

N° d'ordre :
01/2002-E/C-I

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENNE

Faculté de Génie Mécanique et Génie des Procédés

Département de Génie des Procédés

THESE

Présentée par

Mme SAIDA SEMSARI

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR D'ETAT EN GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Contribution à l'étude de l'inhibition de certains niveaux trophiques par
la présence de cations métalliques dans l'eau

Soutenue le : 15 avril 2002
Devant le jury composé de :

G.NEZZAL	Professeur-USTHB	Président
H.AIT AMAR	Professeur-USTHB	Directeur de thèse
R.SERIDJI	Professeur-USTHB	Examinatrice
F. LARABA	Maître de conférence-USTHB	Examinatrice
R.BAKOUR	Professeur-USTHB	Examineur
M.SAOUTHY	Professeur-HCA	Examineur

Remerciements

J'adresse des remerciements particuliers à Monsieur le Professeur H. Aït Amar, Professeur au département de Génie des Procédés de la Faculté de Mécanique et Génie civil, qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour son aide qui m'a permis de mener à terme ce travail.

Mes remerciements à Madame le Professeur G. Nezzal, Professeur au département de Génie des Procédés de la Faculté de Mécanique et Génie civil, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury.

Que Madame le Professeur R. Seridji, Professeur Doyenne de la Faculté des Sciences Biologiques, soit assurée de ma plus grande reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame Y. Laraba, Maître de conférence à la Faculté des Sciences Biologiques, pour l'intérêt qu'elle a porté à cette recherche en acceptant de participer au jury.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur R. Bakour, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, pour avoir accepté de faire part du jury.

Que Monsieur le Professeur M. Saouthi, Professeur à l'Hôpital Central des Armées, reçoive mes remerciements et je suis honorée de sa présence.

Je remercie très particulièrement, le Professeur L. De Meester, Professeur au laboratoire d'Ecologie Aquatique de l'Université de Leuven (Belgique), que j'ai eu la chance de connaître et qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour son aide et ses conseils.

Je remercie également, le professeur C. Younos, Professeur au Centre Européen d'Ecologie de l'université de Metz, pour sa collaboration.

Paramètres utilisés.-

- CI 50 : Concentration inhibitrice de 50% des organismes-test ; masse.volume^{-1} ;
- LOEC : La plus faible concentration qui affecte significativement ; masse.volume^{-1} ;
- NOEC : La plus grande concentration qui n'affecte pas significativement ; masse.volume^{-1} ;
- R_m : Taux intrinsèque ;
- C.V : Coefficient de variation ;
- I : Index phototactique ;
- MVS: Matières volatiles en suspension;
- X : Biomasse ; masse.volume^{-1} ;
- μ : Taux de croissance ; temps^{-1} ;
- $\frac{dS}{Xdt}$: Vitesse d'élimination du substrat ; temps^{-1}
- a : Rendement cellulaire ;
- b : coefficient de respiration endogène ; temps^{-1} ;
- K_i : Constante d'inhibition ; masse.volume^{-1} ;
- K_S : Constante de saturation ; masse.volume^{-1} ;
- $\frac{dN}{dt}$: Taux d'accroissement des feuilles ; temps^{-1} .

Résumé :

Ce travail consiste en la mise au point d'outils biologiques pour l'évaluation de la toxicité de l'eau.

Le modèle d'un protocole des essais à court terme a permis l'examen de l'influence de certains paramètres physico-chimiques : température, forme d'un métal, complexation, salinité et de la dureté sur la toxicité de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} .

L'élaboration d'une installation expérimentale fonctionnant en continu où le niveau trophique est représenté par les daphnies (*Daphnia magna*) a abouti à la mise au point d'un système de bioindication. Dans ce cas, la survie de la daphnie est examinée en présence de : Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} .

L'application du test chronique (21 jours) a permis le suivi de l'inhibition de la survie et de reproduction de *Daphnia magna* par Cd^{++} , Cu^{++} et Ni^{++} .

Une méthodologie moyennant l'effet phototactique de *Daphnia magna* a été proposée visant à mettre au point un biocapteur phototactique soumis à la toxicité de cadmium.

Des essais utilisant l'activité épuratrice des boues activées ont été considérés et ont permis de comprendre les phénomènes d'inhibition et d'adaptation de ces boues en présence du chrome trivalent.

Par ailleurs, deux plantes aquatiques d'eau douce, *Lemna minor* et *Salvinia natans* ont été exposées à Cd^{++} , Cu^{++} et Zn^{++} afin de tester leurs sensibilités vis-à-vis de ces produits. Nous avons en conséquence, réalisé une étude histologique sur des feuilles de *Salvinia natans* contaminées par la toxicité métallique.

Sommaire

Introduction.....	01
Chapitre I.- Analyse bibliographique.....	04
I.- Généralités.....	04
II.- Sources de métaux dans l'hydrosphère.....	04
III.- Comportement, répartition et devenir des métaux dans les systèmes aquatiques et continentaux.	06
IV.- Effet de la contamination métallique des milieux aqueux et des biocénoses.....	09
V.- Méthodes d'évaluation des risques de perturbations par les agents polluants dans les milieux aquatiques.	13
V.1.- Généralités.....	13
V.2.- Les bioindicateurs.	13
V.2.1.- <i>Daphnia magna</i>	14.
V.2.1.1.- <i>Morphologie</i> : (figure3).....	14
V.2.1.2.- <i>Présentation systématique</i>	14
V.2.1.3.- <i>Anatomie</i>	15
V.2.1.4.- <i>Ecologie</i>	16
V.2.1.5.- <i>Reproduction</i>	16
V.2.1.6.- <i>Effet de certains facteurs environnementaux sur la vie de la daphnie</i>	16
V.2.2.- les microorganismes d'une boue activée :.....	18
V.2.3.- <i>Lemna minor</i> , <i>Lemna Polyrhiza</i> et <i>Salvinia natans</i>	18
V.3.- Biomonitoring.	21
V.3.1.- Monitoring chimique.	21
V.3.2.- Les biomarqueurs.	22
V.3.3.- Les bioessais.....	22
V.3.3.1.- <i>Tests de toxicité aiguë (ou à court terme)</i>	23
V.3.3.2.- <i>Tests de toxicité sub-chronique (ou à moyens terme)</i>	24
V.3.3.3.- <i>Tests de toxicité chronique (ou à long terme)</i>	24
V.3.3.4.- <i>Tests de toxicité aquatiques</i>	24
Chapitre II.- Matériel et méthodes.....	26
I.1 Tests de toxicité aiguë : élevage des daphnies dans des conditions d'éclairage et de nourriture homogènes naturelles.....	26
I.1.1.- Tests de toxicité aiguë statiques.....	26
I.1.1.1.- <i>Matériel</i>	26
I.1.1.2.- <i>Méthodes</i>	26
I.1.1.3.- <i>Essais avec variation de la température</i>	29
I.1.1.4.- <i>Essais avec variation de la forme du métal</i>	29
I.1.1.5.- <i>Essais avec variation de la salinité</i>	29

I.1.1.6.- Essais avec variation de la dureté.....	30
I.1.1.7.- Essais en présence des agents complexants : Na_2 EDTA, acide humique et KH_2PO_4	30
I.1.2.- Tests de toxicité aiguë dynamiques.....	32
I.1.2.1.- Matériel.....	32
I.1.2.2.- Méthode.....	34
I.1.2.3.- Essais de détoxification.....	34
I.2.- Tests de toxicité aiguë et chronique : élevage des daphnies dans des conditions d'éclairage et de nourriture artificielles.....	36
I.2.1.- Le matériel biologique.....	36
I.2.2.- Définition de quelques termes usuels employés dans le test chronique.....	36
I.2.3.- Milieux d'essais.....	37
I.2.4.- Condition d'élevage des daphnies.....	38
I.2.5.- Culture de <i>Scenedesmus</i> sp.	40
I.2.6.- Conduite de l'essai chronique.....	40
I.2.7.- Expressions des résultats.....	41
I.3.- Tests sur le comportement phototactique de <i>Daphnia magna</i>.....	42
I.3.1.- Matériel biologique.....	42
I.3.2.- Elevage des daphnies.....	42
I.3.3.- Matériel.....	43
I.3.4.- Méthodes des essais.	43
I.4.- Tests sur l'activité épuratrice d'une boue activée.	45
I.4.1.- Matériel.....	45
I.4.2.- Méthode.....	46
I.5.- Tests sur <i>Lemna minor</i> et <i>Salvinia natans</i>.....	47
I.5.1- Matériels biologiques : <i>Lemna minor</i> , <i>Lemna polyrrhiza</i> et de <i>Salvinia natans</i> ..	47
I.5.2.- Conditions de culture.	47
I.5.2.1.- Préparation des solutions mères.....	47
I.5.2.2.- Préparation des solutions d'oligo-éléments.....	48
I.5.2.3-. Préparation du milieu d'essai et de culture.....	48
I.5.2.4.- Essais de toxicité.....	49
Chapitre III.- Résultats et discussion.....	50
III.1.- Etude de la toxicité aiguë de Cd^{++}, Cu^{++}, Ni^{++} et Zn^{++} à l'aide de <i>Daphnia magna</i> : élevage dans des conditions homogènes naturelles.....	50
III.1.1.-Effet de la température.....	50
III.1.2.- Effet de la forme métallique.....	54

III.1.3.- Effet de complexation de: Cd, Cu, Ni et Zn par le Na ₂ EDTA, l'acide humique et les phosphates.....	57
III.1.4.-Effet de la salinité et de la dureté.....	66
III.1.4.1.- Effet de la salinité.....	66
III.1.4.2.- Effet de la dureté.....	70
III.1.5.-Test avec renouvellement du milieu.....	74
III.1.5.1.- Essai avec variation du temps de contact « métal-daphnies »....	74
III.1.5.2.- Essais avec variation de la concentration.....	80
III.1.5.3.- Essais de toxicité après dilution d'un milieu contaminé.....	86
III.2.- Tests de toxicité aiguë et chronique : élevage des daphnies dans des conditions de nourriture et d'éclairage artificielles.....	88
III.2.1.-Test de toxicité aiguë.....	89
III.2.2.- Test de toxicité chronique.	
III.3.-Effet du Cadmium sur le comportement phototactique de <i>Daphnia magna</i>.....	102
III.3.1.-Tests en continu avec et sans apport de nourriture.....	106
III.3.2.- Tests statiques avec apport de nourriture.....	109
III.4.- Etude de l'inhibition de l'activité des boues activées en présence de chrome trivalent.....	111
III.5.- Etude de l'inhibition de la croissance de <i>Salvinia natans</i> et <i>Lemna minor</i> par : Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ et Zn⁺⁺.....	129
III.5.1.- Etude de la croissance de : <i>Salvinia natans</i> , <i>Lemna minor</i> et <i>Lemna Polyrrhiza</i>	129.
III.5.2.-Etude de la croissance de <i>Salvinia</i> en présence de Cd ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ et Zn ⁺⁺ et examen microscopique.....	130
III.5.3.- Etude de la croissance de <i>Lemna minor</i> en présence de : Cd et Cu.....	140
Conclusion	144
Référence Bibliographique.....	147

Introduction.-

L'usage intensif de nombreux composés chimiques à tous les niveaux (industriel, chimique, agricole....) engendre des rejets fort polluants dans les récepteurs naturels. Cette pollution qu'elle soit solide, liquide ou gazeuse a souvent comme récepteur final un milieu aquatique, sujet à une forte pression anthropique.

La surveillance du milieu et des écosystèmes est exercée depuis plusieurs années afin d'éviter les conséquences parfois graves de la pollution. Le suivi de l'impact des métaux lourds entre autres agents nocifs a mis en relief l'importance d'un aspect scientifique connu sous le nom d'écotoxicologie.

Les problèmes liés aux éléments chimiques toxiques, dépassent le cadre national et certains organismes internationaux comme l'ISO (International Standards Organisation) se sont chargés d'établir des normes qui servent de base à la législation internationale.

Depuis 1986, nous nous sommes intéressés, en Algérie (Semsari, 1992) dans un premier objectif, à l'application de ces méthodes pour la caractérisation des rejets métalliques. Nous avons alors développé un programme de mise en place de techniques de contrôle de la toxicité de certaines substances métalliques en particulier. D'un point de vue écologique, se pose le problème du choix des espèces ainsi que celui des niveaux trophiques représentés. Dans les eaux douces, les communautés zooplanctoniques et le phytoplancton forment des maillons importants d'une chaîne trophique (Gutknecht, 1965 ; Davis, 1973 ; Bryant, 1976a ; Goss et Bunting, 1983 et Keating, 1985a). En milieu aquatique l'utilisation de la daphnie comme support analytique (Directive CEE, 1986) constitue généralement une méthode efficace (essais à court terme) et donne une indication fiable du niveau de contamination.

La méthodologie du test prolongé qui met en évidence, principalement, des effets sur la reproduction (pour la période 21 jours) demeure en voie de modification. A l'origine, la méthodologie du suivi du comportement des daphnies, en présence d'une pollution, s'inspire des essais de toxicités aiguë et chronique (Didelupis et Rotondo, 1988). Outre ces essais d'évaluation à l'aide des daphnies, les microorganismes d'une boue activée peuvent faire l'objet des techniques de détermination de l'inhibition de l'activité de ces espèces (Lewandowski, 1987). Les espèces végétales peuvent également intervenir comme indicatrices de pollution en tant qu'organismes descripteurs (Muller, 1995 ; Trémolières et *al.*, 1991, 1993, 1994) ou comme organismes de surveillance (Mouvet, 1986).

Ce travail s'intéresse à la toxicité de certains métaux lourds vis-à-vis de *Daphnia magna* (crustacé d'eau douce), des microorganismes d'une boue activée et de deux espèces de plantes aquatiques d'eau douce, *Lemna minor* et *Salvinia natans*.

Dans ce cadre nous nous proposons de présenter dans les chapitres suivants:

I- Une synthèse bibliographique relative à la thématique du sujet à traiter.

II- Matériel et méthodes.

III- Résultats et discussion des études de :

- La toxicité aiguë de différents cations métalliques sur une souche algérienne de *Daphnia magna*. Pour ce faire, nous avons choisi de réaliser des essais à court terme sur des organismes parthénogénétiques vivant dans des conditions homogènes avec nourriture et éclairage naturel. Dans cette optique nous avons cherché à examiner en statique les effets de : - la température,

- la forme du métal,

- la complexation par : le Na₂EDTA, un acide humique et par la présence de phosphate (PO_4^{3-}),

- et de la salinité et de la dureté.

Dans ce même paragraphe, nous avons procédé à la mesure de la toxicité de Cd, Cu, Ni et Zn dans un milieu renouvelé. Nous proposons ensuite le schéma d'une installation et une méthodologie expérimentale de mise au point **d'un appareil de biomonitoring**.

- **La toxicité aiguë et chronique** de Cd, Cu et Ni à l'aide de la même souche de daphnies, cultivées dans ce cas dans des conditions de nourriture et d'éclairage strictement artificielles.

- La toxicité à court terme du cadmium, moyennant le comportement phototactique de *Daphnia magna*. Les réponses d'un tel test s'inscrivent dans la recherche fondamentale de la mise au point **d'un biocapteur phototactique**.

- L'inhibition de l'activité bactérienne d'une boue activée par la présence de chrome trivalent (Cr^{3+}). Un tel outil permet de tester la possibilité d'utiliser l'activité des microorganismes comme **marqueur biologiques**.

- La détermination de la **valeur bioindicateur de *lemna minor* et *Salvinia natans*** dans des solutions contaminées par Cd, Cu et Zn. Dans une telle évaluation, nous nous sommes d'abord intéressés à la mise en place de la stratégie de croissance de ces plantes aquatiques.

Chapitre I.- Analyse bibliographique

I.- Généralités.

Par le terme « métal » sont désignés les éléments du tableau périodique qui sont caractérisés par : une bonne conductivité électrique, une importante conductibilité thermique, une résistance directement proportionnelle à la température, une structure cristalline ainsi que des propriétés mécaniques et magnétiques. Cependant, plusieurs éléments tels que le bore, le silicium, le germanium, l'arsenic et le tellure, possèdent seulement une ou plusieurs de ces propriétés et sont donc appelés « métalloïdes ». Les métaux lourds se différencient en métaux essentiels et non essentiels (Marquis et Boston 1989). Le premier groupe comprend les éléments d'importance physiologique variable, ce sont des métaux pour lesquels une déficience provoque des dérèglements fonctionnels chez les individus. Toutefois si leur concentration dépasse une certaine limite, ils peuvent devenir toxiques. Le second groupe correspond aux métaux dits « toxiques ». Niober et Richardson (1980) proposent que le terme « métaux lourds » soit remplacé par la classification des ions métalliques, par rapport à trois systèmes biologiques et chimiques : demandeurs d'oxygène, demandeurs d'azote et demandeurs de sulfures.

II.- Sources de métaux dans l'hydrosphère.

Aux sources naturelles que soient : l'érosion des roches (Mc Elroy et *al.*, 1975) et des sols et les émissions volcaniques, se sont ajoutés l'extraction minière, l'utilisation des combustibles fossiles (Leckie et James, 1974 ; Bryan, 1976 et Wittman, 1979) et l'emploi des métaux.

L'accélération des cycles géochimiques a provoqué non seulement l'augmentation des teneurs en métaux dans la biosphère mais aussi la dissémination de ces éléments, du fait des différentes applications techniques dans lesquelles ils interviennent (métallurgie, électronique, industrie plastique, chimie des polymères, chimie des pesticides et des colorants). Selon Demago et *al.* (1982), les teneurs en métaux lourds d'origine naturelle dans le système aquatique peuvent être multipliées par 100 ou 1000, lorsque le milieu est soumis à une pression anthropique.

- les effluents domestiques contribuent eux-mêmes aux apports de métaux dans le collecteur aqueux, de part le métabolisme des eaux usées, la corrosion des conduites de

rejets (Cu, Pb, Zn et Cd) et la présence de détergents renfermant Fe, Mn, Cr, Ni, Co, Zn, Cr, B et/ ou As (William et *al.*, 1974 ; Muller et *al.*, 1976).

Tableau 1.- contribution des apports anthropiques à la mobilisation des métaux dans la biosphère (d'après Philips et Rainbow, 1993).

Eléments	Sources géologiques (10 ³ t/an)	Sources anthropiques *(10 ³ t.an ⁻¹)		Total dans les océans (10 ⁶ t)
Fer	25000	319000	395000	4110
Manganèse	440	1600	8150	2740
Cuivre	375	4460	6000	4110
Nickel	370	3930	5320	6850
zinc	300	358	481	2740
Plomb	180	2330	3200	41
Molybdène	13	57	74	13700
Argent	5	7	9	137
Mercure	3	7	10.5	68
Etain	1,5	166	227	14
Antimoine	1,3	40	65	274
cadmium	-	-	17	

*** Deux estimations sont données pour les sources anthropiques.**

- les boues extraites des stations d'épuration d'eaux domestiques, valorisées pour l'amendement des sols agricoles, génèrent de nouveau une pollution métallique des eaux préalablement traitées (Gandais et Marchandise, 1992).

- les émissions industrielles atmosphériques de métaux se déposent au sol et dans les cours d'eau par l'intermédiaire des précipitations (Stiegel et Klee, 1974) ou de dépôts secs. On peut toutefois observer des teneurs en métaux anormalement élevées dans des régions non industrielles (Market et Wekert, 1989 ; Foster et *al.*, 1991, Van Daalen, 1991 ; Steines et *al.*, 1994) parfois très éloignées des zones arctiques (Savarino et *al.*, 1994). Le tableau 2 résume les principales sources industrielles de certains métaux, suivies de références bibliographiques correspondantes.

III.- Comportement, répartition et devenir des métaux dans les systèmes aquatiques et continentaux.

Le devenir des métaux dans l'eau est tributaire de leur nature et de leurs propriétés, mais aussi des paramètres physiques et chimiques du milieu qui conditionnent leur répartition sous différentes formes chimiques. De ces dernières dépend la répartition des métaux dans les divers compartiments de l'écosystème (Florence et *al.*, 1992). Les compartiments, sont de manière simplifiée, divisés entre le compartiment dit stationnaire, le sédiment et le compartiment circulant comprenant les fractions particulières et dissoutes du métal. Selon Föstner et Wittman (1981), la phase dissoute correspond à la fraction de métal restant dans l'eau après filtration à 0.45µm, même si elle n'est pas forcément représentative de la fraction métallique disponible pour la biomasse. La distribution de traces de métaux dans les eaux naturelles est contrôlée par les réactions d'équilibre diverses, celles-ci étant constamment influencées par les facteurs du milieu. Stumm et Morgan (1970) ; Stumm et *al.*(1972), (tableau 3) ont mis en évidence les formes métalliques les plus rencontrées dans les eaux courantes naturelles.

La répartition multiphasique des métaux dans le milieu aquatique peut être influencée par le débit (Pettine et *al.*, 1994), le pH (Hem, 1970 ; Leckie et James, 1974 ; O'shea et Mancy, 1978 ; Campbel et Evans, 1987 ; Pulls et *al.*, 1991 et Kooner, 1992), la présence des ligands organiques et inorganiques (Stumm et Morgan, 1970 ; Tinsley, 1979 ; Leckie et James, 1974 ; Liven, 1991), la teneur en cations, notamment Ca et Mg (O'shea et Mancy, 1978 ; Stadler et Skindler, 1993) ou la salinité du milieu dans les zones estuariennes (Hart et Davis, 1978 ; Van Den Berg, 1991 et Ouddane et *al.*, 1992). Boyle et *al.* (1976) ; Mantoura et *al.* (1978) ; Turner et *al.* (1981) ont examiné la forme toxique de métaux lourds en fonction de la variation de la salinité. Ils indiquent que dans les solutions diluées, la complexation par le chlore n'est pas importante et que la forme libre d'un métal croît avec une réduction de la salinité.

Blust et *al.* (1992) proposent un modèle de compléxation (figure 1.-) du cadmium créé par la différence de salinité.

Ces profils situent la forme cationique dans la zone des faibles salinités. Ce modèle explicite d'une part l'influence de la salinité sur la forme d'un métal, libre ou complexée, et donc l'incidence de la salinité sur la toxicité métallique évaluée par un test biologique.

Mantel et Frammer (1983) montrent que la perméabilité des organismes aquatiques est plus faible dans le cas d'une salinité modérée que dans de la salinité importante.

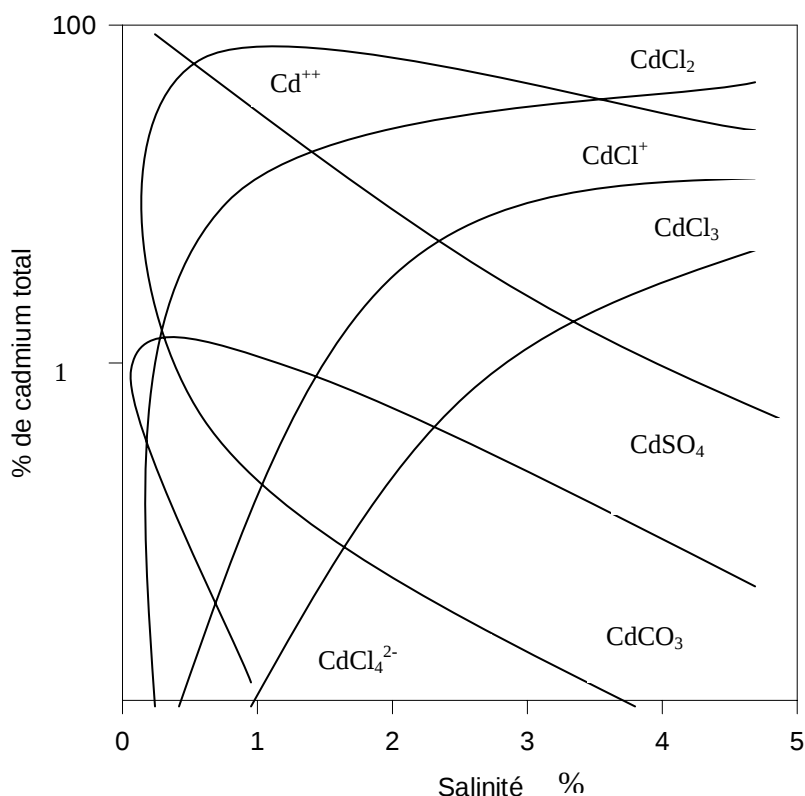


Figure 1.- Les différentes espèces de cadmium en fonction de la salinité
(pH = 8,1 ; $P_{\text{O}_2} = 10^{-0,63}$ atm ; $P_{\text{CO}_2} = 10^{-3,48}$ atm) (Blust et *al.*, 1992).

La capacité des particules solides dans l'eau à adsorber les métaux a été décrite par Guy et *al.*, (1975) et Langmüir (1976).

Rashid (1971) estime que les 2/3 du phénomène de complexation des métaux par les acides humiques sont attribués au processus d'adsorption et que seulement 1/3 est lié à un échange cationique.

Diverses observations ont montré que les oxydes de Fe et de Mn se trouvent en quantité importantes dans l'environnement (Herman, 1971 ; Lee, 1975). Groth (1971) démontre que Co, Zn et Cu coprécipitent dans l'eau naturelle avec les hydroxydes de Fe et Mn avec des

taux respectifs de 67, 86 et 98% et que Zn et Cd ne coprécipitent qu'en présence de carbonates.

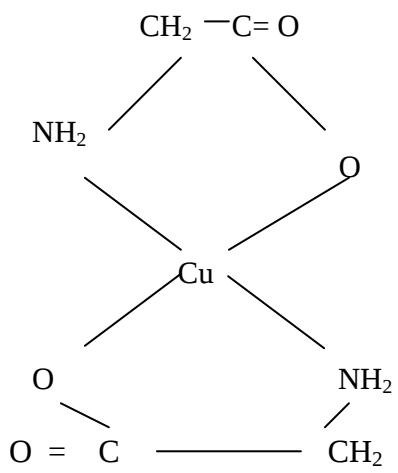
Tableau 2.- Sources industrielles des rejets métalliques.

Métal	Industries	Références bibliographiques
<u>Chrome hexavalent</u>	-Métallurgie : 1, 2 -Fabrication des ferrochromes : 2, 3 -Peintures :1, 2,3 -Tanneries : 4 -Explosifs : 1,2.	1 : Klaassen et <i>al.</i> , 1986 2 : Levesque, 1979 3: Hammond et <i>al.</i> ,1986 4 : Taylor et <i>al.</i> , 1979.
<u>Cuivre</u>	-Textiles, Peinture, Câbles, Appareils électriques, photographie, etc.	Levesque, 1978.
<u>Cadmium</u>	Fabrication des pigments, Equipements électriques, Fabrication de certains biocides, Fabrications d'accumulateurs au nickel - cadmium	Levesque, 1978 Klein et <i>al.</i> , 1974.
<u>Zinc</u>	Domaine d'application commun avec le cadmium.	Levesque, 1978
<u>Nickel</u>	Fabrication d'alliage avec cuivre, fer et aluminium ; préparation d'aciers spéciaux résistants, nickelage par électrolyse, métallisation au nickel.	Levesque, 1978.

La matière organique que renferment les eaux naturelles affecte la capacité adsorptive des sédiments (Pillali et *al.*, 1971 ; Jonasson, 1977) et les matières en suspension (MES) (Sholkovitz, 1976). Ainsi, les métaux complexés par les acides humiques deviennent incapables de libérer les sulfures, hydroxydes et carbonates (Rashid et *al.*, 1973) . Elkert et Sholkowitz (1976) ; Nissebaum et Swaine, (1976) notent que l'aspect électrostatique et chimique du récepteur aqueux résulte de la floculation par Al et Fe.

Cette analyse nous permet de préciser que chaque métal se distribue et agit au sein de l'écosystème en fonction de ses propriétés propres et de la manière dont jouent les facteurs du milieu.

Tableau 3.- Les différentes formes métalliques
les composants majeurs des eaux naturelles
(Stumm et Belinski,1972).

Formes :	Exemples
- Ionique libre	$\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$; $\text{Fe}^{2+}(\text{aq})$; $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$
- Complexée inorganique	$\text{Cu}(\text{OH})_2^{2+}$; $\text{Pb}(\text{CO}_3)_2^{2-}$; CdCl^+
- Complexée organique	
- Formes complexée avec des molécules à haut poids moléculaire	Me --- lipides Me----acide humique Me----polysaccharides
- Formes à aspect colloïdal	$\text{Fe}(\text{OH})_3$; $\text{Mn}_7\text{O}_{13} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Formes à aspect colloïdal pouvant précipiter	$\text{Me}_x(\text{OH})_y$; MeCO_3 ; MeS etc...

IV.- Effet de la contamination métallique des milieux aqueux et des biocénoses.

L'étude des effets toxiques des métaux lourds sur les biocénoses au sein des écosystèmes est du ressort de l'écotoxicologie. Le champ d'investigation de cette discipline s'exerce à

deux niveaux différents, c'est à dire avant et après une source de pollution. Avant, elle a une fonction « prédictive », après elle a une fonction d'évaluation de l'importance des atteintes subies par l'environnement. Ainsi, une nomenclature très spécifique a apparu dans ce contexte. Prosi (1979) définit la biomagnification comme étant le résultat du transfert des métaux dans les différents niveaux trophiques par les voies de passage de la nourriture dans les organismes. Ramade (1972) indique que la biomagnification est le transfert de l'accroissement de la concentration en toxique, au fur et à mesure que l'on progresse dans les différents niveaux d'une chaîne écologique. Shwan et Connel, (1983) attribuent la présence des traces métalliques dans les membranes des muscles des carnivores au phénomène de biomagnification. La bioaccumulation selon Martoja et *al.*, (1984) est la concentration d'éléments supérieure au seuil requis pour qu'une cellule assume normalement son métabolisme et maintienne son équilibre ionique. Outre le fait que les métaux peuvent être biomagnifiés et accumulés au sein des chaînes trophiques, l'expression biologique de l'accumulation des métaux ou du simple contact avec les métaux lourds est la « toxicité ».

L'illustration de l'impact des métaux lourds sur les composants et les fonctions naturelles des écosystèmes est schématisée par la figure 2.-.

La revue bibliographique, relative aux effets des métaux sur certains organismes des eaux douces et continentales, démontre que l'exposition au chrome hexavalent ou autres métaux lourds dissous dans l'eau, entraîne une intoxication liée à la fonction des branchies (Knoll et Fromm, 1960 ; Skidmore, 1970 ; Lewis, 1971 ; Burton et *al.*, 1972 ; Olson et *al.*, 1973). Les poissons, mis directement en contact avec une eau polluée, accumulent avec une grande rapidité des quantités appréciables de métaux (Van der Putte et *al.*, 1981). Les travaux des auteurs (Brungs et *al.*, 1973 ; Mc Kim et Benoit, 1974 ; Sellers et *al.*, 1975 ; Soble et Cooper, 1976) sur le cuivre, (Matthiessen et *al.*, 1973, 1977) sur le zinc, (Sangalang et Freeman, 1979 ; Olson et *al.*, 1973 ; Lock, 1979) sur le cadmium ont mis en évidence l'accumulation des métaux dans les tissus des branchies et une détérioration de celles-ci. Calabresse et Nelson. (1975), Mc Carty et *al.* (1976) notent une perturbation de la respiration et de l'osmorégulation.

La toxicité des sels de chrome vis-à-vis des organismes inférieurs est établie selon les espèces et la valence de ce métal. L'effet toxique du chrome trivalent apparaît pour des concentrations supérieures ou égales à 5 mg de $\text{Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$ sur l'activité épuratrice d'une boue activée (Semsari et Gäid, 1994).

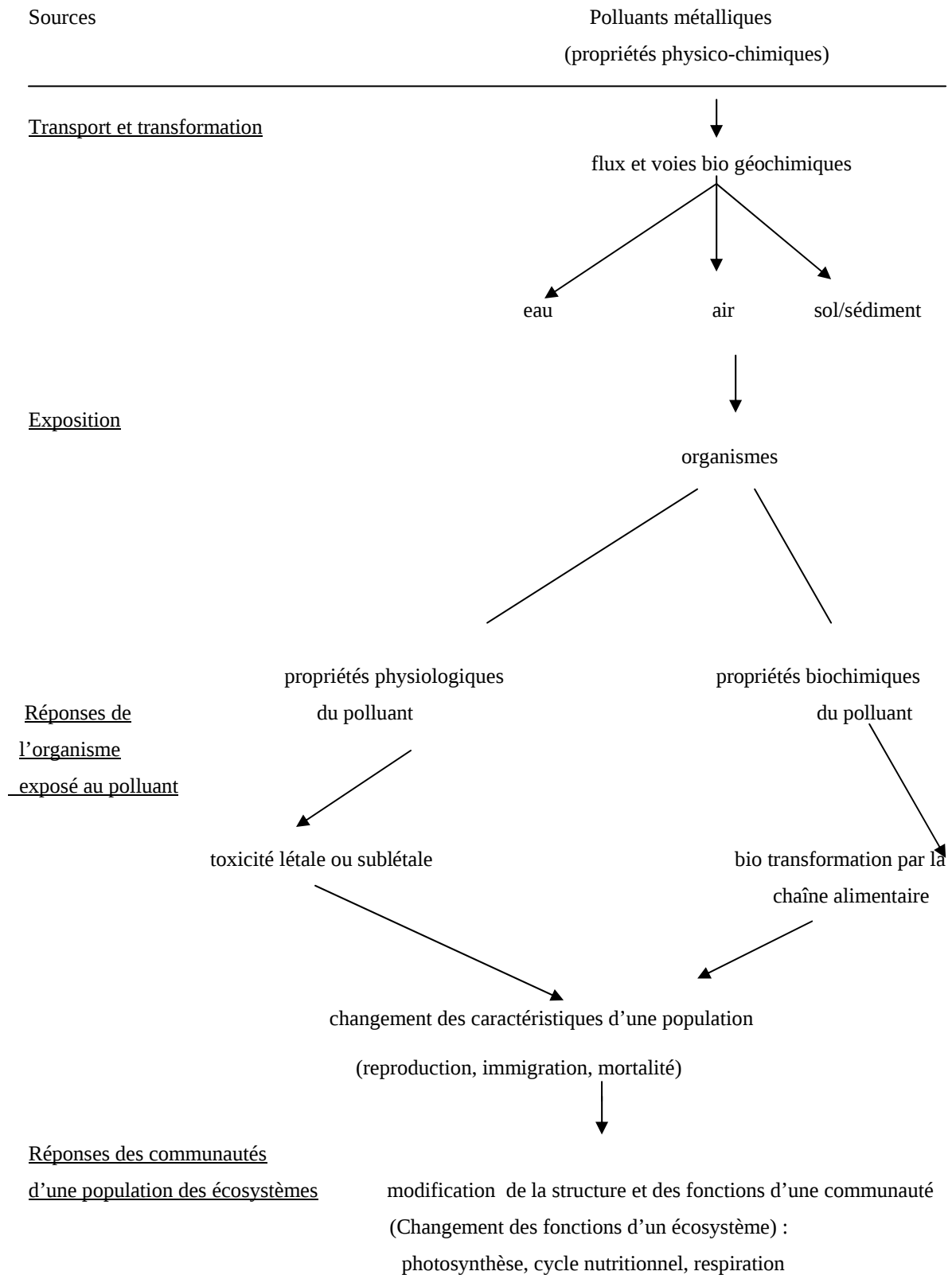


Figure 2.- Impact de la pollution métallique sur les fonctions d'un écosystème
(Connell et Miller, 1984).

Dans le cas des algues, la concentration inhibitrice de la croissance des chlorelles en 96 est évaluée à $445 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Jouany et al., 1982). Mugel et al. (1978) montrent que la concentration inhibitrice des organismes testés pendant 10 jours (CI 50 10 jours) de la croissance des chlorelles est de $4,5 \text{ mg de Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$.

D'après Bodar (1989), l'exposition prolongée au cadmium affecte la biomasse reproductrice de *Daphnia magna* et la taille de ponte de celle-ci. Les auteurs Winner (1981), Münzinger (1990), Ensenrink et al., (1993) ont considéré et évalué l'inhibition de certains critères biologiques de *Daphnia magna* par les métaux lourds.

