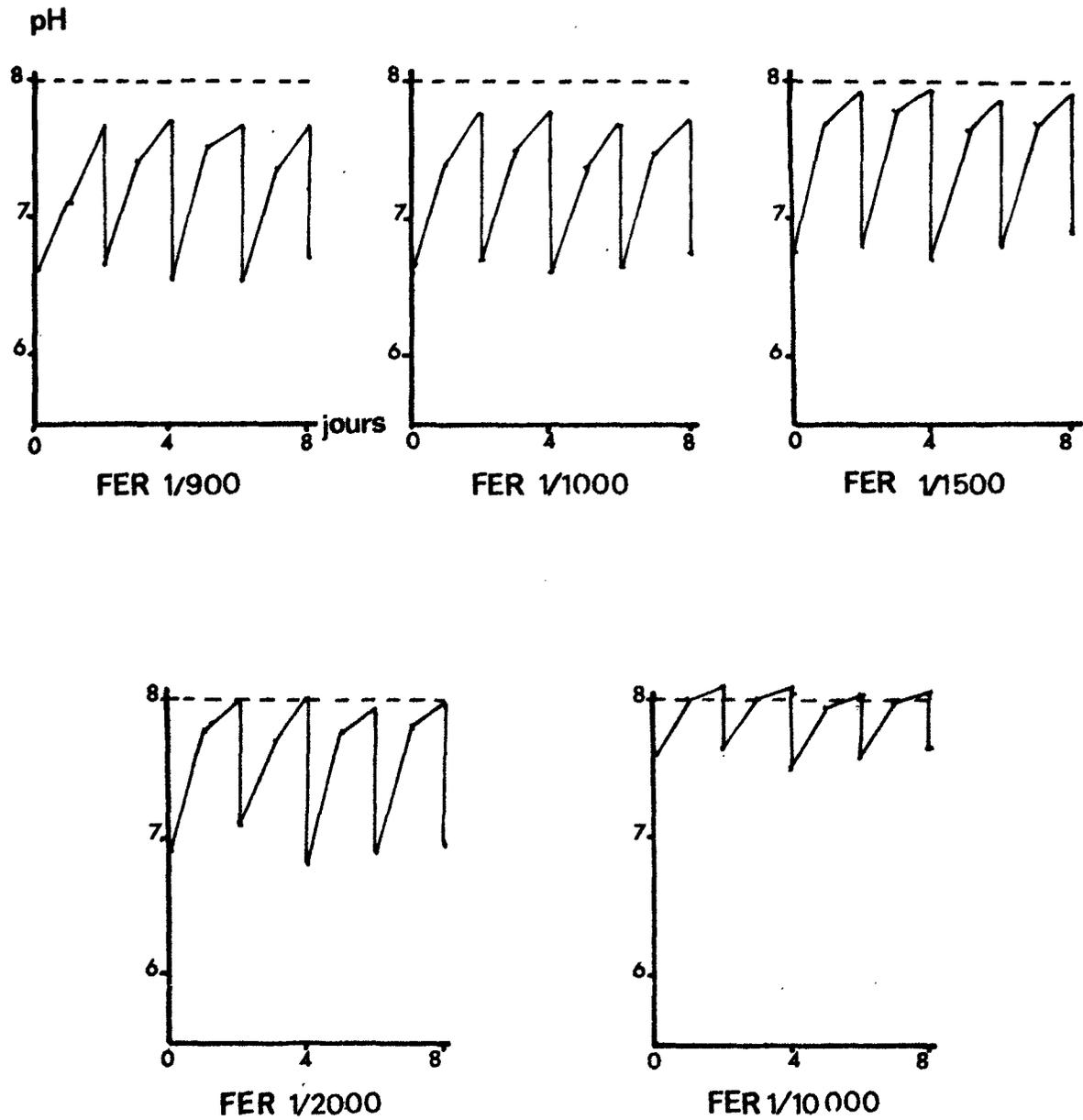
La mortalité croît avec la concentration des solutions : elle est pratiquement nulle dans la dilution 1/10000 et elle atteint 50 % en 25 jours dans celle au 1/900 (annexe 38). Remarquons, pour cette dernière, que le pH est resté entre 6,6 et 7,7 mais que la concentration en fer est élevée (33,3 mg/l) et intervient vraisemblablement.

./....



