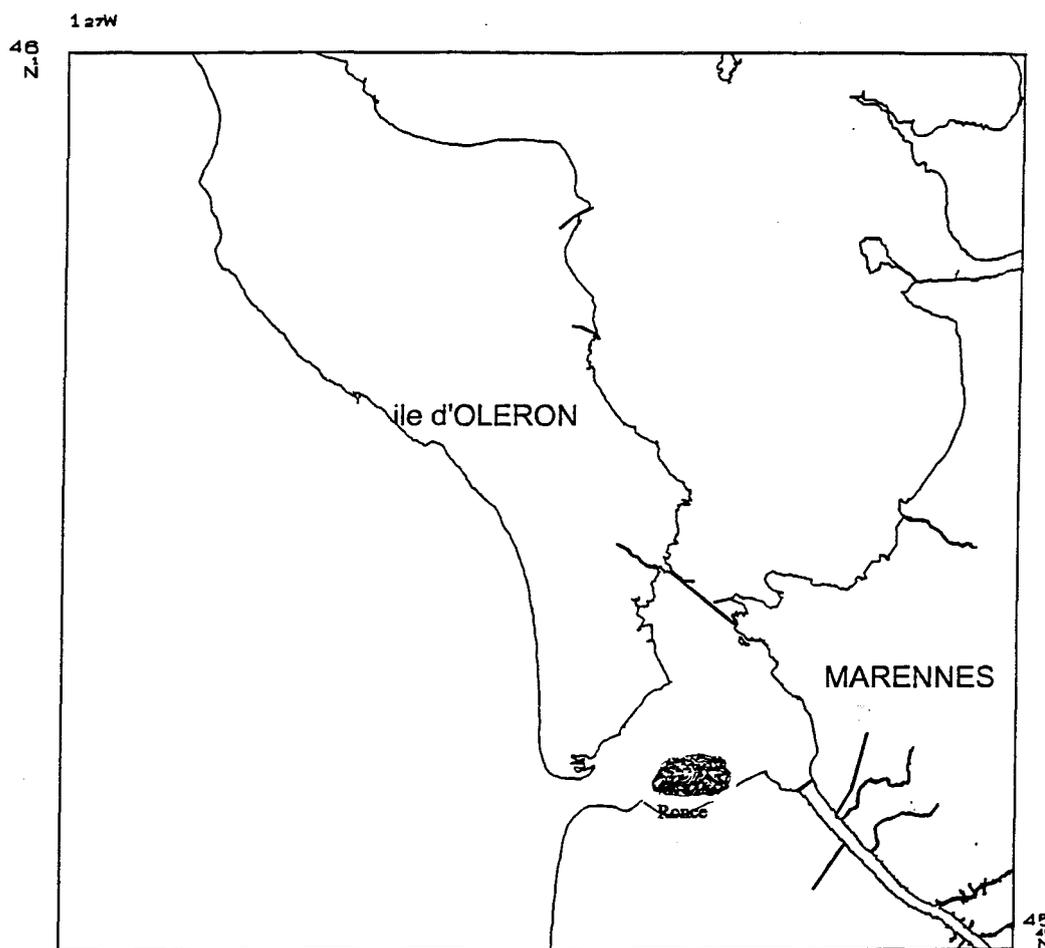


TESTS PRELIMINAIRES DE TOXICITE DES EFFLUENTS
DE LA STATION D'EPURATION DE LA TREMBLADE
SUR L'HUITRE CREUSE (*Crassostrea gigas*).



LAGARDE Franck
1^{er} année
Institut National des Sciences et Techniques de la Mer
50110 TOURLAVILLE.

IFREMER
Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charente
17390 LA TREMBLADE



TESTS PRELIMINAIRES DE TOXICITE DES EFFLUENTS
DE LA STATION D'EPURATION DE LA TREMBLADE
SUR L'HUITRE CREUSE (*Crassostrea gigas*).

LAGARDE Franck
1^{er} année
Institut National des Sciences et Techniques de la Mer
50110 TOURLAVILLE.

IFREMER
Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charente
17390 LA TREMBLADE

Après avoir constaté la baisse de productivité conchylicole du bassin de Marennes Oléron et l'augmentation des mortalités sur certains gisements, l'IFREMER a décidé de mettre en place un suivi plus approfondi du cheptel. Par conséquent, beaucoup de paramètres doivent être étudiés afin de déceler l'origine des perturbations constatées.

Suite aux soupçons émis par les professionnels, une étude a été effectuée afin de déterminer un impact des eaux de la station d'épuration de La Tremblade sur les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*). L'expérimentation consiste à immerger différents lots d'huîtres dans des dilutions Eau de station/ Eau de mer afin d'étudier les variations de qualité (indice AFNOR) et observer des mortalités.

Les résultats des expériences n'ont pas permis de mettre en évidence un effet direct (baisse de qualité, mortalité) des effluents de la station d'épuration sur les huîtres creuses ni sur les larves.

D'autres études portant sur la qualité des eaux rejetées dans l'estuaire de la Sèvre seront mises en place afin de compléter le suivi et la compréhension des phénomènes du suivi du bassin.

SOMMAIRE

REMERCIEMENT

I. INTRODUCTION

II. L'IFREMER

1. Le laboratoire d'étude IFREMER/GAP/URAPC
 - a) L'unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charente
2. Les différents types de programmes

III. LA STATION D'EPURATION DE LA TREMBLADE

1. Fiche descriptive de la station d'épuration
2. Caractéristiques de la station d'épuration
3. Mode de fonctionnement

V. MISE EN PLACE DU TEST DE TOXICITE DES EFFLUENTS DE LA STATION D'EPURATON SUR LES HUITRES *Crassostrea gigas*

A. EXPERIMENTATION AVEC DES HUITRES ADULTES *Crassostrea gigas*

1. Matériels et méthodes
2. Résultats et Discussions
3. Conclusion

B. EXPERIMENTATION AVEC DES LARVES D'HUITRES *Crassostrea gigas*

1. Matériels et méthodes
2. Résultats et discussions
3. Conclusions

VI. BILAN GENERAL DU TEST DE TOXICITE

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur Philippe GOULLETQUER, chef de l'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes de La Tremblade, pour m'avoir accueilli dans son établissement et aiguillé pendant la durée du stage.

Je remercie au même titre, Monsieur Olivier LE MOINE, qui m'a guidé pendant les expériences et qui a su faire preuve de patience et de pédagogie pendant le traitement et l'analyse des données expérimentales. Je remercie également Patrick SOLETCHNIK pour ses compétences dans le domaine de l'analyse statistique informatique.

Je remercie Monsieur Patrice NEUROT, Gérant de la station d'épuration de La Tremblade, ainsi que l'équipe du laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de l'IFREMER Ronce les Bains pour leur volonté de collaboration qui m'a été très agréable.