La toxicité des métaux vis-à-vis du monde aquatique dépend de la forme sous laquelle se trouve le métal et des caractères physiques et chimiques du milieu. Trama et Benoit (1960), Cotton et Wilkinson (1972), Spry et Wiener (1991) notent l'influence d'une diminution du pH dans un environnement peu minéralisé qui entraîne une accumulation importante des métaux par les poissons. Meador (1991) met en évidence les effets simultanés du pH, de la teneur en carbone organique dissous (COD) et des concentrations en cuivre sur *Daphnia magna*. L'auteur montre ainsi que la CL 50 24 heures (concentration létale en 24 heures) du cuivre est d'autant plus importante que la teneur en COD est faible ($< 2 \text{ mg.L}^{-1}$) et que le pH passe de 8,0 à 7,0. L'augmentation des teneurs en COD ($> 3,8 \text{ mg.L}^{-1}$) se traduit par une absence de toxicité et ce, quelle que soit la concentration en Cu^{2+} (de 0 à 75 mg.L^{-1}), mettant ainsi en évidence le rôle tampon assuré par la présence dans l'eau de complexants naturels tels que les acides humiques (Winner, 1985 ; Pommery et al., 1985, Campbell et Evans, 1987).

A l'origine, l'étude des toxiques dans l'environnement était fondée sur l'analyse (identification, quantification) des molécules rejetées dans le milieu environnant. Les progrès constants de la chimie de synthèse conduisent à des rejets de substances dont la nature chimique est difficilement identifiable, même à l'aide de méthodes et techniques d'analyse les plus avancées. Ces techniques analytiques ne renseignent que très peu sur les effets liés à la contamination du milieu et des espèces qui y vivent (Neubecker et al., 1983 ; Witton, 1991 ; Florence et al., 1992; Laouedj, 1994).

L'étude de la structure des biocénoses qui survivent en milieu pollué, selon les méthodes dites écologiques, ne permet pas, le plus souvent, de connaître la nature exacte de l'agent nocif, mais conduit à suspecter des sources de pollution là où les techniques physico-chimiques sont inopérantes. L'exploitation des données bibliographiques peut conduire alors à une estimation de la toxicité de ces effluents pour l'homme, à partir de l'étude des perturbations biocénotiques.

V.- Méthodes d'évaluation des risques de perturbations par les agents polluants dans les milieux aquatiques.

V.1.- Généralités.

Pour remédier aux menaces des produits chimiques qui résultent de l'activité de l'homme, il est indispensable de savoir évaluer la contribution à la pollution des différents déversements. On doit prévoir la mise en évidence de la toxicité, à l'aide de divers organismes aquatiques, des effluents ou de substances chimiques qui entrent dans leur composition. D'une manière générale, la toxicité est définie comme étant l'aptitude à provoquer des dommages chez un organisme vivant (Cabridenc et *al.*, 1974 ; Ramade, 1977 ; Butler, 1978 ; OMS, 1979 ; Ravera, 1980).

Les recherches toxicologiques sont orientées vers un domaine se rapprochant de l'écologie, à savoir l'écotoxicologie. D'après Jouany (1982) ; Bouquegneau et *al.* (1985 a) l'écotoxicologie est l'étude des effets de toute nature des toxiques sur toutes les espèces vivantes et leurs organismes, leurs rapports avec la matière inanimée, leurs rapports entre - elles et avec l'homme.

V.2.- Les bioindicateurs.

Pour appréhender les phénomènes de toxicité des métaux vis-à-vis de l'ensemble des organismes composant la chaîne trophique, des méthodes, faisant appel aux communautés ou aux organismes que l'on appelle « indicateurs », ont été développées. Blandin (1986) définit les indicateurs comme étant des organismes ou ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permettent de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écomplexe et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications naturelles ou provoquées ». L'emploi des variables biologiques (niveaux d'organisation de l'édifice biologique) se traduit dans les faits par l'existence d'une multitude de méthodes d'évaluation (Lange et *al.*, 1994) des altérations des systèmes, de la toxicité potentielle et des voies de transfert des polluants. Bellan (1984) montre que les indicateurs biologiques ou taxons indicateurs sont des « détecteurs » révélant l'existence des conditions complexes à interpréter et résultent, le plus souvent, d'un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques difficiles à mesurer. Le premier système de caractérisation biologique de la pollution des eaux courantes a été élaboré par Kolkwitz et Marson (1908,

1909) et Kolkwitz (1950). Il s'agit du système des saprobies, amélioré par Liebmann (1962), qui fait référence au critère absence ou présence d'espèces indicatrices (pollio-sensibles ou polluo –résistantes).

Patrick (1949) s'est intéressé à la diminution de la diversité des communautés aquatiques, parallèlement à l'augmentation de la pollution.

Les biocénoses seront toujours des témoins plus fiables des effets globaux des divers facteurs d'altération du milieu, par rapport à une seule espèce indicatrice d'un type de contamination (Iserentant et De Sloover, 1976). L'intérêt des biocénoses aquatiques dans l'étude de la pollution réside dans leur capacité d'intégration des variations de la qualité des eaux. Ces variations s'inscrivent dans la composition des peuplements aquatiques et persistent en dehors des phases de pollution, par opposition aux analyses physico-chimiques qui ne sont significatives qu'au moment et à l'endroit du prélèvement.

L'emploi de la daphnie, comme organisme indicateur (Anderson, 1980 ; Buikema et al. 1980 ; Van Leeuwen et al., 1986 ; Shartz , 1984 ; Bodar, 1989) n'est plus contesté.

Les microorganismes d'une boue activée épuratrice ont été considérés de manière satisfaisante comme indice d'inhibition par Suthirak et al., (1981) et Lewandovski (1987).

Les plantes aquatiques utilisées comme révélatrices des paramètres de la qualité des eaux continentales sont également acceptables (Husak et al. 1989). Dans les paragraphes suivants, sont donnés les descriptions biologiques des espèces utilisées pour ce travail.

V.2.1.- *Daphnia magna*.

V.2.1.1.- Morphologie : (figure3).

V.2.1.2.- Présentation systématique.

Embranchement :	Arthropodes
- Classe :	Crustacés
- Sous classe :	Branchiopodes
- Ordre :	Diplostracés
- Sous ordre :	Cladocères

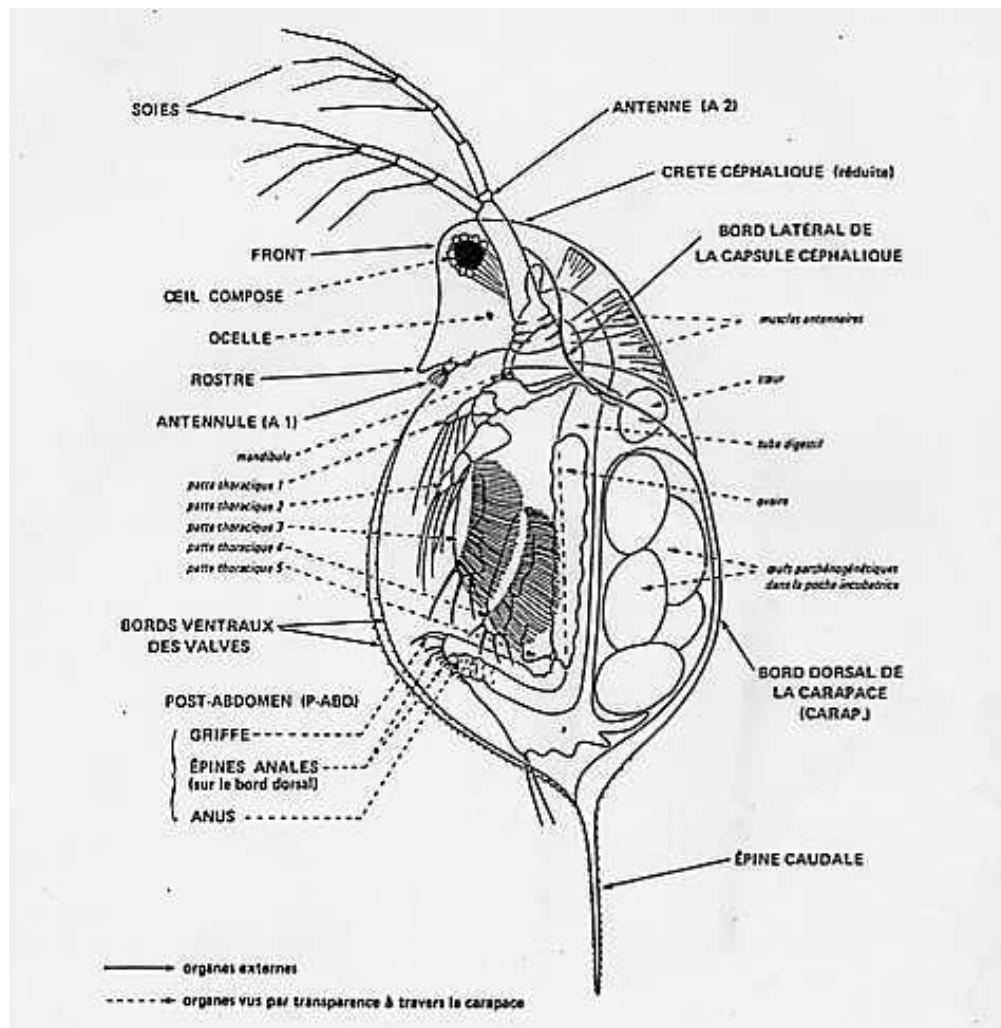


Figure 3.- Schéma d'une daphnie (adapté par Peters et Bernadi, 1987).

La distribution des daphnies dans le monde est différente ; *Daphnia magna* n'est présente que dans la faune d'Angleterre, en Afrique du Nord, en Chine et plus précisément en Mandchourie (Chine du Nord) (Leonahard et Lawrence, 1981).

V.2.1.3.- Anatomie.

Daphnia magna est l'espèce de daphnies la plus grande, elle peut atteindre 5 mm à l'état adulte. Son corps est protégé par une carapace bivalve qui laisse la tête libre. La carapace est transparente, celle-ci rend les organes facilement visibles à l'œil nu ou la loupe binoculaire. Elle comporte un seul œil résultant de la fusion de deux yeux latéraux. Le tube digestif est un cordon fin parallèle à l'axe du corps. Ses longues antennes servent à la nage.

V.2.1.4.-Ecologie.

La daphnie est largement répandue dans la zone tempérée de la biosphère et est omniprésente dans les eaux stagnantes ou à courant lent. Elle joue un rôle prépondérant dans les chaînes alimentaires aquatiques en tant que proie ou en tant que prédateur (Hebert, 1978). Elle se rencontre dans les eaux peu minéralisées, riches en matières organiques dissoutes ou en suspension et pas polluées par les substances chimiques.

V.2.1.5.- Reproduction.

Daphnia magna présente deux modes de reproduction ; l'un très fréquent et qui est celui de la reproduction par parthénogénèse, l'autre est celui de la reproduction sexuée. La voie parthénogénétique est une caractéristique intéressante, puisqu'elle permet d'obtenir des élevages de souches pures à partir d'une seule daphnie. L'incubation a lieu dans une poche placée dans le dos de la daphnie. Les jeunes daphnies expulsées sont mûres au bout de 6 à 7 jours. A l'automne, où les conditions sont défavorables et lorsque la température de l'eau tombe en dessous de 10°C, les femelles parthénogénétiques donnent naissance à un mélange de mâles et de femelles. Les femelles fécondées par des mâles, donnent naissance (au printemps) à des femelles parthénogénétiques réamorçant ainsi un nouveau cycle (Lundahl, 1973).

La reproduction des daphnies dans les eaux naturelles est estimée à 5 tonnes/hectare. an.

V.2.1.6.- Effet de certains facteurs environnementaux sur la vie de la daphnie.

En général, la température affecte la croissance, le développement, la reproduction, la respiration, le comportement et la survie des animaux aquatiques (Myrand et al., 1982).

Les cladocères sont éctothermes, la chaleur de leur corps dérive de l'environnement (Korpelainen, 1986). Des cycles de vie effectués à des températures élevées montrent une maturité tardive (Korpelainen, 1986). Cette affirmation est applicable à *Daphnia magna* où le temps de maturité diminue avec l'augmentation de la température (Goss et Bunting, 1983).

La survie de *Daphnia magna* est affectée par la température (Mattice et al., 1981 ; Stephenson et al., 1984). Goss et Bunting (1983) ont vérifié que le maximum de reproduction se situe à 20°C et que *Daphnia magna* produit plus de jeunes à 15, 20 et 25°C qu'à 10 et 30°C. Dans le cas des métaux lourds (Chapman et al., 1980) montrent une sensibilité croissante des daphnies à l'augmentation de la température.

La gamme optimale de pH pour la reproduction se situe entre 7,6 et 8,5 (CEE, 1986, ASTM, 1987). Selon Taub et Dollar, (1964), un milieu compatible à la daphnie doit être chimiquement stable à l'intérieur d'une gamme de pH allant de 6 à 9. Lundahl (1973) a vérifié que les daphnies sont capables de survivre à des pH compris entre 5,7 et 9,0. Havas (1985) trouve que *Daphnia magna* est extrêmement sensible à des pH inférieurs à 5,0. Selon Borgmann (1983), la toxicité de l'hydroxyde de cuivre varie selon le pH du milieu.

La dureté totale de l'eau peut affecter le comportement des daphnies. Winner (1986) montre qu'une meilleure longévité est obtenue chez *Daphnia magna* avec une eau moyennement dure (115 mg.L⁻¹ CaCO₃), qu'avec une eau douce (58 mg.L⁻¹ CaCO₃).

La turbidité selon Scholtz et *al.*, (1988) n'influe de façon significative sur la capacité de reproduction de *Daphnia barbata* que pour des niveaux de turbidité compris entre 0,5 et 1,28 mg.L⁻¹ de particules en suspension.

Les faibles concentrations en oxygène dissous (1,8 mg O₂.L⁻¹) réduisent la maturité, le nombre de jeunes produits ainsi que le poids sec des daphnies.

Homer et Waller (1983), Koyabachi et Nezu (1986) trouvent que le niveau d'oxygène dissous diminue quand la concentration normale d'hémoglobine dans le sang de la daphnie augmente d'environ vingt fois. Replacée dans une eau bien aérée, la concentration de l'hémoglobine de la daphnie diminue progressivement jusqu'à 50% de la valeur initiale. Green (1985) attribue cette diminution à un passage dans l'hémoglobine dans les œufs ou bien à une destruction de celle-ci dans les cellules.

L'éclairement (photopériode) peut être naturel ou artificiel dans la réalisation d'un élevage de daphnies. La photopériode peut être selon différents auteurs de :

- 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (Burns, 1969 ; Van Leeuwen, 1985 a, 1985 c, 1986 ; Proulx et *al.*, 1984 ; Scholtz et *al.*, 1988 ; Coniglio et Baudo 1989)
- 14 heures de lumière et 10 heures d'obscurité (Goss, 1980 ; Goulden et *al.*, 1982 ; Myrand et De la Noue, 1982 ; Goss et Bunting., 1983 ; De Meester, 1993)
- 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité (Porter et *al.*, 1983 ; Cowgill et *al.*, 1984 ; Groth et kimerle, 1985 ; Biesinger et *al.*, 1986 ; Winner, 1984, 1986, 1989 ; Xiu et *al.*, 1989 ; Kubitz et *al.*, 1995).

Homer et Waller (1983) signalent que l'utilisation d'une illumination continue permet de minimiser les fluctuations de l'oxygène dissous, causées par la photosynthèse algale et la respiration.

Les milieux de culture utilisés pour les daphnies sont très variés : milieu naturel, mélange de milieu naturel et de milieu synthétique et milieu synthétique.

La nourriture joue incontestablement un rôle important dans le maintien des cultures des daphnies. En effet, il est indispensable de leur fournir de l'énergie nécessaire pour une bonne reproduction. Selon Schwartz (1984), un changement de qualité et de quantité de la nourriture entraîne immédiatement un changement remarquable chez la daphnie.

V.2.2.- les microorganismes d'une boue activée :

Ces microorganismes sont présents dans les eaux usées sous forme de flocons qui ont un diamètre apparent de 3 à 6 mm. Leur concentration totale dans un réacteur biologique est de 3 à 6 g.L⁻¹, exprimée en matières volatiles en suspension (MVS). La dégradation des composés organiques ou minéraux (N et P) est réalisée à l'aide de bactéries hétérotrophes ou autotrophes.

V.2.3.- *Lemna minor*, *Lemna Polyrhiza* et *Salvinia natans*.

Du fait de leur sensibilité, immobilité et relative facilité d'identification, les espèces végétales apparaissent particulièrement appropriées à la détection, à la cartographie et au suivi de divers types de pollution (Muller, 1995).

De nombreux travaux ont permis de montrer que la composition de la végétation aquatique constitue un outil de diagnostic particulièrement efficace pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Les travaux Trémolieres et *al.* (1993) concernent les relations entre la composition des phytocénoses aquatiques et la composition physico-chimique de l'eau.

D'autres auteurs se sont intéressés, de manière particulière, à la toxicité des métaux lourds en particulier et leur impact sur la végétation aquatique (Jackson et Kalff, 1993 et Claveri, 1994).

L'effet de l'ion ammonium sur la nitrate réductase de *Lemna minor* a été considéré par (Orebamjo et Stewart, 1975). Nous n'avons par contre rencontré aucune documentation utilisant *Salvinia natans* dans des essais écotoxiques.

A l'instar de bons nombres d'espèces aquatiques, nous avons sélectionné *Lemna minor* (lentille d'eau) et *Salvinia natans* afin de définir et de déterminer l'impact de Cd, Cu et Zn

sur leur croissance. Un tel résultat devrait nous permettre de conclure sur leurs modifications morphologiques par une analyse microscopique.

Nous signalons que ces espèces sont présentes sur le réseau hydrographique. Etant donné les conditions de vie, *Lemna minor* se traduit par une large répartition géographique en Algérie alors que *Salvinia natans* ne se situe que dans la région d'El Kala.

Nos échantillons de *Salvinia natans* proviennent du jardin botanique de Nancy. La *Lemna minor* nous a été fournie d'un clonage maintenu au laboratoire d'environnement de l'université de Chambéry (France). Nous avons également procédé à l'étude de la croissance de *Lemna polyrhiza*, provenant du jardin botanique de Nancy mais sans l'exploiter comme bioindicateur de toxicité.

a) Description des plantes.

- *Lemna minor* et *polyrhiza* (lentilles d'eau)
- *Salvinia natans*.

b) Les lentilles d'eau.

Les *lemna* sont des plantes flottantes, très petites, réduites à une lame verte ou « frondes » de la forme de la grosseur d'une lentille d'où le nom de lentille d'eau. En dessous des frondes, elle porte une racine en son centre. Elles se multiplient par bourgeonnement de nouvelles lames et ne fleurissent pratiquement jamais. Les mâles comportent une étamine, les femelles sont identifiées par leur carpelle. Elles sont réunies par trois (deux mâles et une femelle) dans une petite spathe ou par deux (1 mâle et 1 femelle) et sans spathe.

Dans le lac de Tolga, dans la région d'El Kala, elles sont omniprésentes dans les eaux dont le pH varie entre 6 -7 et dont la conductivité est de 1 à 1,9 mS/cm. Elles flottent librement au-dessus d'une colonne de 1,20 m d'eau (observations personnelles de Kadid, 1998). Les *Lemna* sont pourvues de plusieurs racines filiformes, non ramifiées, sans poils absorbants ou parfois entièrement dépourvues de racines (Nouvelle flore de Belgique, du Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines).

c) *Lemna minor*.

lemna minor (figure 4) est une petite lentille d'eau de 2 à 4 mm de longueur. Elle devient abondante du mois de juin à septembre et est hydrothérophyte. Dans le milieu naturel, elle vit préférentiellement dans les eaux stagnantes douces ou faiblement saumâtres.

d) *Lemna polyrhiza*.

Elle présente de nombreuses racines et a un comportement annuel. Elle est considérée la plus grande des lentilles d'eau ; sa taille peut atteindre 8 mm de diamètre. A la face inférieure, les pseudo-racines sont réunies en faisceaux de fibres radicales. Elle pousse dans les fossés, les plans d'eau calmes et se régénère par bourgeonnement.

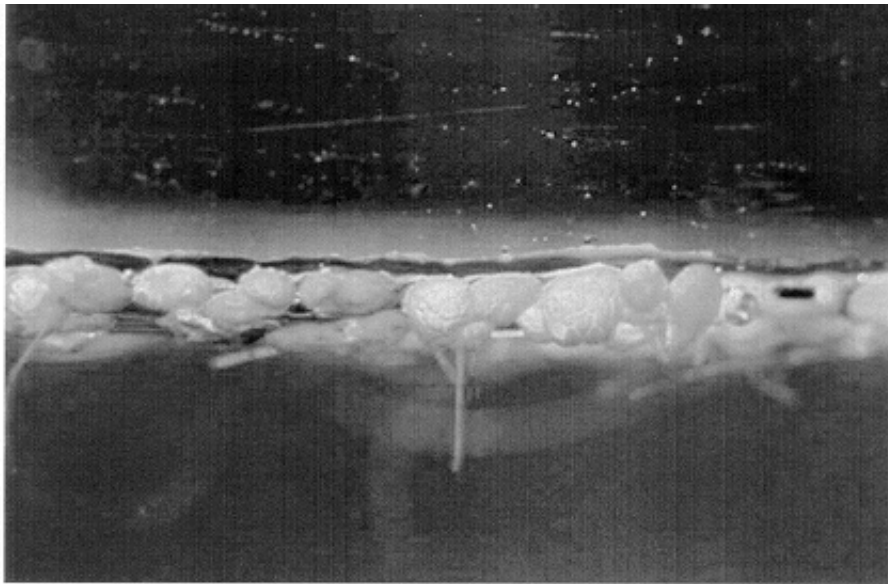
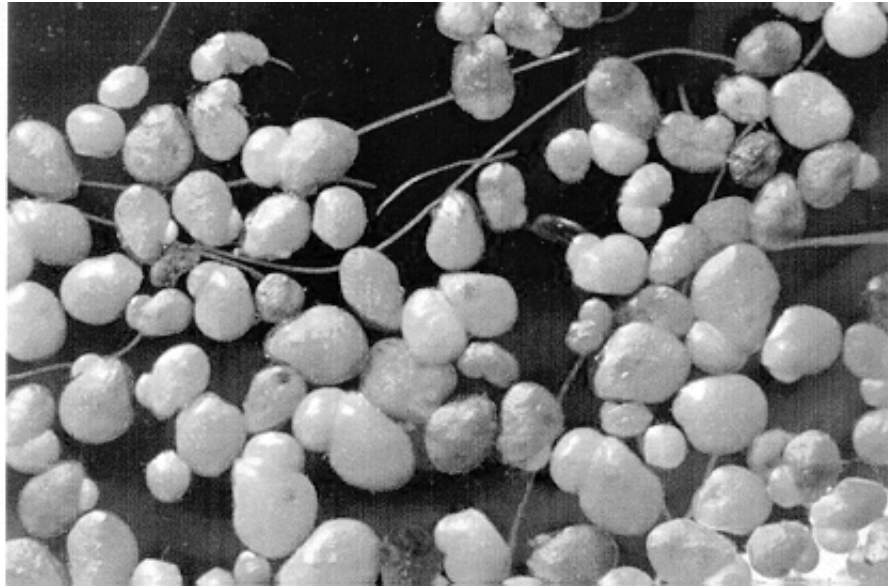


Figure 4.- *Lemna minor* dans son milieu de vie naturel.

e) *Salvinia natans*.

Elle appartient à la famille des Salviniacée (Silviniacées). C'est une plante herbacée, flottant à la surface des eaux. Elle est petite et comporte une tige au moins ramifiée, mais pas de vraies racines.

Les feuilles verticillées par trois dont deux entières flottantes et poilues et la troisième submergée et finement découpée en pseudo racine ramifiée et poilue. Les feuilles poilues en dessous, présentent des ponctuations saillantes et des poils étoilés en dessus. Les sporocarpes sont de deux sortes les uns à macrospores et les autres à microspores, groupés par 4 à 8 entre les pseudo-racines ou à la base des rameaux atteignant deux à trois millimètres (nouvelle flore de la Belgique).

V.3.- Biomonitoring.

Celui ci a pour objectif d'évaluer l'impact de la pollution à l'instant t ou en fonction du temps à l'un des niveaux de l'édifice biologique. Dans ce contexte, la difficulté est de prendre en compte et de recréer l'existence d'un écosystème appelé « mécosome » ou « microcosme » (Perrondin, 1988 ; AFNOR , 1992 ; Meador et *al.*, 1993 et Ribeyre et *al.*, 1994).

V.3.1.- Monitoring chimique.

L'objectif du monitoring chimique est d'estimer les quantités de polluants accumulées ou accumulatrices dans la chaîne trophique. Les organismes tests représentatifs dans ce cadre sont inspirés de ceux énoncés par Phillips (1977).

Les macrophytes aquatiques incluant les algues sont largement utilisées dans le cadre du suivi de l'impact des métaux lourds et leur répartition dans l'écosystème (Whitton et *al.*, 1981 ; Lethonen et *al.*, 1989 ; Jacksson et Kalff, 1993).

A l'échelle des organismes, s'est développée toute une série de méthodes regroupant les tests de toxicité, biotests (bioessais) basés sur la détermination de la toxicité létale et chronique.

Les tests comportementaux (biocapteurs) sont basés sur une réponse comportementale ou physiologique de l'organisme-test face à un polluant et les tests basés sur l'induction d'un dysfonctionnement métabolique moyennant les biomarqueurs.

V.3.2.- Les biomarqueurs.

Le National Research Council (1987) définit un biomarqueur comme toute modification biochimique, physiologique et morphologique dans les plantes permettant de mesurer leur exposition à des substances.

En fait, l'efficacité d'une espèce et donc l'efficacité d'un biomarqueur dépend du degré d'adaptation au stress environnemental des populations étudiées (de plantes, d'animaux, et de microorganismes) et de leur homogénéité.

V.3.3.- Les bioessais.

Un bioessai ou biotest consiste à observer le comportement d'un individu (ou d'un groupe homogène d'individus) mis en contact, dans des conditions expérimentales bien définies, avec le milieu du test.

Pour plusieurs raisons, le choix de l'espèce bioindicatrice est complexe car les espèces présentent des sensibilités différentes au toxique (Hueck Van Plas, 1978). Pour la possibilité d'adaptation des espèces au toxique, il faut prévoir la facilité dans l'élevage et sa maintenance ainsi que la facilité d'observation des effets étudiés. Dans les effets recherchés, les polluants peuvent se manifester par leur toxicité immédiate ou « aiguë » ; dans ce cas, les effets observés sont généralement des effets létaux. La toxicité chronique et l'accumulation des substances le long d'une chaîne alimentaire sont décrits par des modifications morphologiques, des modifications de la croissance, de la reproduction, de l'activité métabolique et ou du comportement (Baudo, 1987). La littérature, concernant plus spécifiquement le comportement, est assez restreinte. Le changement du comportement des poissons, pris comme indice de toxicité par (Besch et al, 1977) et résultant de la mise en place d'un protocole fonctionnant dans des conditions très contrastées de lumière et de température, s'est montré un critère sensible et permettant une détermination rapide de la toxicité. Une autre étude (Coulon et al, 1983) a évoqué la possibilité du suivi du comportement des rotifères mais sans la considération d'une quelconque pollution. Dans ce contexte des méthodes basées sur la détermination et la quantification de la migration diurne du zooplancton ont été développées. Cushing (1951) ; ; Hutchinson (1967) ; Bayley (1986) ; Hanney (1988) trouvent que la tendance de migration ne diffère pas seulement entre les espèces mais dépend également de l'âge, du sexe et de la saison.

Lors de leurs études Dodson et *al.* (1994) ; Ringelber (1995) révèlent une corrélation étroite entre la migration verticale et la lumière sans pouvoir préciser d'autres facteurs prépondérants dans ces déplacements des daphnies. L'explication écologique, citée par Stirling et *al.* (1990) ; De Meester (1993a) ; De Meester (1996a) met en évidence l'aspect génétique des populations aquatiques qui contribue à cette aptitude aux déplacements dans une direction verticale.

De Meester (1991) note que le phototactisme de *Daphnia magna* est lié à un gradient de lumière et que ce caractère héréditaire est désigné par des effets phototactique positif, intermédiaire et négatif, selon la convention choisie.

Flickinger et *al.* (1982), Goodrich et Lech (1990), De Meester (1993b) et (Semsari, 1995 : travaux de thèse) ont mis en place des méthodologies de suivi de la toxicité en utilisant l'effet phototactique de *Daphnia magna* comme critère biologique. A ce titre, nous citons le monitor conçu par Knie (1978) où la daphnie a assuré la mise en évidence de la toxicité des pesticides autour de la valeur CI 50 24 heures. Dans la suite, en chapitre résultats expérimentaux, nous ferons référence aux termes « biomonitor » et effet phototactique de *Daphnia magna* pour évaluer la toxicité engendrée par le cadmium. Cependant, l'emploi d'un « biomonitor » impose le choix d'un clone pas très sensible aux modifications des conditions d'essais autres que celles des concentrations du polluant. De Meester (1993b) indique que le clone, *Daphnia magna*, phototactiquement positif (celui utilisé pour nos travaux) n'est pas sensible aux petites variations des conditions expérimentales dans ce système de bioindication.

V.3.3.1.- Tests de toxicité aiguë (ou à court terme).

La toxicité aiguë résulte des effets nocifs survenant très peu de temps après l'administration soit d'une dose unique, soit de doses multiples réparties sur une courte période. L'épreuve de toxicité aiguë la plus utilisée implique la détermination de la concentration létale (CL 50). Cette concentration a été définie comme l'expression statistique de la concentration du produit qui est supposée tuer 50 % des animaux testés. Lorsque le critère utilisé n'est pas la mortalité, la CI 50 (concentration inhibitrice) est utilisée ou la CE 50 (concentration efficace).

Le test de toxicité aiguë constitue l'essai de référence classiquement mis en œuvre par les normes ISO (1989) et AFNOR (1983). Ce test, qui permet, d'une part, une classification du degré de toxicité des substances ou des effluents considérés nocifs, constitue une étape

préliminaire précédant le test chronique et, d'autre part, de mieux prévoir la gamme de concentrations à considérer lors du test prolongé.

V.3.3.2.- Tests de toxicité sub-chronique (ou à moyens terme).

Elle résulte de l'administration de doses ou du maintien de l'organisme dans un milieu renfermant une concentration définie en substances à étudier pendant des durées atteignant moins de 10 % de la durée de vie de l'organisme étudié (Baudo, 1987). La toxicité mesurée peut être celle d'un effet létal ou subléthal tel que modification de croissance, de comportement etc.

V.3.3.3.- Tests de toxicité chronique (ou à long terme).

Ethymologiquement, le terme « chronique » provient du grec « chronos » qui signifie temps. En écotoxicologie, le test chronique est défini comme le test à long terme. Les effets chroniques peuvent être interprétés de quatre façons différentes (Suter et *al.*, 1987). Les effets chroniques résultent de l'exposition à long terme et doivent inclure l'ensemble des stades de développement et de vie, ils ne sont pas sévères, ils s'observent à des concentrations plus faibles que les autres.

Le test de toxicité chronique met en évidence, sur une durée de 21 jours, les effets de substances sur : la survie ou mortalité, la croissance, la ponte, la physiologie, la cytologie, la production d'oxygène, etc. Tous ces paramètres ont fait l'objet de discussions de différentes organisations internationales (National Academy of Science, 1975 ; FAO/FIDA, 1976 ; National Academy of Science, 1981 ; OCDE, 1982).

Bien que déjà standardisée par certains (ASTM, 1987), la procédure du test chronique avec *Daphnia magna* fait encore l'objet d'études menées en particulier par l'OCDE et la CEE. Les sensibilités des différentes souches de *Daphnia magna* (dans le cas des études des effets sublétaux) à une même substance s'avèrent différentes. Münzinger et Monicelli (1992) trouvent une différence significative entre les réponses de trois souches de *Daphnia magna*, provenant de trois pays différents, aux toxicités chroniques du chrome, du zinc et du nickel. Baird et *al.* (1991) attribuent la variabilité dans les résultats des tests de toxicités aux différences génétiques entre les clones de *Daphnia magna*.

V.3.3.4.- Tests de toxicité aquatiques.

Ces tests peuvent être réalisés suivant trois modalités :

- en milieu statique, le milieu expérimental n'est pas renouvelé.
- en milieu semi-statique, du fait d'une biodégradation possible et pour éviter l'accumulation de déchets, le milieu expérimental est renouvelé périodiquement
- en milieu dynamique, le milieu est renouvelé en permanence.

Dans ce cas, Hellowell (1978) explique qu'un monitor (ou machine de surveillance) doit assurer les fonctions suivantes :

- Les observations d'une station dans une courte durée de temps et fournir ainsi une description qualitative et quantitative,
- Etablir un programme continu de suivi,
- S'assurer que les formulations fournies sont reproductibles.

Zumwalt et *al.* (1994) reprochent aux bioessais écotoxicologiques en statique d'être inappropriés pour un grand nombre de produits chimiques comme les métaux lourds pour leur caractère sorptif ou d'autres composés pour le fait qu'ils soient rapidement dégradables, volatiles ou insolubles.

La préférence de certains auteurs (Knie, 1978) pour les essais avec écoulement continu pourrait être expliquée, comme le suggère Zumwalt et *al.* (1994). Cependant certaines contraintes majeures tels que les volumes importants des solutions à préparer, restreignent le choix d'un tel régime de fonctionnement dans une expérience de laboratoire.

Dans les recherches toxicologiques (Vasseur et *al.*, 1991) proposent une batterie de tests qui n'en demeurent pas moins vrais que ceux-ci restent des tests prédictifs des effets toxiques.

A défaut de pouvoir tester la sensibilité de toutes espèces qui peuplent l'environnement hydrique, la toxicité est évaluée sur les espèces-types, connues pour leur sensibilité et sont représentatives des groupes taxonomiques importants : bactérie, algues, crustacés, poissons et plantes aquatiques.

Notre choix s'est porté en un premier lieu, sur un crustacé d'eau douce (*Daphnia magna*). Nous avons ensuite testé les sensibilités des microorganismes d'une boue activée et de deux plantes aquatiques d'eau douce (*Lemna minor* et *Salvinia natans*).

Une synthèse bibliographique relative aux conditions d'élevage et de culture des réactifs biologiques impliqués dans les biotests, fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre II.- Matériel et méthodes

I.1 Tests de toxicité aiguë : élevage des daphnies dans des conditions d'éclairage et de nourriture homogènes naturelles.

I.1.1.- Tests de toxicité aiguë statiques.

La souche de *Daphnia magna* nous a été fournie par l'ONDPA (Office National de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture).

I.1.1.1.- Matériel.

Les tests sont réalisés dans des tubes à essais qui sont placés lors des expériences dans une étuve où la température est fixée à $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Les concentrations en ions métalliques sont vérifiées à l'aide d'un dosage par absorption atomique (modèle Pye Unicam).

I.1.1.2.-Méthodes.

a) Mode d'élevage des daphnies.

Les daphnies sont maintenues par reproduction parthénogénétique dans un bassin cylindrique de 85 cm de hauteur et 3,6 cm de diamètre (initialement désinfecté) dans lequel sont mélangés : 85 Kg de terre pour sa contenance en sels minéraux, 1,5 Kg de chaux agricole (chaux pure CaCO_3) ayant pour rôle l'augmentation du pH de l'eau, 500 g d'engrais chimique constituée de 18 % de potasse (KOH), de 18 % de superphosphate (P_2O_5) et 12 % d'azote, 7,3 Kg de fumier, une quantité d'eau (provenant d'un forage) juste nécessaire pour couvrir le mélange préparé.

Ce mélange ainsi réalisé est laissé tel quel, pendant 10 à 12 jours à une température comprise entre 19 et 21°C . Après ce temps, est observée la formation du phytoplancton, caractérisée par une coloration verte, suite à celle-ci l'ensemencement du milieu par les daphnies génitrices est effectué et l'éclairement est assuré naturellement.