### EXPERIENCE 6

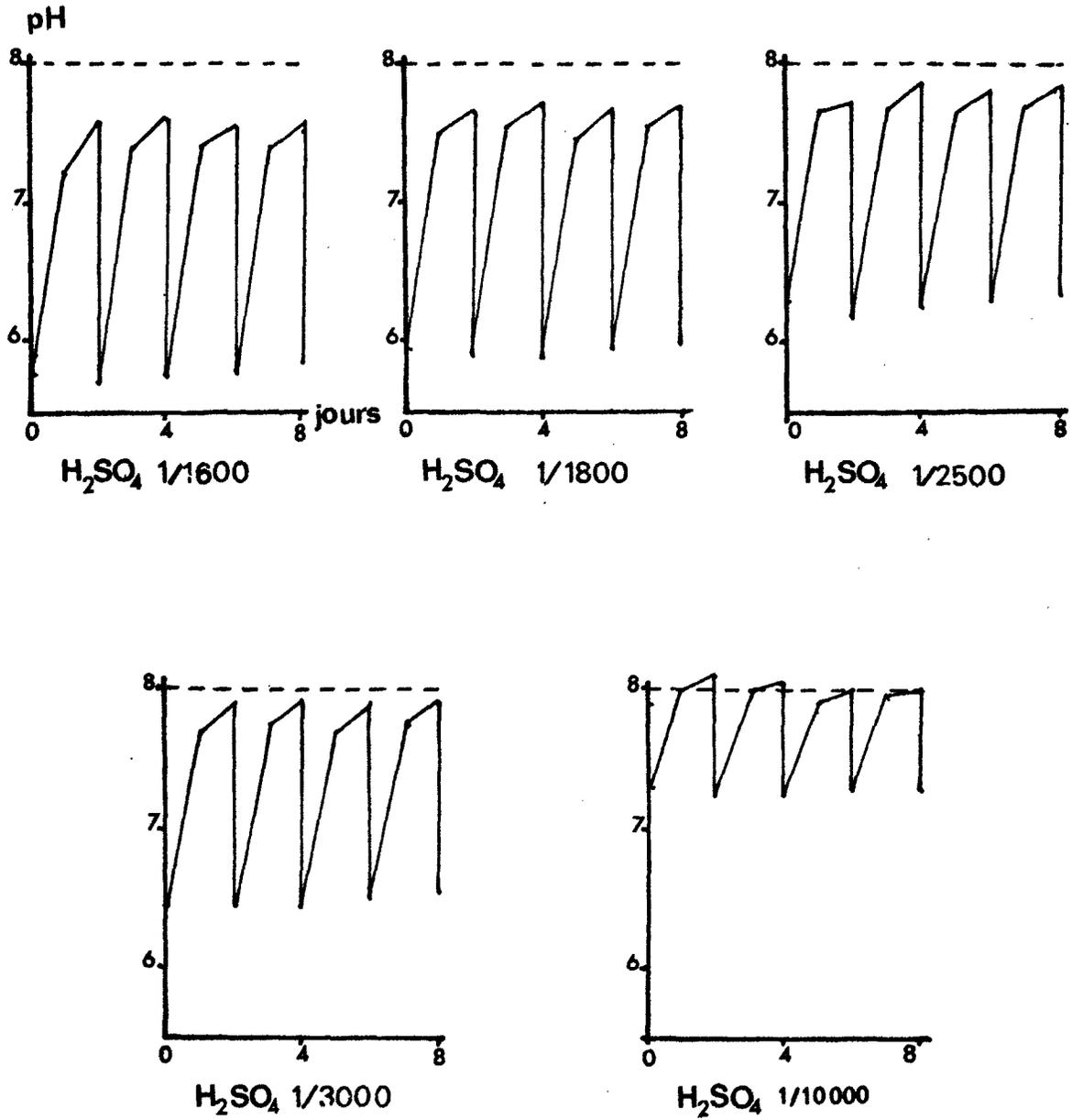
**Figure : 15** Variations du pH pour les dilutions de l'effluent Tiioxide



EXPERIENCE 6

Figure : 16

Variations du pH pour les dilutions de la solution de sulfate ferreux (FER 30 g/l)



### EXPERIENCE 6

Figure :17

Variations du pH pour les dilutions de la solution acide à 8%.

La solution acide à 8 %

Les résultats sont donnés dans les annexes 39 et 40. Les maximums de mues sont synchrones avec ceux des témoins. La mortalité augmente graduellement avec la concentration de la solution ; du 1/1600 au 1/2500 elle dépasse celle des témoins.

La mortalité atteint 50 % au 36ème jour avec la dilution 1/1800 et au 21ème jour avec le 1/1600, soit pour des variations cycliques de pH respectivement de 5,8 à 7,7 et de 5,5 à 7,5.

Nombres cumulés de métamorphoses

Comme dans l'expérience 5, le nombre de métamorphoses diminue graduellement lorsque la concentration de l'effluent Tioxyde augmente (figure 18). Dans les dilutions échelonnées de 1/1200 à 1/900, les métamorphoses ont lieu de plus en plus tard, tandis qu'au 1/800 on ne constate aucune métamorphose.

De la même façon, le retard dans l'apparition des métamorphoses est de plus en plus marqué dans les dilutions 1/1500 à 1/900 de la solution de sulfate ferreux.

Dans la solution acide, le nombre des métamorphoses diminue notablement en fonction de la concentration, mais l'apparition des premières métamorphoses est à peu près synchrone.

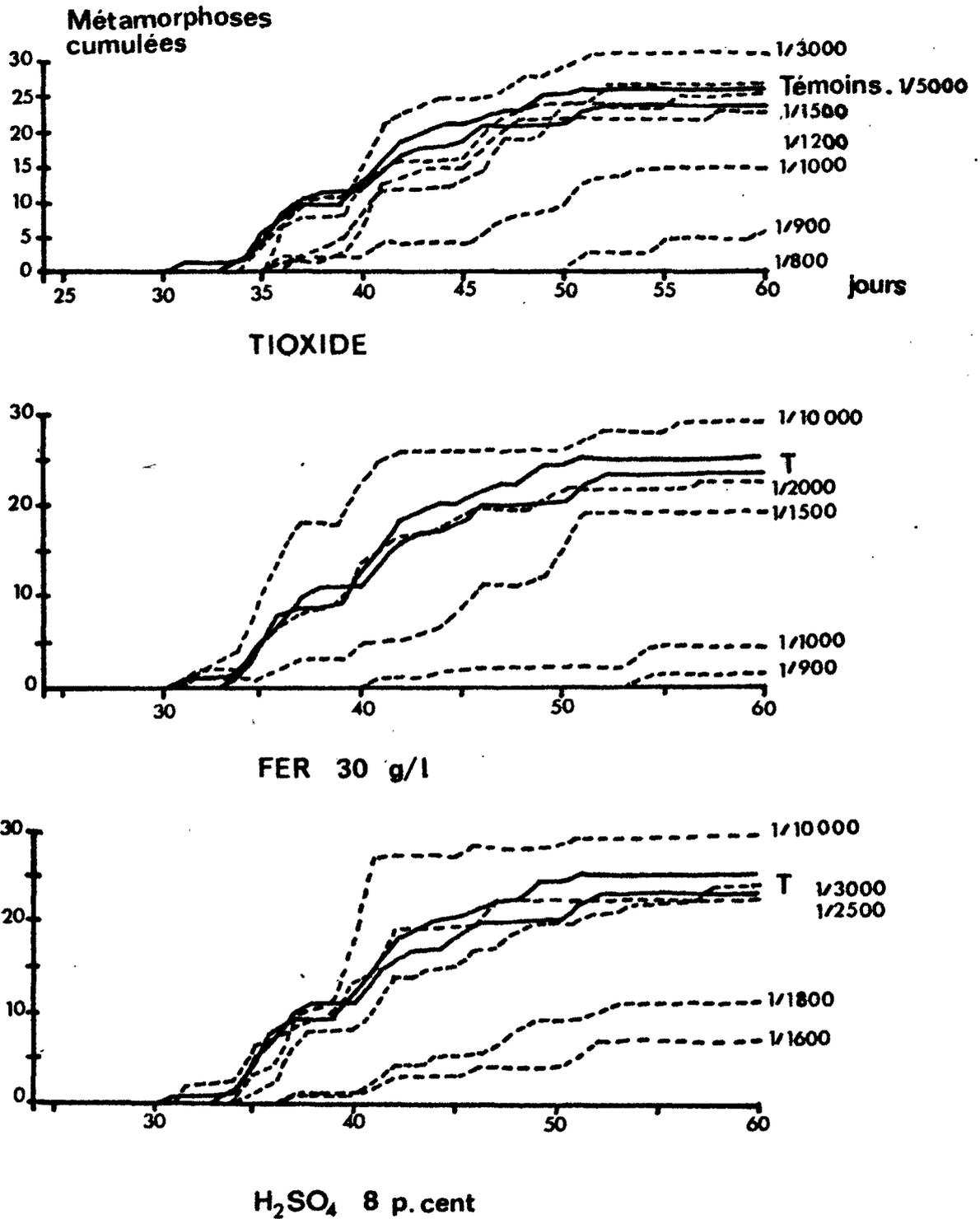
Nombres moyens de mues avant la métamorphose