Enfin, je remercie vivement tout le personnel du laboratoire (chercheurs, techniciens, documentaliste, secrétaire) principalement Sylvie TAILLADE, Daniel RAZET, Nicole FAURY, Florence RIVET, Paul GRAS et la stagiaire Marie-Isabelle LODATO pour leur soutien et leur bonne humeur.

INTRODUCTION

La conchyliculture est une activité importante dans le bassin de Marennes-Oléron. L'aquaculture extensive de l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) représente, avec 130 000 tonnes par an, la première ressource marine nationale (Héral, 1986) dont 40 % se fait dans ce bassin. Il est donc important de connaître et d'étudier l'ensemble des phénomènes du bassin.

Depuis 1970, on observe un ralentissement de la croissance des huîtres sur le bassin et une baisse de productivité sur certains bancs ostréicoles exploités tels que Ronce les Bains (25 % de mortalité en Juillet 1996) et le banc de Perquis (25 % de mortalité en Juillet 1996) (REMORA 1995). Depuis 1988, les élevages ostréicoles de Charente-Maritime subissent en périodes printanières et estivales, des mortalités significatives et anormales. Un suivi de ces cheptels a donc été mis en place par IFREMER afin de rechercher les relations éventuelles entre la productivité, la mortalité et les paramètres environnementaux et biométriques.

Voilà maintenant 4 années que des doutes sont émis par les exploitants professionnels du bassin sur la qualité des eaux de rejet de la station d'épuration de la Tremblade. La mise en route de l'installation permettant le traitement physicochimique (traitement estivale) a été mise en cause dans le problème de mortalité qui se produit aux débuts du mois de Juin. Etant donné l'inquiétude des ostréiculteurs face à ce problème, l'IFREMER a donc jugé nécessaire de mettre en place un test de toxicité des effluents de la station d'épuration de la Tremblade sur les huîtres (*Crassostrea gigas*) ainsi que sur leurs larves

Cette expérience a été effectuée à la station d'IFREMER de La Tremblade.

I. L'IFREMER

1.1. Le laboratoire d'accueil IFREMER/GAP/URAPC

L'Institut Français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER) est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC). Il est placé sous la tutelle du Ministère de la Recherche et du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

L'IFREMER gère un budget de près de 1 milliard de francs en 1995 et emploie 1 250 personnes (ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs).

L'IFREMER mène des recherches à caractère fondamental en collaboration avec des universités et des organismes de recherches tels que le CNRS et l'INRA, dans des disciplines très variées (biologie, chimie, écotoxicologie, pathologie, géologie), sur le milieu marin.

Il participe aux grands programmes internationaux (Evolution du climat) et a pour vocation de valoriser les produits de la mer.

Le laboratoire de génétique, aquaculture et pathologie (GAP) de La Tremblade regroupe 4 unités de recherches :

- L'Unité de Recherche en Génétique (URGE),
- L'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes (URAPC),
- L'Unité de Recherche Aquacole en Pays de Loire (URAPL),
- L'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale (URPIG).

1.1.a L'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes

Les principaux objectifs de cette unité sont :

- La définition des paramètres et indicateurs écologiques et physiologiques permettant de contrôler et de gérer l'exploitation de la ressource conchylicole,
- La contribution au développement d'une filière contrôlée en conchyliculture,
- La participation à l'amélioration des espèces par l'expérimentation et le contrôle des performances des produits sélectionnés en collaboration avec l'URGE

Pour réaliser ces objectifs, l'unité possède un marais conchylicole expérimental (5 claires et 2 réserves), une salle d'écophysiologie à l'écloserie d'IFREMER à Ronce les Bains et un laboratoire à La Tremblade.

Les différents programmes réalisés sont effectués par une équipe de 7 personnes.

Personnel scientifique :

Responsable : Philippe GOULLETQUER

Cadres : Olivier Le MOINE
Patrick SOLECTCHNIK
Daniel RAZET

Paul GRAS

Technicien : Philippe GEAIRON

Personnel administratif :

Secrétaire : Sylvie TAILLADE

L'ensemble du personnel titulaire travaille à 100 % à l'URAPC, hors mis Sylvie TAILLADE (80 %) qui assure le secrétariat et la comptabilité du GAP (20 %)

2. Les différents types de programmes:

• Institutionnels

Ce sont des projets décidés à l'échelon national ou régional.

Actuellement, on peut citer le programme d'expérimentation de culture d'huîtres en eaux profondes, le suivi de la teneur en cadmium dans les sédiments du bassin de Marennes-Oléron et le suivi de la mortalité des huîtres dans ce même bassin.

• Semi institutionnels

Ce sont des programmes nationaux ou régionaux internes à l'IFREMER :

- Le réseau REGEMO (REseau GENétique MOLLusques) qui concerne le suivi de production d'espèces nouvelles ou de nouvelles souches génétiques (huîtres triploïdes *Crassostrea gigas*),
- Le réseau REMORA (REseau MOLLusques du Département Ressources Aquacoles) qui suit la croissance et la production des huîtres sur 50 stations distribuées sur le littoral français,
- Le réseau hydrobiologique et bases de données RAZLEC qui permettent de suivre les fluctuations hydrologiques du bassin ostréicole depuis 1973.

• Contractuels

Ces programmes proviennent de contrats négociés avec des collectivités ou/et des entreprises. En 1994, le VI^{ème} contrat de plan Etat/Région d'une durée de 5 ans sur la problématique d'amélioration des huîtres en claires ostréicoles, a été signé. L'URAPC travaille sur cette étude en collaboration avec le CREMA de la Rochelle et l'université de Nantes