Nous signalons que nos prélèvements ont lieu principalement pendant les mois d'avril, mai et juin de chaque année afin, d'écarter la possibilité de présence des mâles parmi les daphnies parthénogénétiques.

b) Milieu d'essais.

La méthodologie des essais est largement inspirée de celle décrite dans la norme ISO (1989). Le milieu d'essai préconisé par la norme est une eau synthétique (eau de dilution) de composition : NaHCO_3 0,0640 g.L⁻¹ ; CaCl_2 0,294 g.L⁻¹ ; MgSO_4 0,123 g.L⁻¹ et KCl 0,005 g.L⁻¹.

Les caractéristiques du milieu d'essai, préparé au laboratoire, sont regroupées dans le tableau 4.-.

Tableau 4.- Les caractéristiques du milieu expérimental
(T= 20.2°C, pH = 7,9, conductivité C = 2,39 mS.cm⁻¹).

Eléments	[Eléments] (mé.L ⁻¹)
Ca ⁺⁺	5,20
Mg ⁺⁺	3,32
K ⁺	0,86
Na ⁺	6,50
Cl ⁻	13,0

Avant son utilisation, l'eau de dilution est aérée jusqu'à saturation en oxygène. Le pH est de $8,0 \pm 0,2$.

Les organismes utilisés pour les tests de toxicité ont été ramenés au laboratoire la veille des tests et ont été immédiatement immergés dans l'eau de dilution. La température de l'enceinte où se sont déroulées les expériences est de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Pour tous les bioessais, sont utilisés les petits âgés d'au moins 72 heures ; ceux-ci ci sont obtenus sur un tamis de 500 µm de diamètre.

c) Méthodologie des tests.

Les tests sont conduits dans des tubes à essais. Tout le matériel entrant en contact avec les solutions servant aux manipulations est en verre. La méthode est destinée à déterminer, dans les conditions bien définies par la norme, la concentration de la substance testée qui, en 24 et 48 h, inhibe (ou immobilise) 50% des daphnies mises en expérimentation.

Les solutions d'essais sont préparées à partir d'une solution mère à une concentration C_0 , choisie de telle façon que la majorité des solutions filles soient préparées à l'aide d'une même pipette.

Les métaux retenus pour cette partie de l'étude sont : le cadmium, le cuivre, le nickel et le zinc (sous forme de sulfates), tous analytiquement purs (produits Merck).

L'exactitude et le maintien des concentrations en ions métalliques sont vérifiés à l'aide d'un dosage par absorption atomique (modèle Pye Unicam). Les longueurs d'ondes utilisées pour ces éléments métalliques sont pour : Cd, 229 nm ; Cu, 325 nm ; Zn, 214 nm et Ni, 232 nm.

Les bioessais sont réalisés en deux phases, un essai préliminaire qui donne une indication approximative de la CI 50 et sert à déterminer la gamme de concentrations pour l'essai définitif.

Dans un tube à essai correspondant à une concentration donnée, C_i , de la substance, sont introduits successivement :

- le milieu d'essai jusqu'à obtention d'un volume de 9 ml (ce milieu correspond à la concentration C_i),
- après homogénéisation sont introduites 5 daphnies et le volume total est alors complété jusqu'à 10 ml avec le milieu d'essai
- chaque test comporte 4 répétitions pour une même concentration
- un test blanc (témoin) est réalisé parallèlement à chaque série d'essais.

Les tubes sont ensuite placés à l'obscurité dans une étuve à $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aux différents temps de lecture (24 et 48 heures), la mobilité des crustacés est déterminée par le dénombrement des daphnies mobiles. Les daphnies, qui sont incapables de se déplacer dans les 15 secondes suivant une légère agitation du récipient, sont considérées comme étant immobilisées, même si elles agitent leurs antennes.

A l'issue de chaque test, sont notés la concentration finale en oxygène dissous et le pH de chaque solution.

d) Contrôle de la sensibilité du réactif biologique.

Le contrôle du réactif biologique est réalisé avec à l'aide d'une solution de bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) appelée substance de référence dont la CI 50 est déterminée afin de vérifier l'homogénéité de chaque lot de *Daphnia magna*. Dans ce cas, la CI 50 doit être comprise entre 0,6 et 1,7 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot \text{L}^{-1}$.

Dans le témoin, le taux d'immobilisation doit être inférieur à 10%.

e) *Expression des résultats.*

Le calcul des CI 50 24 et 48 heures est réalisé à l'aide d'un logiciel utilisant la méthode probit (Lichtfield et wilcoxon, 1949) qui permet également le calcul des intervalles de confiance à 95% pour chaque CI 50.

L'analyse de la variance (test ANOVA) a fait apparaître entre les paramètres biologiques (les critères biologiques de suivi de la toxicité) une différence significative ou non significative.

Cette méthodologie, ainsi décrite, est appliquée pour tous les tests de toxicités aiguës, statiques et à laquelle ont été apportées des modifications pour le suivi des effets des paramètres environnementaux sur la toxicité de : Cd, Cu, Ni et Zn.

I.1.1.3.- Essais avec variation de la température.

Les essais sont menés aux températures 5, 10, 20 et 30°C. Les essais réalisés à 20 et 30°C ont lieu dans une étuve dont la température peut être aisément contrôlée. Un cryostat type MK 70 MLW a été utilisé afin d'assurer et de stabiliser les températures 5 et 10°C.

I.1.1.4.- Essais avec variation de la forme du métal.

Pour l'étude de la forme d'un métal ont été considéré les formes sulfates, chlorures, nitrates et/ou acétates de cadmium, cuivre, nickel et zinc. De telles formes seront données en détail au chapitre III, paragraphe III.1.2.-.

I.1.1.5.- Essais avec variation de la salinité.

Pour faire varier la salinité nous avons procédé aux ajouts de quantités de NaCl dans l'eau de dilution (ISO, 1989) dont la salinité est de 0,28 g NaCl.L⁻¹.

La salinité a été mesurée selon deux méthodes.

a) Méthode conductimétrique :

Celle-ci fait appel à un conductimètre type LN 302 de marque « Hydromat » dont la mesure permet l'évaluation de la salinité (Rodier, 1984), suivant la relation:

$$S \text{ ‰} = (0,08995) + (28,29720 R) + (1,2.80832 R^2) - (10,67869 R^3) + (5,98624 R^4) - (1,32340 R^5)$$

Où:

S : salinité en ‰ ou g NaCl.L⁻¹.

R : conductivité de l'échantillon / conductivité de l'eau (la conductivité de l'eau de mer est égale à 47,7 mS/cm).

b) Méthode volumétrique ou méthode de Mohr :

La méthodologie dans ce cas, est décrite dans l'ouvrage de Rodier(1984).

1.1.1.6.- Essais avec variation de la dureté.

Comme pour le paramètre salinité, nous avons fait varier la dureté des solutions à tester à partir d'une solution mère ayant la composition suivante : 0,800 g.L⁻¹ de NaHCO₃ ; 1,188 g.L⁻¹ de 1,188 g.L⁻¹ CaCl₂. 2H₂O ; 0,0104 g.L⁻¹ de K₂ SO₄ et 0,668 g.L⁻¹ de Mg Cl₂ .6H₂O Ce mélange est inspiré de la solution recommandée par la norme ISO (1989). Le choix de cette composition a été fait dans le but de maintenir constants les rapports Cd⁺⁺/Mg⁺⁺ et Na⁺/K⁺.

Les essais de toxicité avec Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺ sont réalisés selon la méthodologie proposée par la norme ISO (1989).

La dureté des solutions mères est vérifiée à l'aide de la méthode complexométrique à l'EDTA (Rodier, 1984).

1.1.1.7.- Essais en présence des agents complexants : NA₂ EDTA, acide humique et KH₂PO₄.

En vue de tester la toxicité de Cd, Cu, Zn et Ni sous formes complexées en utilisant *Daphnia magna*, nous nous sommes proposés d'étudier cet aspect à l'aide de trois agents complexants : Na₂EDTA, un acide (Aldrich Chemical Company) et les phosphates PO₄³⁻.

a) Préparation des solutions avec le NA₂ EDTA .

A partir d'une solution mère de Na₂ EDTA, nous avons procédé à des dilutions avec de l'eau de dilution (dont la composition est décrite dans le protocole de la norme ISO, 1989), afin de réaliser des solutions stocks de concentrations : 10⁻³; 10⁻⁴ et 10⁻⁵ M. Ces dilutions ont été appelées solutions A. Les solutions d'essais sont préparées par dilution d'une solution mère de Cd, Cu, Ni et Zn (sous forme sulfate) à laquelle sont ajoutés les volumes de la solutions A, correspondants à chaque concentration testée.

b) Préparation des solutions d'acide humique (Ha).

Une courbe d'étalonnage à l'aide d'un appareil type (Spectronic 710) a été établie (figure 5.-) afin de vérifier la concentration en acide humique dans les solutions.

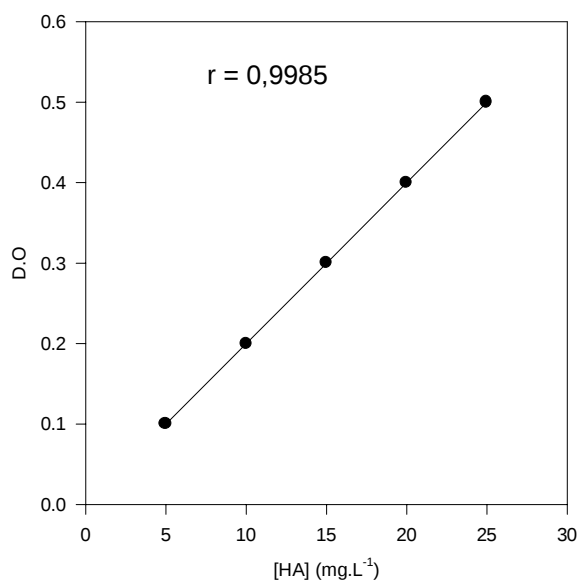


Figure 5.- Courbe d'étalonnage de l'acide humique.

Des solutions stocks contenant 10 et 15 mg d'acide humique par litre ont été préparées à l'aide de la solution de dilution de la norme ISO (1989). Les solutions destinées aux bioessais sont formées après dilution des solutions mères de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} . Les dilutions sont effectuées au moyen des solutions stocks retenant 10 mg Ha.L^{-1} ou 15 mg Ha.L^{-1} .

c) Préparation des solutions avec les phosphates PO_4^{3-} .

Dans cette partie, n'ont été considérés que : Cu, Ni et Zn, sous forme chlorures.

Les phosphates utilisés sont sous forme de KH_2PO_4 pour lesquels une concentration de 10^{-5} mole.L⁻¹ de KH_2PO_4 a été choisie. Nous signalons que cette concentration a déjà fait l'objet d'une étude sur la complexation du cadmium et du cuivre réalisée par Pommery et al. (1983).

Le milieu synthétique expérimental (ISO, 1989) pour lequel nous avons opté présente un minimum de risques de complexation dû aux ligands inorganiques. A cet effet, nous avons procédé à une vérification, en mesurant les concentrations métalliques dans l'eau bidistillée et dans l'eau synthétique en question. Une telle analyse n'a montré aucune différence significative ($P > 0,05$) entre les deux mesures.

L'exactitude et le maintien des concentrations initiales en métal (Cu, Ni et Zn) et de celles destinées aux tests ont été vérifiées trois jours après la mise en contact métal-ligand, ce temps étant proposé par Pommery et *al.* (1983).

Les formes des métaux employées dans ce cas sont :

- dans le cas du complexant Na₂ EDTA : forme sulfate.
- dans le cas de l'acide humique : forme sulfate.
- dans le cas du KH₂PO₄ : forme chlorure.

Pour cette étude n'ont été déterminés que la CI 50 24 h et ses intervalles de confiances, la détermination de ces dernières est décrite dans l'ouvrage de Finney (1971).

I.1.2.- Tests de toxicité aiguë dynamiques.

I.1.2.1.- Matériel.

L'installation expérimentale utilisée (figure 6.-) évite le plus possible le problème d'adsorption. L'unité étant constituée par des fioles coniques en verre d'une capacité d'un demi-litre. La circulation des solutions est réalisée avec un débit pour lequel nous n'avons observé aucun stress spécifique à l'écoulement. Le débit est réglé pour l'ensemble des expériences à une valeur moyenne de 11 ml.min⁻¹, ce qui assure un temps de renouvellement du milieu de 45,5 minutes. Dans les études menées par Brichon (1978) et Lauth et al. (1996), les débits sont fixés à 5 ml.min⁻¹ pour des tests sur *Cériodaphnia dubia* et à 17 ml.min⁻¹ pour un test poisson, considéré par le premier auteur. Nous précisons qu'une vérification du débit est effectuée régulièrement dans le temps.

L'apport continu des diverses solutions de contaminants est assuré par une pompe péristaltique multicanaux (type DP-2 – 2Nr 870 183). Les solutions sont amenées dans les fioles d'essais par des tuyaux capillaires. Les solutions de métaux sont préparées à partir de leur sel de sulfate, puis diluées dans l'eau synthétique (eau de dilution) décrite au paragraphe I.1.1.2.-.

Cette eau permet de simuler une eau naturelle de composition homogène en sels minéraux. Un cryostat, (type DK 22 Nr 54120) permet de maintenir la solution de distribution à 20°C. Un pH-mètre, (type MV 870 Nr 860378), a été à chaque fois utilisé pour la mesure du pH. Pour éviter la perte des daphnies dans la sortie d'eau, nous avons procédé au bouchage des orifices à l'aide de membranes (tissu à plancton), qui sont changées après chaque test.

L'analyse des concentrations métalliques est réalisée à l'aide d'un appareil d'adsorption atomique Pye Unicam SP9.

L'étude des cinétiques est effectuée sans interruption comme suit:

- Variation du temps d'écoulement des solutions contaminées ;
- Variation de la concentration du métal pour un temps d'écoulement constant ;
- Essai de détoxification par lavage du milieu contaminé.

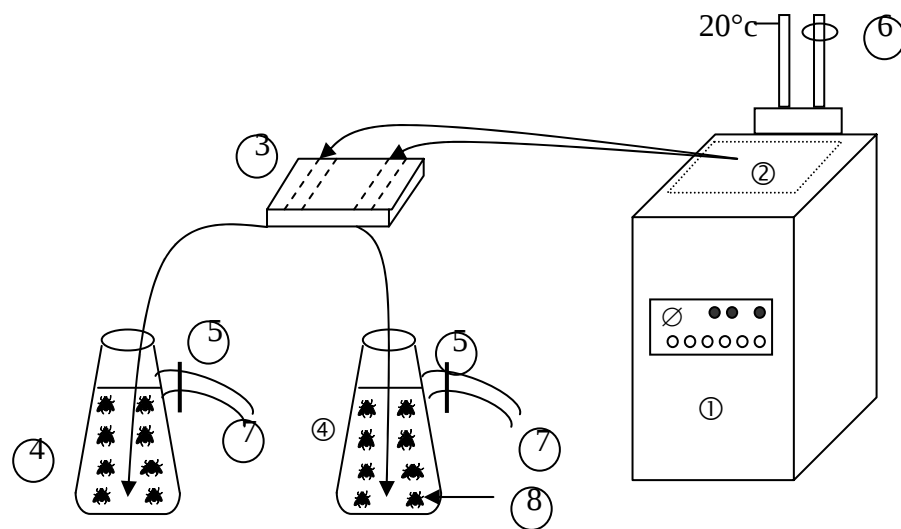


Figure 6.- Schéma du dispositif expérimental.

- Légende : 1 : Cryostat
- 2 : Solution stock (T = 20°C)
- 3 : Pompe péristatique
- 4 : Bacs d'essais
- 5 : Tissu à plancton
- 6 : Régulateur de température
- 7 : Sotie d'eau
- 8 : Daphnies

I.1.2.2.- Méthode.

Tous les essais sont réalisés en plein jour et répétés 3 fois. La température de la salle, exempte de toxiques est contrôlée en continue et est de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Les daphnies utilisées ont un âge qui ne dépasse pas 72 heures, elles sont obtenues par superposition de deux tamis de mailles respectives de 0,6 et 0,8 μm . Les daphnies choisies sont celles retenues sur le tamis de faibles dimensions.

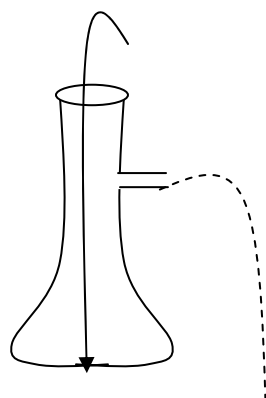
Avant chaque essai, les crustacés subissent une phase d'adaptation de 30 min à l'écoulement et à la solution synthétique non contaminée. Pour chaque test 30 daphnies bien sélectionnées sont introduites dans les unités expérimentales. Les dénombrements des daphnies mobiles sont réalisés dans des boîtes pétri, en prenant des fractions successives du volume total. Parallèlement à chaque essai, un témoin est considéré et l'homogénéité du lot de daphnies est vérifiée à l'aide d'un test aiguë (24 h) au bichromate de potassium.

C'est grâce à la programmation et à l'utilisation d'un grand nombre de flacons préalablement lavés à l'acide chlorhydrique et rincés plusieurs fois, que nous avons pu obtenir la fréquence des échantillons souhaités.

Selon la séquence programmée, nous préciserons dans les résultats expérimentaux le temps ou la durée d'exposition, la concentration du métal et le temps consacré au lavage. Connaissant le mode de fixation des métaux sur une phase solide, le suivi des concentrations retenues par le système « milieu d'essai daphnies » est effectué à partir de la concentration initiale à l'entrée et celle collectée à la sortie.

I.1.2.3.- Essais de détoxification.

Comme l'indique le schéma (figure 7.-), après avoir assuré le passage de l'eau de dilution pendant les temps ainsi mentionnés, les milieux traités sont testés à l'aide de 30 daphnies selon le même protocole que celui décrit, avec une durée de test de 30 min. Si nous considérons les variations des taux d'inhibition après 15, 30 et 60 minutes de lavage (figure 7.-), nous notons que cette opération suffit pour éliminer partiellement les effets de perturbations.



contamination par :

$$[M^{++}]_0 = 1 \text{ mg.L}$$

durée d'intoxication

t = 30 minutes

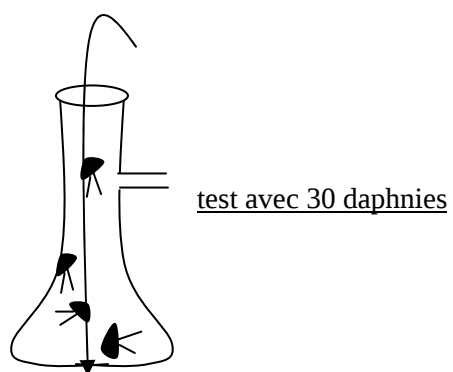
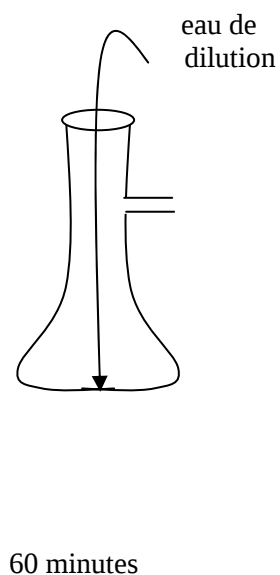
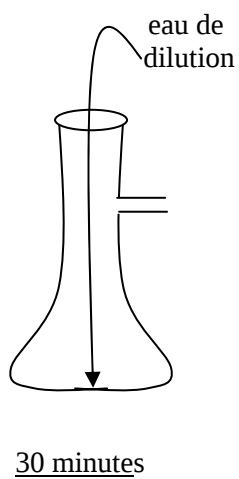
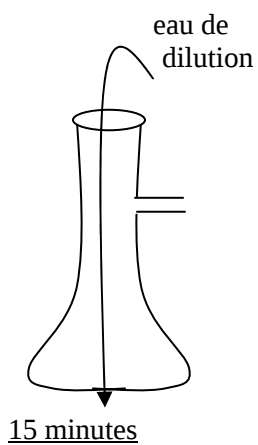


Figure 7.- Méthodes des essais de détoxification.

I.2.- Tests de toxicité aiguë et chronique : élevage des daphnies dans des conditions d'éclairage et de nourriture artificielles.

I.2.1.- Le matériel biologique.

La souche *Daphnia magna* utilisée est maintenue par reproduction parthénogénétique dans un aquarium de 5 litres, duquel nous prélevons des petits qui sont transférés dans des cristallisoirs de deux litres et où s'effectue réellement la culture des crustacés. L'ensemble des travaux (élevage et bioessais) se déroulent dans une chambre thermostatée à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Les organismes utilisés pour les tests de toxicité sont acclimatés pendant au moins trois générations (figure 8.-) à la nourriture et au milieu d'essai approprié.

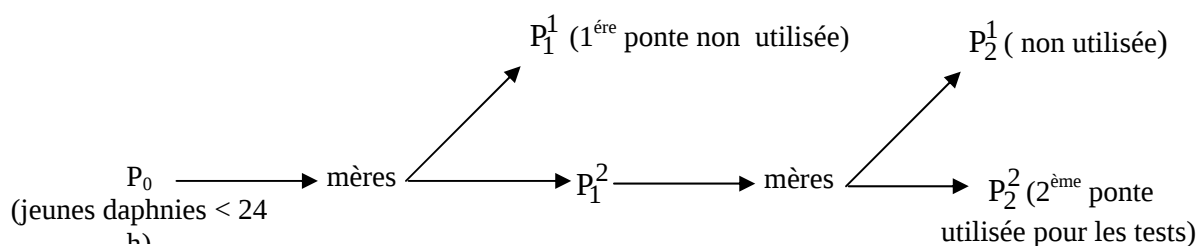


Figure 8.- Schéma de l'obtention des jeunes daphnies utilisés pour les tests.

I.2.2.- Définition de quelques termes usuels employés dans le test chronique.

- Daphnies mère : il s'agit des animaux présents au début du test et dont la reproduction est l'un des objectifs principaux du test.
- Progéniture : sont les jeunes daphnies vivantes, produites par les daphnies mères dans le test.
- LC50 (21 jours) : c'est la concentration du produit toxique susceptible de tuer 50% des organismes mis à l'épreuve et ce pendant 21 jours. Elle peut être déterminée par la méthode statistique proposée par Kooijman (1981).
- LOEC : (Lowest Observed Effect Concentration) : c'est la concentration la plus faible du produit testé qui cause un effet statistiquement significatif sur l'un des paramètres biologiques mesurés.

- NOEC : (No Observed Effect Concentration) : c'est la concentration du produit testé la plus élevée qui ne cause pas d'effet statistiquement significatif sur l'un des paramètres biologiques mesurés.

- Le taux intrinsèque d'accroissement naturel (r_m) : sous des conditions environnementales données, le r_m est déterminé à partir de l'équation décrite par Lotka, (1913) :

$$\sum_{x=0}^x I_x m_x e^{-r_m x} = 1$$

où : I_x : proportion de survie à l'âge x

m_x : nombre de jeunes par daphnie mère survivant à l'âge x .

Selon Myrand et De la Noue (1982), ce taux est défini comme étant le taux d'accroissement maximal que peut atteindre une population. Cette détermination est intéressante puisqu'elle intègre diverses caractéristiques (âge, fécondité, mortalité) qui conditionnent le pouvoir reproductif d'une espèce (Van Leeuwen et al., 1985a).

I.2.3- Milieux d'essais.

Les daphnies sont mises en culture dans un milieu oligo-Lefèvre- Czarda (norme AFNOR T 90304, 1980) qu'on notera désormais milieu LC, auquel on additionne un certain volume d'eau minérale (eau Saïda) dans les proportions 4/5 d'oligo-LC et 1/5 d'eau minérale.

Le milieu LC (Lefèvre-Czarda) est composé des solutions suivantes :

a- Solution de base

Cette solution est obtenue en mélangeant : la solution 1 (4 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ pour 100 ml H_2O distillée) ; solution 2 (10 g de KNO_3 pour 100 ml H_2O distillée) ; solution 3 (3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pour 100 ml H_2O distillée) et la solution 4 (4 g de K_2HPO_4 pour 100 ml H_2O distillée).

b- Solutions d'oligo-éléments.

* Solution oligo I composée de: 30 mg.L^{-1} de sulfate de cuivre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 60 mg.L^{-1} Heptamolybdate d'ammonium ; $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 60 mg.L^{-1} sulfate de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 60 mg.L^{-1} de chlorure de cobalt $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 60 mg.L^{-1} nitrate de manganèse $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et de 60 mg.L^{-1} d'acide citrique $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

* Solution oligo II contenant : $1,625 \text{ g.L}^{-1}$ de citrate de fer $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,625 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfate de fer $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et $0,625 \text{ g.L}^{-1}$ chlorure de fer $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

La pureté des produits utilisée est indiquée dans le tableau 5.-

La préparation d'un litre de milieu oligo-LC est réalisée en mélangeant 1 ml de chacune des solutions mères 1 à 4 ainsi que 0,5 ml des solutions oligo 1 et oligo 2 à 1000 ml d'eau distillée.

Ce milieu oligo-LC est utilisé pour l'élevage des daphnies et pour la culture des algues qui sert de nourriture à ces crustacés. Dans le cas de son emploi pour les algues, le milieu oligo-LC est stérilisé à l'autoclave à $120 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes. Le pH du milieu est de $7,1 \pm 0,1$. Dans le cas où le milieu oligo-LC est utilisé pour les daphnies on ne procède pas à la stérilisation. Nous devons vérifier et ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$ et ensuite le conserver à 4°C au maximum pendant 2 semaines.

c- Préparation du milieu LC/Eau minérale (Saïda).

Ce milieu est préparé le jour même de la mise en route des tests ou pendant les jours où sont effectués les changements des milieux d'élevage et donc des milieux d'essais. Ce milieu est réalisé en mélangeant l'eau minérale de commerce Saïda, et du milieu oligo-LC dans les proportions respectives des 4/5 et 1/5.

I.2.4.- Condition d'élevage des daphnies.

Les daphnies sont élevées dans une enceinte thermostatée à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, avec une lumière de 500 à 1000 lux et une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. L'élevage est réalisé selon la structure suivante :

- un aquarium de 5 litres pour l'élevage stock.
- 4 cristallisoirs de 1 litre de milieu d'essai, contenant des daphnies filles de moins d'un mois.
- 2 cristallisoirs, de même contenance, contenant des daphnies mères âgées de un à deux mois.

Nous couvrons tous les cristallisoirs à l'aide d'un plastique transparent de quelques millimètres d'épaisseur. L'élevage est renouvelé toutes les quatre semaines à partir des cristallisoirs de daphnies mères ayant environ 1 mois. Les jeunes daphnies utilisées pour

Tableau 5.- Caractéristiques des produits utilisés.

Formules chimiques	Origine	Pureté %
Ca(NO ₃).4H ₂ O	Merck	99
KNO ₃	Merck	99
MgSO ₄ .7H ₂ O	Panreac	99
K ₂ HPO ₄	Merck	99
(NH ₄)MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	Normapur	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Fluka	99,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	Merck	99
Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Fluka	98,5
C ₆ H ₈ O ₂ .2H ₂ O	Panreac	
C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	Fluka	
FeSO ₄ .7H ₂ O	Normapur	99
FeCl ₃ .6H ₂ O	Panreac	99
3 CdSO ₄ .8H ₂ O	Merck	99
K ₂ Cr ₂ O ₇	Merck	99
NiSO ₄ .6H ₂ O	Merck	99
CaCl ₂ .2H ₂ O	Panreac	99
CuSO ₄ .5H ₂ O	Fluka	99
NaHCO ₃	Fluka	99
KCl	Fluka	97

les tests sont issues de mères ayant au moins 1 mois, ce qui évite les problèmes liés à l'emploi des premières pontes (faible poids sec).

Les changements de milieu et la nourriture des daphnies s'effectuent les samedi, lundi et mercredi. La nourriture impliquée dans notre étude est constituée de cellules vivantes d'algue, *Scenedesmus sp*, à raison de 10⁵ cellules /daphnie. jour. Ce type d'algue a été le choix de certains auteurs (Claus, 1976 ; Lampert, 1986 ; Kühn, 1989a ; Münzinger, 1991 et De Meester, 1993) pour leurs cultures de *Daphnia magna*.

Nous avons également additionné, aux milieux d'essais et d'élevage, de la levure de pain ou de boulanger, préparée de la manière suivante :

- Dans 1 litre d'eau bidistillée, 5 g de levure de pain granulée sont mélangés à faible vitesse pendant 5 min. 300 ml du surnageant sont prélevés après une décantation de la solution pendant 12 heures au moins à 4°C. 250 µl/daphnie. jour du surnageant sont fournis aux daphnies et même lors des tests.

I.2.5.- Culture de *Scenedesmus* sp.

La souche de base nous a été fournie par l'ISMAL (Institut des Sciences Maritimes et de l'Aménagement du Littoral), qui elle même provient d'un laboratoire de recherche en aquaculture de l'université de Gand (Belgique).

Cette algue est maintenue en culture dans une chambre thermostatée à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Elle reçoit un flux lumineux de 500 à 1000 lux, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. La préparation des algues s'effectue en plusieurs étapes. Celles-ci débutent par un ensemencement d'erlens de capacité 250 ml contenant 90 ml de milieu LC (stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min) avec 10 ml d'une culture précédente âgée de 7 jours. Pour cela, nous prélevons 10 ml d'une ancienne culture que nous plaçons dans 90 ml de milieu LC. Le mélange ainsi réalisé est laissé sept jours en culture sur une table d'agitation. Cette culture mère (des erlens) est utilisée pour l'ensemencement d'un ballon contenant 900 ml de LC. La durée de la culture fille est de huit jours. L'inoculum représente toujours 10% du volume final. L'ensemencement est réalisé dans des conditions stériles. les cultures filles (ballons) sont aérées continuellement pendant huit jours (dans la pièce thermostatée). Après huit jours, les ballons sont mis au repos à 4°C et après décantation des algues au fond du ballon, le surnageant est éliminé par siphonage. L'étape finale consiste à dénombrer au microscope les cellules d'algues contenues dans un volume défini à l'aide d'une cellule de Mallassez.

I.2.6.- Conduite de l'essai chronique.

Le test consiste en l'exposition de jeunes daphnies (daphnies mères) âgées de moins de 24 heures, pendant 21 jours à des concentrations croissantes de la substance à testée. Le nombre moyen de jeunes daphnies issues d'une daphnie mère pour chaque concentration testée est comparée au nombre de daphnies produites par daphnie mère dans le témoin.

Les essais sont réalisés dans des bêchers en verre de 250 ml.

a- Préparation des solutions des substances d'essais.

Nous préparons une solution mère, en dissolvant une certaine masse x (correspondant à la concentration désirée) dans l'eau distillée à partir de laquelle nous effectuons des dilutions à l'aide du milieu LC/eau minérale. Les sels de métaux utilisés sont : $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NiSO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

La gamme de concentration est choisie d'après les données bibliographiques et un témoin est réalisé parallèlement à chaque essai. Les tests sont conduits sur une période de 21 jours.

b- Méthodologie des tests.

L'essai est conduit dans des conditions semi-statiques. le renouvellement du milieu et l'apport de la nourriture (algues + levure) sont effectués trois fois par semaine (samedi, lundi et mercredi).

Le démarrage d'un test se fait avec une seule daphnie, introduite individuellement dans un bêcher contenant 100 ml du milieu (LC/eau minérale), pour chaque test 10 individus (10 répétitions) par concentration sont exposées aux toxiques, ainsi que pour le témoin. L'éclairement est artificiel avec une intensité lumineuse de 500 à 1000 lux. et la photopériode est de 16 h de lumière et 8 heures d'obscurité. Tous les essais sont réalisés dans une chambre thermostatée à $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les récipients d'essai ne sont pas aérés nous couvrons d'ailleurs chaque bêcher à l'aide d'un papier plastique transparent (de très faible épaisseur). Les daphnies utilisées au début de l'essai sont âgées de 0 à 24 heures. Tous les deux jours, lors du renouvellement des milieux, les daphnies mères prélevées sont transférées dans des milieux frais, préparés à l'avance avec la nourriture appropriée. Pour ce transfert, nous nous servons d'un tube en verre d'un diamètre de 3 à 5 mm muni d'une pipette. Le volume du milieu transféré ne dépasse pas 2 ml. Pour chaque récipient, la progéniture est dénombrée et éliminée à chaque changement du milieu. Les mortalités éventuelles des daphnies mères sont également notées. Nous relevons régulièrement le pH de toutes les solutions que nous préparons. L'oxygène dissous est vérifié dans certaines conditions, mais à aucune mesure il ne semble s'écarter des normes c'est à dire $< 2 \text{ mg.L}^{-1}$.

c- Clauses de validité d'un test chronique. Pour que le test de toxicité chronique soit valable, il faut que les critères suivants, pour le témoin, soient respectés (OCDE, 1991) :

- la mortalité des daphnies mères doit être inférieure ou égale à 10%, après 21 jours de test.
- le nombre moyen de jeunes daphnies produites par daphnies mère doit être supérieur ou égal à 60 à la fin de l'essai.

I.2.7.- Expressions des résultats.

a- Test aiguë.

Les CI50 24 et 48h sont déterminées par la méthode « Probit » décrite dans l'ouvrage de Finney (1971).

Les CI50 sont comprises entre deux valeurs limites et varient dans un intervalle de confiance de 95% (Wilcoxon et Lichtfield, 1949).

b- Test de toxicité chronique.

De façon générale, l'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide de tests de comparaison multiple qui fait appel à l'analyse de la variance ANOVA.

A l'aide du test de Newman-Keuls, qui permet la recherche de groupes de traitements homogènes, nous avons identifiés les traitements dont les effets sont différents.

Les LOEC et NOEC ont été déduites ou déterminées à partir de tests appropriés, test de Dunnett et test de Bonferroni. La méthode de Bonferroni est utilisée comme une alternative de la procédure de Dunnett ; celle-ci est très utilisée pour la détermination de la NOEC. Elle consiste en une analyse de la variance (ANOVA) pour comparer chaque traitement à l'essai témoin. Cette analyse exige au moins trois répétitions. Néanmoins, les mortalités des daphnies mères dans les essais de toxicité conduit à un nombre inégal de répétitions pour les essais initiés avec la répétition de 10. Le test de Bonferroni a été, donc, considéré pour l'analyse de tels résultats comme une alternative de la procédure de Dunnett. Cette analyse statistique est réalisée à l'aide d'un programme approprié

I.3.- Tests sur le comportement phototactique de *Daphnia magna*

I.3.1.- Matériel biologique.

L'espèce *Daphnia magna* que nous avons testée appartient aux laboratoires d'écologie animale de l'université de Gand et au laboratoire d'écologie et d'aquaculture de l'université de Leuven (Louvain). Nos travaux de recherche se sont déroulés dans ces deux institutions où le système de clonage de *Daphnia magna* assure une production abondante de ce crustacé positivement phototactique nommé, C_{1 34}, et qui a été isolé en 1989. Les daphnies primitives de ce clone proviennent de la région de Citadelpark (City pond) de la ville de Gand.

I.3.2.- Elevage des daphnies.

Les différentes daphnies femelles parthénogénétique du clone C_{1 34} sont maintenues en élevage dans des flacons en verre de contenance 1 litre dans une chambre thermostatée à $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, avec un éclairage de 14 h de lumière et 10 h d'extinction automatique de la lumière. Les milieux d'élevage sont renouvelés quotidiennement avec remplacement d'un quart du volume du récipient par un milieu fraîchement préparé. Les daphnies sont nourries

à l'aide de l'algue *Scenedesmus acutus* dont la culture est conduite de manière presque similaire à celle décrite paragraphe I.2.6.-. Les daphnies reçoivent une ration d'algues d'environ 2.10^5 cellules/ml.j et le milieu d'élevage est une eau déchlorée. La progéniture est éliminée et ne sont maintenues dans le système de clonage que les daphnies d'environ 10 jours, avec une densité de 20 à 30 femelles par litre.

I.3.3.- Matériel.

Pour cette étude a été utilisé un biocapteur fonctionnant avec un débit d'environ 10 ml.min^{-1} , (figure 9.-) est lié à une pompe péristaltique type DK22.