Dans cette expérience, nous avons suivi le développement des individus pendant 60 jours, puis nous avons conservé en essais seulement ceux qui n'avaient pas métamorphosé.

Ainsi, avec la dilution 1/1000 de l'effluent Tioxyde, la seule larve restante est morte au 72ème jour sans avoir métamorphosé. Au 1/900, une autre larve n'a métamorphosé que le 69ème jour.

En ce qui concerne la solution ferrique, diluée au 1/1500, deux larves ont métamorphosé aux 81ème et 88ème jours. A la dilution 1/1000 une larve a métamorphosé au 72ème jour et une autre est morte le 100ème

./....



**Figure 18 : Expérience 6**

Métamorphoses cumulées en fonction du temps

sans passage au stade de post-larve. Enfin, une dernière larve, venant de dilution 1/900, est morte sans métamorphoser le 73ème jour.

Dans la plupart des cas précités, les animaux étaient à l'état de "prémétamorphose", les caractères principaux de la post-larve étant réunis, mais avec persistance des péréiopodes natatoires des premiers stades.

Le nombre moyen de mues, avant métamorphose (tableau 17) diminue quand la dilution croît, mais la différenciation est moins marquée dans le cas de la solution sulfurique à 8 %.

		Nombres moyens de mues	Ecart-type	Nombres de mesures
Témoin 1		7,81	1,19	22
Témoin 2		7,84	0,86	26
TIOXIDE	1/900	10,85	1,55	7
	1/1000	9,46	1,54	15
	1/1200	8,62	1,03	24
	1/1500	8,45	0,98	22
	1/3000	7,96	0,91	30
	1/5000	8,16	1,00	25
FER à 30 g/l	1/900	11,00	0,81	3
	1/1000	11,00	2,87	7
	1/1500	9,35	2,35	20
	1/2000	7,78	1,14	23
	1/10000	7,44	1,06	29
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 8 %	1/1600	9,00	1,41	8
	1/1800	8,72	0,96	11
	1/2500	7,59	0,83	22
	1/3000	8,25	1,19	24
	1/10000	7,62	0,80	29

TABLEAU 17 : Moyennes du nombre de mues avant la métamorphose dans des dilutions de Tioxide et des solutions d'acide et de sulfate ferreux.  
./....

Les écarts type relatifs à l'effluent Tioxyde diminuent avec la dilution, la valeur plus élevée qui correspond à la dilution 1/5000 est modifiée par la mortalité, de même que celle correspondant à la solution de fer au 1/900.

D'une façon générale, l'augmentation du nombre de mues avant la métamorphose est liée à l'augmentation de la concentration en acide, mais également à l'augmentation de la concentration en fer.

#### - Discussion

Nous retrouvons ici les résultats de la 5ème expérience, mais avec une gamme de concentrations plus étalée. La présence de quantités importantes d'hydroxyde ferrique semble intervenir pour une bonne part dans les retards observés dans les métamorphoses en post-larves.

Nous pouvons ainsi discerner les dilutions en-dessous desquelles le développement est sérieusement compromis, soit :

- 1/1200 de l'effluent Tioxyde correspondant à une acidité de 0,0047 % et une teneur en fer de 3,91 ppm,
- 1/1500 de la solution de fer à 30 g/l correspondant à une acidité de 0,0006 % et une teneur en fer de 20 ppm,
- 1/2500 de la solution acide à 8 % correspondant à une acidité de 0,0032 %.

En fait, les critères à retenir pour déterminer des teneurs toxiques limites sont :

- la mortalité dans un délai donné,
- le nombre de mues avant la métamorphose,
- le nombre de métamorphoses pour chaque lot d'individus.

./.....

D - INFLUENCE DE L'EFFLUENT TIOXIDE NEUTRALISE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE (7ème EXPERIENCE)

Nous avons recréé, dans cette expérimentation, des conditions qui ne se rencontrent pas lors de rejets dans le milieu naturel : effluent peu dilué mais pratiquement neutralisé. Le but recherché était de dissocier l'effet intrinsèque des composants métalliques de celui de l'acidité.

a) Protocole expérimental

Les dilutions étudiées étaient préparées en quantités importantes une semaine à l'avance et abondamment aérées afin d'accélérer le processus de neutralisation. Elles étaient ensuite utilisées suivant le même protocole expérimental que celui décrit précédemment.