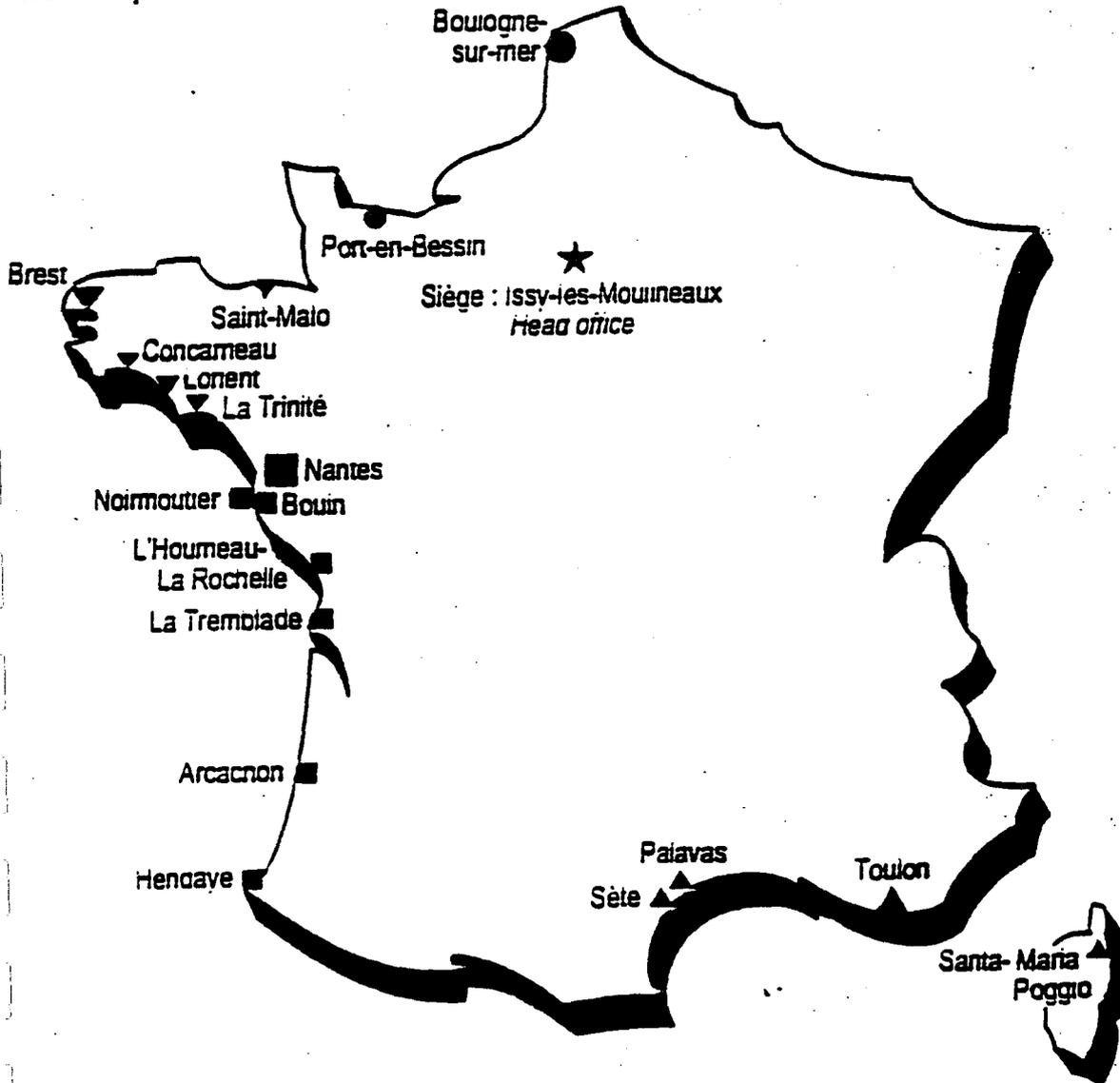
Les programmes de 1995 concernent principalement :

- la valorisation des claires ostréicoles ; affinage des huîtres creuses *Crassostrea gigas* en période automnale,
- qualité des mollusques,
- réseau national "REMORA",
- réseaux régionaux "RAZLEC" et "Croissance",
- écosystème conchylicole et mortalité..

ANNEXE I

Implantation de l'AFREMER

Métropole



- ▼ ■ ▲ ◆ Centres
- ▼ ■ ▲ Stations rattachées
- Délégations

Outre-Mer



II. LA STATION D'EPURATION DE LA TREMBLADE

1. Fiche descriptive de la station d'épuration

Implantation : LA TREMBLADE Les Grands Rivaux

Département : CHARENTE MARITIME

Maître d'ouvrage : SIVOM presqu'île d' Arvert

Exploitant : C.E.R (Compagnie des Eaux Royannaise); (AFFERMAGE)

Agence de bassin : Adour Garonne

Milieu récepteur : Estuaire de la Seudre

Capacité nominale : 3 200 m³.J⁻¹

: 960 kg DBO₅. J⁻¹

: 16000 Equivalent Habitant (1 Equivalent Habitant correspond à 150-200 L
eaux par jour)

Mise en service : Novembre 1976

constructeur : DEGREMONT

2. Caractéristiques de la station d'épuration

Le principe de base de la station d'épuration de La Tremblade (Charente-Maritime) est l'épuration par boue activée.

Deux types de traitement des eaux sont utilisés selon les saisons. Le traitement "de routine" par boue activée augmente d'une étape physicochimique pendant l'été. La période hivernale est relativement calme en matière de débit des eaux usées (700 m³/jour) alors que la période estivale avec l'afflux des touristes provoque une augmentation des débits d'eaux usées (de 1 800 à 2 000 m³/jour). Les pics du 14 juillet et du 15 août peuvent monter jusqu'à 2 400 m³/jour.

3. Mode de fonctionnement

L'eau brute arrive dans le bassin tampon. Ce bassin a pour rôle de réguler les débits sur les installations de la station.

• Le traitement primaire

Il consiste à éliminer les déchets les plus encombrants, il est constitué :

- du **dégrillage** (retenue des déchets de 1 à 3 cm),
- du **dessablage** (sédimentation des matières lourdes par écoulement lent)
- du **dégraissage et déshuilage** (avec aération il y a remontée des matières légères puis récupération par raclage automatique),
- **décantation primaire** (dépôt de matières en suspension pour formation de boue primaire renvoyée vers une étape de traitement spécifique). Le décanteur primaire est utilisé pendant la période estivale.

• Le traitement secondaire

C'est un traitement biologique. L'eau usée est envoyée dans le **bassin de boues activées** qui comprend un brassage et une aération des eaux afin de favoriser un développement bactérien. Ce traitement s'effectue dans le bassin d'aération.

Les microorganismes ont un rôle important, ils permettent l'élimination des pollutions colloïdes.

Le clarificateur sert de décanteur secondaire qui assure la séparation des boues.

Le devenir des boues

Les boues peuvent être utilisées en agriculture (utilisation des carbones, azote, phosphore potassium). Elles peuvent également être incinérées.

- Le traitement secondaire physicochimique ne fonctionne pas en continu pendant l'année (tableau 1). Il intervient uniquement pendant la période estivale afin d'améliorer la qualité d'épuration de la station. C'est un complément du procédé biologique, qui permet la réduction des matières colloïdales. Ce procédé emploie des réactifs tels que le chlorure de fer (FeCl_3) et la chaux (CaO). Il est utilisé pour l'affinage des eaux épurées biologiquement, et améliore l'épuration d'apports brutaux et massifs de pollution en amont d'une épuration biologique. Ce traitement a lieu dans le turbo circulator.

Tableau 1 : Récapitulatif des dates de mises en route et d'arrêt du traitement physicochimique.