La colonne (figure 9.-) d'une hauteur de 10 cm et d'un diamètre interne de 5 cm, comporte au fond et au sommet deux disques de filet à plancton, afin d'empêcher la sortie des daphnies.

Le tube cylindrique (colonne) qui correspond au biocapteur, est divisé en 4 sections de 2.5 cm chacune (U, M₂, M₁ et L). Lors du test, La colonne est placée dans une boîte en PVC de couleur grise (16 x 28 x 35 cm), muni d'un trou de diamètre $\varnothing = 1\text{cm}$, qui permet les observations comportementales des daphnies dans la colonne, lors des tests. Le comportement phototactique est caractérisé par un index symbolisé par I.

$$I = 2(U-L) = 100 \frac{(U-L)}{50} \quad (\text{De Meester, 1993})$$

Où : U et L, représentent les nombres de daphnies dans ces différents compartiments de la colonne.

I.3.4.- Méthodes des essais.

Dans un premier temps, notre objectif a été de réaliser des tests avec renouvellement du milieu en utilisant 10 daphnies par test, ayant chacune un âge d'environ 10 jours. Les daphnies qui nous ont paru faibles n'ont pas été sélectionnées pour les tests. Les variations du comportement sont enregistrées pendant 4 heures et, parallèlement à chaque, test 10 daphnies témoins ont été considérées. L'expérience dure 10 minutes en présence de lumière et pour chaque minute d'intervalle sont comptées, par observations à travers le trou ($\varnothing = 1\text{cm}$), les animaux dans les compartiments U, M₂, M₁ et L. Suite à ce comptage, nous procédons à l'extinction de la lumière afin d'adapter les daphnies à 20 min d'obscurité.

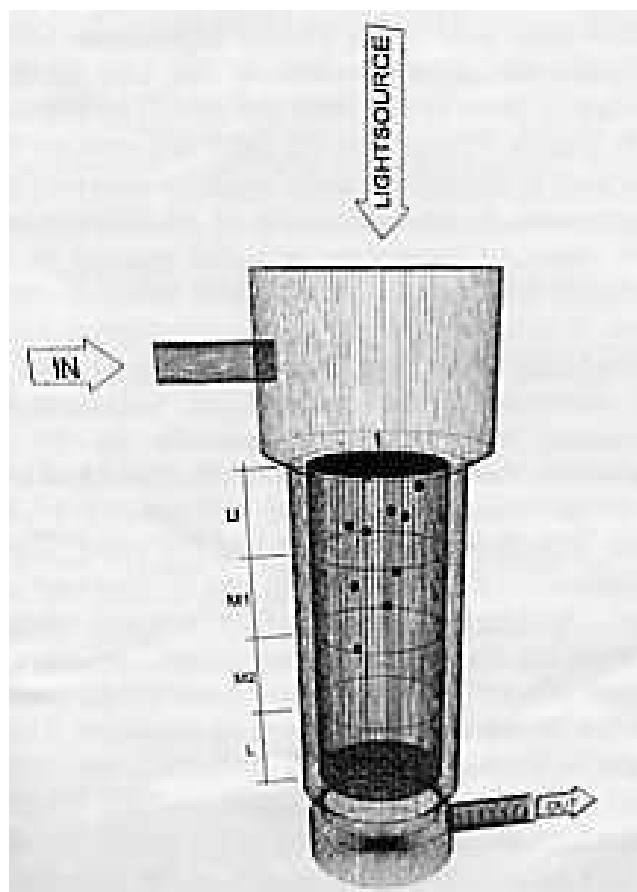


Figure 9.- Dispositif expérimental.

La durée d'une lecture est donc égale en totalité à 30 min. On ne considère, toutefois, que les résultats des cinq dernières min en pensant qu'un stress pourrait être dû aux premiers temps d'éclairage.

Toutes les expériences, dans la première étape de ce travail, ont été conduites dans le milieu d'élevage.

Nous débutons les tests à 13 h, afin de minimiser les rythmes endogènes de daphnies (De Meester, 1993b).

Selon De Meester (1991), l'absence de nourriture n'affecte pas l'effet phototactique des daphnies et ce, pour une durée de temps ne dépassant pas cinq heures. Une étape d'acclimatation de 3 à 4 h des daphnies aux solutions d'essais précède chaque test ; pour cela, 10 daphnies sont immergées et isolées dans un bêcher de 250 ml contenant 200 ml des solutions servant aux tests. Les expériences, excluant la nourriture algale élimine le risque d'adsorption du cadmium sur les particules de *Scenedesmus*.

Nous précisons que chaque essai est répété 4 à 6 fois . Pour la première série de tests, le sulfate de cadmium ($8 \text{ CdSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a été utilisé pour réaliser les dilutions correspondant aux concentrations : $0.01 \text{ mg Cd}^{++} \cdot \text{L}^{-1}$ et $0.06 ; 0.2 \text{ et } 0.4 \text{ mg Cd}^{++} \cdot \text{L}^{-1}$. Les solutions sont préparées avec de l'eau distillée dont les concentrations sont vérifiées à l'aide d'un spectromètre de masse à plasma (PQ + VG Elemental).

Les daphnies ayant subi une adaptation à la solution test sont transférées, à l'aide d'un tube en verre de diamètre 0.5 cm et d'une propipette, dans la colonne où elles demeurent 20 min dans l'obscurité, après ce temps nous procédons à l'éclairage pendant 10 min. Ensuite nous réalisons le comptage des daphnies attirées par la lumière et c'est ce phénomène de migration dans le sens de la lumière qui met en évidence l'effet phototactique positif des daphnies. Les valeurs de I sont comprises entre -1 (effet phototactique négatif) et +1 (effet phototactique positif). De Meester (1991) considère les daphnies phototactique positives, pour $0,5 < I < 1$.

Pour la seconde étape sont précisées, au chapitre résultats et discussion (paragraphe III.3.1.- et III.3.2.) les modifications apportées aux conditions opératoires. Toute la pratique expérimentale s'est déroulée dans une chambre thermostatée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

I.4.- Tests sur l'activité épuratrice d'une boue activée.

I.4.1.- Matériel.

Le dispositif expérimental utilisé est un réacteur fonctionnant en semi continu. Cet appareillage est constitué de quatre cellules permettant chacune l'introduction de 2,5 litres de boues. Chaque cellule est munie d'un diffuseur d'air injectant celui-ci à un débit de $0,15 \text{ l.h}^{-1}$. A l'intérieur du système est assurée une concentration en oxygène dissous de l'ordre de 2 à 3 mg.L^{-1} . Les mesures de pH sont faites à l'aide d'une électrode type Orion (modèle 401). Le pH du milieu est inférieur à 8 dans tous les cas, évitant ainsi les phénomènes de précipitation du Cr^{3+} . L'âge des boues est fixé à 6 jours, déduit d'une purge quotidienne de liqueur mixte de 416 ml.

I.4.2.- Méthode.

Le substrat utilisé pour l'alimentation du réacteur est un produit alimentaire appelé Nutra-force et qui est représentatif de la composition chimique (tableau 6.-) moyenne d'une eau usée.

La composition de l'eau usée synthétique est :

- DBO_5 : 960 – 1080 mg.L^{-1} (demande biologique en oxygène sur 5 jours)
- MES < 20 mg.L^{-1} (matière en suspension)
- DCO : 1800 – 2000 mg.L^{-1} (demande chimique en oxygène)

Tableau 6.- Analyse nutritive du Nutra-force.

Substances	%	Substance	%
Protéines	24,5	Calcium	0,900
Lipides	5,5	Phosphore	0,855
Glucides	5,5	Fer	0,025
Ac.linoalique	2,5	Iode	0,001
Vitamines B6, B12, C	0,054	Magnésium	0,375
Riboflamines	0,001	Cuivre	0,003
Niacines B3	0,035	Zinc	0,010
Ac.folique	0,002	Potassium	1,210
Biotine	0,001	Manganèse	0,005
D-Pantothanate	0,002	Sodium	0,640

Le chrome (Cr^{3+}) est additionné dans l'alimentation sous forme chlorure de $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Les concentrations en Cr^{3+} choisies sont : 0 ; 5 ; 75 ; 100 ; 150 et 200 mg.L^{-1} . Les différentes concentrations en toxique sont injectées en début d'expérience, puis sont suivies les cinétiques d'élimination de la DCO et de la DBO_5 pour les concentrations en boues activées données. Dans le cas du test prolongé (20 jours), les injections du toxique sont réalisées quotidiennement dans la même liqueur mixte. Pour les essais à court terme, les prélèvements sont effectués à des intervalles de temps de 20 min pendant 1 heure, puis un prélèvement toutes les heures jusqu'à 4 h de test. Le test d'adaptation comporte 6 échantillonnages répartis dans le temps comme suit : 0, 1, 2, 8, et 20 jours.

A cours du temps, des échantillons de 50 ml chacun sont soutirés du milieu réactionnel. Sur le surnageant sont effectuées les analyses concernant la DCO et le chrome. La DCO est dosée suivant la méthode au bichromate de potassium (Rodier, 1984). Le chrome est analysé à l'aide d'un appareil photométrique d'absorption atomique (type Perkin Elmer), à une longueur d'onde de 357.9 nm. Sur le même échantillon, les MES et MVS de la liqueur mixte sont déterminées respectivement par évaporation à 110°C, puis calcination à 500°C.

I.5.- Tests sur *Lemna minor* et *Salvinia natans*

I.5.1- Matériels biologiques : *Lemna minor*, *Lemna polyrhiza* et de *Salvinia natans*.

Les échantillons de *Salvinia natans* collectés sur leur site, au jardin botanique de Nancy sont placés dans des bêchers en verre de 500 ml et ont été transplantés au laboratoire dans des conditions strictement artificielles. De la même manière, nous avons procédé à l'échantillonnage de *Lemna polyrhiza*. *Lemna minor* nous a été fournie d'un clonage cultivé au laboratoire d'environnement de l'Université de Chambéry où elle était maintenue dans des conditions artificielles. Tous les échantillons ont été transportés à $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Le milieu de maintien de ces plantes au laboratoires est basé sur celui de Hoagland légèrement modifié.

I.5.2.- Conditions de culture.

Les réactifs que nous citerons pour la préparation des milieux sont tous de pureté analytique reconnue et proviennent de Sigma Chemical Co (Sigma Aldrich Chimie). L'eau utilisée est l'eau Milli Q.

I.5.2.1.- Préparation des solutions mères

Cette solution est composée de : 11,8 g.L⁻¹ de nitrate de calcium (S₁): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 10,11 g pour 100ml de nitrate de potassium (S₂) : KNO_3 de 12,33 g pour 100 ml sulfate de magnésium (S₃): $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 6,8 g pour 100 ml d' dihydrogénophosphate de potassium anhydre KH_2PO_4 (S₄) et de 30,37 g.L⁻¹ de sulfate de fer (S₅) : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Ces solutions, sauf S₅, peuvent être conservées à 4°C à l'obscurité ; S₅ est préparée avant chaque usage.

1.5.2.2.- Préparation des solutions d'oligo-éléments.

Solutions (S₆), cette est obtenue en mélangeant : 2,86 g.L⁻¹ d'acide borique : H₃BO₃ ; 1,55 g.L⁻¹ de sulfate de manganèse : MnSO₄.7H₂O ; 0,22 g.L⁻¹ de sulfate de zinc : ZnSO₄.7H₂O et de 0,079 g.L⁻¹ de sulfate de cuivre : CuSO₄.5H₂O.

Solutions (S₇), cette solution est composée de : 2,86 g.L⁻¹ d'Heptamolybdate d'ammonium (NH₄)₆ MO₇ O₂₄.4 H₂O ; 229,6 mg.L⁻¹ de NH₄VO₃ ; 96 mg.L⁻¹ de CrK (SO₄)₂.12 H₂O ; 47,85 mg.L⁻¹ de NiSO₄.7 H₂O ; 49,3 mg.L⁻¹ de Co (NO₃)₂. 6H₂O et de 17,94 mg.L⁻¹ de Na₂WO₄.2H₂O.

1.5.2.3.- Préparation du milieu d'essai et de culture.

Ce milieu est préparé en mélangeant : 100 ml de S₁ ; 5 ml de S₂ ; 4 ml de S₃ ; 1 ml de S₄ ; 1 ml de S₅ ; 1 ml de S₆ et 1 ml de S₇ dans 1000 ml d'eau MilliQ.

Ce mélange subit une filtration sous vide sur 0,22 µm. Le pH du produit ainsi obtenu est de 5.5 environ. Nous préparons ce milieu juste avant son emploi.

Trois cristallisoirs de deux litres ont servi aux cultures stocks de chaque plante. Les cultures filles, prélevées des cristallisoirs de mise en route de ces cultures, sont transplantées dans des bêchers de 250 ml. Chaque récipient est couvert d'un papier plastique (papier cuisine), transparent et d'environ 0,5 mm d'épaisseur. Ce plastique protecteur, légèrement troué, est utilisé afin d'empêcher certains dépôts solides dans les solutions et faciliter le passage d'air.

L'éclairement fourni sous lumière blanche continue est de 4000 ± 500, lux pour une photopériodique de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité.

La température de la salle de culture est d'environ 25°C. Pour les tests, nous avons préféré immerger les flacons d'essais dans un bac muni d'un dispositif régulateur de température, qui permet d'obtenir dans les récipients d'essai une température de 25 ± 1 °C.

La salle d'expérimentation est exempte de vapeurs et de poussières toxiques. La densité des plantes dans les solutions de culture et d'essais est de 10 colonies de deux feuilles par 150 ml dans le cas de culture et de 5 colonies de deux feuilles dans les solutions destinées à la réalisation des tests.

Les solutions et les plantes sont maintenues en conditions « axéniques » afin d'empêcher le développement des micro-algues. L'entretien est assuré par repiquage régulier tous les 14 jours, de colonies de deux feuilles dans le milieu de culture.

1.5.2.4.- Essais de toxicité

Pour nos essais, nous avons utilisé les plantes à partir d'au moins la deuxième génération (sélectionnées 48 heures avant l'essai) d'une culture âgée de 14 jours. Des colonies de deux feuilles de taille égale sont repiquées dans les solutions d'essais, puis placées dans les conditions d'éclairage continu (dans le cas des tests de toxicité) et à une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les tests ont lieu dans des bêchers de contenance 250 ml, contenant chacun 100 ml de solution d'essai dans lesquelles sont immergées 5 colonies (10 feuilles), échantillonnées lors du changement que nous effectuons tous les 14 jours sur les cultures. Pour les essais, nous sélectionnons des feuilles entières ne comportent aucune nécrose.

Chaque expérience comporte trois répétitions, et l'analyse statique est réalisée (analyse de la variance, ANOVA) à l'aide d'un logiciel Minitab.

Chapitre III.- Résultats et discussion.

III.1.- Etude de la toxicité aiguë de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} à l'aide de *Daphnia magna* : élevage dans des conditions homogènes naturelles.

III.1.1.-Effet de la température.

Les résultats du tableau 7.- montrent que la toxicité aiguë de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} aux différentes températures 5, 10, 20 et 30°C varie. Ces résultats sont exprimés en CI 50 24 et 48 h.

La conformité de chaque lot de daphnies est vérifiée au moyen du test au bichromate de potassium. Les résultats exprimés en CI 50 24 heures (mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot \text{L}^{-1}$) sont tous comparables avec une CI 50 24 heure comprise entre 0,9 et 1,28 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Ce résultat montre l'homogénéité des daphnies et leur conformité aux exigences de la norme ISO (1989).

Nous soulignons le fait que toutes les daphnies utilisées, dans ce chapitre, présentent la même sensibilité au bichromate de potassium.

En considérant les résultats obtenus à 20°C des CI 50 24h et 48h (tableau 7.-) , il s'avère que le degré de toxicité varie, pour les deux durées de test, dans l'ordre de toxicité croissante, Zn^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} et Cd^{++} . Nous notons qu'un tel classement a été obtenu par Persoone et *al.* (1989), bien que leurs conditions expérimentales soient différentes des nôtres. Pour la même température d'essai (Khangarot et Ray, 1987 ; Vardia et *al.*, 1988 et Milan et *al.*, 1995) montrent à l'aide de *Daphnia magna* que Cu^{++} est plus toxique que Zn^{++} . Selon Bellaver et Gorbi, (1981), la toxicité du cuivre, exprimée en CI 50 24h, est égale à 0,05 $\text{mg Cu}^{++} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, plus faible que celle obtenue dans nos bioessais. Jouany et *al.* (1977) obtiennent une CI 50 24h égale à 0,03 $\text{mg Cd}^{++} \cdot \text{L}^{-1}$ qui marque une toxicité de cadmium plus grande que celle démontrée dans nos travaux. L'évaluation de la toxicité de ce même métal, réalisée par Bellaver et Gorbi (1981) indique une CI 50 24h égale à 0,12 $\text{mg Cd}^{++} \cdot \text{L}^{-1}$. Le zinc, selon notre méthodologie expérimentale, s'est révélé moins toxique que celui testé dans les conditions expérimentales adoptées par Bessi (1988). En effet, les CI 50 24h sont égales respectivement à 12,5 mg et 0,573 $\text{mg Zn}^{++} \cdot \text{L}^{-1}$, ce qui montre une différence importante entre ces deux résultats.

Tableau 7.- Toxicité aiguë de Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺ aux températures de 5, 10, 20 et 30°C (tests sur *Daphnia magna*).

Ions métalliques	CI50 24 heures (mg cation/L)				CI50 48 heures (mg cation/L)			
T (°C)	5	10	20	30	5	10	20	30
Cd ⁺⁺	0,035 $\left(\begin{array}{c} 11,9x+0,06 \\ 0,8888 \end{array} \right)$	0,05 $\left(\begin{array}{c} 0,26x+0,41 \\ 0,8912 \end{array} \right)$	0,065 $\left(\begin{array}{c} 17,51x-0,63 \\ 0,8994 \end{array} \right)$	0,02 $\left(\begin{array}{c} 11,29x+0,24 \\ 0,8888 \end{array} \right)$	0,003 $\left(\begin{array}{c} 58,44x+0,34 \\ 0,9631 \end{array} \right)$	0,007 $\left(\begin{array}{c} 11,19x+0,42 \\ 0,9553 \end{array} \right)$	0,005 $\left(\begin{array}{c} 18,79x+0,42 \\ 0,8835 \end{array} \right)$	0,0016 $\left(\begin{array}{c} 45,2x+0,43 \\ 0,8999 \end{array} \right)$
Cu ⁺⁺	0,034 $\left(\begin{array}{c} 10,29x+0,15 \\ 0,9764 \end{array} \right)$	0,105 $\left(\begin{array}{c} 5,63x-0,054 \\ 0,9813 \end{array} \right)$	0,105 $\left(\begin{array}{c} 5,68x-0,04 \\ 0,9813 \end{array} \right)$	0,02 $\left(\begin{array}{c} 8,24x+0,34 \\ 0,9762 \end{array} \right)$	0,008 $\left(\begin{array}{c} 20,78x+0,34 \\ 0,9762 \end{array} \right)$	0,026 $\left(\begin{array}{c} 5,42x+0,33 \\ 0,9846 \end{array} \right)$	0,032 $\left(\begin{array}{c} 9,47x+0,23 \\ 0,8995 \end{array} \right)$	0,003 $\left(\begin{array}{c} 12,4x+0,47 \\ 0,9963 \end{array} \right)$
Zn ⁺⁺	4,8 $\left(\begin{array}{c} 0,086x+0,15 \\ 0,9843 \end{array} \right)$	9,0 $\left(\begin{array}{c} 0,086x-0,28 \\ 0,9910 \end{array} \right)$	12,5 $\left(\begin{array}{c} 0,08x-0,45 \\ 0,9910 \end{array} \right)$	1,40 $\left(\begin{array}{c} 0,08x+10,36 \\ 0,9810 \end{array} \right)$	1,6 $\left(\begin{array}{c} 0,11x+0,24 \\ 0,9900 \end{array} \right)$	3,5 $\left(\begin{array}{c} 0,11x+0,14 \\ 0,9673 \end{array} \right)$	4,40 $\left(\begin{array}{c} 0,10x+0,14 \\ 0,9980 \end{array} \right)$	0,68 $\left(\begin{array}{c} 0,28x+0,31 \\ 0,9899 \end{array} \right)$
Ni ⁺⁺	2 $\left(\begin{array}{c} 0,19x+0,08 \\ 0,9932 \end{array} \right)$	5,5 $\left(\begin{array}{c} 0,065x+0,11 \\ 0,9799 \end{array} \right)$	8,0 $\left(\begin{array}{c} 0,078x-0,076 \\ 0,9871 \end{array} \right)$	0,88 $\left(\begin{array}{c} 0,13x+0,36 \\ 0,9678 \end{array} \right)$	0,42 $\left(\begin{array}{c} 0,5x+0,29 \\ 0,9662 \end{array} \right)$	2,8 $\left(\begin{array}{c} 0,079x+0,28 \\ 0,9901 \end{array} \right)$	2,0 $\left(\begin{array}{c} 0,2x+0,1 \\ 0,9231 \end{array} \right)$	0,18 $\left(\begin{array}{c} 0,52x+0,37 \\ 0,9900 \end{array} \right)$

* Les paramètres entre crochets indiquent l'équation de régression (détermination des CI50) ainsi que son coefficient de corrélation.

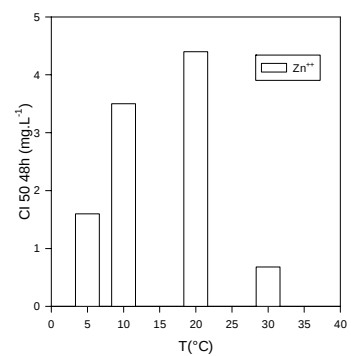
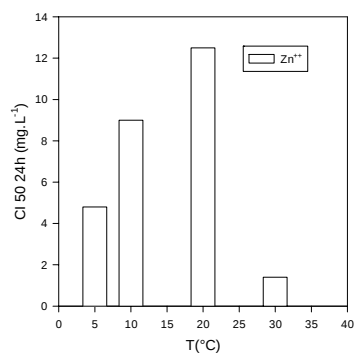
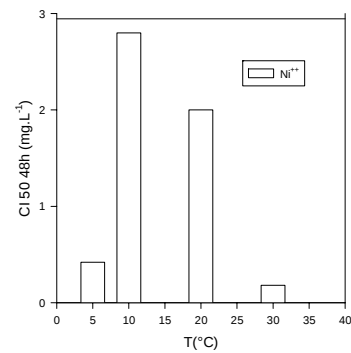
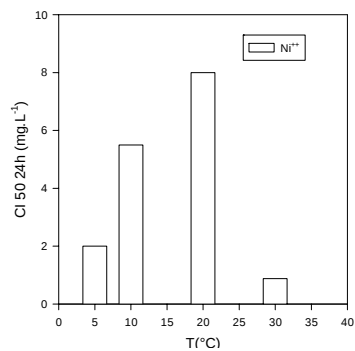
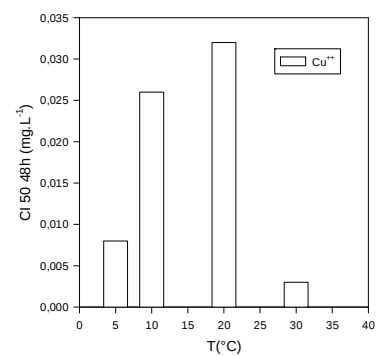
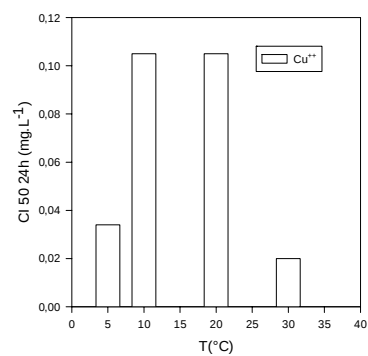
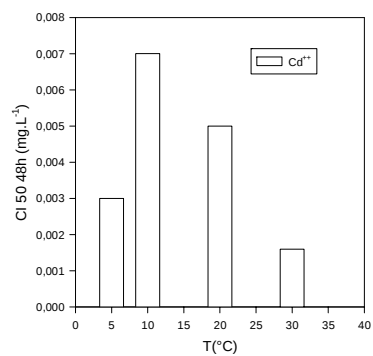
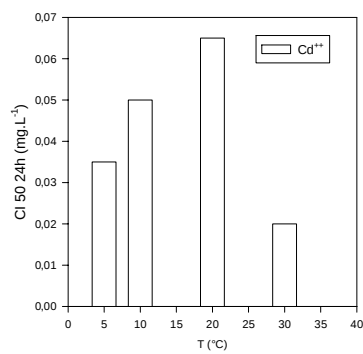
Nous pensons que ces variations des résultats bibliographiques quant à la sensibilité de *Daphnia magna* par rapport à la toxicité métallique, peuvent être imputables à : la dureté de l'eau (Pagenkope, 1986), à la température de l'eau, aux techniques de culture (Cowgill, 1987), autant qu'aux caractéristiques physiologiques des organismes. Goss (1980) a rapporté qu'à 4 et 35°C, *Daphnia magna* se trouve dans une situation de stress critique et reste immobilisée. Les résultats du tableau 7.- montrent que la température n'a aucun effet sur le classement par ordre de toxicité décroissante de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} .

Le profil des variations CI 50 24h et CI 50 48h (figures 10.-) aux différentes températures considérées ainsi que l'analyse de la variance des CI 50 24 et 48heures montrent une différence signification ($P < 0,05$) dans les cas du cadmium, du nickel et du zinc.

Afin de comparer les CI 50 24 et 48h du cuivre, aux températures 10 et 20°C l'analyse statistique est réalisée au moyen du test ANOVA et montre que la toxicité de ce métal n'est pas significativement modifiée par une variation de la température ($P > 0,05$).

Les variations sur la (figures 10.-) nous amènent à conclure qu'aux températures 5 et 30°C, la toxicité est plus importante qu'à 10 et 20°C. Ceci peut s'expliquer par le fait que la solubilité de l'oxygène dans le milieu tend à atténuer la nocivité d'un produit métallique.

A cet effet, Anderson (1980) affirme que la température affecte la solubilité, l'hydrolyse ainsi que la distribution des formes d'une espèce métallique telle que l'aluminium. Brown (1929) fixe la température létale de *Daphnia magna* à 41°C. Selon Goss (1980), une élévation de la température peut favoriser la solubilité de nombreux sels métalliques et un accroissement de l'activité des métabolismes dans les organismes vivants, ce qui se traduit par un effet toxique plus élevé sur la daphnie. Aux basses températures (5°C), la pénétration du toxique dans les organismes récepteurs peut être accentuée.



Figures 10.- Variations des CI 50 24h et 48h en fonction de la température.

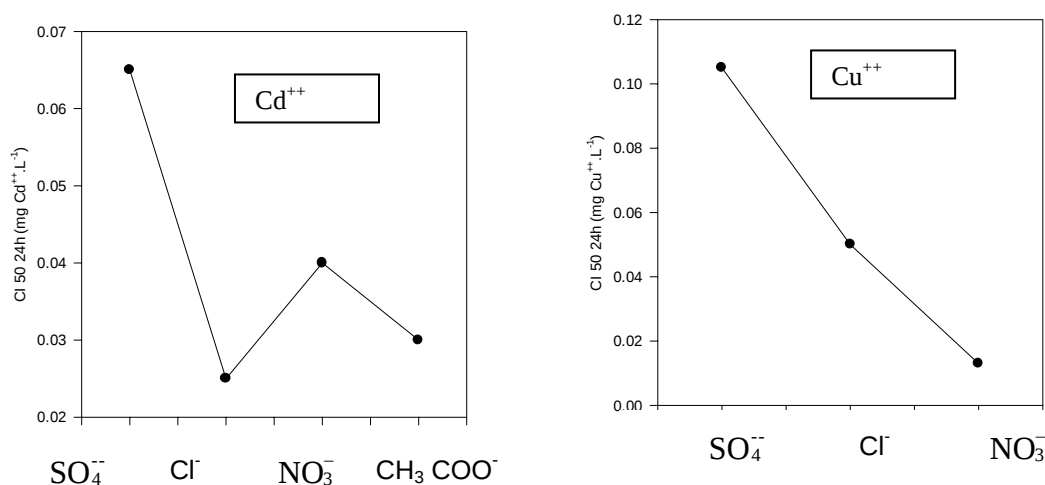
III.1.2.- Effet de la forme métallique.

Selon Bryan (1976a) la forme organique ou inorganique d'un métal modifie la toxicité des métaux lourds dans les systèmes aquatiques. Cet aperçu sur l'influence de la toxicité liée à la forme du métal nous a incité à examiner cet aspect. Les expériences menées dans ce cas font appel à la technique décrite au chapitre II.

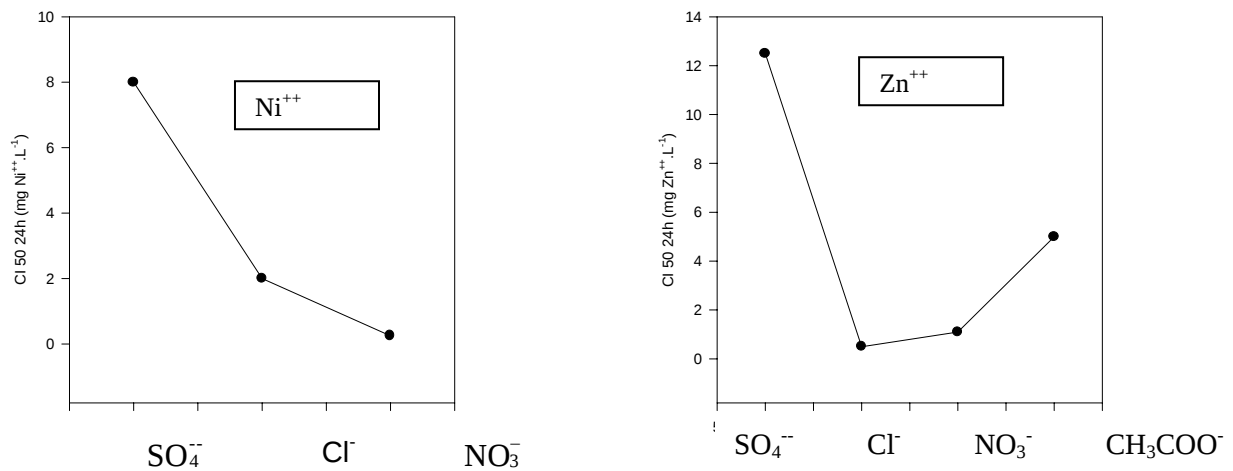
A l'usage, différentes formes d'un même métal ont été considérées. Les espèces utilisées dans cette étude sont :

- * Cadmium : $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Cd} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- * Cuivre : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- * Nickel : $\text{NiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- * Zinc : $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $(\text{CH}_3 \text{COO})_2 \text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Ces différents produits ont servi à la préparation des solutions d'essais ; les paramètres CI 50 24h et CI 50 48h de chacune de ces formes sont donnés respectivement par la figure 11.-. et le tableau 8.-



Figures 11.-Variation des CI 50 24h en fonction de la forme d'un métal.



Figures 11.-Variation des CI 50 24h en fonction de la forme d'un métal.

Cette illustration nous permet d'établir deux types d'échelles de toxicité décroissante :

- Un classement pour un même métal pris sous les différentes formes.
- Un classement spécifique à chaque forme et regroupant les quatre métaux.

Il ressort du premier type de classement les conclusions suivantes :

- Toxicité du cadmium : Cl -Cd > NO₃ -Cd > CH₃COO-Cd > SO₄-Cd
- Toxicité du cuivre : NO₃-Cu > Cl-Cu > SO₄-Cu.
- Toxicité du nickel : NO₃-Ni > Cl-Ni > SO₄-Ni
- Toxicité du zinc : Cl-Zn > NO₃- Zn > CH₃COO-Zn > SO₄-Zn

On remarque que les formes nitrates et chlorures sont en général les plus toxiques, contrairement à la forme sulfate qui s'est révélée plus tolérable par les crustacés. Pour les tests 48 h interviennent de légères modifications dans ce classement, nous présentons ces résultats dans le tableau 8.-.

Tableau 8.- : Détermination des CI 50 48 h selon la forme du métal.

Sels métalliques	CI 50 48 h (mg.L ⁻¹)
Cd Cl ₂ . 2H ₂ O	0,009
Cd(NO ₃) ₂ . 2H ₂ O	0,002
(CH ₃ COO) ₂ Cd. 2H ₂ O	-
CdSO ₄ . 8/3 H ₂ O	0,005
Ni Cl ₂ .2H ₂ O	0,3
Ni(NO ₃) ₂ . 2H ₂ O	0,02
NiSO ₄ .H ₂ O	2
ZnCl ₂ .2H ₂ O	0,065
Zn(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	0,011
(CH ₃ COO) ₂ Zn.2H ₂ O	0,12
Zn SO ₄ .H ₂ O	4,4

Dans ce cas, les formes cuivriques n'ont pas été étudiées.

Pour cette durée de test, les nitrates des différents métaux demeurent les plus toxiques. Pour le cadmium la forme sulfate s'avère plus toxique que la forme chlorure. Nous notons par conséquent que la durée d'un test est un facteur déterminant dans la classification de la toxicité des éléments.

Si nous considérons les quantités en nitrates, chlorures et sulfates (tableau 9.-) contenus dans les solutions d'essais, on remarque que ces concentrations n'atteignent jamais celles recommandées par l'O.M.S et qui sont : NO₃⁻, 50 mg.L⁻¹ ; Cl⁻, 200 mg.L⁻¹ ; SO₄⁻, 200 mg.L⁻¹, imposées comme valeurs limites pour les eaux de consommation.

Tableau 9.- Concentrations en nitrates, chlorures, sulfates dans les milieux d'essais.

Métaux	NO ₃ (mg.L ⁻¹)	Cl ⁻ (mg.L ⁻¹)	SO ₄ ⁻ (mg.L ⁻¹)
Cadmium	8,90	5,09	8,50
Cuivre	18,26	11,17	15,10
Nickel	17,46	10,37	29,36
Zinc	19,43	12,05	16,35

Ceci nous permet d'attribuer la toxicité métallique au seul cation libéré en solution. En terme prédictif, la forme nitrate serait à l'origine d'une intoxication métallique plus prononcée que celle produite par les chlorures ou sulfate d'un métal.

Enfin, nous établissons un classement de deuxième type et ce, par rapport aux différentes formes considérées :

- Sulfate : $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Zn}$
- Chlorure : $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni}$.
- Nitrate : $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Zn}$.
- Acétate : $\text{Cd} > \text{Zn}$

III.1.3.- Effet de complexation de: Cd, Cu, Ni et Zn par le Na₂EDTA, l'acide humique et les phosphates.

Dans ce paragraphe n'est citée que la CI 50 24 h et ses intervalles de confiance, la détermination de ces dernières est décrite dans l'ouvrage de Finney (1971).

L'inhibition de *Daphnia magna* dans les témoins contenant respectivement le Na₂ EDTA, l'acide humique et les phosphates n'était jamais supérieur à 10%. Le pH de toutes les solutions n'a jamais excédé 7,6.

Les variations des CI 50 24h en fonction des quantités de complexants additionnées aux solutions sont données dans les tableaux 10.- à 12.-.

Nous rappelons que dans cette étude de complexation par les phosphates, n'ont été testées que les formes chlorures de cuivre, de nickel et de zinc. Nous relevons de cette énumération de données expérimentales l'influence de la complexation sur la toxicité de Cd, Cu, Zn et Ni. Une atténuation significative ($P < 0.05$) de la toxicité est observée dans les conditions de complexation comprenant 10^{-5} M de Na₂ EDTA, 15 mg.L⁻¹ d'acide humique et 10^{-5} M de KH₂ PO₄.

Dans les autres cas, où les concentrations sont : 10^{-4} M (Na₂ EDTA) ; 10 mg Ha.L⁻¹ qui n'ont fait l'objet d'aucune étude au préalable, les différences entre les CI 50 ne sont dans aucun cas significatives ($P > 0,05$). Aucune incidence significative ($P > 0,05$) de complexation sur la toxicité métallique de nickel et de zinc n'a été examinée en présence du Na₂ EDTA et de l'acide humique.