De cette façon, nous avons pu rechercher l'influence de l'effluent et de la solution de sulfate sur le développement de P. serratus lorsque l'acidité n'est plus en cause. Les larves ont été suivies comme dans les expériences antérieures.

Nous avons testé les dilutions :

- 1/800 ; 1/900 ; 1/1000 ; 1/1200 ; 1/1500 ; 1/3000 ; 1/5000 de l'effluent Tioxide,
- 1/900 ; 1/1000 ; 1/1500 ; 1/2000 et 1/10000 de la solution de fer à 30 g/l dont les teneurs en fer figurent dans le tableau 16.

Pendant les 60 jours d'expérimentation, le pH des dilutions a été suivi. Les valeurs échelonnées de 7,42 à 8,12, sont restées pratiquement constantes pendant toute la durée de l'expérience.

b) Résultats

Pourcentages de mues et de mortalités

Les résultats sont représentés dans les annexes 41 à 44. Les témoins présentent des mues régulières et individualisées pendant les 13 stades du développement.

Tioxide (annexes 41 et 42)

La mortalité n'atteint jamais 40 % pendant toute l'expérience et est partout légèrement supérieure à celle des témoins.

./.....

Les maximums de mues sont nettement individualisés et ne présentent pas de décalage par rapport au témoin.

Fer à 30 g/l (annexes 43 et 44)

La mortalité croît régulièrement du 1/2000 au 1/900 avec l'augmentation de la teneur en sulfate ferreux. Les pourcentages de mues sont peu individualisés dès le 9ème stade. Notons qu'au 1/10000 les résultats sont marqués par une mortalité accidentelle survenue le 26ème jour.

Nombres cumulés de métamorphoses

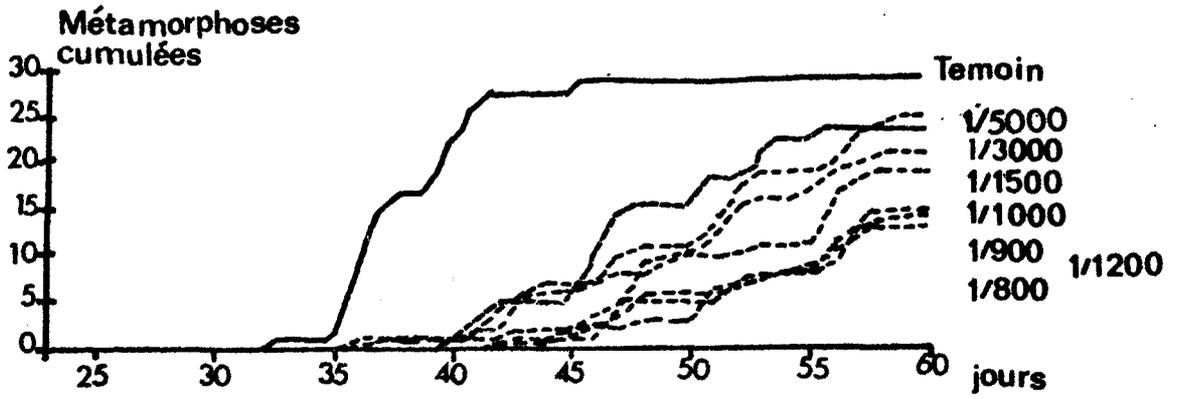
Les résultats concernant Tioxyde sont représentés dans la figure 19. Le nombre des métamorphoses diminue graduellement par rapport au témoin, avec l'augmentation de la concentration, et ceci dès la dilution 1/5000. Le même phénomène apparaît, bien que moins marqué, avec la solution de fer.

Nombres moyens de mues avant la métamorphose

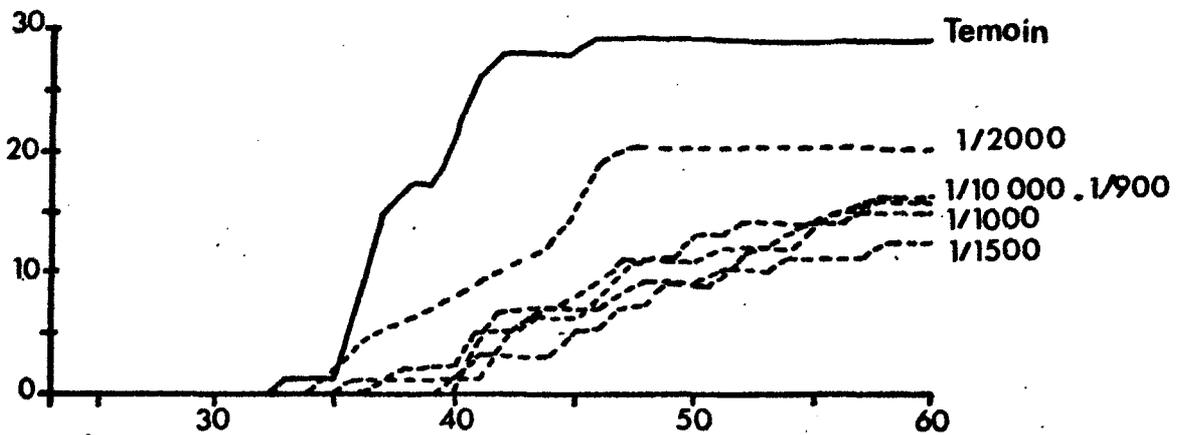
De même que dans l'expérience précédente, l'apparition des métamorphoses de quelques individus est fortement retardée. Ce retard croît avec la concentration. Par exemple, dans la dilution 1/5000, 3 larves n'ont métamorphosé qu'aux 63ème et 64ème jour, et au 1/800, 4 autres n'ont métamorphosé qu'aux 66ème et 68ème jour.