ANNEE	MISE EN ROUTE	ARRET
1996	05 Juillet	-
1995	05 juillet	31 août
1994	10 juillet	31 août
1993	15 juillet	31 août

Remarque: on peut constater que les dates de mise en fonctionnement du traitement physicochimique (mois de Juillet) ne correspondent pas avec les dates de mortalité des huîtres sur les bancs de Ronces les bains et Perqui (mois de Juin)

- Traitement tertiaire

Le traitement secondaire élimine 35 % environ de l'azote et du phosphore alors qu'il faut en enlever 70 à 95%. De plus , des microorganismes et des particules doivent également disparaître pour optimiser l'épuration. Il est donc nécessaire de mettre en place un traitement tertiaire adapté à chacun de ces paramètres.

1. La nitrification, dénitrification

L'augmentation de l'aération permet la formation de nitrates (nitrification). La liqueur obtenue après cette opération est placée en anoxie afin que les bactéries utilisent l'oxygène du nitrate : il y a alors formation d'azote gazeux qui s'évapore.

- Réduction de la population de micro organisme

Après traitement classique, les eaux épurées contiennent plus d'un million de microorganismes par litre dont certains peuvent être porteurs de maladies. La réduction des microorganismes s'impose alors:

Elle est effectuée par désinfection chimique par le chlore libre. La dose de chlore utilisée est de 8 à 10 g /m³. La dose quotidienne utilisée en période estivale est donc de l'ordre de 20 kilogrammes (on a pu constater la présence de larves de moustique dans le bassin de chloration).

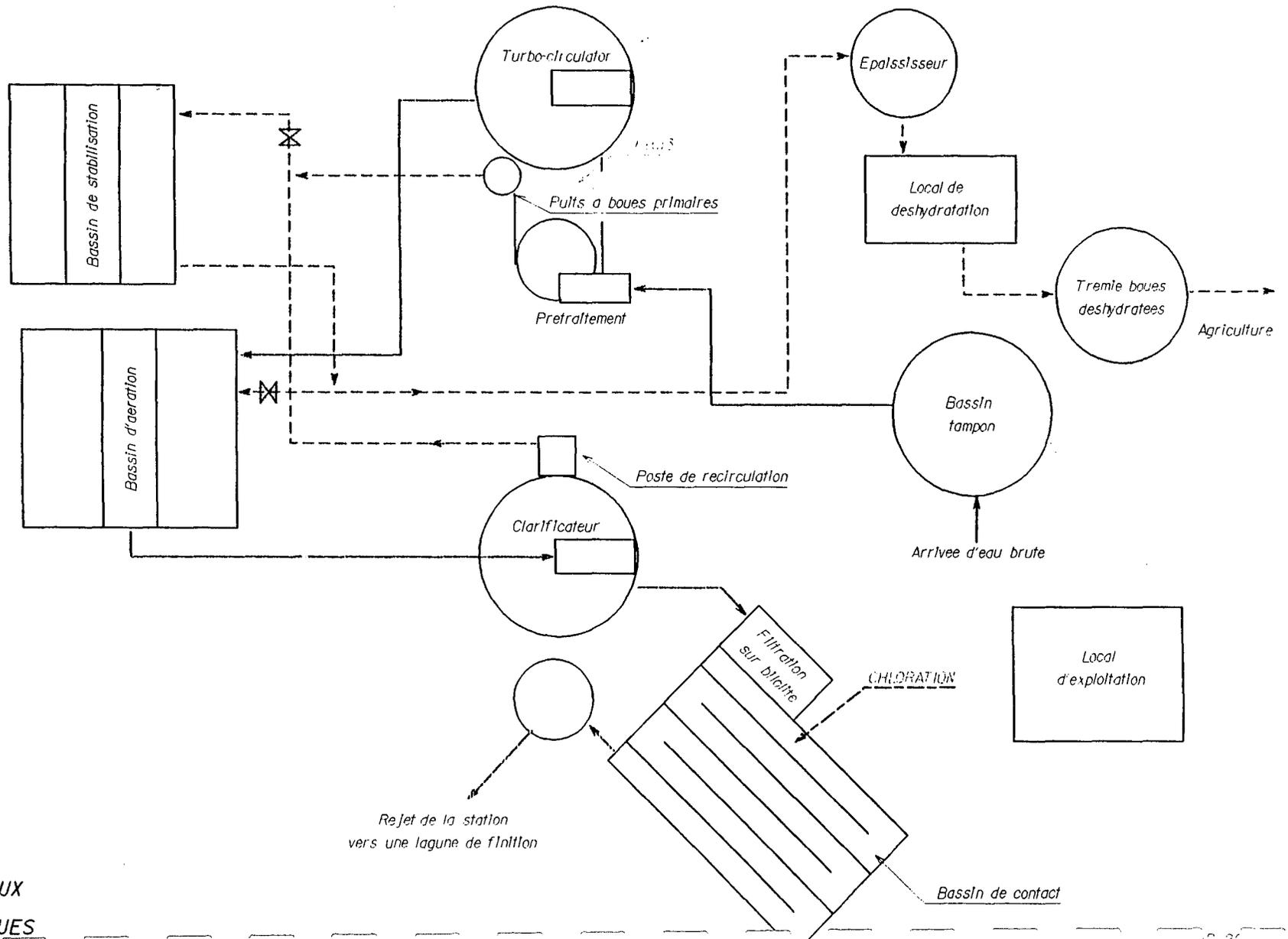
- Le lagunage naturel

Il est utilisé comme traitement final. Il s'agit d'un grand bassin d'une profondeur de 0,8 à 1,2 m où le développement algal et bactérien naturel permet d'effectuer un traitement de finition. Le temps de séjour variable selon les débits. La lagune a un volume d'environ 4500 m³. Les effluents y séjournent

donc de 2 à 7 jours. Après ce traitement de finition, l'eau est relarguée dans le milieu naturel. Dans le cas de la station d'épuration de La Tremblade, les ouvertures de vannes se font en été 30 minutes après la pleine mer pendant 5 heures alors que l'hiver, il se fait 1 heure après la pleine mer pendant une durée de 4 heures. C'est du lagunage que sera puisée l'eau pour la réalisation de l'expérience.

STATION D'EPURATION DE LA TREMBLADE

SCHEMA DE PRINCIPE 16000 EH



III. MISE EN PLACE DU TEST DE TOXICITE

A. EXPERIMENTATION AVEC DES HUITRES ADULTES (*Crassostrea gigas*)

1. Matériels et méthodes

1.1. Objectif de l'étude

Le but de l'expérience est de tester l'impact de la qualité de l'eau sur les huîtres et leur survie. Pour ce faire on effectue un contrôle quotidien de la survie du changement de l'indice AFNOR (l'indice AFNOR permet de classer les huîtres (fines, spéciales) selon les variations de poids frais de chair de chaque huître.