Tableau 10.- Evaluation des CI 50 24 h en fonction des quantités de Na₂ EDTA ajoutées.

Métal	[Na ₂ EDTA] (M)	CI 50 (mg.L ⁻¹) ⁽¹⁾	Régressions curvilignes ⁽²⁾	Régressions linéaires ⁽²⁾
Cd ⁺⁺	0	0,065 (0,054 – 0,076)	0,015e ^{14,9x}	30x – 1,35 (0,8994)
	10 ⁻⁵	0,08 ^(b) (0,078 – 0,010)	0,15e ^{7,84x}	6,66x – 0,06 (0,9928)
	10 ⁻⁴	0,043 (0,039 – 0,05)	0,14 e ^{14,2x}	0,34x + 0,29 (0,9967)
Cu ⁺⁺	0	0,1 (0,09 – 0,11)	0,04e ^{22,25x}	10,71x – 0,55 (0,9431)
	10 ⁻⁵	0,243 ^(b) (0,19 – 0,29)	0,23e ^{2,45x}	1,25x + 0,17 (0,09646)
	10 ⁻⁴	0,1 (0,089 – 0,11)	0,072e ^{10,53x}	2,94x + 0,011 (0,9321)
Ni ⁺⁺	0	8,0 (7,44 – 8,56)	0,057e ^{0,27x}	0,15x – 0,6 (0,8949)
	10 ⁻⁵	7,88 (7,04 – 8,12)	0,13e ^{0,17x}	0,06x + 0,05 (0,9992)
	10 ⁻⁴	7,99 (7,35 – 8,65)	0,09e ^{0,47x}	0,08x + 0,1 (0,9643)
Zn ⁺⁺	0	12,50 (11,79 – 13,21)	0,006e ^{0,39x}	0,16x – 1,36 (0,9103)
	10 ⁻⁵	12,53 (12,00 – 13,06)	0,11e ^{0,11x}	0,04x (0,9994)
	10 ⁻⁴	12,3 (11,98 – 12,64)	0,05e ^{0,31x}	0,1x – 0,2 (0,9883)

⁽¹⁾ : les limites de confiance sur CI 50 sont données entre parenthèses.

⁽²⁾ : régressions correspondant aux % d'inhibition en fonction de la concentration en métal désignées par x.

^(b) : Différence significative (P < 0.05) entre les CI 50 sans complexant et les CI 50 avec complexant.

La détoxification impliquée par l'effet complexant du KH₂ PO₄ a apparu dans tous les cas de produits testés. En effet, les différences entre les CI 50 se sont montrées hautement significatives (P < 0,001). Pommery et *al.*, (1983) ont abouti à des conclusions similaires. La somme des résultats communs concerne l'atténuation de l'effet toxique du cadmium en présence du Na₂ EDTA et des phosphates.

Tableau 11.- Evaluation des CI 50 24 h en fonction de la concentration en acide humique.

Métal	[Ha] (mg.L ⁻¹)	CI 50 (mg.L ⁻¹) ^(b)	Régressions curvilignes ⁽²⁾	Régressions linéaires ⁽²⁾
Cd ⁺⁺	0	0,065 (0,054 – 0,076)	0,015e ^{14,9x}	30x – 1,39 (0,8994)
	10	0,04 (0,034 – 0,046)	0,25e ^{19,6x}	10x + 0,2 (0,9888)
	15	0,1 ^(b) (0,089 – 0,11)	0,08e ^{23,10x}	10x – 0,2 (0,9763)
Cu ⁺⁺	0	0,1 (0,099 – 0,11)	0,04e ^{12,25x}	10,71x – 0,55 (0,9431)
	10	0,1 (0,088 – 0,11)	0,28e ^{2,58x}	1,32x + 0,27 (0,8992)
	15	0,16 ^(b) (0,14 – 0,17)	0,09e ^{5,12x}	1,58x + 0,07 (0,8952)
Ni ⁺⁺	0	8,0 (7,88 – 8,12)	0,057e ^{0,27x}	0,15x – 0,6 (0,8949)
	10	8,9 ^(b) (8,44 – 9,36)	0,13e ^{0,17x}	0,08x – 0,1 (0,8662)
	15	8,02 (7,39 – 8,15)	0,06e ^{0,22x}	0,11x – 0,47 (0,9791)
Zn ⁺⁺	0	12,50 (11,79 – 13,21)	0,006e ^{0,39x}	0,16x – 1,36 (0,9103)
	10	12,01 (11,97 – 12,05)	0,035e ^{0,35x}	0,15x – 0,55 (0,9014)
	15	12,08 (11,86 – 12,3)	0,05e ^{0,21x}	0,08x – 0,38 (0,8543)

⁽¹⁾ : les limites de confiance sur CI 50 sont données entre parenthèses.

⁽²⁾ : régressions correspondant aux % d'inhibition en fonction de la concentration en métal.

^(b) : Différence significative (P < 0,05) entre les CI 50 sans, complexant et les CI 50 avec complexant.

Stakhouse et *al.* (1988) attribuent les différences entre les effets complexants d'un acide humique à la dureté de la solution d'essai. Cette hypothèse, ainsi évoquée, explique la non complexation du cuivre par PO₄³⁻ dans le milieu expérimental utilisé par Pommery et *al.* (1983).

Tableau 12.- Evaluation des CI 50 24 h en fonction des quantités de phosphates ajoutées.

métal	[KH ₂ PO ₄] (M)	CI 50 (mg.L ⁻¹) ⁽¹⁾	Régressions curvilignes ⁽²⁾	Régressions linéaires ⁽²⁾
Cu ⁺⁺	0	0,05 (0,045 – 0,055)	0,39e ^{0,91x}	0,56x + 0,38 (0,9966)
	10 ⁻⁵	0,39 ^(b) (0,33 – 0,45)	0,2e ^{1,5x}	0,73x + 0,19 (0,9634)
Ni ⁺⁺	0	20 (1,87 – 2,13)	0,26e ^{0,16x}	0,08x + 0,21 (0,9863)
	10 ⁻⁵	5,0 ^(b) (4,83 – 5,19)	0,17e ^{0,16x}	0,06x + 0,14 (0,9966)
Zn ⁺⁺	0	0,5 (0,46 – 0,54)	0,24e ^{1,47x}	x (0,8073)
	10 ⁻⁵	4,75 ^(b) (4,25 – 5,25)	0,07e ^{0,36x}	0,1x (0,9832)

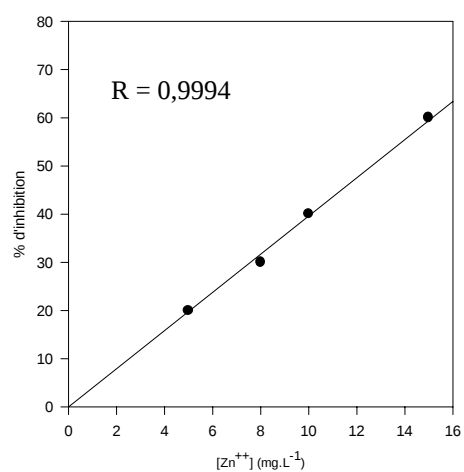
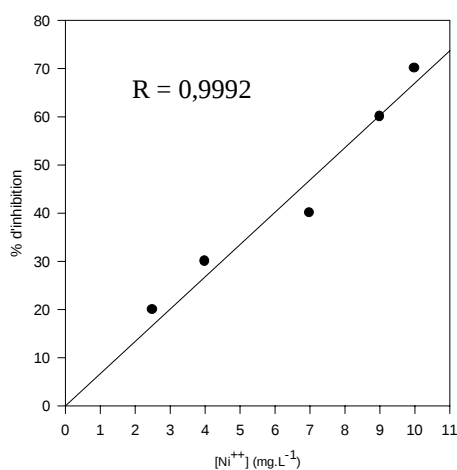
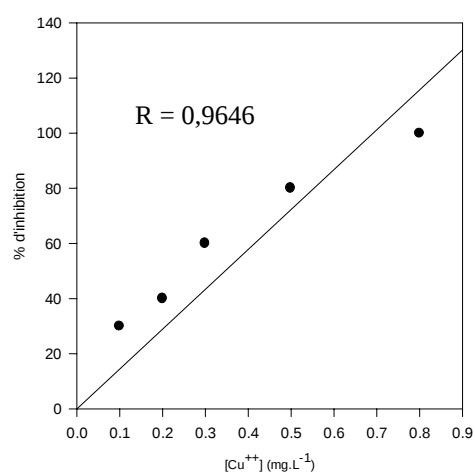
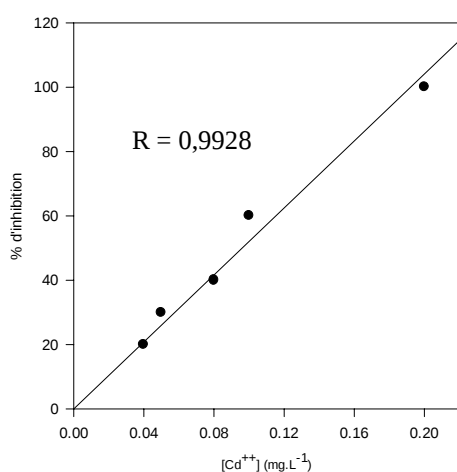
⁽¹⁾ : les limites de confiance sur CI 50 sont données entre parenthèses.

⁽²⁾ : régressions correspondant aux % d'inhibition en fonction de la concentration en métal.

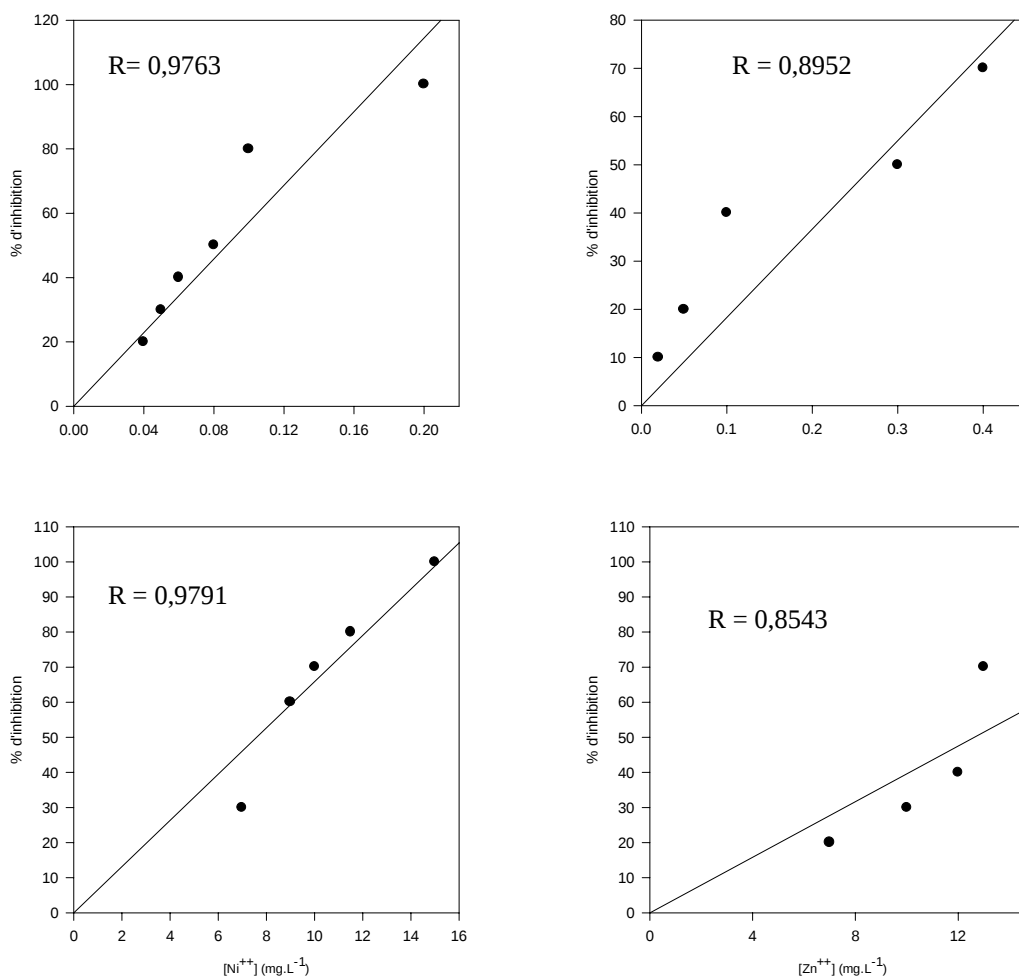
^(b) : Différence significative (P < 0.05) entre les CI 50 sans complexant et les CI 50 avec complexant.

Le profil des évolutions des taux d'inhibition des daphnies par rapport à l'augmentation des concentrations en métal (figures 12.- à 14.-) montrent des droites de régression significatives autrement, les régressions curvilignes (tableaux 10- à 12.-) n'ont pas amélioré les coefficients de corrélation dans la majorité des cas ; ceci peut expliquer que la mortalité est directement dépendante de la concentration métallique. Les exceptions qui contredisent cette dernière affirmation sont marquées par des coefficients de corrélation légèrement plus faibles que les autres dans l'étude nickel-phosphate et zinc-phosphate. Nous pensons alors que les éléments Ha-Cu et Ha-Zn présentent un caractère labile suspecté par Pommery et *al.* (1985). Les constats de Mantoura et *al.* (1978) qualifient d'instable le complexe cadmium carbonate et précisent que sa redissolution est provoquée par une simple variation du pH. A l'instar de cette hypothèse, nous pensons que des fractions de complexes nickel-acide humique et zinc-phosphate relarguent une certaine quantité de cations (Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺), bien que le pouvoir complexant de K₂ HPO₄ réduit de manière significative la toxicité de Cu, Ni et Zn.

Par ailleurs, aucun effet de complexation n'est observé pour 10⁻⁴ M de Na₂ EDTA et 10 mg.L⁻¹ d'acide humique. Ce cas, pourrait être également lié à la conséquence d'un équilibre entre les formes complexées et les teneurs de métaux redissous.



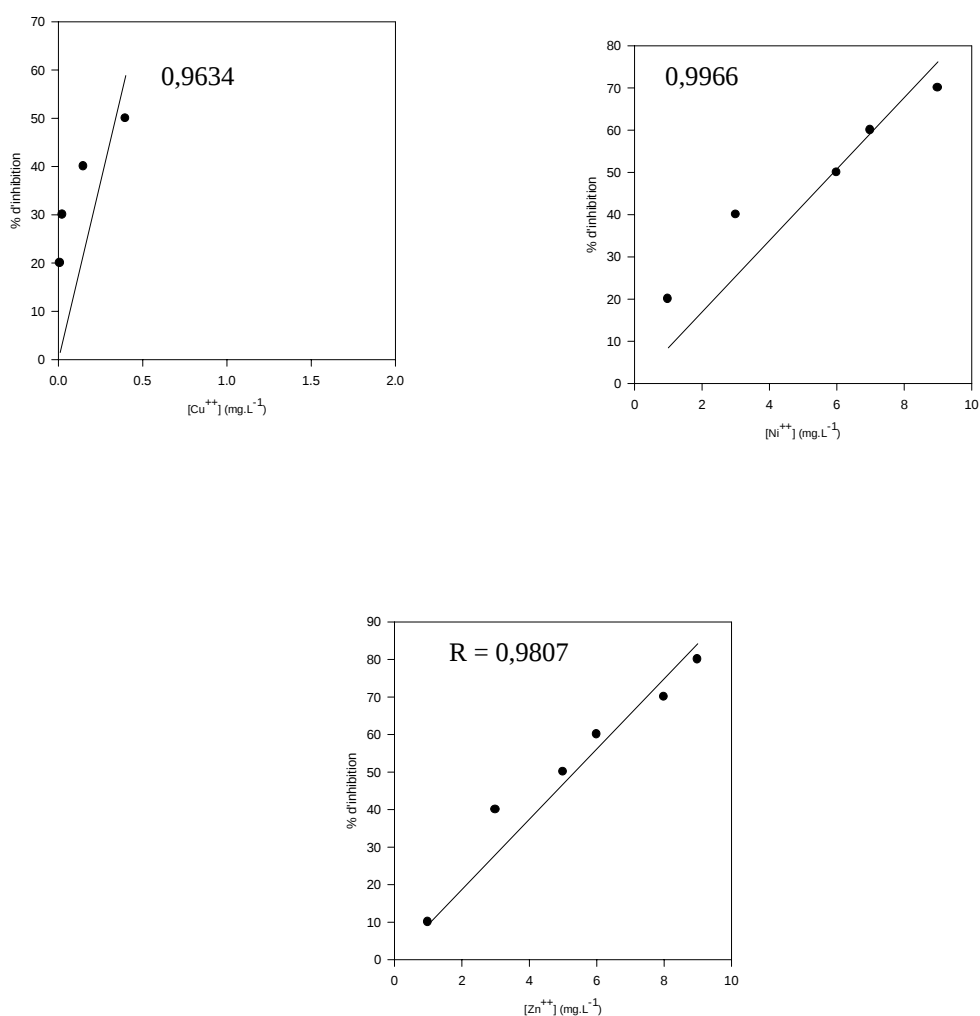
Figures 12.-Variation du taux d'inhibition en fonction des concentrations métalliques,
 $[\text{Na}_2 \text{EDTA}] = 10^{-5} \text{ M}$.



Figures 13.- Variation du taux d'inhibition en fonction des concentrations métalliques, $[Ha] = 15 \text{ mg.L}^{-1}$.

Stakhouse et Benson (1988) proposent encore que les différences des résultats obtenus dans les différentes études résident dans le mécanisme de complexation et la libération d'un proton à partir d'un groupement acide ou d'hydroxyde, compris dans la structure de l'acide humique. Ces auteurs observent une élévation de la toxicité du cadmium (LC50 72h) en présence de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ d'acide humique. Cependant au cours de 96 heures de test et avec $0,5$ et 5 mg.L^{-1} , aucun effet du complexant sur la toxicité de cadmium n'est décelé. Ils obtiennent une réduction considérable de la toxicité de ce métal pour 50 mg.L^{-1} d'acide humique. Nous constatons (pour le même auteur et donc pour un même protocole) que les résultats sur la complexation vis-à-vis de la toxicité des métaux ne font l'objet d'aucune comparaison, du fait de l'instabilité des complexes formés. Après s'être assurés des

possibilités de relargage du cation métallique à partir d'une forme complexée et donc de la redissolution du métal, cette expérience a été ensuite confrontée à l'étude analytique des quantités de métaux complexés et celles absorbées par les daphnies dans les milieux expérimentaux renfermant KH_2PO_4 . Pour ce faire, nous avons analysé Cu^{++} et Ni^{++} dans les conditions mentionnées dans les tableaux 13.- et 14.-. Nous soulignons le fait que certaines concentrations ont nécessité la méthode des ajouts dosés.



Figures 14.- Variation du taux d'inhibition en fonction des concentrations métalliques :
 $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 10^{-5} \text{ M}$.

Tableaux 13.- Résultats analytiques des quantités de Cu^{++} après 24h de test.a) $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0 \text{ M}$

$[\text{Cu}^{++}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,01	0,05	0,3	3	4
pH	8,05	8,09	8,10	7,89	8,15
$[\text{Cu}^{++}]^{(1)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	-	0,04	0,26	2,42	3,35
$[\text{Cu}^{++}]^{(2)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	-	0,038	0,18	1,32	1,85
$[\text{Cu}^{++}] \text{ absorbée (mg.L}^{-1}\text{)}$	-	0,002	0,08	1,1	1,5

⁽¹⁾ : Test sans daphnie.⁽²⁾ : Test avec daphnies.b) $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 10^{-5} \text{ M}$

$[\text{Cu}^{++}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,01	0,025	0,39	0,97	2,44
pH	8,65	8,60	8,68	8,72	8,74
$[\text{Cu}^{++}]^{(1)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	-	0,019	0,365	0,801	2,00
$[\text{Cu}^{++}]^{(2)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	-	0,01	0,112	0,524	1,35
$[\text{Cu}^{++}] \text{ absorbée (mg.L}^{-1}\text{)}$	-	0,009	0,253	0,277	0,650

Tableau 14.- Résultats analytiques des quantités de Ni^{++} après 24h de test.c) $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0 \text{ M}$

$[\text{Ni}^{++}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	1	3	5	6	8	9
pH	8,59	8,59	8,65	8,65	8,65	8,67
$[\text{Ni}^{++}]^{(1)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,820	2,45	4,27	5,31	7,15	8,37
$[\text{Ni}^{++}]^{(2)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,37	1,5	2,55	3,39	7,3	6,55
$[\text{Ni}^{++}] \text{ absorbée (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,45	0,95	1,72	1,92	1,85	1,82

d) $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 10^{-5} \text{ M}$

$[\text{Ni}^{++}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	1	3	5	6	8	9
pH	8,75	8,72	8,76	8,76	8,73	8,70
$[\text{Ni}^{++}]^{(1)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,38	1,48	3,89	4,27	5,82	7,05
$[\text{Ni}^{++}]^{(2)} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,16	0,58	2,41	3,21	4,68	5,27
$[\text{Ni}^{++}] \text{ absorbée (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,22	0,9	1,48	1,06	1,14	1,78

⁽¹⁾ : Test sans daphnie.

⁽²⁾ : Test avec daphnies.

Etant donné la différence entre les gammes de concentrations initiales de cuivre (tableaux a et b), nous pouvons montrer à partir du tableau 13.- le résultat de la complexation et de la précipitation ($\text{pH} > 8$) de Cu^{++} . Nous citons à titre indicatif le passage de 0,39 et 2,44 mg.L^{-1} de cuivre à respectivement 0,365 et 2,00 $\text{mg Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$ après 24h, de mélange cuivre-phosphate.

Pour le nickel, la dissimulation de celui-ci par la présence de $\text{K}_2\text{H PO}_4$ est mise en évidence. Si nous attribuons (tableau 14) cette baisse de concentration en Ni^{++} (test sans daphnies avec $[\text{K}_2\text{H PO}_4] = 0 \text{ M}$) au phénomène de précipitation, la comparaison entre $[\text{Ni}^{++}]^{(1)}$ des tableaux c) et d) fait plutôt apparaître la réaction de complexation. Ces données permettent d'estimer les quantités de nickel dissimulées voir complexées (tableau 15.-).

Tableau 15.-Détermination de $[\text{Ni}^{++}]$ dissimulée.

$[\text{Ni}^{++}]_{\text{initiale}} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	1	3	5	6	8	9
$[\text{Ni}^{++}]_{\text{dissimulé}} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0,44	0,97	0,29	1,07	1,32	1,33

On peut donc associer l'augmentation des quantités de Ni^{++} complexées à une augmentation des teneurs initiales de ce métal.

Ces résultats n'ont pas permis une exploitation fine de la quantification de Ni^{++} complexé (la répétition des analyses des échantillons n'a pas excédé 2). Toutefois l'objectif principal de mise en évidence du phénomène de complexation et en conséquence de celui d'une baisse de la toxicité est réalisé.

III.1.4.-Effet de la salinité et de la dureté.

III.1.4.1.- Effet de la salinité.

Notre étude sur la salinité est menée selon le protocole de la norme ISO (1989) que nous avons légèrement modifié afin de faire varier la salinité des milieux d'essais par addition d'une quantité choisie de chlorure de sodium dans l'eau de dilution (ISO, 1989).

La CI 50 24h du test au bichromate est évaluée à 1,15 mg de $K_2 Cr_2 O_7.L^{-1}$ les intervalles de confiance sont de 1,043 et 1,25 $mg.L^{-1}$. Ce résultat est en accord avec les critères de validité imposés par la norme (ISO, 1989).

Les valeurs des salinités citées au tableau 16.- sont comparées pour les deux méthodologies citées (conductimétrique et volumétrique de Mohr).

Tableau 16.- Détermination analytique de la salinité.

Salinité (g NaCl.L ⁻¹)	0,28		0,45		2,42		10,87	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Maximum	0,37	0,30	0,48	0,52	2,58	2,44	13,17	-
Minimum	0,26	0,25	0,42	0,43	2,38	2,10	10,40	-
Moyennes	0,32	0,29	0,47	0,49	2,54	2,30	12,39	-
C.V	13,20	7,51	5,03	7,56	3,17	6,4	8,62	-

(1) : méthode conductimétrique

(2) : méthode volumétrique (mohr)

C.V : coefficient de variation

Pour l'étude de l'effet de la salinité sur la toxicité de Cd^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} et Ni^{++} nous avons considéré les salinités : $S_0 = 0,28 \text{ g NaCl.L}^{-1}$; $S_1 = 0,45 \text{ NaCl.L}^{-1}$ et $S_2 = 2,42 \text{ g NaCl.L}^{-1}$. Nous mentionnons que S_0 , S_1 et S_2 correspondent respectivement aux salinités : eau de dilution (ISO, 1989), la salinité qui ne provoque aucune inhibition des daphnies (déduites du test NaCl sans la présence de cations métalliques), la salinité qui inhibe 50% des daphnies testées.

Le calcul des CI 50 24h et CI 50 48h exprimées en $g \text{ NaCl.L}^{-1}$ donne:

$$CI\ 50\ 24h = 2,40\ g\ NaCl.L^{-1} \pm 0,17$$

$$CI\ 50\ 48h = 0,49\ g\ NaCl.L^{-1} \pm 0,19$$

Dans le tableau 17 sont présentées les CI 50 24 et 48h, déduites de l'étude de l'effet de la salinité sur la toxicité des métaux testés.

Tableau 17.- Effet de la salinité sur la toxicité de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} .

		métaux	$S_0 = 0,28$	$S_1 = 0,45$	$S_2 = 2,42$
CI 50 24h (mg cation.L ⁻¹)	Cd^{++}		0,059 (0,0528 – 0,0659)	0,38 ^(b) (0,025 – 0,051)	0,0068 ^(b) (0,0042 – 0,010)
	Cu^{++}		0,1 (0,09 – 0,11)	0,08 (0,06 – 0,10)	0,07 (0,05 – 0,10)
	Ni^{++}		5,83 (4,92 – 6,74)	9,23 ^(b) (7,93 – 10,53)	4,60 ^(b) (2,06 – 7,14)
	Zn^{++}		9,58 (8,30 – 10,8)	6,13 ^(b) (4,69 – 7,57)	6,10 ^(b) (4,63 – 7,57)
CI 50 48h (mg cation.L ⁻¹)	Cd^{++}		0,0046 (0,0025 – 0,0065)	0,011 ^(b) (0,0057 – 0,016)	0,005 (0,002 – 0,007)
	Cu^{++}		0,03 (0,02 – 0,04)	0,06 ^(b) (0,05 – 0,07)	0,03 (0,01 – 0,04)
	Ni^{++}		1,82 (1,28 – 2,36)	4,20 ^(b) (1,87 – 6,53)	1,15 (0,63 – 1,61)
	Zn^{++}		4,60 (3,31 – 5,89)	2,00 ^(b) (1,67 – 2,36)	2,38 ^(b) (1,30 – 3,46)

Entre parenthèses sont données les intervalles de confiance

^(b) : comparaison des CI 50 ($S_0 = 0,28g\ NaCl.L^{-1}$) et CI 50 (S_1 et S_2) ($P < 0,05$).

Pour une discussion explicite, nous préférons tenir compte aussi de l'illustration graphique de certaines variations des concentrations métalliques en fonction des taux d'inhibition et des différentes salinités. Ces variations sont représentées schématiquement par les figures 15.- et 16.-.

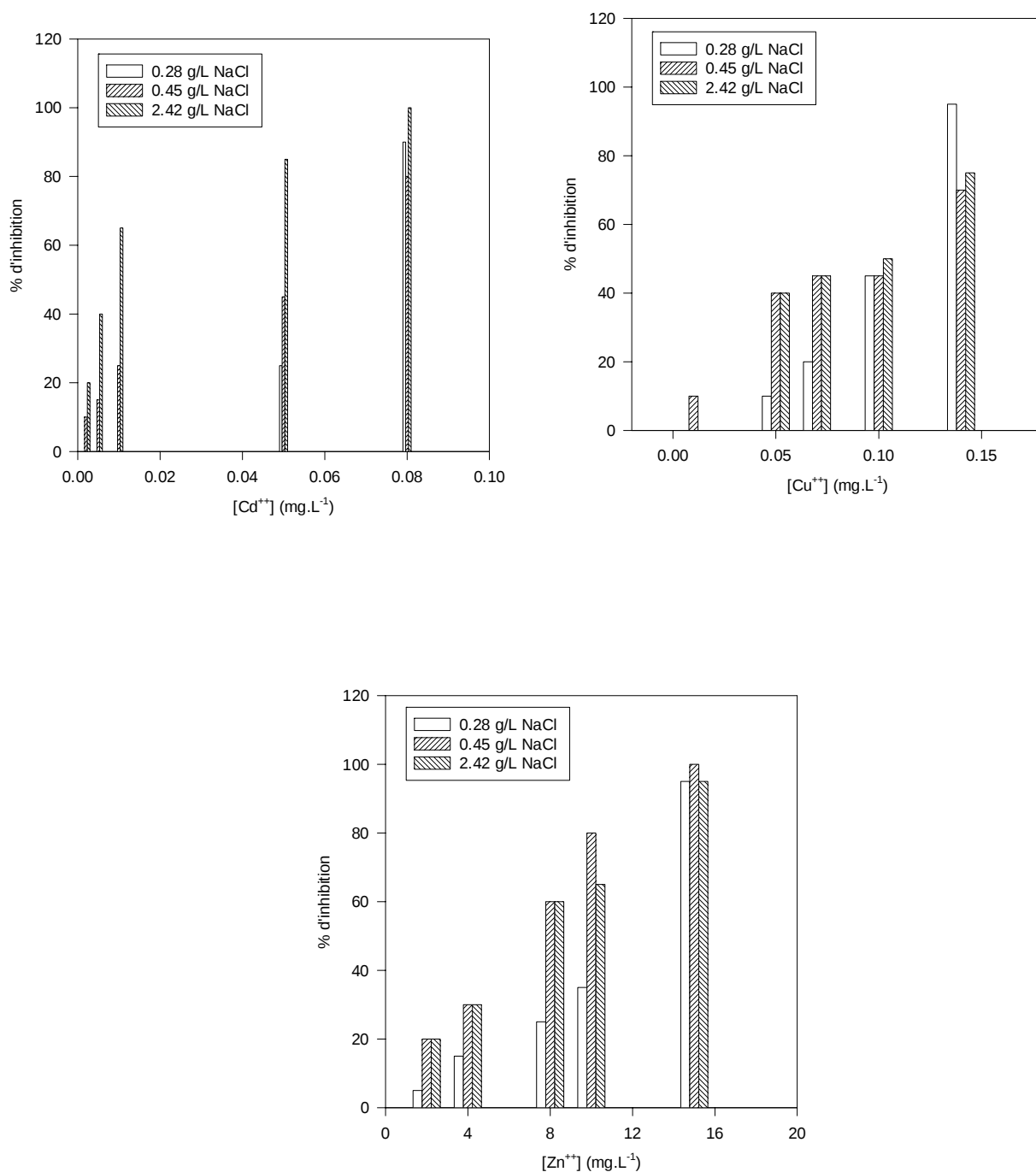


Figure 15.- Effet de la salinité sur la toxicité de Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ et Zn⁺⁺ (tests 24h).

De tels résultats permettent de démontrer, dans certains cas, des différences significatives ($P < 0,05$), pour une variation combinée, salinités-concentrations métalliques (Semsari et *al.*, 2001). On note dans la présente étude, que pour Cd, Cu et Zn, l'effet de toxicité du métal en 24 heures est plus important à mesure que la salinité du milieu augmente (figure

15.-). Toutefois, La littérature relative à l'influence simultanée de la salinité-ions métalliques indique une augmentation de la tolérance de ces ions par les daphnies pour une salinité croissante (Poldoski, 1979 ; Bryant et *al.*, 1985 b ; De Lisle et Roberts, 1988 et Persoone et *al.*, 1989). Cette observation est confirmée par nos résultats sur 48h et une salinité de 0,42 g NaCl.L⁻¹ (figure 15.-). En effet, les différences entre les CI 50 48h relatives à Cd, Cu et Ni sont très significatives ($P < 0.05$) (tableau 17.-). Les CI 50 correspondant à Cd, Cu et Ni passent respectivement de 0,0046 à 0.019 mg de Cd⁺⁺.L⁻¹ ; de 0,03 à 0,06 mg de Cu⁺⁺.L⁻¹ et de 1.82 à 4.20 mg de Ni⁺⁺.L⁻¹. Cette constatation (figure 16.-) tend à confirmer le phénomène de complexation évoqué par Blust et *al.* (1992). Pour une salinité égale à 0.45 g.L⁻¹, les complexes chlorures zinc pourraient être instables ou plutôt toxiques s'ils sont ingérés par les réactifs biologiques. Selon Rand et Perocelli (1984), l'effet de la salinité dépend particulièrement de la nature génétique des réactifs biologiques qui eux déterminent si les organismes peuvent, à une salinité donnée, exprimer une tolérance ou non à un toxique. Nous obtenons, par ailleurs, une chute des CI 50 24h (tableau 18.-) pour une augmentation de la salinité ; cette indication chiffrée sur une même souche de daphnies contredit quelques peu l'hypothèse de Rand et *al.* (1984).

Mise à part ces propositions, évoquées par différents auteurs, nous pensons que l'effet de la salinité est lié à la durée d'exposition des daphnies aux produits toxiques. Nous associons donc, l'effet de la durée d'exposition au phénomène d'osmose cité dans les travaux de Sunda et *al.* (1978). Ces travaux examinent la nocivité de métaux lourds en présence de sels. Nous déduisons alors, que le phénomène d'osmose tendrait à privilégier l'action de l'ion métallique que sa complexation. Une atténuation de la nocivité de Cd, Cu et Ni (test 48h) pourrait résulter d'une compétition des cations divalents en question et les ions calcium et magnésium pour les sites adsorptifs portés par les daphnies.

La salinité S₂ (S₂ = 2,42 g NaCl.L⁻¹) est apparemment trop importante et son effet inhibiteur devrait être additionné à celui du métal. Cette synergie d'effets entraîne une élévation importante de la toxicité.

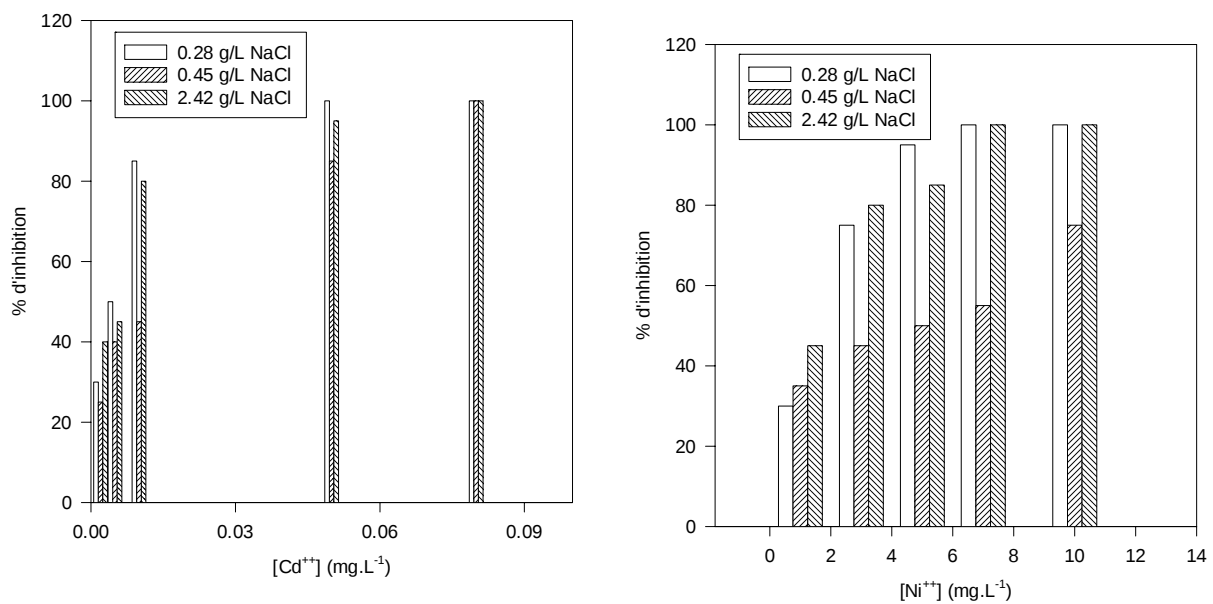


Figure 16.-Effet de la salinité sur la toxicité de : Cd⁺⁺ et Ni⁺⁺ (tests 48 heures).