Les nombres moyens de mues avant métamorphose ne diffèrent pratiquement pas, au sein de chaque série de dilutions, contrairement à l'expérience précédente (tableau 18).

./.....



TIOXIDE



FER 30 g/l

**Figure 19 : Expérience 7 .**

Métamorphoses cumulées en fonction du temps

		Nombres moyens de mues	Ecart-type	Nombres de mesures
Témoïn		7,41	0,61	29
TIOXIDE	1/800	10,85	1,42	20
	1/900	10,27	1,32	18
	1/1000	10,20	1,35	24
	1/1200	9,44	1,20	25
	1/1500	10,44	1,34	18
	1/3000	9,33	1,24	21
	1/5000	9,53	1,21	26
FER à 30 g/l	1/900	8,68	1,04	16
	1/1000	9,11	1,59	18
	1/1500	8,30	1,06	13
	1/2000	7,89	1,29	19
	1/10000	9,27	1,39	18

**TABLEAU 18** : Moyennes du nombre de mues avant la métamorphose, pour Tioxide et la solution de sulfate ferreux.

Les nombres moyens de mues avant métamorphose dans les dilutions de l'effluent Tioxide sont échelonnés de 9,33 à 10,85, et dans les dilutions de la solution de fer de 7,89 à 9,27.

Il y a donc un retard plus prononcé dans le cas de l'effluent malgré des teneurs en fer bien plus faibles, ce qui tendrait à faire intervenir dans la toxicité un facteur autre que le fer ou l'acidité ; ce résultat est cependant difficilement explicable car il n'a pas été observé, de manière aussi accentuée, dans l'expérience précédente où l'on utilisait des solutions à pH non stabilisé.

Les écarts-types obtenus avec les dilutions de Tioxide sont plus importants dans l'ensemble que ceux relatifs à la solution de fer.

### c) Discussion

En tenant compte de la neutralisation des solutions testées par l'eau de mer, on peut retenir dans cette expérience :

./...

- une délimitation plus nette des pourcentages de mues dans l'effluent Tioxide, se traduisant par une individualisation des pics que l'on ne retrouve pas dans la solution de fer,
- une diminution du nombre des métamorphoses avec l'augmentation de la concentration de l'effluent Tioxide. Le nombre d'individus métamorphosés est plus faible que chez les témoins dans la dilution 1/5000 malgré un pH proche de 8,
- des nombres moyens de mues avant la métamorphose et des écarts-types plus élevés dans l'ensemble pour les dilutions de l'effluent.

Notons, dans cette dernière expérience, que les concentrations élevées en fer de la solution de référence (20, 30 et 33,3 mg/l) interviennent, en l'absence d'acidité notable, dans l'importance des mortalités observées.

On peut donc, dans cette expérience, évoquer un autre facteur que l'acidité intervenant à long terme dans l'apparition des métamorphoses : la charge en fer du milieu.

#### E - DISCUSSION GENERALE

Les premiers essais de toxicité aiguë qui portent principalement sur l'effluent Montédison montrent que les seuils létaux (100 %) correspondent pour l'effluent à une acidité de 0,0058 % et une teneur en fer de 29 ppm, pour la solution de fer, à une acidité de 0,0040 % et une teneur en fer de 88 ppm, et pour la solution acide à 0,0080 % d'acide sulfurique 34 N. Ces mortalités sont obtenues en 4 jours dans une eau de mer non renouvelée. Lorsque le pH initial est de 6,0, il y a progressivement neutralisation et aucune mortalité n'est enregistrée en 4 jours.

La toxicité à long terme a été suivie au cours de sept expériences durant de 1 à 2 mois en fonction de la période d'apparition des métamorphoses pour les trois effluents : Montédison, Tioxide et Thann et Mulhouse.

./....

1°) L'effluent Montédison

Dans les deux premières expérimentations les larves n'ont subi un choc acide qu'en début d'expérience puisque les mêmes dilutions étaient utilisées pendant toute la durée des essais.

Dans ces conditions expérimentales nous n'avons pas décelé de différences significatives entre les témoins et les solutions testées. Ainsi, une concentration en fer aussi élevée que 22 mg/l semble dépourvue d'effets (dilution 1/2000 de l'effluent).

Dans les deux expériences suivantes les animaux ont été soumis à d'importantes variations cycliques de pH. Des mortalités importantes (50 % et 90 % les 14ème et 34ème jours) sont observées dans la dilution 1/2000 de l'effluent (0,0044 % d'acidité et 22 mg/l de fer) ; les mortalités sont bien plus faibles (10 et 20 % aux mêmes temps) dans la dilution 1/2000 de la solution de sulfate ferreux qui présente la même teneur en fer pour une acidité moindre (0,0010 %). L'acidité joue un rôle primordial dans ces mortalités ; le pH initial et sa cinétique de neutralisation semblent importants : un pH initial de 5,8 tendant vers 7 en 48 heures (Montédison 1/2000), est très toxique, à long terme, alors que des évolutions de 6 à 7,3 (Montédison 1/2500) et de 5,9 à 7,6 (solution de  $H_2SO_4$  8 % 1/2000) ne le sont pas. Ainsi le pH initial mais aussi la pente de la courbe de neutralisation, c'est-à-dire sa vitesse, joueraient un rôle essentiel dans la toxicité constatée.

2°) L'effluent Thann et Mulhouse

Une seule expérimentation a pu être conduite à 21° C d'où les mortalités plus importantes constatées. La dilution 1/500 de l'effluent (0,0042 % d'acidité et 25 mg/l de fer) a une composition très proche de la dilution 1/2000 de Montédison (0,0044 % et 22 mg/l) mais témoigne cependant une plus faible mortalité ; l'explication doit probablement être recherchée au niveau d'une vitesse de neutralisation plus grande à partir d'un même pH initial de 5,8, mais atteignant une valeur plus élevée en 48 heures.