On vérifiera également une éventuelle accumulation bactérienne dans les huîtres soumises aux eaux de station d'épuration (coliformes fécaux).

1.2. Conditions expérimentales

a) Origine des huîtres

Les huîtres sont issues d'un naissain capté en 1994 et prégressi sur le banc de la Mortanne (bassin de Marennes-Oléron). Le détroquage a eu lieu en décembre 1995. Le stockage a été effectué sur le banc d'Agnas (bassin de Marennes-Oléron).

b) Echantillonnage

Les échantillons sont constitués de 50 huîtres dépourvues de toute autre biomasse (balanes, algues). La manipulation se prolongera sur 15, 14, 13, 12 et 11 jours selon les expérimentations. La première expérience a débuté le 05/07/96 alors que la cinquième expérience a fini le 22/07/96. Ils sont soumis à quatre conditions différentes et stockés dans des bacs individuels de 50 litres. Chaque condition est reproduite 5 fois en s'échelonnant sur 5 jours (soit une nouvelle condition par jour).

1ère condition (lot n° R) : Renouvellement quotidien de toutes les eaux (49,5 l d'eau de mer + 0,5 l d'eau de la station d'épuration de La Tremblade) soit une dilution à 1 %.

2ème condition (lot n° NR) : dilution à 1 % (49,5 l d'eau de mer + 0,5 l d'eau de la station d'épuration de La Tremblade) l'eau ne sera pas renouvelée sur la durée de la manipulation.

3ème condition (lot n° TR) : échantillon Témoin avec Renouvellement quotidien d'eau (49,5 l d'eau de mer + 0,5 l d'eau douce) soit une dilution à 1 %.

4ème condition (lot n° TNR) : Témoin Non Renouvelée sur la durée de la manipulation (49,5 l d'eau de mer + 0,5 l d'eau douce) soit une dilution à 1 %.

Le lot n° 1 est mis en place pour déterminer si un effet d'accumulation des eaux de la station d'épuration de La Tremblade provoque des changements des comportements de l'huître à long terme (15 jours) (recherche d'un effet chronique).

Le lot n° 2 est mis en place pour montrer une éventuelle mortalité de populations par une dose unique d'effluents (recherche d'un effet aigu).

Les lots 3 et 4 sont des lots témoins. L'eau douce est ajoutée afin d'homogénéiser la salinité dans les bacs test et les bacs témoins.

1.3. Définition des paramètres étudiés

Les échantillons font ensuite l'objet des mesures suivantes :

- poids individuel de chaque huître,
- stade de maturation, selon une échelle relative de 1 à 4 dont les critères macroscopiques sont :
 - * stade 1 : huître maigre, glande digestive visible par dessus et par dessous
 - * stade 2 : huître peu grasse, glande digestive visible dessous et dessus par transparence
 - * stade 3 : huître grasse, canaux de la gonade discernable (stries blanchâtres)
 - * stade 4 : huître très grasse, une lame de scalpel frottant légèrement la gonade par en dessous fait s'échapper la laitance (produits génita ux)
- poids frais de chair égouttée

Ces données permettent de calculer un indice de qualité : indice AFNOR de remplissage (100 fois le poids frais de chair égouttée divisé par le poids total)

Sur une période donnée, cet indice permet de suivre la qualité de chair de l'huître et donc la qualité de leur milieu environnant. Les huîtres sont classées commercialement selon la norme AFNOR en catégories "huîtres fines" et "huîtres spéciales".

Tableau 2: Les différentes catégories d'huîtres

INDICE AFNOR	APPELATION
< 6,5	non classées
6,5 < AFNOR < 9	"Fines"
> 9	"Spéciales"

Cet indice donne une idée du taux de remplissage des huîtres et caractérisent ainsi la qualité des huîtres suivies.

En parallèle, un contrôle quotidien de mortalité ainsi que la surveillance de température et la concentration en oxygène sont effectués afin de vérifier que ces paramètres n'influent pas sur la survie. L'ensemble des données est traité par le système informatique d'analyses statistiques LOTUS. Les résultats font l'objet d'analyses statistiques afin de déceler des corrélations entre les différents paramètres mesurés pendant l'expérimentation (étude de poids frais par rapport aux conditions expérimentales ; étude des stades de maturation par rapport aux conditions expérimentales).

2. Résultats et Discussions

D'après la figure 1, on voit que la condition TNR se distingue des 3 autres lots à la fin de l'expérience

Tableau 1: Poids frais de chair égouttée moyens selon les conditions expérimentales

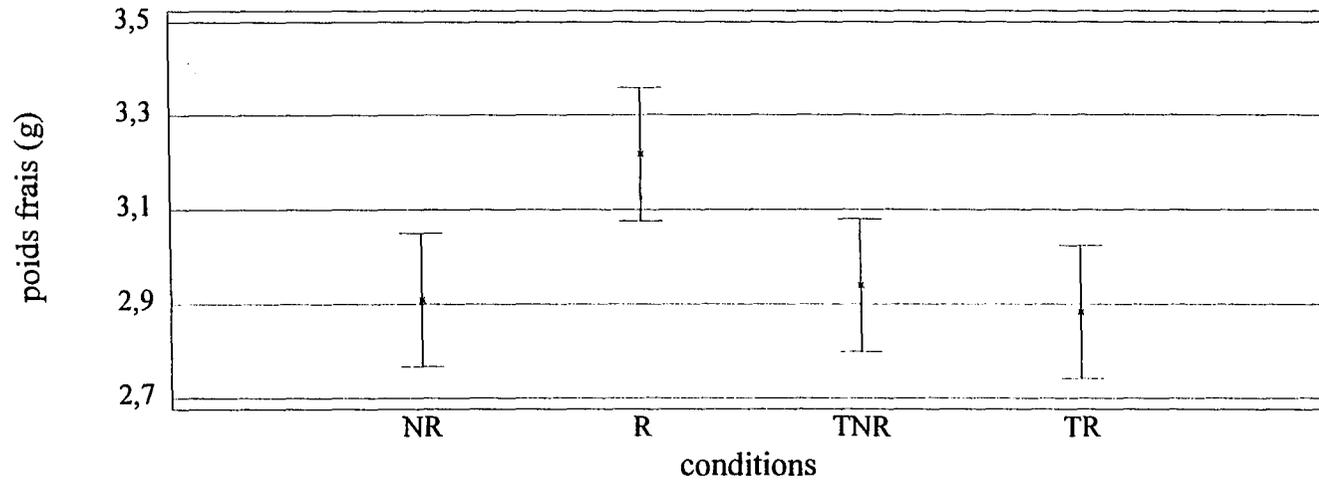
	R	NR	TR	TNR
POIDS MOYEN (en g)	2.94957	2.92674	2.93992	3.13275

Ce résultat indique que les échantillons issus des conditions expérimentales sont homogènes mis à part l'échantillon Témoin Non Renouvelé.