Nous retenons de cette étude un dernier point qui nous permet d'établir un classement par ordre de toxicité décroissante pour les différentes salinités et pour une durée d'exposition de 24h.

- S₀ = 0,28 g NaCl.L⁻¹ : Cd⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Ni⁺⁺ > Zn⁺⁺
- S₁ = 0,45 g NaCl.L⁻¹ : Cd⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Zn⁺⁺ > Ni⁺⁺
- S₂ = 2,42 g NaCl.L⁻¹ : Cd⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Ni⁺⁺ > Zn⁺⁺

Nous notons que ces variations de salinité n'entraînent pas de modifications appréciables de ce classement.

III.1.4.2.- Effet de la dureté.

Différents auteurs (Maki et Brishop, 1979 ; Lewis et Maki, 1981 ; Meador, 1991 ; Diamond et *al.*, 1992 ; Erickson et *al.*, 1996 ; Semsari et Aït Amar, 2001) ont montré l'effet de la dureté sur la toxicité des métaux lourds par rapport aux organismes aquatiques.

Lewis et Maki (1981) ont choisi de faire varier la dureté de 50 à 350 mg.L⁻¹ CaCO₃ pour un test sur *Daphnia magna*. Dans un même objectif, Diamond (1992) a opté pour une gamme allant de 400 à 800 mg.L⁻¹ CaCO₃, en utilisant *Ceriodaphnia dubia*.

Dans une première étape, nous avons procédé à l'examen de la variation de la dureté. Pour ce faire, les concentrations suivantes : 250, 350, 450, 550, 750 et 825 mg.L⁻¹ CaCO₃ ont été testées. Les recommandations ISO (1989) ; AFNOR (1983) et OCDE (1992) portent sur les eaux assez dures, les eaux de faibles duretés ne sont pas retenues par ces organisations.

La détermination analytique de la dureté par dosage complexométrique figure dans le tableau 18.-.

Tableau 18.- Evaluation de la dureté : analyse complexométrique.

Dureté (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	250	450	750	825
Min	230	438	725	815
Max	259	460	755	832
Moyenne	250.09	451	750.89	820.0
C.V	5.67	2.08	2.51	1.03

La répétabilité des résultats pour une même analyse semble convenable.

Les concentrations inhibitrices intégrant la dureté sont :

- CI 50 24h = 488,63 mg.L⁻¹ CaCO₃, avec des intervalles de confiances de 383,60 et 622,41 mg.L⁻¹ Ca CO₃
- CI 50 48h = 267,62 mg.L⁻¹ CaCO₃ avec des intervalles de confiances de 200 et 349,93 mg.L⁻¹ CaCO₃

Suite à ces conclusions, nous avons choisi d'effectuer l'étude écotoxicologique avec deux duretés : 250 et 500 mg.L⁻¹ CaCO₃ en présence de Cd⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺.

Les résultats obtenus (tableau 19.-) représentent les CI 50 24 et 48 h. La représentation graphique des variations des taux d'inhibition par rapport à une augmentation de la concentration métallique et de la dureté (figure 17.-) montre l'effet simultané de la dureté et de la toxicité métallique sur l'inhibition de *Daphnia magna*.

La première indication que nous relevons de ces variations est qu'en générale la toxicité est croissante, lorsque la dureté varie de 250 à 500 mg.L⁻¹ CaCO₃.

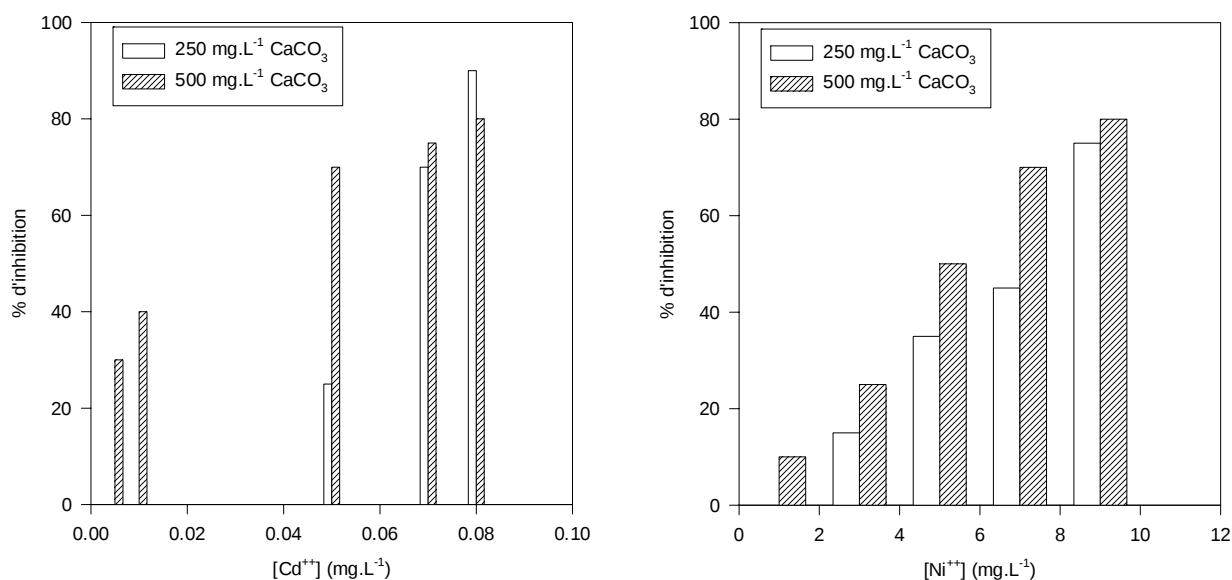


Figure 17.- Effet de la dureté sur la toxicité de Cd et Ni, (tests 24 h).

Tableau 19.-Effet de la dureté sur la toxicité de Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺ .

Métaux		D ₁ = 250 (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	D ₂ = 500 (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)
CI 50 24h (mg cation.L ⁻¹)	Cd ⁺⁺	0,0594 (0,054 – 0,065)	0,0306 ^(b) (0,011 – 0,034)
	Cu ⁺⁺	0,1 (0,09 – 0,11)	0,05 ^(b) (0,03 – 0,07)
	Ni ⁺⁺	5,83 (4,92 – 6,91)	4,81 (3,99 – 5,61)
	Zn ⁺⁺	9,58 (8,30 – 11,05)	5,84 ^(b) (4,04 – 7,72)
CI 50 48h (mg cation.L ⁻¹)	Cd ⁺⁺	0,0046 (0,003 – 0,0075)	0,0071 (0,0024 – 0,011)
	Cu ⁺⁺	0,03 (0,02 – 0,04)	0,01 (0 – 0,05)
	Ni ⁺⁺	1,82 (1,28 – 2,37)	1,26 (0,59 – 1,93)
	Zn ⁺⁺	4,60 (3,31 – 5,90)	2,52 ^(b) (1,17 – 3,92)

Entre parenthèses sont données les intervalles de confiance

^(b) : comparaison significative entre CI 50 à D₁ = 250 et D₂ = 500 mg.L⁻¹ CaCO₃.

Dans une étude similaire (Kimball, 1978 ; non publié) rapporte que la NOEC (No effect concentration) 24 heures du cobalt chute de $4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($D_1 = 250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) à $3,8$ pour $400 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Le résultat de cet auteur est donc en accord avec les variations observées.

La littérature relative à ce sujet relève des avis différenciés. Kimball (1978) trouve que la CL 50 48 h du cobalt croît rapidement pour des duretés comprises entre 50 et $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Diamond (1992) a abouti cependant, aux faits suivants :

- La NOEC 96h du cobalt mesurée sur *Pimephales promelas*, est maximale à des duretés très faibles et qu'elle est considérablement réduite pour une dureté du milieu égale à $400 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

- La CL 50 48h déterminée sur *cériodaphnia dubia*, en présence de cobalt, varie de façon très irrégulière dans une gamme de concentrations de 50, 200, 400 et $800 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. L'auteur ne note, donc, aucune régression significative dans l'évolution de ses résultats. Abel (1974), Dave (1978), Muller (1980) ont montré que les métaux lourds sont généralement plus toxiques dans une eau douce que dans une eau dure.

Holcombe et al. (1978) démontrent que la dureté a un effet important sur la toxicité du zinc. En ce qui concerne nos résultats, les CI 50 du zinc varient significativement ($P < 0,05$) lorsque la dureté passe de 250 à $500 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

L'analyse des résultats du tableau 19.- nous permet de déduire que la dureté la plus élevée tend à augmenter la toxicité du zinc et que ce fait est moins marqué dans les cas du cadmium et du nickel. Le cuivre s'est révélé (tableau 19.-) significativement plus toxique ($P < 0,05$) plus toxique dans le milieu de dureté $500 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Cependant, les essais de Gauss et al. (1985) sur la toxicité du cuivre révèlent une toxicité constante pour une variation de la dureté allant jusqu'à $800 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Si l'influence simultanée dureté-ions métallique (tableau 19.- et figure 17.-) tend à augmenter la toxicité de Zn^{++} et Cu^{++} et même si cette augmentation est moins prononcée pour Cd et Ni ($P > 0,05$), deux hypothèses peuvent être émises :

- Une interaction compétitive avec les cations et plus particulièrement le calcium et le magnésium, peut être la cause d'une élévation de la toxicité entraînant ainsi une augmentation de l'activité ionique.

- La formation de complexes insolubles carbonates-métaux lourds ; cette hypothèse ne serait plus valable si ces complexes ne sont pas ingérés par les daphnies.

Une dernière remarque est que le classement de toxicité des quatre métaux demeure inchangée, $\text{Cd}^{++} > \text{Cu}^{++} > \text{Ni}^{++} > \text{Zn}^{++}$ pour une variation de la dureté et du temps d'exposition.

III.1.5.-Test avec renouvellement du milieu.

La volonté d'obtenir en laboratoire certaines conditions de fonctionnement d'un appareil de monitoring de la pollution toxique, qui peut être similaire à ce qui serait observable in-situ, a fait l'objectif de cette partie de l'étude.

Contrairement aux essais précédents, la toxicité de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} est suivie à l'aide d'un test dynamique pour lequel nous proposons une méthodologie expérimentale et un schéma simplifié d'une installation (chapitre II).

L'expérience a permis dans un premier temps la détermination des coefficients de variation sur un certain nombre d'évaluations du débit (tableau 20.-) en fonction des débits fixés par la pompe pristatique.

Tableau 20.-Détermination des débits.

Débit (ml.min ⁻¹)	Entrée	Sortie
Minimum	10,71	10,90
Maximum	11,24	11,32
Moyen	10,92	11,04
C.V	2,10	1,79

Les valeurs des coefficients de variation expriment la constance des débits d'entrée et de sortie.

III.1.5.1.- Essai avec variation du temps de contact « métal-daphnies ».

Dans une première étape de mise en œuvre et afin d'éviter de s'affranchir du problème de non-inhibition, pour une expérimentation ne dépassant pas 6 heures, le choix consiste à prendre une concentration relativement élevée de 1 mg de métal.L⁻¹ pour la contamination du milieu. Ce choix est motivé par l'objectif d'installer un moyen de contrôle et non pas d'affiner une limite de détection.

Pour ce faire, la sensibilité de 30 daphnies a été testée à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et à pH de la solution de 7,65.

Les résultats obtenus sont donnés au tableau 21.-.

Pour les différentes étapes de ce paragraphe, nous utiliserons les notations suivantes :

$[\text{métal}]_s$: concentration du métal à la sortie du milieu expérimental,

$[\text{métal}]_r$: concentration retenue dans le milieu d'essai,

$[\text{métal}]_0$: concentration initiale à l'entrée on $[\text{métal}]_e$,

* Dans ces cas, les milieux ne sont pas entièrement renouvelés ($t < 50$ min) pour pouvoir distinguer entre une rétention et une dilution.

Tableau 21.- Test avec flux entrant et flux sortant.

- cas du cadmium, $[\text{Cd}^{++}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$, pH = 7,60.

Temps d'écoulement (minutes)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% 'inhibition	$[\text{Cd}^{++}]_r/\text{daphnie}$ (mg.L^{-1})
	min	Max			
15	24	25	1,66	18,33	*
30	19	22	6,13	31,66	*
60	14	18	10,20	46,66	0,029
120	11	12	4,16	61,66	0,025
240	0	0	0	100	0,022
360	0	0	0	100	0,028

s du cuivre, $[\text{Cu}^{++}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$, pH = 7,72.

Temps d'écoulement (minutes)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% 'inhibition	$[\text{Cu}^{++}]_r/\text{daphnie}$ (mg.L^{-1})
	min	Max			
15	27	28	1,72	8,33	*
30	24	27	4,92	15	*
60	22	25	5,34	21,66	0,022
120	18	21	6,45	35	0,019
240	12	15	10,87	55	0,012
360	3	5	20,41	86,66	0,0016

- cas du nickel, $[\text{Ni}^{++}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$, pH = 7.67.

Temps d'écoulement (minutes)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% 'inhibition	$[\text{Ni}^{++}]_r/\text{daphnie}$ (mg.L^{-1})
	min	Max			
15	28	30	3,21	3,33	*
30	27	28	1,72	8,33	*
60	25	27	3,14	13,33	0,014
120	19	24	13,50	26,33	0,01
240	16	17	2,88	45	0,004
360	7	12	24	68,33	0,003

- cas du zinc, $[\text{Zn}^{++}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$, pH = 7,80.

Temps d'écoulement (minutes)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% 'inhibition	$[\text{Cd}^{++}]_r/\text{daphnie}$
	min	Max			
15	29	30	1,58	1,60	*
30	28	29	1,64	5,0	*
60	26	29	4,56	8,33	0,004
120	25	25	0	16,66	0,026
240	19	22	8,64	31,66	0,015
360	16	18	5,44	43,33	0,005

Nous obtenons dans tous les cas, une bonne reproductibilité de la mesure de la mobilité des daphnies (C.V < 25%).

Dans le seul cas où le coefficient de variabilité a atteint 24%, la répétabilité est considérée mauvaise et provient probablement de l'état des organismes tests.

La figure 18.- résume pour les 4 métaux considérés, les taux d'inhibition par rapport au temps d'écoulement.

Il ressort de ce résultat (figure 18.-) que la toxicité des 4 métaux suit l'ordre décroissant suivant : $\text{Cd}^{++} > \text{Cu}^{++} > \text{Ni}^{++} > \text{Zn}^{++}$.

Les différents modes opératoires (test statique ou dynamique) ne semblent pas avoir

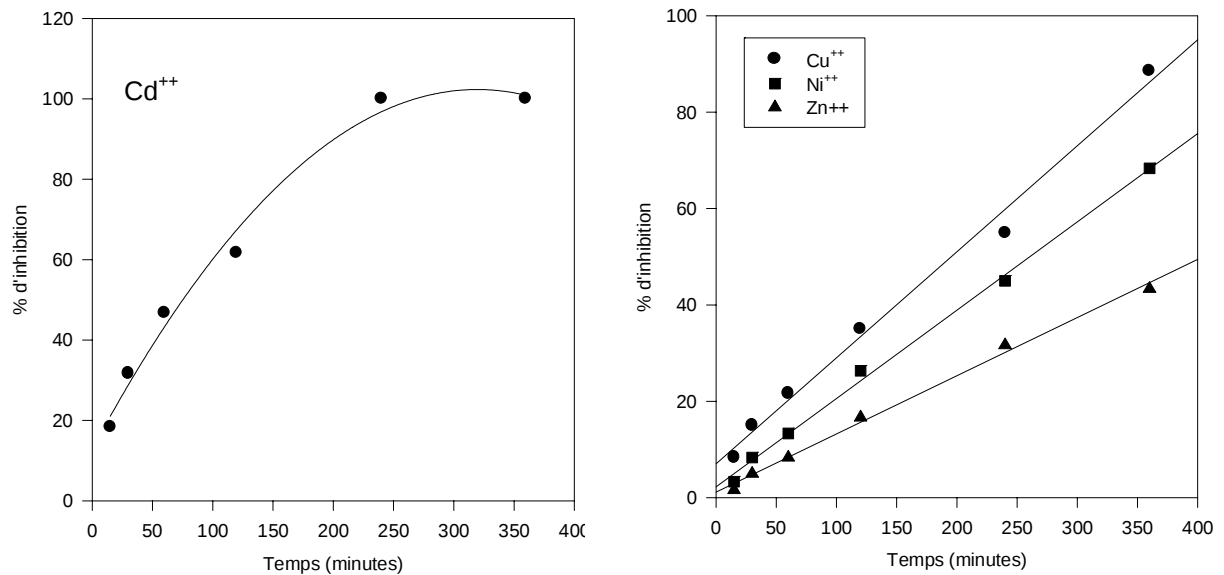


Figure 18.- Variation du taux d'inhibition en fonction du temps.

Des régressions linéaires sont quantifiées pour Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} .

Les taux d'inhibition dans ces cas suivent des lois linéaires (déterminés par la méthode des moindres carrés). Le pourcentage d'inhibition produit par le cadmium est lié au temps par une fonction du type $y = a t^b$.

Dans le tableau 22.-, nous regroupons les lois ainsi obtenues.

Tableau 22.- Taux d'inhibition = f (temps).

Métaux	Régressions	Coefficients de corrélations
Cd^{++}	Curviligne	-
Cu^{++}	$y = 0,22t + 7.0273$	0,9956
Ni^{++}	$y = 0,18t + 2.2492$	0,9987
Zn^{++}	$Y = 0,12t + 1.1613$	0,9974

Où : y = taux d'inhibition

t = temps.

Ces fonctions confirment encore, que le cadmium est doté d'un pouvoir toxique élevé. En effet, 18% d'inhibition par sont atteints aux 15 premières minutes de test et que ce pourcentage n'apparaît pour les trois autres métaux qu'après 60 minutes.

En raison de la capacité du bac-test et du débit de passage des solutions dans celui-ci, les quantités de métaux retenues par les daphnies ne sont considérées qu'après 60 min d'essai. Pour ce choix, nous rappelons que le temps de renouvellement total du milieu est évalué à 45,5 min.

La quantification des concentrations à la sortie de l'unité permet de distinguer quatre cinétiques (figure 19.-) selon que les daphnies sont immergées dans le cadmium, cuivre, nickel ou zinc.

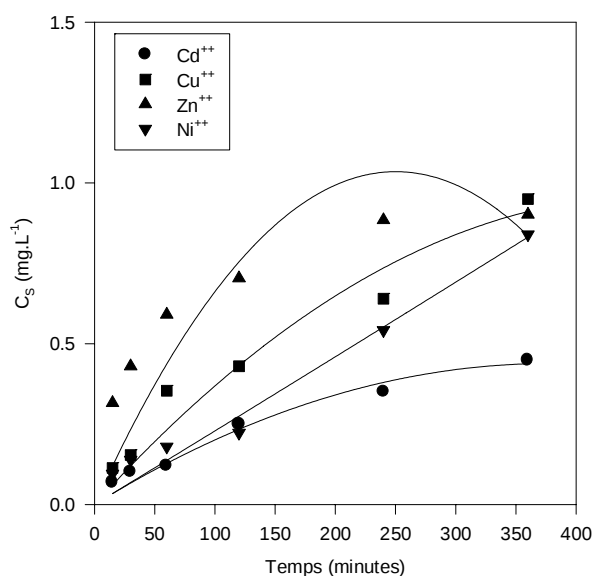


Figure 19.- Variation des quantités de métaux sortants du milieu d'essai.

Cette illustration montre que les quantités de métaux sortant (C_s) sont d'autant plus grandes que le temps de renouvellement est élevé, révélant ainsi le processus de contamination par, l'apport continu de métaux dans le milieu expérimental. Lors de cette phase, il ne nous est pas possible de prédire une adsorption et de la quantifier.

Pour des temps d'exposition supérieurs ou égaux à 60 min, les effets des quatre métaux se traduisent par des inhibitions croissantes (figure 18.-) corrélées à une augmentation des teneurs en métaux à la sortie (figure 19.-).

Les cinétiques de consommation des cations métalliques par les daphnies (figure 20.-) résultent du suivi des métaux pris par celles-ci. Pour cela, nous précisons qu'il ne se produit pas de précipitation aux pH donnés au tableau 21.-. De telles évaluations montrent

une baisse des concentrations métalliques retenues ($[M^{++}]_r/daphnie$) à partir d'une valeur maximale de Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} aux temps respectifs de 60; 60; 60 et 120 min. Nous pensons qu'il s'agit d'un arrêt de rétention des cations métalliques par les daphnies et que la capacité maximale adsorptive (des daphnies) est atteinte autour d'un temps d'expérience égal à 60 minutes à l'exception du cas du zinc.

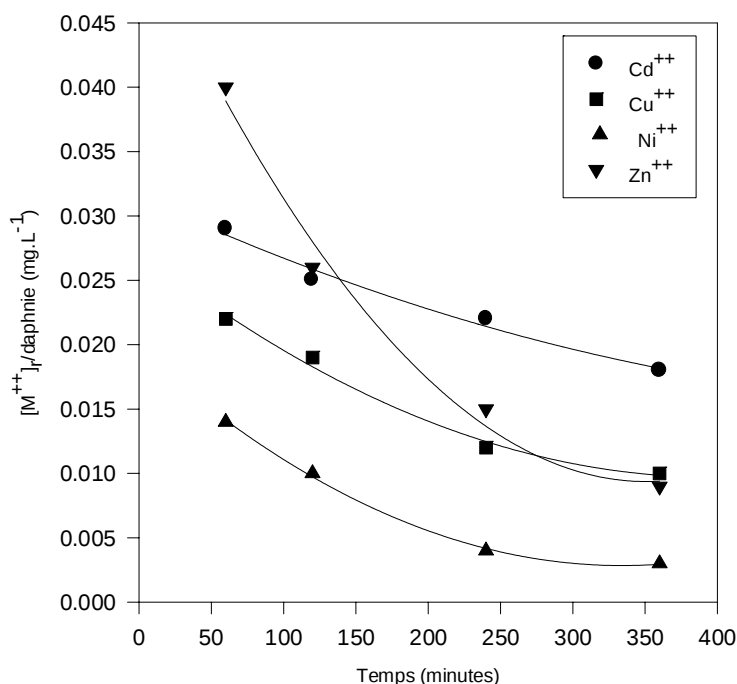


Figure 20.- Evolution des quantités de métaux retenues par daphnies en fonction du temps.

Enfin, cette analyse (tableau 22.- ; figures 18.- à 20.-), suggère que le phénomène d'adsorption, permet de quantifier une intoxication qui est sans doute la conséquence de l'absorption des toxiques par les organismes mis à l'épreuve. Ces observations expliquent donc la fixation du polluant sur les sites d'adsorption de la paroi cellulaire.

Dans ce même ordre d'idées, nous avons envisagé de faire varier la concentration pour un temps fixé. L'effet de la concentration est considéré dans une classe de valeurs incluant 1 $mg.L^{-1}$, des concentrations plus faibles et des concentrations supérieures à 1 $mg.L^{-1}$. Le débit d'amenée d'eau et des concentrations en toxique demeure constant.

Afin de limiter les volumes d'alimentation du dispositif, nous avons choisi un temps d'essai de 30 min et nous avons aussi fixé les concentrations métalliques à : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg.L⁻¹.

III.1.5.2.- Essais avec variation de la concentration.

Les expériences menées avec : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg cation métallique.L⁻¹ ont permis d'évaluer également les effets inhibiteurs de Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺ (tableau 23.-)

Tableau 23.- Détermination des taux d'inhibition en fonction de la concentration de métaux.

- Cadmium , pH = 7,75.

[Cd ⁺⁺] (mg.L)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% 'inhibition	[Cd ⁺⁺] _s
	mini	maxi			
0,25	25	28	4,73	11,66	0,041
0,5	19	24	10,67	28,33	0,095
1	19	22	6,03	31,66	0,102
1,5	12	13	3,72	58,03	0,436
2	8	10	9,07	70	0,678

- Cuivre , pH = 7,85.

[Cu ⁺⁺] (mg.L ⁻¹)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% 'inhibition	[Cu ⁺⁺] _s
	mini	maxi			
0,25	29	30	1,60	1,66	0,046
0,5	28	29	1,66	5,00	0,099
1	24	26	3,26	16,66	0,59
1,5	15	18	13,02	45,76	0,504
2	8	11	23,61	70,0	0,703

- Nickel, pH = 7.56.

[Ni ⁺⁺] (mg.L ⁻¹)	Nombre de daphnies mobiles		C.V	% inhibition	[Ni ⁺⁺] _s
	mini	maxi			
0,25	30	30	0	0	0,06
0,5	30	30	0	0	0,092
1	28	30	2,81	4,91	0,138
1,5	28	28	0	6,66	0,268
2	25	28	4,73	11,66	0,389

- Zinc, pH = 7.32.

[Zn ⁺⁺] (mg.L ⁻¹)	Nombre de daphnies mobiles		CV	% inhibition	[Zn ⁺⁺] _s
	mini	maxi			
0,25	30	30	0	0	0,193
0,5	30	30	0	0	0,295
1	28	29	1,66	5	0,419
1,5	27	29	2,91	6,66	0,587
2	24	27	4,92	15	0,761

La représentation graphique de la figure 21.- met en évidence l'effet de chaque métal, lorsque sa concentration est augmentée à l'entrée

La résultante d'une fixation extra cellulaire et intra cellulaire, du nickel et du zinc provoque une immobilisation similaire des daphnies. La forte capacité inhibitrice du cadmium demeure une réponse commune à tous les processus d'intoxication étudiés.

Les formes convexes des profils correspondant au zinc et au nickel particulièrement, expliquent que les vitesses d'inhibition sont relativement lentes aux faibles concentrations. En effet, l'exemple de C_e = 0,25 mg.L⁻¹ montre des taux relatifs d'inhibition de 11,66 ; 0 et 0 % pour Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ et Zn⁺⁺.

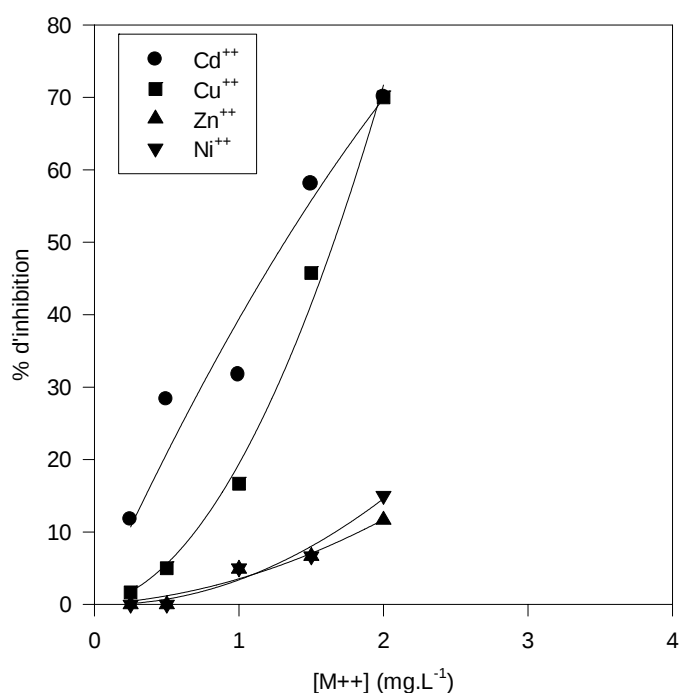


Figure 21.- Variation du taux d'inhibition en fonction de C_e .

Nous retenons alors que la vitesse de rétention du métal, interprétée comme la résultante d'un mécanisme physico-chimique d'adsorption au niveau des sites de la paroi cellulaire, est mise en évidence lors de la phase de dilution (temps d'exposition inférieur à 50 min). C'est ainsi que l'on démontre la grande affinité des métaux pour les structures surfaciques évoquée par Vray et *al.* (1992). Cependant, les travaux de ces auteurs considèrent qu'une phase d'adsorption rapide du ^{106}Ru par *Rhynchostegium riparoides*, succède une phase d'adsorption lente, induisant ainsi une accumulation de ce métal.

L'allure des variations des courbes de la figure 22.- permet d'établir des corrélations qui expriment la concentration sortante de métal (C_s) en fonction de la concentration entrante (C_e). En effet, ces courbes qui interprètent l'évolution de C_s en fonction de C_e , semblent suivre des lois du type $C_s = \alpha [C_e]^\beta$.

Les coefficients α et β sont des constantes qui peuvent être obtenues en portant $\ln C_s$ en fonction de $\ln C_e$. Les corrélations ainsi déduites sont données dans le tableau 24.-.

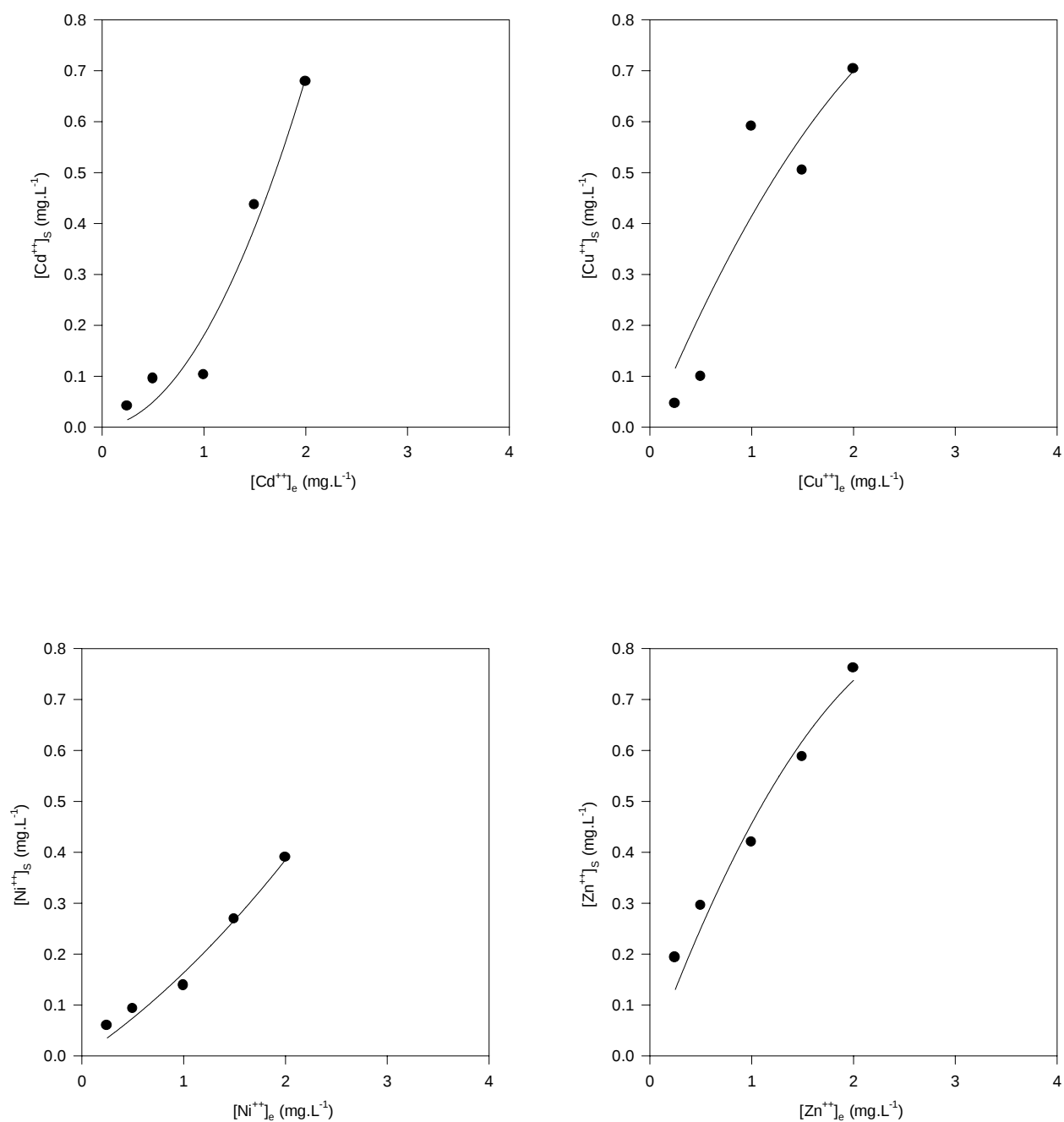


Figure 22.- Variation des concentrations en métaux à la sortie en fonction des concentrations de métaux à l'entrée.

Tableau 24.- Expression de C_s en fonction de C_e .

Métaux	Cd^{++}	Cu^{++}	Ni^{++}	Zn^{++}
corrélation	$C_s = 0,32 C_{e1}^{1,41}$	$C_s = 0,4 C_e^{1,41}$	$C_s = 0,18 C_e^{0,33}$	$C_s = 0,64 C_e^{0,46}$

Toutefois, ces relations ne sont pas systématiques puisqu'elles dérivent d'un certain nombre de conditions opératoires mais, elles décrivent le type de fonction qui pourraient lier C_s et C_e .

En déterminant les différences entre C_e et C_s pour une durée d'exposition de 30 min $\left(\frac{C_e - C_s}{t}\right)$, on obtient ainsi la quantité de métal restante ou retenue dans le milieu d'essai.

Les valeurs de pH des solutions inférieures à 8 devraient éliminer la possibilité de précipitation des métaux. Ce passage, donc, du métal à travers les membranes des daphnies a pour conséquence des perturbations de la mobilité de celles-ci.

Le schéma représentatif des variations du taux d'inhibition en fonction de $\left(\frac{C_e - C_s}{t}\right)$ ($t = 30$ min) (figure 22.-) fait apparaître des fonctions du type : % d'inhibition = $a \left(\frac{C_e - C_s}{t}\right)^b$.

La détermination de telles relations devraient permettre d'estimer le taux d'inhibition par une analyse de la concentration résiduelle de métal ou d'apprécier celle-ci connaissant les pourcentages de daphnies inhibées.

La détermination des constantes a et b est réalisée à partir des graphes de la figure 24.-.

Les relations résultantes de la figure 23.- sont formulés pour chaque métal au tableau 25.-

Tableau 25.- Expressions du taux d'inhibition en fonction $\left(\frac{C_e - C_s}{t}\right)$.

Métaux	Cd^{++}	Cu^{++}	Ni^{++}	Zn^{++}
y = % d'inhibition	$y = 910x^{0,8}$	$y = 23647x^{1,95}$	$y = 1057 x^{1,38}$	$y = 47.5x^{0,70}$

Où x désigne $\left(\frac{C_e - C_s}{t}\right)$

Les paramètres CI 50 30 minutes sont déterminés dans le but d'estimer les fractions $\frac{CI\ 50\ 30'}{CI\ 50\ 24h}$. Nous rappelons que les CI 50 24h sont celles déduites dans les paragraphes

(II.3.1.-) traitant la toxicité aiguë en statique. Les CI 50 30 min sont respectivement pour de 0,308 ; 0,516 ; 0,648 et 0,980 pour Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Zn^{++} .