./...

L'expérimentation sur cet effluent, avec variations cycliques de pH, semble donc confirmer le rôle de l'acidité sous le double aspect d'une limite inférieure létale de pH voisine de 6 d'une part, et de l'importance de la cinétique de neutralisation d'autre part.

### 3°) L'effluent Tioxide

Les essais faisant intervenir des variations cycliques de pH font apparaître des mortalités importantes lorsque les différentes concentrations sont supérieures ou égales à 0,0057 % d'acide. En effet, si la mortalité est moyenne au 1/1000 (0,0057 d'acide et 4,7 mg/l de fer), elle croît avec l'élévation d'acidité dans les dilutions plus faibles. A l'opposé, la dilution 1/2000 (0,047 % d'acide ; 3,9 mg/l de fer) montre une mortalité comparable à celle des témoins.

Dans tous les cas les faibles teneurs en fer ne semblent pas provoquer ces mortalités ; le pH initial et sa cinétique de neutralisation semblent être le facteur essentiel de la toxicité observée. Nous retrouvons également ici la limite létale inférieure pour un pH initial voisin de 6. La limite critique du pH est très aiguë puisque la mortalité est importante pour Tioxide 1/900 (pH variant de 6 à 7,6 en 48 heures) alors qu'elle est comparable à celle des témoins pour le 1/1200 (pH variant de 6,3 à 7,8 dans le même temps).

Les résultats, obtenus avec les dilutions de la solution de référence acide, mettent en relief l'effet du pH dès la concentration de 0,0040 % (pH évoluant de 5,9 à 7,8 en 48 heures) ; à 0,0032 % d'acide (pH variant de 6,2 à 7,8 en 48 heures) les effets constatés varient légèrement d'une expérience à l'autre montrant bien les limites de cette zone sensible du pH.

Mais le fer, à fortes concentrations, a également une action importante sur la mortalité des larves ; en effet, la mortalité moyenne constatée pour la dilution 1/1000 de la solution de fer (30 mg/l) augmente parallèlement à l'accroissement de cette teneur. Dans ce cas l'acidité, très faible, et les valeurs initiales des pH (6,5 à 6,8) ne peuvent être mis en cause.

./...

En ce qui concerne les nombres de métamorphoses cumulées, les résultats obtenus montrent, d'une façon générale, l'influence de l'augmentation des concentrations pour l'effluent et les solutions de référence. De plus, les effets observés sont concomitants avec ceux enregistrés dans le cas des mortalités ; on peut ainsi souligner certaines concentrations sensibles à partir desquelles les nombres de métamorphoses sont nettement inférieures à ceux des témoins :

- 0,0057 % d'acide pour Tioxyde,
- entre 20 et 30 mg/l de fer pour la solution de sulfate ferreux,
- 0,0040 % d'acide pour la solution sulfurique.

Le retard dans l'apparition des post-larves, caractérisé par le nombre de mues qui précèdent la métamorphose, est peu marqué dans le cas des différentes solutions d'acide ; en revanche, avec les dilutions 1/900 et 1/1000 de Tioxyde et de la solution de sulfate ferreux, on constate un accroissement important du nombre moyen de mues.

Les essais réalisés avec les solutions d'effluent et de fer à pH stable ne montrent pas d'effet significatif pour toutes les concentrations testées c'est-à-dire jusqu'à un maximum de 5,87 mg/l de fer. La mortalité est légèrement supérieure à celle du témoin mais elle est pratiquement identique dans les sept dilutions expérimentées. Ceci semblerait exclure un effet notable du cortège de métaux contenus à l'état de traces - dont des métaux lourds - dans l'effluent Tioxyde.

La solution de fer neutralisée montre une certaine mortalité dès la concentration de 20 mg/l de fer ; cette mortalité devient importante à 33,3 mg/l.

Les nombres de métamorphoses cumulés sont très nettement inférieurs à ceux des témoins pour toutes les dilutions testées.

Le retard dans l'apparition de la métamorphose est peu marqué en ce qui concerne la solution de sulfate de fer alors qu'il est important pour la plupart des dilutions de Tioxyde. Ces résultats ne peuvent pas être interprétés dans l'état actuel de nos travaux.

./.....

F - CONCLUSIONS GENERALES

Avant d'essayer de dégager quelques conclusions de ces séries d'expériences, il convient de remarquer que les effets notés, lors des trois dernières expérimentations, étaient le plus souvent accentués en fin d'étude. Les quatre premières expériences n'ayant pu, pour des raisons pratiques, être prolongées au-delà de 35 à 40 jours, certains résultats peuvent avoir été masqués.

Retenons toutefois que pour toutes les séries mettant en jeu des variations cycliques de pH, l'acidité était le facteur essentiel des mortalités observées. Le pH initial et la cinétique de neutralisation sont importants et complémentaires. Au voisinage de pH 6,0 qui peut être considéré comme le seuil létal d'acidité, la mortalité est plus ou moins importante selon que la neutralisation en 48 heures est lente ou progressive.

La cinétique de neutralisation est fonction d'un certain nombre de facteurs :

- la concentration en sulfate ferreux ; quand elle augmente elle tend à abaisser le pH et par conséquent à ralentir la neutralisation,
- l'oxygénation du milieu ; le comportement chimique de ce type d'effluent, en milieu marin, induit une consommation gazeuse qui diminue la charge en oxygène dissous. Pour des milieux fermés ou des eaux profondes, mal oxygénés, ce facteur intervient notablement et retarde la neutralisation de la charge acide.

D'autre part le fer seul, à fortes concentrations (30 mg/l), entraîne des mortalités importantes de larves. Ce phénomène est plus particulièrement mis en évidence pour les expériences de longue durée.