L'analyse des échantillons ne présente pas de différence de poids de chair égouttée entre les lots d'huîtres ayant subi un temps de séjour dans l'eau de station (R, NR) et les lots témoins (TR, TNR)

L'expérimentation, dans les conditions de manipulation décrites précédemment, ne permet pas de conclure que les effluents de la station d'épuration de La Tremblade ont un effet sur les poids de chair égouttée.

fig. 1. poids frais moyens pour les différentes conditions d'expérience



La figure 2 permet d'établir l'étude du poids de chair égouttée par rapport aux différents jours de lancement des expériences. Le but de cette analyse est de trouver un effet journalier de l'eau de la station d'épuration sur les huîtres.

Effectivement, on peut penser que la qualité de l'eau issue de la station n'est pas stable. Chaque expérience a donc démarré avec 1 jour de décalage afin de mesurer un effet particulier des effluents sur une journée précise.

Cependant, d'après l'analyse de variance, on voit qu'il n'y a pas de différence significative entre les lots .

Dans les conditions de manipulations décrites, on ne peut donc pas mettre en évidence un impact des eaux de la station d'épuration sur une variation de poids frais de chair égouttée des huîtres selon les jours.

D'après la figure 3, on peut constater que la maturation sexuelle des huîtres n'est que très peu variable selon les différentes conditions expérimentales.

Il n'y a que 2 conditions qui se distinguent (R et TN). L'échantillon R est plus mature que l'échantillon TN mais cela avec des amplitudes très réduites. La différence entre chaque condition n'est pas assez significative pour pouvoir en tirer des résultats corrects.

Le reste des lots n'est pas différent significativement. Par conséquent, la manipulation ne permet pas de montrer une influence de l'eau de la station d'épuration sur la maturité sexuelle des huîtres.

D'après l'interprétation de la figure 4, on effectue une analyse de variance des stades de maturation par rapport aux différents jours de lancement de l'expérience. Celle-ci ne permet pas de montrer une influence directe de l'effluent de la station (la différence entre chaque intervalle de confiance des stades de maturation étant trop minime pour pouvoir isoler les jours de lancement).

Une analyse bactériologique est réalisée pour déterminer une éventuelle présence de coliformes fécaux dans la chair des huîtres. Les résultats de celle-ci s'avèrent négatifs c'est à dire qu'il y a moins de 30 coliformes fécaux par 100 grammes de chair et de liquide intervalvaire.

D'autre part, aucune mortalité n'a été constaté sur l'ensemble des conditions expérimentales ni sur la durée totale de l'expérience.