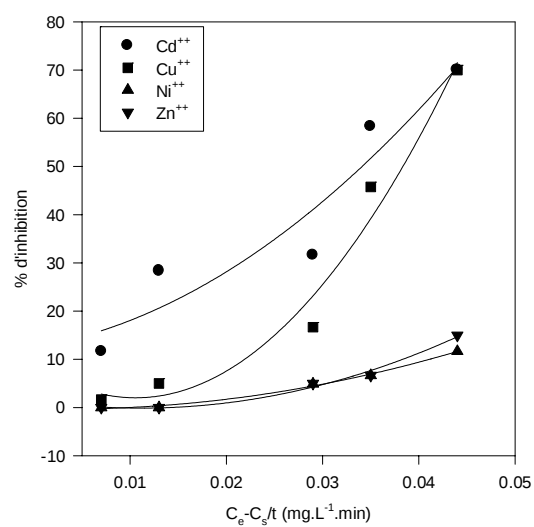
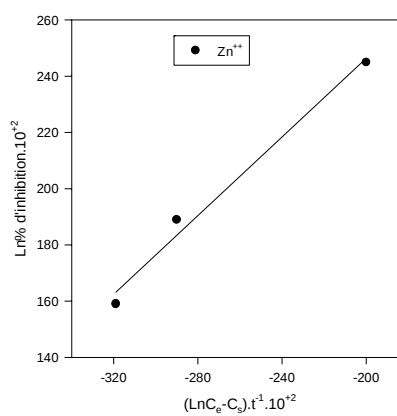
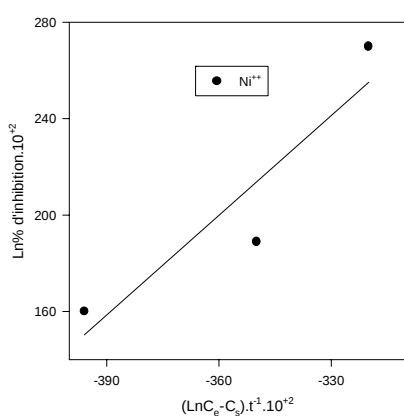
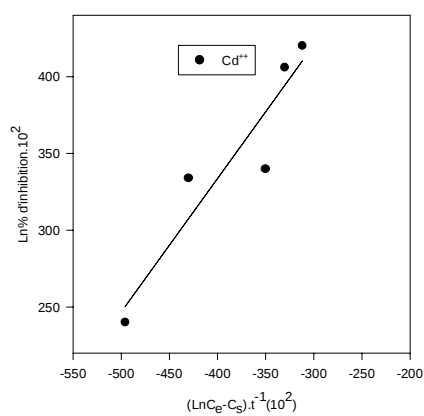
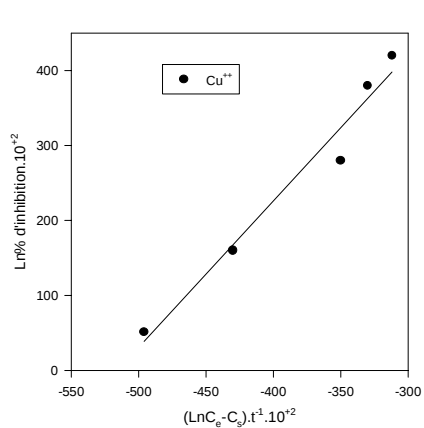


Figure 23.- Variation du taux d'inhibition par rapport à $\left(\frac{C_e - C_s}{t}\right)$.



Figures 24.- Détermination des constantes a et b.

Les rapports $\frac{CI\ 50\ 30'}{CI\ 50\ 24h} = 5$ pour Cd et Cu s'avèrent bien corrélés de même que pour Ni (0,081) et de Zn (0,078).

Nous pensons que ces couples de rapports ne permettent de tirer aucune hypothèse d'intérêt particulier.

L'expérience menée au laboratoire montre clairement l'influence d'une augmentation du temps d'exposition ou de concentration en métal. La méthode de lavage ou de dilution serait un critère quelque peu détoxifiant, signifiant ainsi une diminution de l'inhibition des daphnies.

III.1.5.3.- Essais de toxicité après dilution d'un milieu contaminé

La méthode de lavage et les étapes opératoires suivies lors de ces essais sont données au chapitre I.

Les résultats obtenus (figure 25.-) montrent que les pourcentages des daphnies immobilisées chutent rapidement jusqu'à atteindre même 0%, dans les cas du nickel et du zinc, lorsque la dilution est assurée pendant 60 min.

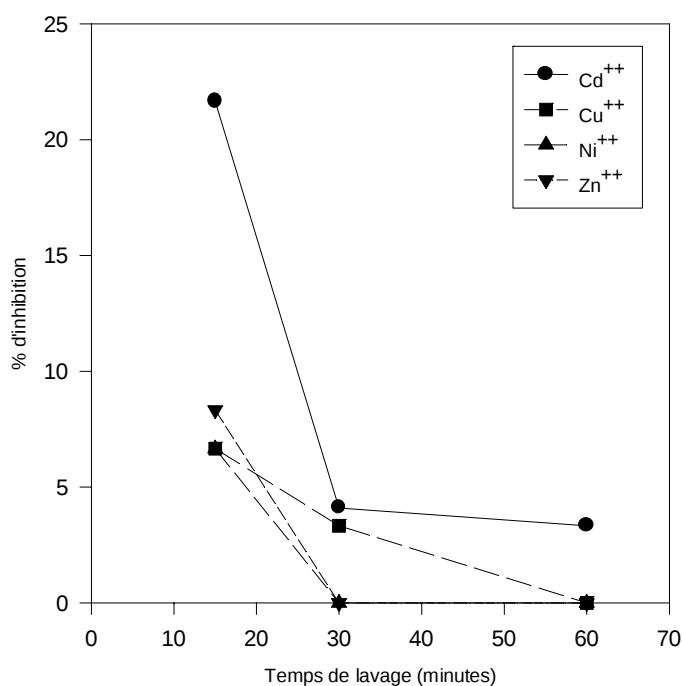


Figure 25.-Taux d'inhibition en fonction du temps de lavage.

L'efficacité de ce critère mérite donc d'être prise sérieusement en considération à une échelle plus proche des conditions réelles d'une station. Les dosages des métaux (Cd, Cu, Ni et Zn) sont effectués, d'une part, juste avant le démarrage du traitement par dilution et d'autre part après 15, 30 et 60 min de lavage. Les résultats de cette analyse, figurant dans le tableau 26.- montrent ainsi l'effet de dilution sur les concentrations métalliques qui tend sans restriction à modifier l'information analytique recueillie sur les échantillons de l'étape d'avant lavage.

Tableau 26- Résultats d'analyse des concentrations métalliques.

Temps de lavage (min)	C_0 et C_f (mg.L ⁻¹)			
	Cd	Cu	Ni	Zn
	($C_0 = 0,097$)	($C_0 = 0,135$)	($C_0 = 0,45$)	($C_0 = 0,142$)
15	0,071	0,105	0,235	0,116
30	0,058	0,062	0,096	0,089
60	0,023	0,023	0,085	0,033

Où : $C_0 = [M^{++}]$ avant l'opération lavage ;
 $C_f = [M^{++}]$ à la fin de l'opération lavage.

Pour une unité expérimentale de contenance 500 ml, le temps optimal de détoxification est estimé à 30 minutes approximativement.

Pour une dilution étalée sur 60 min, les quantités de métaux (C_f) sont considérablement réduites. Celles-ci tombent respectivement pour Cd, Cu, Ni et Zn de 0,097 à 0,023, 0,135 à 0,023, 0,452 à 0,085 et 0,142 à 0,033 mg.L⁻¹. Outre ces observations qui font d'autant plus ressentir qu'une pollution métallique accidentelle est éliminée par un simple procédé de dilution, nous remarquons que les rapports $\left(\frac{C_0}{C_f}\right)_{15 \text{ min}}$ et $\left(\frac{C_0}{C_f}\right)_{60 \text{ min}}$ (tableau 27.-) ne révèlent pas de grandes variations.

Tableau 27.- Evaluation des rapports $\left(\frac{C_0}{C_f}\right)$.

Métaux	Cd	Cu	Ni	Zn
$\left(\frac{C_0}{C_f}\right)_{15'}$	1.36	1.28	1.62	1.22
$\left(\frac{C_0}{C_f}\right)_{60'}$	4.2	5.86	5.3	4.30

Ces fractions de concentrations expliquent que le procédé de dilution pourrait conduire à des formules de corrélations que nous ne pouvons pas établir, par manque de données, qui ne nous offre pas la possibilité d'un tel calcul.

Jusqu'à présent, de nombreux travaux ont porté sur la mort physiologique en test aiguë (statique), mais la connaissance des variables liées au fonctionnement des installations biologiques de contrôle en continu de la qualité de l'eau restent restreintes. Ce manque d'informations en littérature nous a conduit à élaborer un schéma descriptif, avec lequel nous avons recensé quelques éléments nécessaires à la mise en œuvre d'un système d'alarme opérant en continu. Un tel dispositif devrait permettre le suivi de la mobilité de *Daphnia magna* susceptible de caractériser l'état d'un milieu. Cette méthode souffre néanmoins de quelques inconvénients, au niveau des stations in situ, liés au contrôle de l'espèce elle-même et de son adaptation à l'eau naturelle d'alimentation dont la composition physico-chimique pourrait présenter une grande variabilité.

Par ailleurs, la sélection en permanence des organismes (au minimum une fois tous les deux jours) selon leur âge, leur taille et la vérification de l'homogénéité d'un lot de daphnies doit être impérativement rigoureuse. Cependant, la démarche analytique, telle que celle que nous proposons permet aisément de signaler les effets insidieux et spectaculaires d'une intoxication par les métaux. La maintenance de tels appareils biologiques imposent la connaissance parfaite des fonctions physiologiques et des techniques d'élevage de ces crustacés.

III.2.- Tests de toxicité aiguë et chronique : élevage des daphnies dans des conditions de nourriture et d'éclairage artificielles

Les caractéristiques de l'eau minérale « Saïda » et du milieu LC + E.M sont données dans les tableaux 28 et 29 respectivement.

On note LC pour Lefèvre Czarda et EM pour eau minérale.

Tableau 28 : Détermination de la composition chimique de l'eau minérale (Saïda)

Ions	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Fe ⁺⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁻⁻	NO ₃ ⁻	CO ₂	SiO ₂
[ions] (g.L ⁻¹)	0,058	0,0034	0,06	0,050	-	0,376	0,081	0,065	0,018	traces	0,009

Tableau 29: Composition du milieu LC + EM

ions	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Fe ⁺⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁻⁻	NO ₃ ⁻	CO ₂	SiO ₂
[ions] (mg.L ⁻¹)	1,12	48,81	18,02	12,36	0,19	-	16,30	22,60	69,91	-	-

III.2.1.-Test de toxicité aiguë.

L'expérience ainsi réalisée (tableau 30.-) permet une étude comparative, compte tenu des valeurs déjà observées (résultats à 20°C, tableau 7) au paragraphe III.1.1.-. Dans les deux cas de test aigus, les résultats montrent une inhibition indissociable de celle due à l'intoxication causée par K₂Cr₂O₇, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ et Ni⁺⁺. Il faut noter également pour ce test, que les variabilités des pouvoirs inhibiteurs des différents cations métalliques constituent une échelle de classement par ordre de toxicité croissante et qui est : Ni⁺⁺ < Zn⁺⁺ < Cu⁺⁺ < Cd⁺⁺. Sachant que nous avons obtenu le même classement au chapitre II, nous déduisons donc de cette remarque que les méthodologies préconisées pour les élevages ne modifient pas l'ordre des toxicités croissantes des 4 métaux.

De ces résultats, il n'apparaît aucune différence significative entre les CI50 pour les deux modes d'élevage. Nous notons, cependant, que cette observation est en contradiction avec l'hypothèse de Enserink et *al.* (1993), qui marque l'effet de la nourriture sur les réponses de *Daphnia magna* à une intoxication par le chrome et le cadmium.

Tableau 30.- CI50 24h et 48h : (1) élevage : conditions naturelles.

(2) élevage : conditions artificielles.

CI50 (mg.L ⁻¹)	Cd ⁺⁺		Cu ⁺⁺	
	(1)	(2)	(1)	(2)
24 h	0,065	0,059	0,105	0,106
	(0,054 – 0,076)	(0,044 – 0,076)	(0,04 – 0,17)	(0,06 – 0,15)
48 h	-	-	0,032	0,038
			(0,022 – 0,042)	(0,028 – 0,048)

*Entre parenthèse sont indiquées les limites de confiance sur les CI50.

Une autre variation, pour des expériences réalisées dans un même laboratoire, est mise en évidence par Dave et *al.* (1981) qui obtiennent une CI 50 24h égale à 0,31 mg.L⁻¹ et une CI50 48h de 0,069 mg Cd⁺⁺.L⁻¹, à partir d'un test sur *Daphnia magna*, alors que cette dernière évaluation correspond à notre résultat de test sur 24 h.

Nous retenons de ces comparaisons que même si les démarches expérimentales sont plus ou moins comparables, dans le cas du test aiguë en particulier, il est cependant difficile d'uniformiser un résultat pour ce type de test par une simple approche analytique. Münzinger et *al.* (1991) attribuent cette disparité à la répartition des daphnies dans les différents écosystèmes situés dans différents pays.

III.2.2.- Test de toxicité chronique.

Dans ce cas, nous exposons les daphnies durant une période de 21 jours à des concentrations sublétales de chrome hexavalent, de cadmium, de cuivre et de nickel. Les concentrations testées sont choisies sur la base de données bibliographiques (tableau 31.-). Cet aperçu, sur les études de l'influence de Cd⁺⁺, Cr⁶⁺, Cu⁺⁺ et Ni⁺⁺ sur *Daphnia magna* à long terme nous a conduit à considérer les gammes de concentrations suivantes :

Cr⁶⁺ : 0 ; 0,5 ; 1 ; 10 ; 20 et 30 µg.L⁻¹ ; Cd⁺⁺ : 0 ; 0,06 ; 0,18 ; 1 et 5 µg.L⁻¹ ; Cu⁺⁺ : 0 ; 2 ; 15 et 20 µg.L⁻¹ ; Ni⁺⁺ : 0 ; 50 ; 75 ; 100 et 120 µg.L⁻¹

Tableau 31.- Données bibliographiques sur les concentrations sublétales de Cr⁶⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ et Ni⁺⁺.

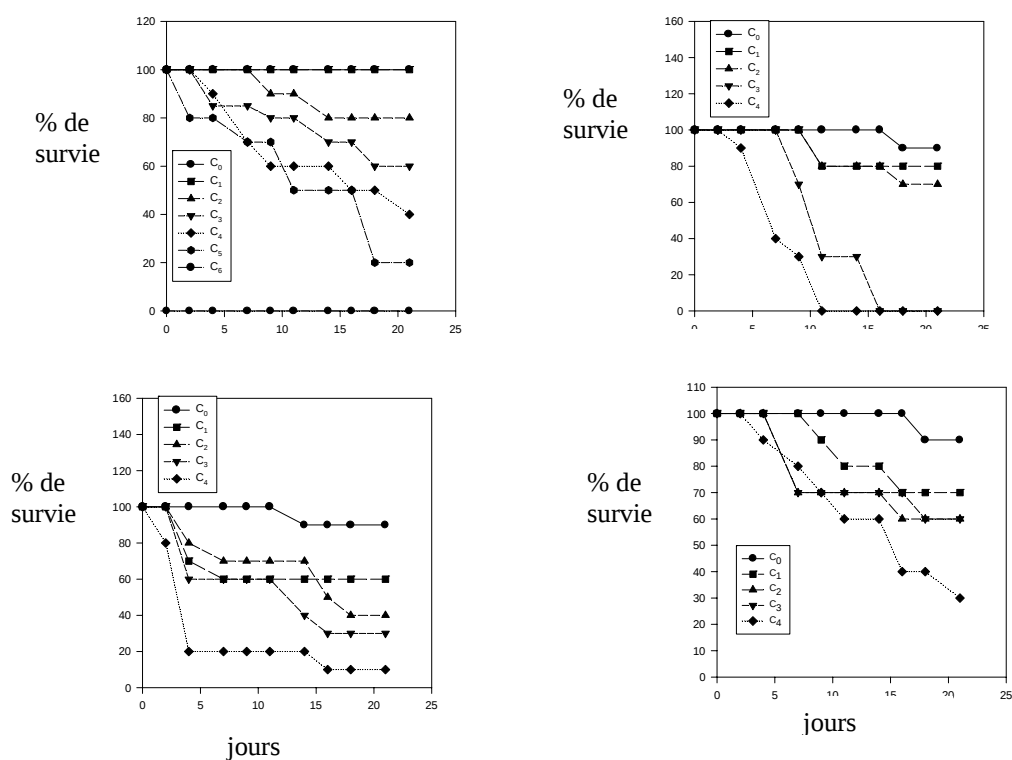
Métal	Gammes (µg.L ⁻¹) et références bibliographiques.	
	20 à 140	- (Coniglio et Baudo, 1989)
Cr ⁶⁺	5 et 10	- (Münzinger et Monicelli, 1992)
	50, 100 et 150	- (Münzinger, 1991)
	0.2, 5, 10, 15, 25	- (Borgman et al., 1989)
Cd ⁺⁺	5, 10, 15, 20, 40	- (Pommery et al., 1983)
	0.5, 1, 2, 5	- (Kluttgen et al., 1989)
	20	- (Winner, 1984)

Tableau 31.- (Suite).

Cd ⁺⁺	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	- (Enserink et <i>al.</i> , 1993)
	2, 4, 8, 15, 20, 25, 30, 40	- (Pommery et <i>al.</i> , 1983)
Cu ⁺⁺	20, 40, 60, 80, 100, 120	- (Winnerand et Farell, 1976)
	40, 80, 120, 160, 200	- (Münzinger, 1990)
Ni ⁺⁺	50, 100, 150	-(Münzinger et Monicelli, 1992)

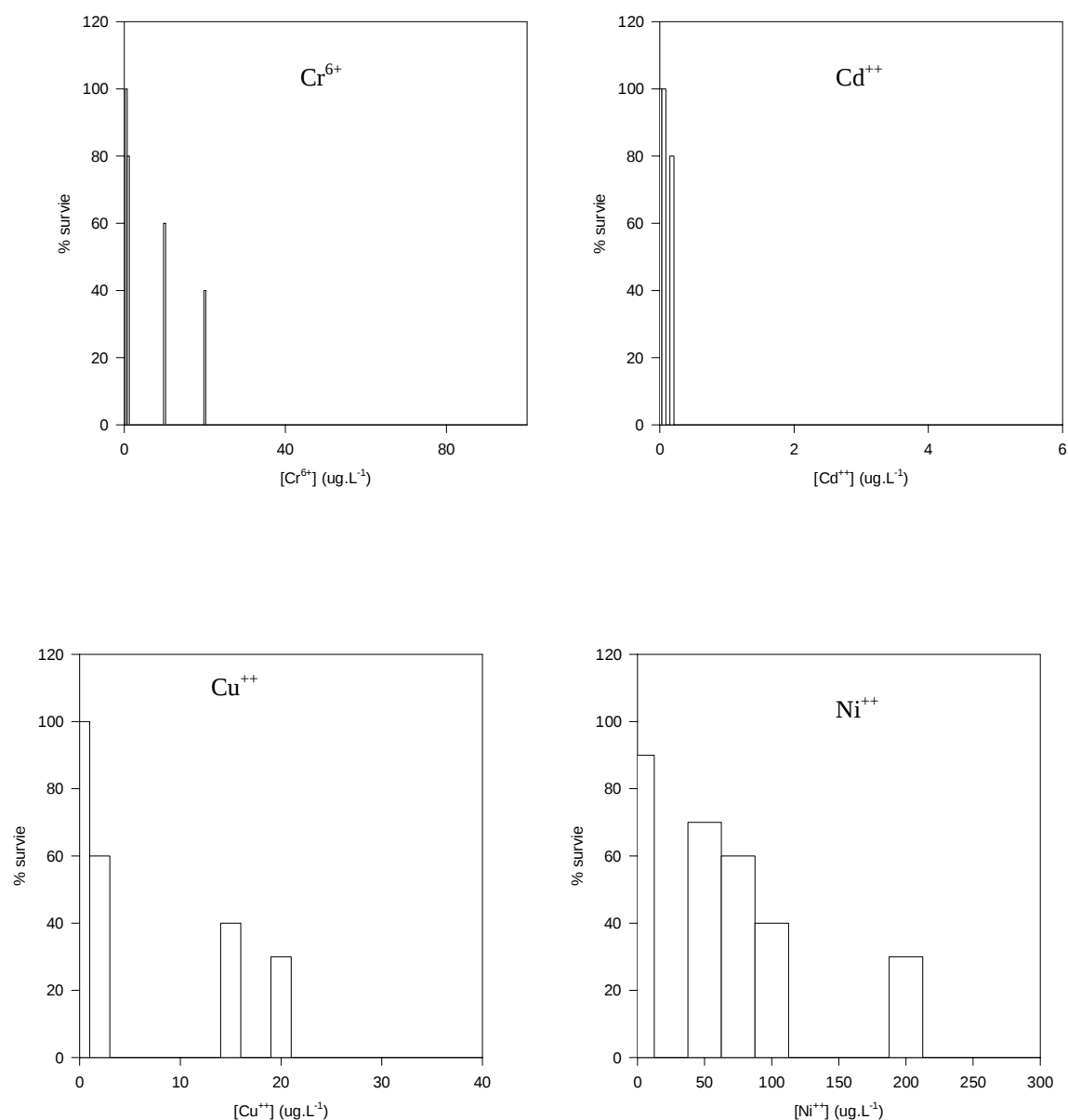
Nous soulignons que les valeurs moyennes de pH et d'oxygène dissous dans toutes les expériences ont varié respectivement de 7,8 à 8,2 et de 6 à 5 mg O₂.L⁻¹.

La présence de métaux dans les solutions montre une variation du taux de survie des daphnies en fonction du temps d'exposition de celles-ci à une toxicité métallique (figure 26.-). Ainsi, on peut noter une réduction du taux de daphnies survivant lorsque la concentration en métal et le temps croient simultanément.



Figures 26.- Variation du taux de survie en fonction du temps et des différentes concentrations métalliques.

Si nous considérons l'effet de la concentration croissante des quatre métaux sur le pourcentage de survie après 21 jours de contact métal–daphnies (figure 26.-), nous relevons une augmentation de la mortalité des daphnies. Les résultats relatifs aux témoins (figure 27.-) se révélés, dans la majorité des cas, satisfaisant aux exigences se l'OCDE (1991), qui imposent un taux de mortalité $\leq 10\%$ dans les milieux exempts de toxiques.



Figures 27.- Evolution du taux de survie en fonction de la concentration de:Cr⁶⁺ Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ et Ni⁺⁺).

Nous soulignons le fait qu'aucune irrégularité dans les variations de survie par rapport aux quantités de métaux ajoutées, n'apparaisse dans nos résultats. Nous obtenons une baisse progressive du taux de survie dans la majorité des cas, sauf pour le cadmium où nous notons une chute brutale de ce paramètre entre 0,18 $\mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$ et 1 $\mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$, qui correspondent respectivement aux taux de 80 et 0%. Pour cela, nous précisons que nous n'avons pas estimé nécessaire d'affiner d'avantage la gamme de concentrations entre les valeurs sus-citées, en pensant qu'un essai à part avec une concentration intermédiaire ne serait valable que si toutes les concentrations étaient testées en même temps (Enserink et *al.*, 1993).

Nous retenons de cette première observation que le test 21 jours décrit bien, le reflet d'un milieu contaminé par une pollution métallique pour pouvoir évaluer son effet subléthal.

L'examen d'autres paramètres biologiques, tels que la reproduction sont résumés dans les tableaux : 32.- à 35.-.

Tableau 32.- Nombre de jeunes daphnies/21 jours : cas du Cr^{6+} .

$[\text{Cr}^{6+}] (\mu\text{g}.\text{L}^{-1})$	0	0,5	1	10	20	90
Max	125	110	100	75	60	6
Min	60	65	63	44	34	0
moyenne	87,8	85,2	78	57	48,6	2,4
écart type	21,38	14,79	14,58	10,41	19,49	0
C.V	24,35	17,20	18,69	18,26	40,10	0

*** $P < 0,05$**

Nous mentionnons que tous les résultats relatifs aux essais témoins sont satisfaisants par rapport aux clauses de validité d'un test acceptable (nombre de jeunes daphnies supérieur ou égal à 60 en 21 jours).

L'analyse de variance, ANOVA ($P < 0,05$) a révélé une différence significative entre les nombres de petits obtenus en 21 jours et le témoin. Le test de Bonferroni nous a permis de déterminer la LOEC et d'en déduire la NOEC pour le chrome hexavalent et qui sont respectivement égales à 10 et 1 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$.

L'effet du cadmium sur la reproduction (tableau 33.-) est significativement observée ($P < 0,05$) pour les concentrations en cadmium égales à 0,18, 1 et 5 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$.

Tableau 33.- Nombre de jeunes daphnies/21 jours : cas du Cd⁺⁺.

[Cd ⁺⁺] (µg.L ⁻¹)	0	0,06	0,18	1	5
Max	127	110	117	9	9
Min	65	69	45	6	6
moyenne	80,2	89,3	78,8	7,5	6,9
Ecart type	24,58	24,78	14,78	1,20	1,18
C.V	30,64	27,75	18,76	16,00	17,10

*** P < 0,05**

Il ressort également dans ce cas, une baisse importante des jeunes daphnies, lorsque la teneur en cadmium passe de 0,18 à 1 µg.L⁻¹. Cette observation exprime l'effet inhibiteur du cadmium sur la reproduction. En effet, les daphnies survivant (figure 26.-) jusqu'à un âge inférieur à 21 jours n'ont pas pu pondre plus de 9 œufs, durant leurs périodes de survie. Les LOEC et NOEC pour chaque paramètre biologique considéré seront présentées et discutées ultérieurement.

Nous présentons les variations de la progéniture en fonction de l'augmentation de la concentration de cuivre dans les solutions d'essais au tableau 34.-.

Tableau 34.-: Nombre de jeunes daphnies/21 jours : cas du Cu⁺⁺.

[Cu ⁺⁺] (µg.L ⁻¹)	0	2	15	20	30
Max	127	141	99	107	14
min	63	59	60	32	6
moyenne	84	83,7	75,7	39,3	9,1
écart type	22,50	25,1	14,00	21,96	4,17
C.V	26,78	29,98	18,49	57,85	43,43

*** P < 0,05**

Le nombre moyen de petits en 21 jours oscille entre 84 et 9,1 pour 2 et 30 µg.L⁻¹ de cuivre, respectivement. On note donc une relation concentration-effet du cuivre pour une élévation de la concentration de celui-ci.

Notons par ailleurs que les daphnies exposées à 2 µg.L⁻¹ de Cu⁺⁺ fournissent une réponse semblable, voire meilleure (max. = 141 œufs) par rapport à celle du témoin où le maximum

d'œufs est de 127. Ceci serait dû probablement à l'intérêt nutritionnel que présente ce métal, à faible concentration, pour la daphnie.

L'analyse de variance révèle une diminution hautement significative ($P < 0,01$) pour Cu^{++} égal à $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les résultats du test Bonferroni pour la détermination de la LOEC sont ci-après.

Les résultats de l'effet du nickel sur le nombre de jeunes daphnies pendant 21 jours de test (tableau 35.-) montrent que ce métal affecte la reproduction de manière moins prononcée que Cr^{6+} , Cd^{++} et Cu^{++} et pour des concentrations nettement plus élevées choisies pour les trois autres métaux.

Tableau 35.- Nombre de jeunes daphnies/21 jours : cas du Ni^{++} .

$[\text{Ni}^{++}] (\mu\text{g.L}^{-1})$	0	50	75	100	200
Max.	114	119	107	88	63
min	60	40	51	32	7
moyenne	80,2	86,0	72,7	69,8	28,1
écart-type	24,58	26,09	17,84	21,88	-
C.V	30,64	30,33	24,53	31,34	-

* $P < 0,05$

Pour une analyse comparative des pouvoirs toxiques de ces métaux, nous choisissons les LOEC et NOEC tirées à partir du test de Bonferroni et que nous portons dans le tableau 36.-.

L'examen des coefficients de variation laisse distinguer une variabilité importante pour les concentrations les plus élevées en cuivre (20 et $30 \mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$) et de nickel ($200 \mu\text{g Ni}^{++}.\text{L}^{-1}$). Ce résultat tend à expliquer que ces deux métaux n'affectent pas de façon semblable les différents organismes soumis à une même concentration. Cependant, ces mêmes concentrations de Cu^{++} et Ni^{++} affectent significativement la reproduction.

Tableau 36.- LOEC et NOEC de la survie et de la reproduction de : Cr^{6+} , Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} .

	Survie				Reproduction			
	Cr^{6+}	Cd^{++}	Cu^{++}	Ni^{++}	Cr^{6+}	Cd^{++}	Cu^{++}	Ni^{++}
LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	10	5	15	200	1	1	20	200
NOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1	0,18	2	100	10	0,18	15	100

Ces résultats montrent que les LOEC et NOEC du nickel sont identiques pour les deux critères biologiques. La ressemblance de ces réponses signifie que les effets de Ni^{++} sur la survie et la reproduction se manifeste à un même niveau de toxicité que le nickel.

La reproduction dans les cas de Cr^{6+} et Cd^{++} s'est révélée le critère le plus sensible vis-à-vis de ces cations métalliques.

Les NOEC relatives au cuivre indiquent que le paramètre survie présente une sensibilité importante par rapport à celle de la reproduction. Ces observations permettent de conclure que les sensibilités des différents critères biologiques n'évoluent pas de manière uniforme et que chaque métal interagit différemment avec le système de reproduction ou de la survie des organismes contaminés.

En considérant un troisième paramètre biologique qui représente le premier jour de ponte (tableau 37.-), nous notons du point de vue de la sensibilité, une ressemblance entre les effets de ces 4 métaux sur ce critère et sur la reproduction.

Tableau 37.- LOEC et NOEC du premier jour de ponte de : Cr^{6+} , Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} .

Paramètres	1 ^{er} jour de ponte			
	Cr^{6+}	Cd^{++}	Cu^{++}	Ni^{++}
LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	10	1	20	200
NOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1	0,18	15	100

Cette remarque met en évidence une relation d'aspect biologique entre le nombre d'individus pondus et le premier jour de ponte. De ce fait, nous préférons expliciter d'avantage les retards causés par les différents métaux sur la ponte et donc la maturité des daphnies. Nous donnons, à cet effet, les résultats détaillés quant aux perturbations du premier jour de ponte (tableau 38.-) par la toxicité métallique. En effet, ces résultats indiquent l'importance du report du premier de ponte au 16^{ème}, jour par la présence de $20 \mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$.

Tableau 38.- Premier jour de ponte, tests avec : Cr^{6+} , Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} .

	[métal] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	maxi	mini	moyenne	écart-type
Cr^{6+} (p < 0,05)	0	7	7	7	0
	0,5	7	7	7	0
	1	9	7	7,8	0,98
	10	9	7	8,4	0,98
	20	11	7	9	1,26
	90	9	0 (pas de ponte)	8	1
Cd^{++} (p < 0,05)	0	7	7	7	0
	0,06	9	7	7,4	0,8
	0,18	9	7	7,8	0,98
	1	9	7	8,2	0,98
	5	9	9	9	0
Cu^{++} (p < 0,05)	0	7	7	7	0
	2	9	7	7,8	0,98
	15	12	9	9,3	0,90
	20	16	12	10,1	2,42
	30	9	12	10,5	15,04
Ni^{++} (p < 0,05)	0	7	7	7	0
	50	9	7	7,4	0,8
	75	9	7	7,8	0,98
	100	9	7	8,4	0,91
	200	7	12	8,5	1,55

Il ressort de l'examen de ces résultats que le chrome hexavalent a causé une inhibition complète de la production de petits crustacés (p < 0,01) pour une teneur de celui-ci de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nous relevons également du tableau 32.-, pour cette même concentration de chrome, une reproduction quasiment nulle pour une durée de test de 21 jours. Cette observation confirme bien la corrélation entre le premier jour de ponte et le nombre de jeunes daphnies que nous avons cité au tableau 32.-. Les trois paramètres biologiques : survie, reproduction et premier jour de ponte dans les cas du chrome et du cadmium, sont les paramètres les plus sensibles de suivi de la toxicité. Adema (1978) opte pour la reproduction comme critère de sensibilité dans les tests chroniques (21 jours). Winnerand et Farel (1976) trouvent que la survie est le meilleur index pour le suivi de toxicité du

cuivre dans le cas d'un test prolongé. Ce qui correspond bien aux résultats des tableaux 36.- et 37.-) qui donnent une LOEC de 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour la survie et des LOEC de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le nombre de jeunes daphnies et le premier jour de ponte.

Taylor et *al.* (1979) recommandent une concentration en chrome « sans danger » de 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mais les NOEC obtenues sont inférieures à cette valeur pour tous les critères considérés.

Coniglio et Baudo (1989) montrent que ce métal réduit le cycle de vie, raccourcit la période de reproduction et diminue le nombre d'œufs pondus par ponte.

Les résultats de nos essais relatifs au cadmium montrent une NOEC très faible. La survie, le nombre de jeunes daphnies et le premier jour de ponte sont affectés significativement ($p < 0,05$) à partir de 0,18 $\mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$. Ces résultats sont assez proches de ceux obtenus par Kluttgen et *al.* (1989), qui montrent une diminution significative de la reproduction à partir de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium. Des valeurs plus faibles de cadmium ont réduit significativement la reproduction des daphnies (Biesinger et *al.*, 1972). Ces auteurs obtiennent 50% de réduction de la survie pour une concentration en Cd^{++} égale à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. D'après Gulati et *al.* (1988), le critère physiologique, taux d'assimilation, s'est montré très sensible à des concentrations en cadmium allant de 1 à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, toujours dans le cas de tests utilisant la daphnie.

Pommery et *al.* (1983) proposent une concentration de 5 $\mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$ pour un effet significatif de ce métal sur la reproduction, la taille de ponte et le nombre de ponte de *Daphnia magna*.

L'étude de la toxicité chronique du cuivre permet de conclure que le paramètre le plus sensible est la survie (LOEC = 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Cette observation est en accord avec celles de Winnerand et Farell (1976) et Ingersoll et Winner (1982) qui montrent une importante sensibilité de la survie vis-à-vis du cuivre. Ces auteurs indiquent une augmentation significative de la toxicité de Cu^{++} pour des concentrations allant de 40 à 60 $\mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$.

Stiff (1971) et Pagenkopf et *al.* (1974) trouvent dans cette même gamme (40 à 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$) un effet significatif du cuivre sur quatre espèces de daphnies, après trois semaines de test.

Münzinger et *al.* (1992) montrent que 5 μg et 10 $\mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$ réduisent la survie dans les proportions respectives de 25 et 75%, ce qui n'est pas très différent de nos résultats où 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ provoquent une réduction de 60%.

La reproduction et le premier jour de ponte sont affectés significativement à la même concentration (LOEC = 20 $\mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$). Lors d'un essai de 3 semaines, Biesinger et

Christensen (1972) observent une diminution de la reproduction de 16%, à partir de 22 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre.