D'une façon générale les études, portant sur l'effet de solutions d'effluents ou de références en fer et en acide, n'ont pas mis en évidence d'autres facteurs que le pH initial, la cinétique de neutralisation et les fortes teneurs en fer. Les métaux à l'état de traces ne semblent pas intervenir au niveau de la toxicité à long terme qui a été abordée dans ce travail.

./...

Des effets à long terme pour des concentrations seuils, légèrement inférieures à celles précitées, sont mis en évidence après 40 jours de développement, sur le nombre et l'apparition des métamorphoses.

Ces résultats sont corroborés par les expériences faisant appel à des solutions neutralisées, soit avant que les larves y soient placées, soit à partir de la première exposition des larves au choc acide. En effet, la mortalité est en général comparable à celle des témoins tant que la teneur en fer ne dépasse pas 30 mg/l.

Enfin, les effets à long terme sur les nombres de métamorphoses sont trop fragmentaires pour faire intervenir d'autres facteurs que le fer.

-----

## B I B L I O G R A P H I E

I. - CULTURES ET ELEVAGES D'ESPECES PLANCTONIQUES

- BOURDILLON-CASANOVA (L.), 1960. - Le méroplancton du golfe de Marseille. Les larves de crustacés décapodes.- Rec. Trav. Sta. mar. Endoume, 30, (18), 286 p.
- CAMPILLO (A.), 1975 a .- Contribution à l'étude de l'élevage de la crevette rose Palaemon serratus (PENNANT) en captivité. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 39 (4), p. 381 - 394.
- CAMPILLO (A.), 1975 b .- Données pratiques sur l'élevage au laboratoire des larves de Palaemon serratus (PENNANT). - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 39 (4), p. 395 - 406.
- CAMPILLO (A.) et LUQUET (P.), 1975. - Influence du taux de protéines sur la croissance de Palaemon serratus (PENNANT) élevée au laboratoire. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 39 (4) p. 407 - 414.
- DEROUX (G.), CAMPILLO (A.) et BRADBURY Ph (C.), 1975. - Ascophrys rodor (CAMPILLO et DEROUX) parasite de la crevette rose P. serratus en élevage. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 39 (4), p. 359 - 379.
- DUTRIEU (J.), 1960. - Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'Artemia salina Leach. - Arch. Zool. exp. gén. 99 (1), p. 1 - 134.
- FIGUEIREDO (M.J.), 1973. - Some food studies in the larval rearing of Palaemon serratus (PENNANT). ICES. CM. 1973/K : 5.
- GURNEY (R.), 1923.- - Some notes on Leander longirostris. M.Edwards and other british prawns. Proc. zool. Soc. London. p. 97 - 123.
- LEBOUR (M.V.), 1917. - The microplankton of Plymouth Sound from the region beyond the break-water. - J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 11 (2), p. 135 - 182.
- Ibid. 1927. - Studies on the Plymouth Brachyura 14, p. 809 - 821.
- Ibid. 1928. - The larval stages of the Plymouth Brachyura. J. Proc. Zool. Soc. London p. 473 - 560.
- Ibid. 1947. - Notes on the inshore plankton of Plymouth.- J. mar. biol. Assoc. U.K. 26 (4), p. 527 - 547.
- REEVE (M.R.), 1969 a .- Growth, metamorphosis and energy conversion in the larvae of the prawn Palaemon serratus. - J. mar. biol. Assoc. U.K. 49, p. 77 - 96.
- Ibid. 1969 b .- The laboratory culture of the prawn Palaemon serratus. - Fish Invest. London Ser II, 26 (1), 37 p.

./.....

SOLLAUD (E.), 1923. - Le développement larvaire des Palaemoninae.— Bull. biol. France Belgique 57 p. 509 - 603.

WICKINS (J.F.), 1970. - The food value of the brine shrimp (Artemia salina Leach) to larvae of the prawn (Palaemon serratus PENNANT). ICES CM 1970/E : 6.

## II. - REJETS EN MER DE SELS METALLIQUES EN MILIEU ACIDE

ABBES (R.), 1972. - Rapport de mission. - Rejets en Méditerranée de résidus de fabrication d'oxyde de titane. - Rapport interne I.S.T.P.M.

AKESSON (B.) 1970. - Ophryotrocha labronica as test animal for the study of marine pollution. - Helgoland. Wiss. Meeres. 20, 1-4, p. 293 - 303.

ARCHIMBAUD (M.), 1974. - Analyse chimique des rejets de la Société Montédison en Méditerranée. Jour. Français d'hydrologie 13, p. 23 - 30.

BOKN et Coll. 1974. - Influence of freshwater industrial waste and domestic sewage on bottom fauna and benthic algae in the Hvaler archipelago (SE - Norway). Revised manuscript of the Symposium on the influence of freshwater outflow on biological processes in fjords and coastal waters, Geilo, 22-26/4, 1974.

C.E.R.B.O.M. Rapport n° 202 (1972 - 1973). - Toxicité et comportement en milieu marin d'effluents provenant de la fabrication d'oxyde de titane. - Rapport général Montedison - Scarlino (Italie).

C.E.R.B.O.M. Rapport n° 221 (1974). - Etude du ~~rejet~~ en Baie de Seine des eaux résiduaires de l'usine du Havre de la Société Thann et Mulhouse. Rapport général. Thann et Mulhouse, usine du Havre (Seine-Maritime).

C.N.E.X.O. Campagne Emeraude (1973). - Extraits du "Livre blanc" concernant les rejets industriels de la Société Montecatini - Edison en Méditerranée (Secrétariat permanent pour l'Etude des Problèmes de l'Eau).

DE CLERCK (R.) et VAN DE VELD (J.), 1974. - Description biologique d'une zone de rejet d'un effluent industriel résultant de la fabrication du dioxyde de titane. ICES CM 1974/E : 29.

DETHLEFSEN (V.), 1973. - Zur frage des Fischvorkommens im Dünnsäureverklappungsgebiet nordwestlich Helgoland. - Arch. Fisch. Wiss. 24, 1-3, p. 65 - 75.