figure 2. poids frais moyens pour les différents jours d'expérimentation

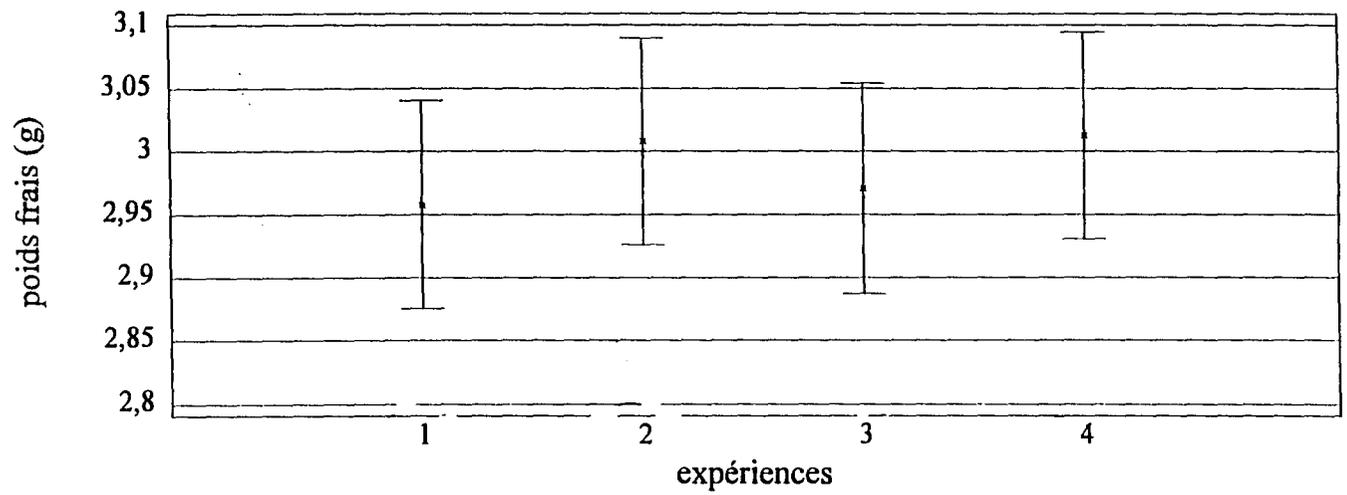


fig. 3. stades de MS pour les différentes conditions d'expérience

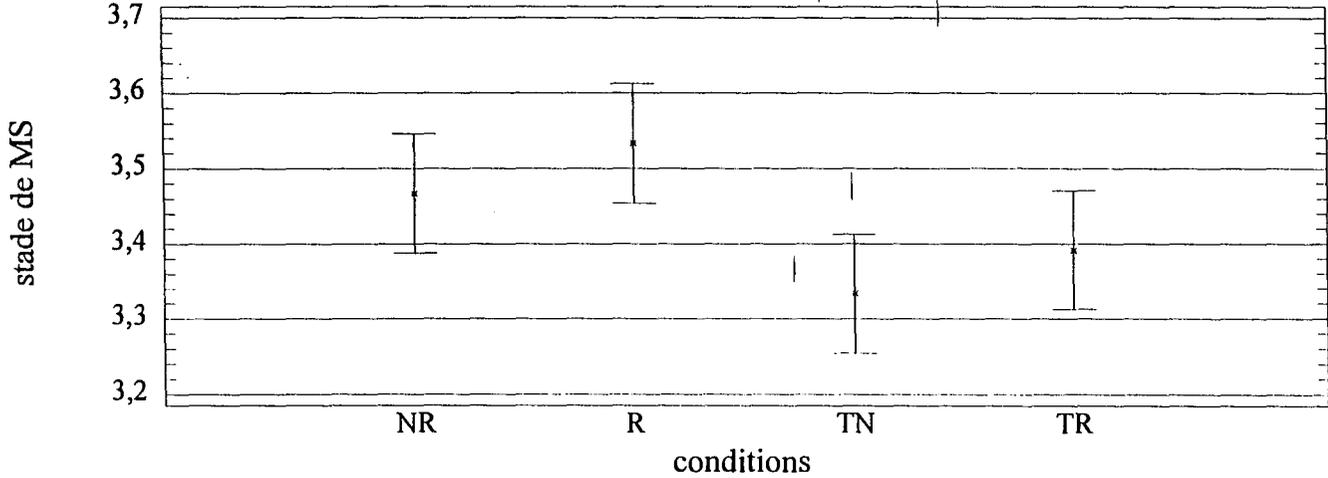
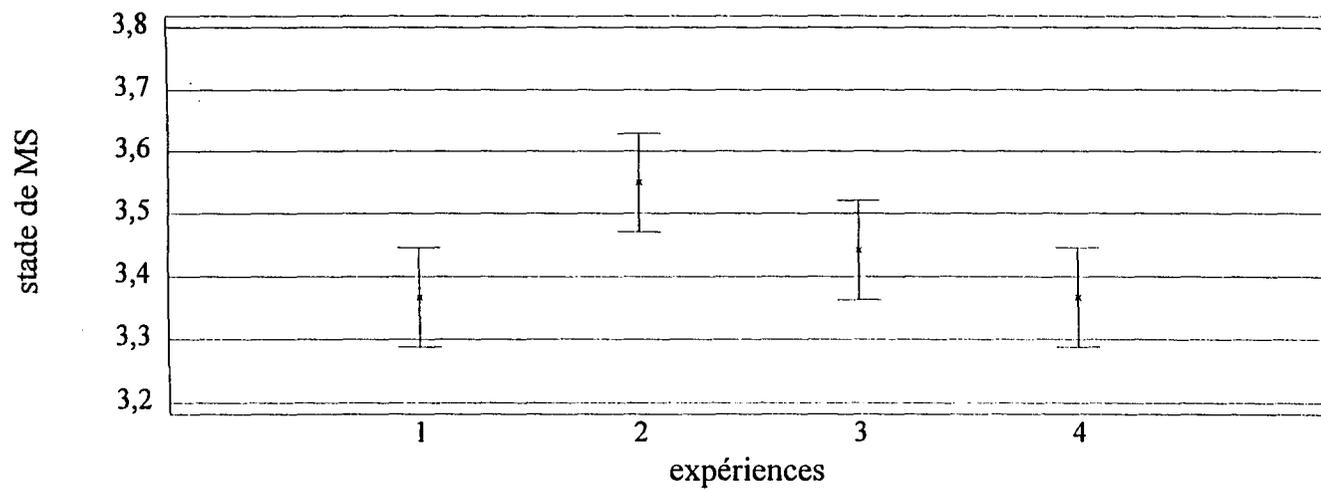


fig. 4. stades de maturité sexuelle pour les différents jours d'expérimentation



3. Conclusion

Le test de toxicité des effluents de la station d'épuration de La Tremblade sur les huîtres adultes (*Crassostrea gigas*) révèle des résultats exploitables après traitement par analyse statistique. L'ensemble des données statistiques montre que les différents échantillons ne se différencie pas suffisamment après avoir subi un séjour dans de l'eau de la station d'épuration. On peut donc dire que, dans les conditions et sur la durée d'expérimentation décrites, il n'y a pas d'influence directe des effluents de la station d'épuration de La Tremblade sur la maturation sexuelle et le poids de chair égouttée des huîtres.

B. EXPERIMENTATIONS AVEC DES LARVES D'HUITRES (*Crassostrea gigas*)

1. Matériels et méthodes

1.1. Objectif de l'expérimentation

Cette procédure va permettre de déterminer si les eaux de rejets de la station ont une influence directe sur la mortalité des larves d'huîtres.

1.2. Conditions expérimentales

Les larves utilisées sont issues de l'écloserie de IFREMER Ronce les Bains. Elles sont âgées de 3 jours lorsque l'expérimentation débute (stade larves D). Afin d'éliminer une source de variabilité expérimentale, les larves ne seront pas nourries. L'expérience va durer 24 heures. Les larves sont conditionnées dans des bidons de 1 litre oxygénés par un léger bullage qui favorise un mouvement hydrodynamique idéal à la mise en suspension de celles-ci.

1.3. Echantillonnage

Après fécondation artificielle (méthode de scarification des gonades), on obtient une quantité inconnue de larves dans un volume d'eau de mer de 2 litres (eau de mer issue de l'écloserie). On appellera cet échantillon "culture A".

a) Dénombrement des larves après la fécondation

On opère à une dilution à partir de la culture A dans une culture B. On prend 10 cm³ de culture A ; on complètera le volume à 1 litre d'eau de mer d'écloserie pour former la culture B. A partir de 3

volumes de 0,5 ml prélevés dans B, on effectue 3 comptages au microscope après avoir fixé les larves par une goutte de formol.

b) Les différentes conditions expérimentales

Quatre conditions expérimentales sont basées sur des dilutions eau de station d'épuration/eau de l'écloserie.

1ère condition : introduction de 10 cm³ d'eau de station dans un volume de 990 cm³ d'eau de mer de l'écloserie.

: dilution au 1/100

2ème condition : introduction de 1 cm³ d'eau de station dans un volume de 999 cm³ d'eau de mer de l'écloserie.

: dilution au 1/1 000.

3ème condition : introduction de 0,1 cm³ d'eau de station dans un volume de 999,9 cm³ d'eau de mer de l'écloserie.

: dilution à 1/10 000.

4ème condition : bidon témoin, dilution au 1/1 000 d'eau douce dans de l'eau de mer de l'écloserie.

Le dilution au 1/1 000 du témoin est choisie car elle est intermédiaire par rapport aux autres dilutions, elle permettra de standardiser les lots au niveau de l'effet de la salinité sur les larves.

Pour avoir des données statistiques correctes, les quatre conditions différentes seront reproduites 5 fois (5 répliquats). On aura donc au total 20 bidons expérimentaux.

Afin d'homogénéiser au maximum les conditions expérimentales, les bidons seront placés les uns à côté des autres de façon totalement aléatoire par tirage au sort pour minimiser toute influence environnementale externe (Lumière, chaleur,...).

1.3. Définition des paramètres étudiés

Il y a donc 20 bidons numérotés de 6 à 25. Les cinq premiers ayant servi à affiner les techniques de comptage.

Tableau 3 : Répartition des bidons selon les différentes conditions.

Condition n° 1 (dilution 1/100)	6	8	18	20	22
Condition n° 2 (dilution 1/1 000)	11	12	15	17	23
Condition n° 3 (dilution 1/10 000)	7	9	10	13	24
Condition n° 4 (témoin dilution 1/1 00)	14	16	19	21	25

1.3.1. Technique de comptage final

- Concentration de larves dans les bidons ; se fait par siphonage de l'eau à travers un filtre de 10 µm. La totalité des larves se trouve concentrée après siphonnage dans un volume de 20 à 30 ml.