DUURSMA (E.K.) et SEVENHUYSEN (W.), 1966. - Note on chelation and solubility of certain metals in sea water at different pH values Netherland. - Journ. of Sea Research, 3, 1, p. 95 - 106.

GRICE (G.O.), 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. Estuar. Coast. Mar. Sci. 1, p. 45 - 50.

./....

- KAYSER (H.), 1969. - Züchtungsexperimente an zwei marinen flagellaten (Dinophyta) und ihre anwendung im toxikologischen abwassertest - Helgoländer wiss. Meeres. 19 p. 21 - 44.
- Ibid 1970. - Experimental-ecological investigations on Phaeocystis poucheti (Haptophyceae): cultivation and waste water test - Helgoländer-wiss. Meeres 20, p. 195 - 212.
- KETCHUM (B.H.), 1974. - Sea disposal of Acid - Iron Wastes resulting from the production of Titanium - Dioxide . ICES CM 1974/E : 52.
- KINNE (O.), ROSENTHAL (H.), 1967. - Effects of sulfuric water pollutants on fertilization, embryonic development and larvae of herring, Clupea harengus. Mar. Biol. 1, p. 65 - 83.
- KINNE (O.), SCHUMANN (K.H.), 1968. - Biologische Konsequenzen schwefelsäure - und eisen sulfathaltiger Industrie abwässer. Mortalität junger Gobius pictus und Solea solea (Pisces). Helgoländer. wiss. Meeres unters. 17 p. 141 - 155.
- LASSUS (P.), 1974. - Etude de la toxicité de solutions acides de sels de fer sur le plancton marin. - Thèse présentée à l'Université de Provence (Aix-Marseille I).
- LASSUS (P.) et MAGGI (P.), 1974. - Les effets biologiques des rejets en milieu marin d'effluents de fabrication d'oxyde de titane. Jour. Français d'hydrologie, 13, p. 31 - 35.
- LE FAUCHEUX (O.), 1974. - Le comportement physique d'un déversement en mer de résidu de fabrication d'oxyde de titane. Jour. Français d'Hydrologie 13, p. 17 - 21.
- LEHTONEN (H.), TUUNAINEN (P.), 1974. - On the effects of effluents from the titanium dioxide industry on the biota and fishery on the coastal area of the Gulf of Bothnia, near Pori, Finland. ICES. CM. 1974/E : 45.
- LEHTONEN (H.), 1975. - The biological effects of the Titanium dioxide industry in Finland ICES. CM. 1975/E : 26.
- LEROY (C.), 1972. - Rejets en Méditerranée de résidus de fabrication d'oxyde de titane - Usine Italienne Montedison de Scarlino - Rapport interne I.S.T.P.M.
- MAGGI (P.) et LASSUS (P.), 1974. - a) Incidences biologiques des déversements d'effluents du type dioxyde de titane. IIème journées Etud. Pollutions, p. 181 - 182, Monaco - C.I.E.S.M.
- Ibid. 1974. - b) Effets biologiques des effluents de quelques fabriques d'oxyde de titane. - ICES. CM. 1974/E : 50.
- MICHEL (P.), 1972. - Rejets en Méditerranée de résidus de fabrication d'oxyde de titane. Rapport interne I.S.T.P.M.
- RACHOR (E.), 1972. - On the influence of industrial waste containing  $H_2SO_4$  and  $Fe SO_4$  on the Bottom Fauna off Heligoland (German Bight) F.A.O. <sup>4</sup> Conference of Marine Pollution FIR : MP/70/E - 101 p. 1 - 4.

- RACHOR (E.) et DETHLEFSEN , 1974. - Effects of acid-iron waste disposal in the marine environment. ICES CM 1974/E : 27.
- STRIPP (K.) et GERLACH (S.A.), 1969. - Die Bondenfauna im verklappungsgebiet von Industrieabwässern nordwestliche von Helgoland. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 12 : p. 149 - 156.
- VACCARO (R.F.) et GRICE (G.D.), 1972. - Acid-Iron waste disposal and the summer distribution of standing crops in the New York Bight - Water Research 6, p. 231 - 256.
- WEICHART (G.), 1972 . - Chemical and Physical Investigations in ther German Bight on marine pollution caused by wastes of Ti O<sub>2</sub> - Factory. F.A.O. Conf. marine Poll., FIR : MP/70/E - 44, p. 1-2.
- Ibid 1975 a. - Untersuchungen über den pH - Wert im Wasser der Deutschen Bucht im Zusammenhang mit dem Einbringen von Abwässern aus der Titandioxid Produktion. Deutschen Hydrographischen Zeitschrift Band 28, 1975 Heft 6.
- Ibid 1975 b. - Untersuchungen über die Fe-Konzentration im Wasser der Deutschen Bucht im Zusammenhang mit dem Einbringen von Abwässern aus der Titandioxid - Produktion. Deutschen Hydrographischen Zeitschrift. Band 28, 1975, Heft 2, p. 49 - 61.
- WIEBE (P.H.), GRICE (G.D.) et HOAGLAND (E.), 1973. - Acid-iron waste as a factor affecting the distribution and abundance of zooplankton in the New-York bight. II - Spatial variations in the field and implications for monitoring studies. Estuar. Coast. mar. sci. 1, p. 51 - 64.
- WILSON (K.W.) et WHIYE (I.C.), 1974. - A review of the biological effects of acid-iron wastes from titanium dioxide production in the United - Kingdom. ICES. CM 1974/E : 40.
- WINTER (J.), 1972. - Long term Laboratory Experiments on the influence of Ferric Hydroxide Flakes on the filter-feeding behaviour, Growth, Iron content and Mortality on Mytilus edulis L. F.A.O. Conf. marine Poll. , FIR : MP/70/E : 112, p. 1 à 11.
-