- Ajustement du volume à 50 cm³ afin d'avoir un volume précisément déterminé pour le comptage. Une homogénéisation correcte sera nécessaire avant chaque prélèvement. Elle se fera à l'aide d'un piston agitateur.

- Cinq comptages à partir de prélèvement de la solution de 50 cm³ seront effectués pour obtenir des résultats statistiquement plus fiables.

2. Matériels et Méthodes

a) Calcul du nombre de larves

D'après la technique énoncée dans le 1.3) Echantillonnage, on sait que l'on aura:

146.10³ larves pour 1 litre de la culture B.

Etant donné que l'on a prélevé 10 cm³ de solution A, on aura 146.10³ larves dans ces 10 cm³. Le volume de solution A est de 2 litres, on aura donc au total 292.10⁵ larves dans 2 litres soit environ 30 millions de larves.

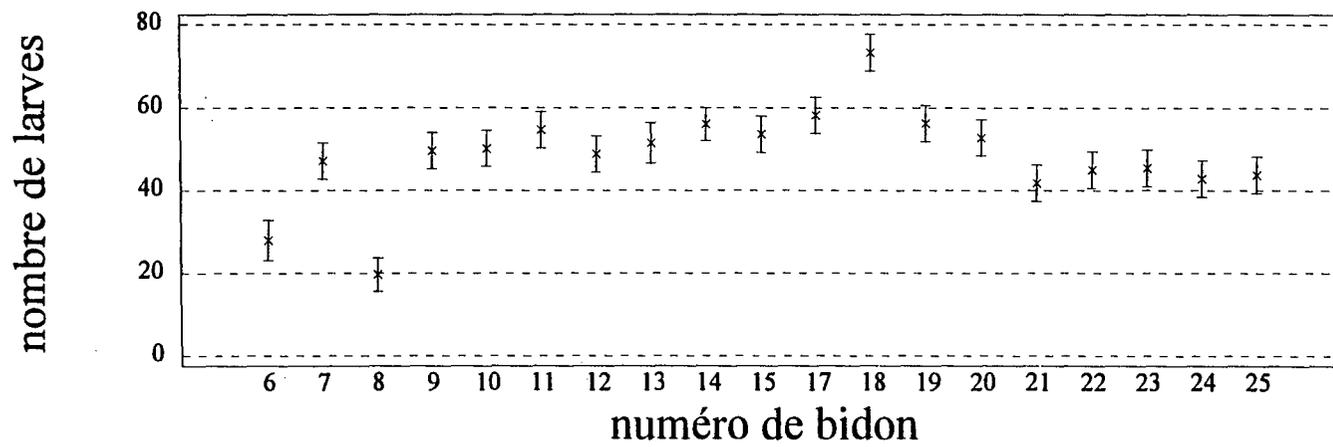
b) Mise en place des échantillons

Une solution est créée à partir d'une dilution de la culture A. Un prélèvement de 100 cm³ de culture A est rapporté à un volume de 1 litre afin d'avoir une concentration larvaire de 1 400 larves par ml.

La concentration larvaire désirée est d'environ 10 000 larves par litre. Cette concentration permet de ne pas faire d'apport de nourriture pendant la durée de l'expérience.

On prélèvera donc 3 fois 2 cm³ de culture C que l'on introduira dans chaque bidon expérimental (3 x 2 cm³ de culture C correspond à environ 8 400 larves), le volume final sera de 1 litre.

Fig 1: nombre de larves en fonction des conditions (numérotation des bidons)



La méthode d'introduction des larves dans chaque bidon expérimental devra toujours être la même afin de ne pas avoir de fluctuation du nombre de larves.

Sur une base de cinq comptages par bidon, on obtient un ensemble de 100 résultats (5 comptages 20 conditions). Ces résultats sont traités en analyse de variance par l'intermédiaire du logiciel STATGRAPHICS.

Globalement, d'après l'analyse graphique et l'analyse de variance des 4 conditions différentes (dilutions aux 1/100, 1/1000, 1/10000), on constate que l'ensemble des échantillons est homogène, (les moyennes du nombre de larves par culture de 1 litre sont situées entre 40 et 55). On enregistre une perte de 40 % environ de l'effectif de larves de départ toutes conditions expérimentales confondues dûe à la manipulation et aux stress des larves pendant l'expérience.

Tableau 1: Moyennes du nombre de larves selon les conditions expérimentales.

conditions	dilution 1/100	dilution 1/1000	dilution 1/10000	Témoins
nbre de larve dans un volume prélevé de 0.5 ml	43	52	48	49

On remarque que dans les échantillons 6 et 8 (dilution a 1/100), la quantité de larves est inférieure à la moyenne. Cependant, on ne peut pas considérer cette différence avec les autres lots comme significative, car la condition (dilution 1/100) est constituée de 5 réplicats dont 3 sont dans la moyenne. Un biais d'expérience est probablement à l'origine de ce résultat.

De plus, l'analyse de variance ne permet pas de différencier les conditions expérimentales entre elles.

3. Conclusion

D'après les résultats issues des différentes conditions expérimentales données, les eaux de la station d'épuration n'ont pas d'impact significatif sur la mortalité des larves d'huîtres *Crassostrea gigas* au stade larve D.

VI. BILAN DU TEST DE TOXICITE DES EFFLUENTS DE LA STATION D'EPURATION DE LA TREMBLADE SUR LES HUITRES *CRASSOSTREA GIGAS*.

L'objectif principal de cette expérience est de mettre en évidence un effet direct de la qualité des eaux de la station d'épuration de La Tremblade sur la survie et la qualité des huîtres creuses et des larves dans le bassin de Marennes-Oléron.

Les résultats sont basés sur la mortalité, sur la variation de la qualité des huîtres (remplissage de coquille), sur l'accumulation bactérienne aux cours du temps selon les différentes conditions (eaux renouvelées, eaux non renouvelées). Les données, après analyse par traitement informatique, ne montre pas de différence significative entre chaque condition permettant de prouver une influence de l'eaux de la station sur les huîtres ainsi que sur leurs larves.

On peut également penser observer le comportement des huîtres dans d'autres effluents tels que les eaux des réseaux pluviaux des stations balnéaires ou les eaux d'origine industrielle en amont de l'estuaire de la Seudre.

Ces expérimentations pourraient être compléter par une étude au printemps précédant les mortalité. Cependant, comme nous l'avons vu le traitement physicochimique des eaux de la station d'épuration reste assez tardif (Juillet; après le début des mortalités).

Une extension du protocole pourrait considérer des concentrations plus élevées de la teneur en eaux de la station (dilution à 10 %) avec cependant le problème de l'impact de la dessalure à cette période de l'année sur la physiologie des huîtres.