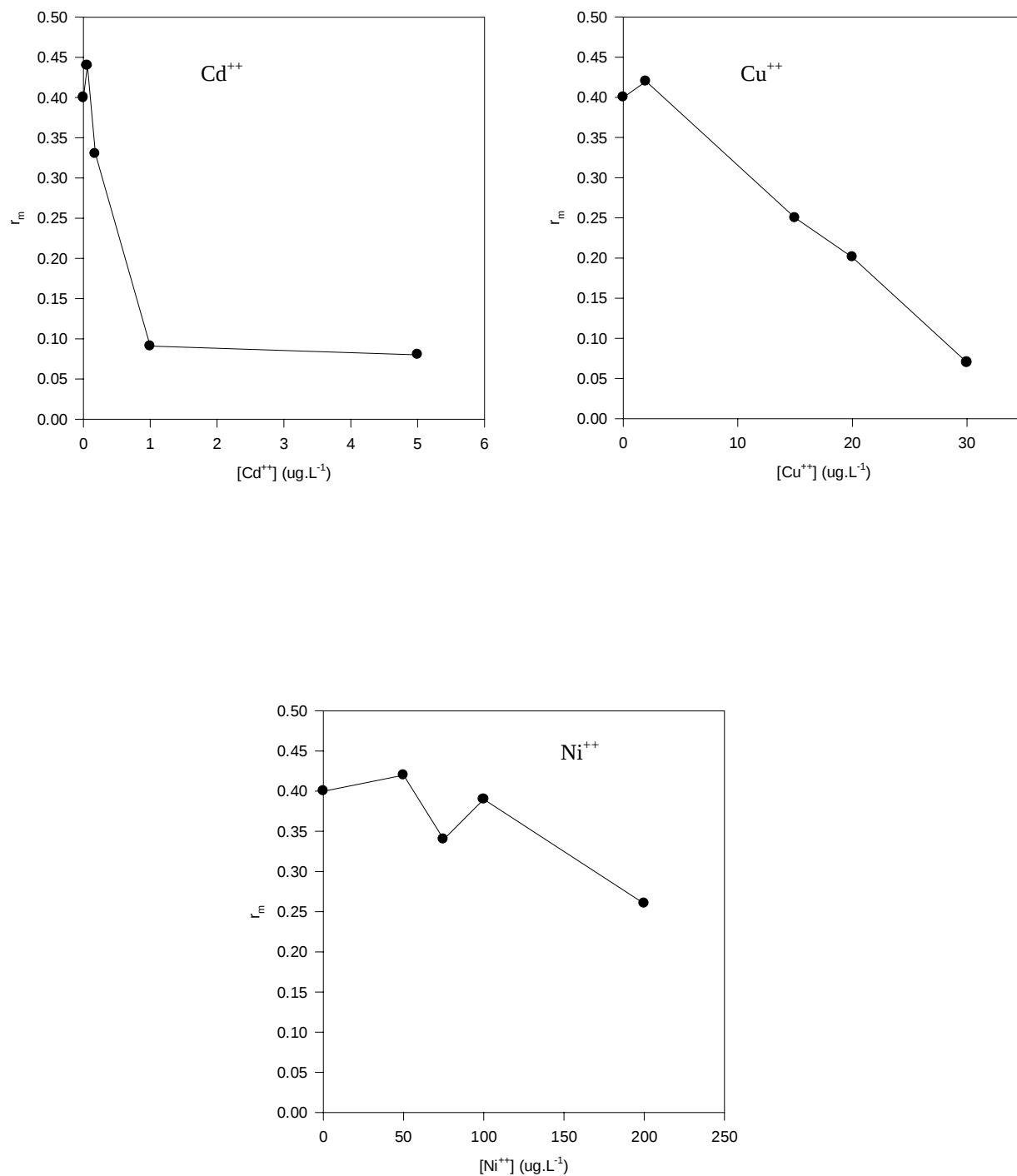
La toxicité aiguë du nickel est confirmée par plusieurs auteurs (Biesinger et Christensen 1972 ; Calabrese et Nelson 1974 ; Gupta *et al.*, 1981 ; Wang, 1986, 1987). Quant à la toxicité chronique de ce métal, certains auteurs se sont intéressés à l'incidence de celui-ci sur différents organismes (Biesinger et Christensen, 1972 ; Pickering, 1974 ; Spencer *et al.*, 1981 ; Avillo *et al.*, 1982 ; Nebecker *et al.*, 1985 ; Münzinger, 1990 et Münzinger, 1991). Le test chronique, dans notre cas, montre une sensibilité identique ($\text{LOEC} = 200 \mu\text{g.L}^{-1}$) des trois paramètres biologiques testés. Biesinger et Christensen (1972) montrent que la survie et la reproduction sont réduites de 50%, pour respectivement 130 et 90 $\mu\text{g Ni}^{++}.\text{L}^{-1}$. Suite à cette énumération de résultats cités par la littérature et en guise de conclusion, nous soulignons les différences entre les réponses des daphnies exposées à des toxicités chroniques des cations métalliques Cr^{6+} , Cd^{++} , Cu^{++} et Ni^{++} .

Cette grande variabilité des résultats des différents auteurs ne peut être liée qu'à l'aspect de l'espèce, de son origine et à la manière dont est réalisée l'expérimentation.

Au moyen de cette évaluation de la toxicité chronique de Cd^{++} , Cu^{++} et Ni^{++} , en particulier, et du Cr^{6+} choisi comme produit de référence, nous nous sommes proposés de déterminer les variations du taux intrinsèque (défini au chapitre I) en fonction des différentes concentrations en métaux (figure 28.-).

Le taux intrinsèque représente les états simultanés de la survie et de la reproduction. Selon la condition du premier jour de ponte (7^{ème} jour), n'ont été considérés que les r_m durant une période allant de 7 à 21 jours.

Les fluctuations des r_m du témoin au cours du temps, peuvent s'expliquer par les différences de compositions des tailles de pontes (nombre d'œufs par ponte).



Figures 28.- Variation de r_m (au 21^{ème} jour) en fonction des concentrations métalliques.

La distinction des r_m respectifs du témoin et des solutions toxiques à partir des figures 28.- (a à c) souligne l'importance du pouvoir toxique du cadmium. En effet, le taux intrinsèque

moyen $\bar{r}_m$ chute (figures 28.-), en fonction des quantités de métaux ajoutées d'une valeur maximale (0,4) aux valeurs respectives de 0,08 pour 5 $\mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$, 0,07 pour 30 $\mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$ et 0,26 pour 200 $\mu\text{g Ni}^{++}.\text{L}^{-1}$.

Par ailleurs, nous n'avons pas testé la sensibilité de ce paramètre et donc pas tenté de déterminer par l'analyse statistique (tests de Bonferroni et Newman Keuls) les LOEC et NOEC relatives à r_m , car les propositions de Winnerand et Farell (1976), ne nous ont pas motivées pour réaliser un tel calcul. Selon ce même auteur, le taux intrinsèque peut être employé comme indice de toxicité, mais que sa sensibilité est faible par rapport à celle de la survie. Ces auteurs montrent que r_m décroît avec une augmentation de la concentration de cuivre et que ce paramètre passe de 0,373 (test témoin) à 0,325 et 0,287, pour respectivement, 60 et 80 $\mu\text{g Cu}^{++}.\text{L}^{-1}$.

Lors d'une étude sur la toxicité, Münzinger (1990) obtient, pour une exposition de *Daphnia magna* à 160 $\mu\text{g Ni}^{++}.\text{L}^{-1}$, un r_m égal à 0,142, ce qui correspond à la moitié du r_m trouvé pour 200 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ de nickel. Enserink et al. (1993) obtiennent des r_m à partir des essais de toxicité à long terme (21 jours) à l'aide de *Daphnia magna* sur le cadmium et le chrome hexavalent, nettement hors des gammes obtenues et de celles citées dans la littérature.

Cette incohérence dans les différents résultats obtenus était prévisible car les critères survie et reproduction, entrant dans le calcul de r_m , n'ont pas représenté une intoxication de manière similaire chez les différents auteurs.

La méthode du test prolongé est proposée pour la surveillance de la toxicité chronique des substances chimiques. A l'issue de ce travail sur l'espèce algérienne, nous tenons à souligner l'importance de nos observations et de notre contribution à l'étude du test chronique. Nous rappelons que, mis à part les essais à court terme (généralement bien standardisé), le test de toxicité à moyen terme (21 jours) demeure en voie de modification (Guilhermino et al., 1999, Girling et al., 2000). Plusieurs auteurs privilégient cette méthode ; toutefois, de nombreux travaux ont fait l'objet d'études traitant des différences dans les réponses des daphnies.

Pour cette variabilité dans les réponses, nous pensons qu'un signal perçu est d'autant plus précis que le stress environnemental qui affecte un processus métabolique est spécifique. La compréhension du phénomène de toxicité devrait donc nécessiter une connaissance approfondie du mode d'action des substances sur les organismes cibles.

Klerks et al. (1987) ont mis en évidence une relation entre l'interaction des métaux lourds avec les organismes test et la génétique des espèces bioindicatrice. Outre la survie et la

reproduction, et en terme de génétique, nous nous proposons d'examiner au chapitre IV, la toxicité du cadmium à l'aide d'un critère de sélection très peu cité par la littérature et qui est l'effet phototactique de *Daphnia magna*.

III.3.-Effet du Cadmium sur le comportement phototactique de *Daphnia magna*.

Notre travail concerne la mise en évidence de la toxicité du cadmium, moyennant l'effet phototactique positif d'un clone de *Daphnia magna* en y adjoignant la mise au point d'une échelle de bioindication à l'aide d'un biomonitor.

Dans le cadre de cette étude, il est apparu nécessaire d'évaluer dans un premier temps, l'influence du temps sur l'index phototactique I pour des solutions non contaminées. Cela est d'autant plus nécessaire qu'un premier essai ait permis de mettre en évidence les cinétiques d'évaluation de l'effet phototactique (tableau 39.-). Les paramètres I relatifs aux essais témoins varient entre 0,51 et 0,73, ce qui confirme les caractéristiques comportementales du clone C₁₃₄, considéré phototactique positif par De Meester (1991).

Les coefficients de variation (C.V), inférieurs dans tous les cas à 25%, montrent l'homogénéité des réponses des daphnies aux conditions expérimentales d'éclairage et d'extinction de la lumière.

L'absence de nourriture durant le test (4 h) n'a pas causé d'effet apparent sur I. En effet, dans le cas du test 3 (tableau 39.-), I est de 0,60, après une demi-heure, puis devient égal à 0,78 au bout de 4 h d'expérimentation.

Tableau 39.- Détermination de I : Essai sans toxique (durée du test = 4 heures).

Temps (h)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4		
Essais	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I ₇	I ₈	Moy.	C.V
1	0,74	0,58	0,58	0,68	0,68	0,54	0,62	0,68	0,64	12,72
2	0,78	0,72	0,62	0,72	0,72	0,56	0,82	0,60	0,69	13,80
3	0,60	0,78	0,64	0,72	0,80	0,80	0,72	0,78	0,72	15,18
4	0,56	0,54	0,50	0,78	0,62	0,52	0,70	0,75	0,62	12,90

Une analyse de variance sur les premiers résultats d'un test de toxicité où les solutions renferment $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de cadmium (tableau 40.-) ne montrent pas de différences significatives ($p > 0,05$) par rapport au témoin. Toutefois, nous relevons une baisse de I au bout de 3 h d'observation.

Tableau 40.- Essai avec $[\text{Cd}^{++}] = 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I ₇	I ₈	Moy.	C.V
I	0,80	0,62	0,70	0,66	0,52	0,30	0,50	0,40	0,54	8,98

Nous pensons, pour cette faible concentration de Cd^{++} , que l'effet de toxicité résulte de la combinaison du temps t de la concentration du toxique. Cette étape nous a conduit, dans des conditions de renouvellement, à réaliser d'autres essais avec une augmentation de la concentration en cadmium. Afin de répondre à l'objectif de cette étude, nous avons choisi la variation suivante : 0,06 ; 0,2 et 0,4 $\text{mg Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$. La figure 29.- illustre l'évaluation des index phototactiques pour une cette variation de concentrations.

Une telle représentation fait ressortir le ralentissement de la capacité des daphnies à accéder aux zones de la colonne les plus proches de la lumière. Ce fait traduit la perturbation de ce caractère génétique. Cependant, la détermination des taux d'inhibition, qui sont, respectivement, de 0 ; 0,06 ; 0,2 et 0,4 égaux à : 0; 55,7; 67 et 55%, n'est pas en proportion exacte avec l'accroissement des teneurs en métal.

Nous pensons que ces fluctuations peu prononcées, bien qu'elles appuient l'effet du cadmium sur I, sont en partie tributaires des essais qui ne sont pas effectués simultanément. Ceux-ci devraient prendre en compte la variabilité des caractéristiques comportementales au cours du temps. A l'instar de cette observation, il apparaît que ces aspects n'ont pas été suffisamment pris en compte pour fournir une explication biologique satisfaisante sur l'état comportemental qui peut varier légèrement d'un organisme à un autre, soumis pourtant à des conditions de stress strictement identiques.

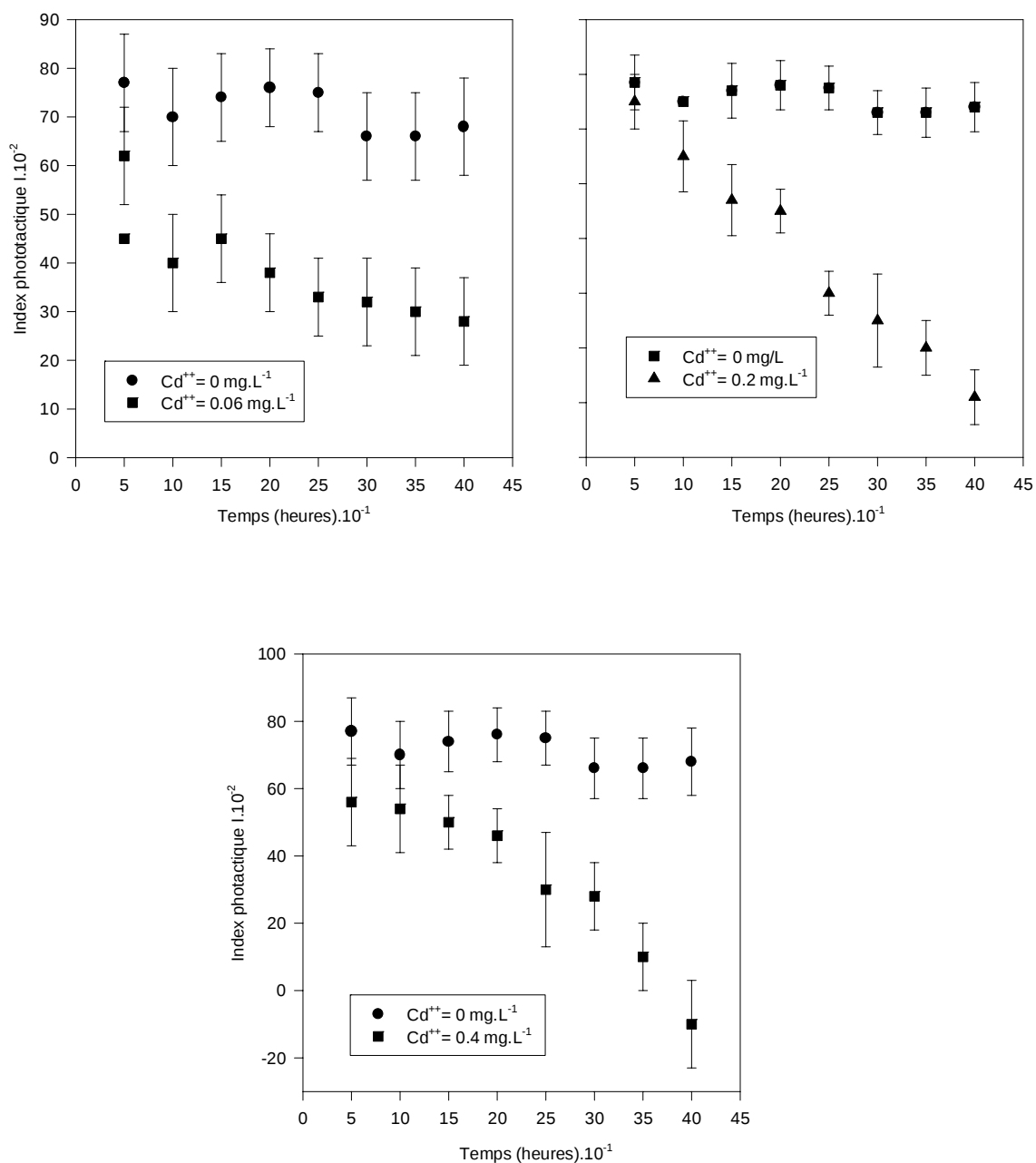


Figure 29.- Variation de I en fonction du temps et de la concentration de Cd^{++} .

Outre ces premières constatations, il apparaît de ces résultats, la possibilité de subdiviser les cinétiques d'intoxication (figures 30.- et 31.-) et de mettre en évidence la fréquence d'apparition d'un effet toxique très significatif ($p < 0,001$) à partir de 3 h de test, voir 6 heures de contact cadmium-daphnies. Le temps de 6 heures correspond à la résultante de la phase d'acclimatation(3 h) et d'un temps de test égal à 3 h.

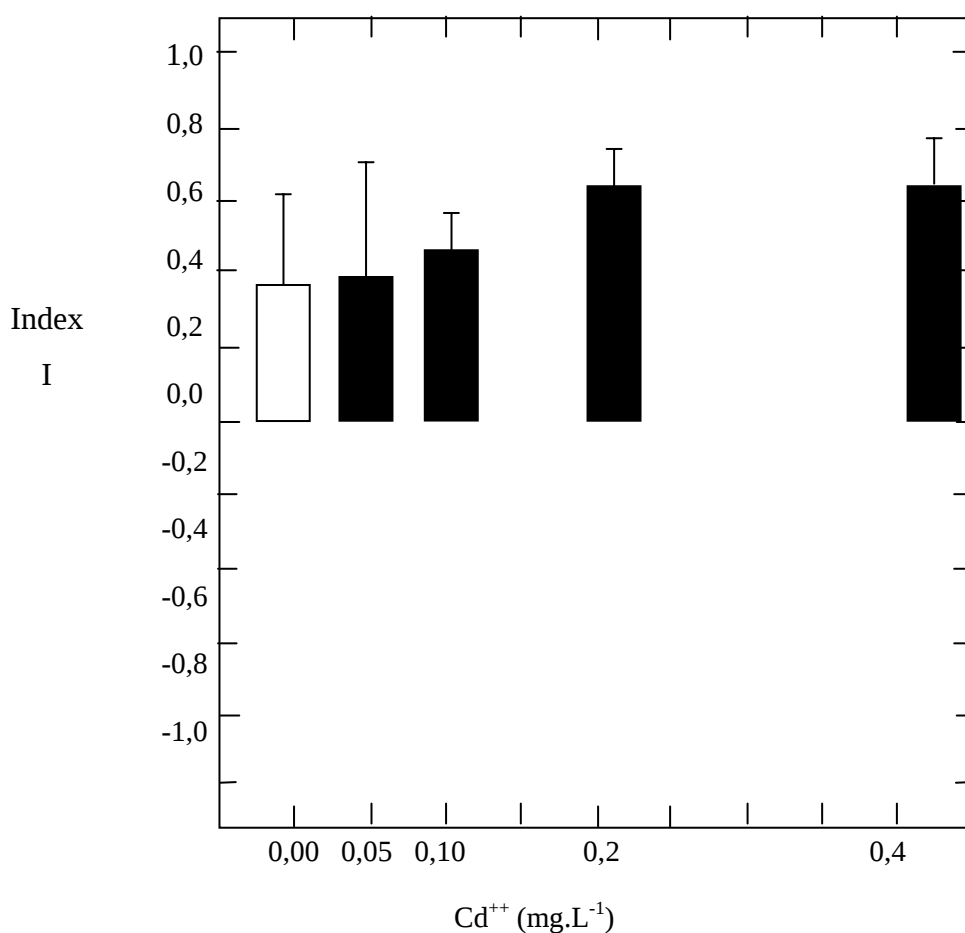


Figure 30- : Variation de I en fonction de $[\text{Cd}^{++}]$ (1^{ère} observation, avant 3 h).

Cette séquence est remarquée, pour les 4 cas de concentrations de Cd^{++} , à la sixième lecture du test (c'est à dire I_6).

Cette fin de phase exprime l'interaction métal-daphnie et constitue, pour ce travail, une base d'informations importantes quant à la mise au point d'un biocapteur phototactique. Le délai de 3 h (reproductible) d'apparition des modifications de l'effet phototactique prévoit l'installation d'une alarme biologique pouvant être déclenchée dans des conditions de stress dû à une pollution métallique en particulier. Les travaux de Michels et *al.* (1998) à l'aide d'essais en discontinu et au moyen du même clone C_{134} , testant le pentachlorophénol n'ont pas abouti à cette intéressante De Meester et Semsari, 1995, non publié).

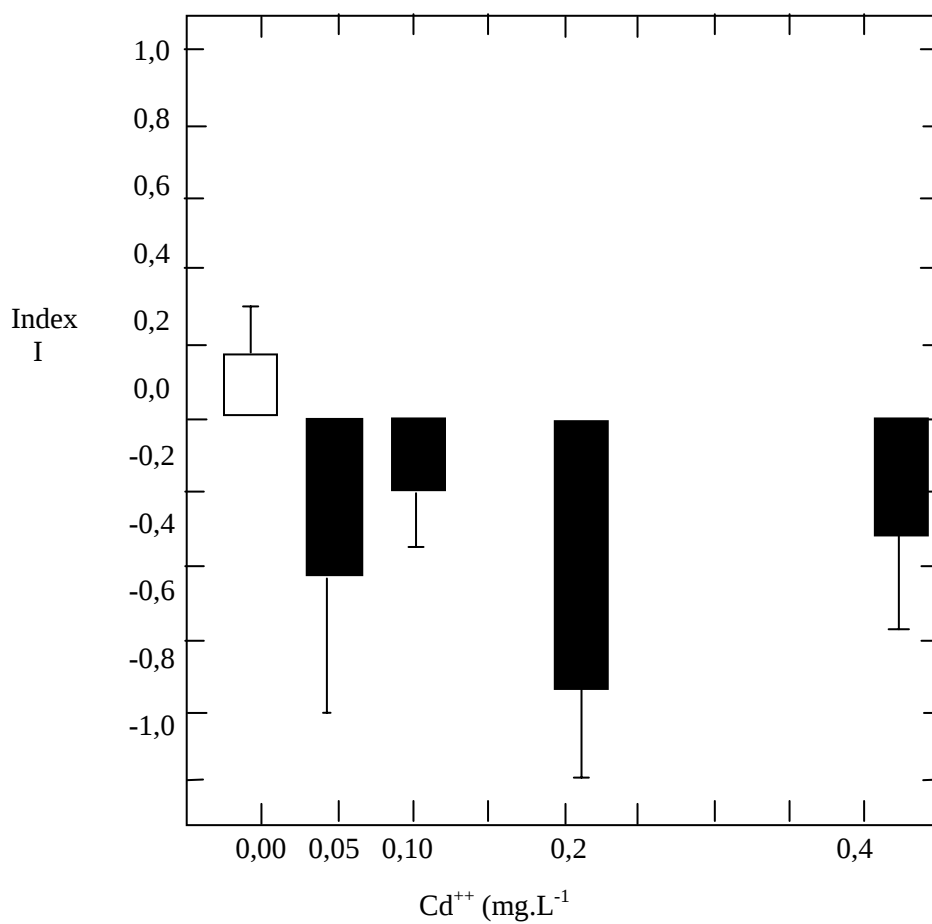


Figure 31.- Variation de I en fonction de $[\text{Cd}^{++}]$ (2^{ème} observations, après 3 h).

L'importance de ce premier résultat et la volonté de procéder à l'étude de la présence de la nourriture (algues) dans les milieux, nous a permis de réaliser une seconde série de tests. A cet effet, cela nous avons modifié les modalités de préparation des solutions servant testes. C'est ainsi que nous avons choisi de réaliser les différentes dilutions de cadmium dans une eau synthétique, selon la norme ISO (1989). Le pH est ajusté à 7,9 à l'aide de solutions normales de NaOH et d'HCl.

III.3.1.-Tests en continu avec et sans apport de nourriture.

Pour ces tests, nous avons considéré la composition de la norme ISO (1989) comme milieu d'essai contenant une concentration de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{++} . Les daphnies n'ont pas été acclimatées aux solutions à tester. Les figures 32.- et 33 représentent les résultats obtenus.

Il est à signaler que le test a été prolongé au-delà des 4 h, suite à la nourriture qui est fournie aux daphnies dans un des cas (observations personnelles de De Meester, précédemment citées).

Dans un sens prédictif, le stress occasionné par le cadmium apparaît nettement en absence de nourriture ; par contre, les bioessais comportant les particules algales de *Scenedesmus acutus* semblent atténuer l'effet de cadmium sur le comportement phototactique (figures 32.- et 33.-). Cette détoxification ne peut être qu'une conséquence du phénomène d'adsorption des cations de cadmium sur la phase solide constituée par l'algue nutritionnelle.

Par ailleurs, la comparaison des témoins nous a permis d'opter pour une conception pourvue de nourriture à base d'algues ce qui serait une résultante d'erreurs dans le cas de tests avec un agent métallique.

Pour une estimer le temps nécessaire à une modification significative ($p < 0,01$) du comportement des daphnies, nous avons préféré porté ($I_{a,n} - I_{s,n}$) en fonction du temps (figure 34.-), si nous considérons que le test avec algues, en majeure partie, n'est pas significativement différent du témoin.

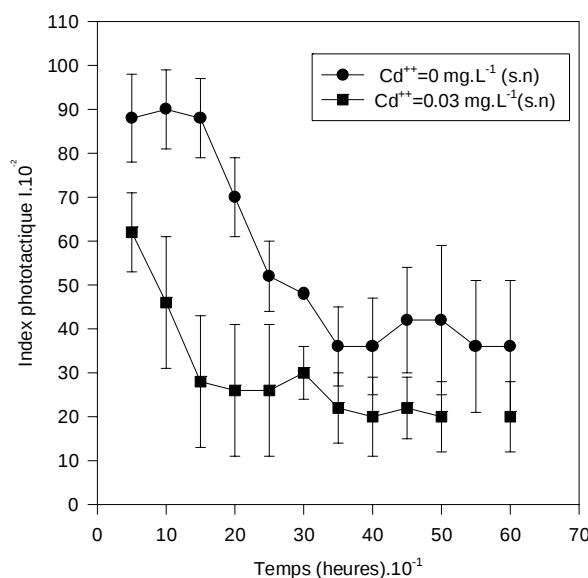


Figure 32.- Variation de I en fonction du temps test sans nourriture.

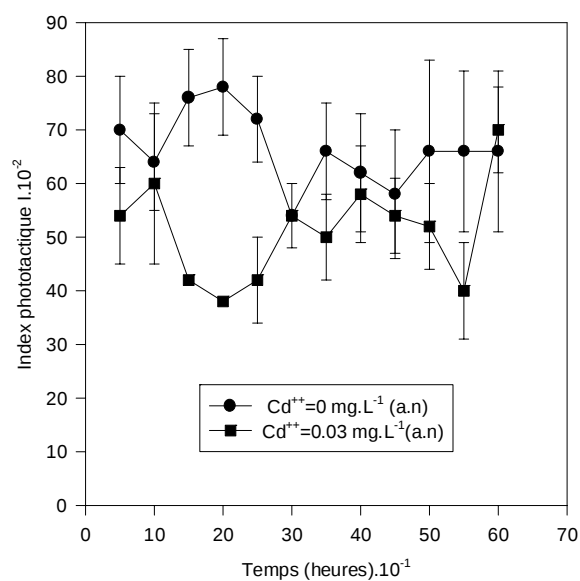


Figure 33.-Variation de I en fonction du temps test avec nourriture.

(s.n) : test sans nourriture.

(a.n) : test avec nourriture.

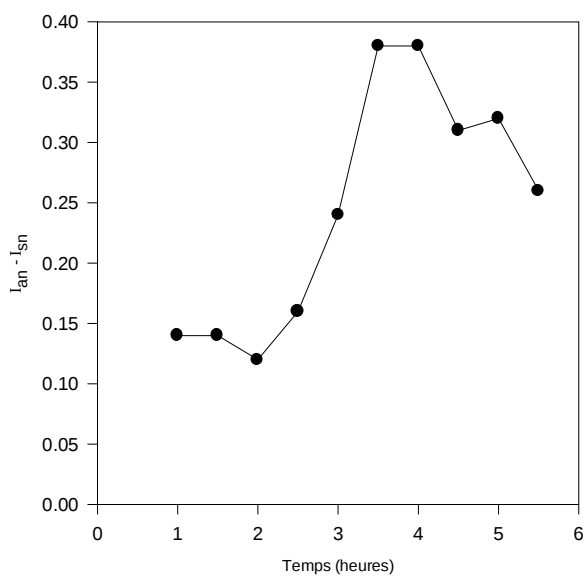


Figure 34.- Evolution de $I_{a.n} - I_{s.n}$ en fonction du temps.

Ces évolutions comportent un optimum qui exprime l'effet le plus profond du cadmium quant à l'essai, sans algue comparativement à l'essai avec nourriture qui est supposé exempt de toxicité après adsorption du métal. Cette évaluation maximale de $I_{an} - I_{sn}$ permet la détermination du temps nécessaire à l'apparition de l'effet toxique et qui est égal à quatre heures. Nous notons donc que ce temps varie en fonction de la composition du milieu d'essai. En effet, ce temps vaut six heures dans le cas où la solution destinée aux essais est une eau déchlorée.

Bien que les tests dynamiques à renouvellement continu permettent de compenser les inconvénients des méthodes statiques, les volumes d'eau utilisés dans ce cas nous contraignent à effectuer des tests sans renouvellement du milieu, afin de dégager plus d'informations sur l'utilisation de la nourriture lors des tests.

III.3.2.- Tests statiques avec apport de nourriture.

En respectant le protocole des essais précédents, (eau synthétique et sans phase d'acclimatation), nous obtenons les variations d' index phototactique représentées aux figures 35.- et 36.-, pour des concentrations de cadmium égales à 0,06 et 0,3 mg.L⁻¹ (CL 50 24 heures obtenue par Dave et *al.*, 1981).

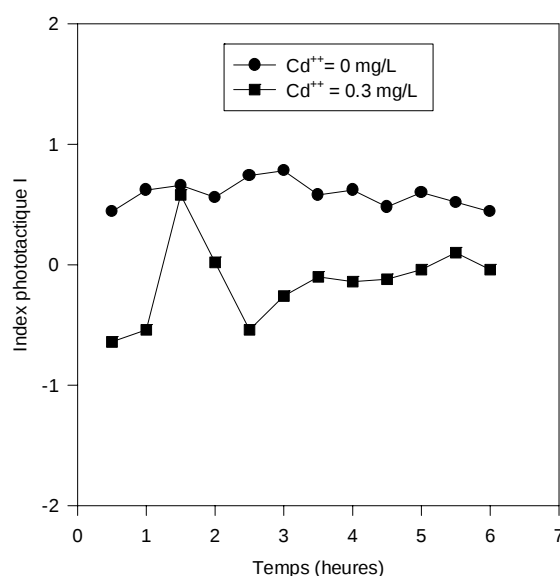


Figure 35.- Variation de I en fonction du temps : test statique (sans acclimatation à Cd⁺⁺).

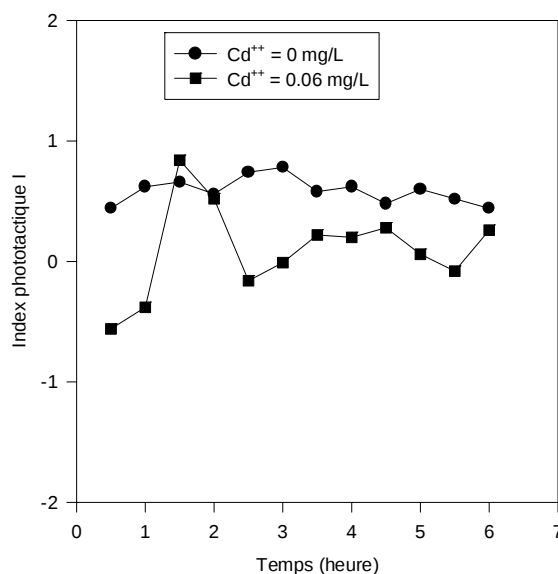


Figure 36.- Variation de I en fonction du temps : test statique (sans acclimatation à Cd⁺⁺).

Nous constatons, dès la mise en contact des daphnies avec les solutions contaminée par des quantités de cadmium de 0.3 et 0.06 mg.L⁻¹, un stress brutal exprimé par $I = -0,64$ et $I = -0,56$, respectivement. Le paramètre croît ensuite jusqu'à + 0,58 et + 0,84, puis rechute de nouveau et se stabilise autour de : - 0,08 et + 0,11 pour 0,3 et 0,06 mg.L⁻¹ de Cd⁺⁺, respectivement.

Pour les deux cas de concentrations, $I_{\max}$ apparaît pour un temps d'exposition de 1 h 30 min ce qui correspond à I_3 . Nous pensons que pendant ce temps a lieu l'adsorption de Cd⁺⁺ sur les cellules d'algue. La réapparition de la toxicité, traduite par une baisse de I, est sans doute une conséquence de la désorption du métal et donc, de son retour en solution. Le phénomène de désorption favorise l'apport de la nourriture pendant les essais, car le signal d'inhibition n'est pas omis dans ce concept. La contamination des milieux pour les deux concentrations intervient à I_6 , ce qui établit une même relation dose-effet au bout de trois heures d'observation.

Nous ajoutons que les rapports des teneurs du contaminant et des indices phototactiques correspondants sont de 5 et 2,5, ce qui témoigne du manque de corrélation entre ces deux grandeurs.

Nous retenons de cette étude : Un effet apparent du cadmium est significatif sur l'effet phototactique de *Daphnia magna*. Michels et al. (1998) ont abouti aux mêmes conclusions sur une étude similaire, qui a été réalisé avec le cuivre.

- Que la composition du milieu d'essai constitue un facteur important dans l'évaluation de la toxicité. En effet, les temps nécessaires d'apparition des premiers signes d'inhibition sont de six heures pour une eau déchlorée et de quatre heures pour une eau synthétique préparée au laboratoire.
- Que la présence d'algues, bien que ou favorable à l'activité phototactique des daphnies (essai témoin), provoque une adsorption du métal en question et une détoxification en conséquence.
- Les tests statiques montrent que le cadmium adsorbé par l'algue *Scenedesmus* est remis en solution par relargage, impliquant ainsi une ré intoxication du milieu d'essai, déduite à partir d'une baisse de l'index phototactique I. Dans les cas d'absence ou de présence de nourriture du réactif biologique, le système d'alerte à la pollution est présent, indépendamment des conditions opératoires considérées.

Nous avons montré que dans des conditions assez originales de tests dynamiques, il est possible de définir certains paramètres de fonctionnement d'une installation biologique de contrôle de la qualité des eaux. Sous un autre aspect méthodologique, (Chapman et *al.* 1996) ont mis en oeuvre un système de monitoring fonctionnant en continue. A l'aide de la méthode que nous proposons, nous contribuons à l'établissement d'une technique de détection de la toxicité, sans pour autant définir les limites de cette détection.

Dans le cadre de notre unique objectif de l'étude d'inhibition et étant donné la variabilité naturelle des espèces aquatiques, nous avons été amenés à considérer l'effet du chrome trivalent sur un autre type d'indicateurs de la toxicité. Les microorganismes d'une boue activée, épuratrice des eaux (inclus dans le règne animal) seront utilisés avec une autre modalité expérimentale au chapitre V.-, afin de mettre en évidence l'inhibition de leur activité par la toxicité du chrome trivalent.

III.4.- Etude de l'inhibition de l'activité des boues activées en présence de chrome trivalent..

Dans cette partie de l'étude, notre choix a porté sur le cation Cr^{3+} , suite à notre observation sur la composition des rejets de la zone industrielle de Réghaïa (Semsari, 1992).

Les travaux, dans ce cas, consistent à mesurer les vitesses d'élimination du substrat (DCO ou DBO_5) afin de montrer l'inhibition de celle-ci par le Cr^{3+} , après une exposition des micro-organismes à Cr^3 durant 20 jours. L'étude de la possibilité d'adapter les

microorganismes d'une boue épuratrice est envisagée. Pour ce faire, nous présentons dans une première étape les résultats des vitesses d'élimination du substrat pour un test de 4 heures (Semsari, 1992 ; Semsari et Gaïd, 1994).

Les données relevées dans la littérature apparaissent contradictoires quant à la toxicité et le devenir du Cr^{3+} dans les milieux récepteurs. Les valeurs inhibitrices se situent entre 5 et 100 mg.L^{-1} , selon les espèces bactériennes, le temps de réaction et la forme chimique du chrome dans le milieu (Nielsen et *al.*, 1987). Lewandowski (1987), en étudiant l'influence des métaux lourds sur l'activité bactérienne, montrent que la comparaison des résultats de plusieurs études sur ce thème est très difficile.

Théoriquement, le processus de dégradation du substrat par les microorganismes est décrit

par les lois mathématiques suivantes : $v = \frac{dS/dt}{X} = \left(\frac{dx}{dt}\right) a x = \mu = \frac{\hat{\mu} \cdot S}{K_s + S}$:

$\left(\frac{ds}{dt}\right)$ = vitesse d'utilisation du substrat, masse. volume⁻¹. temps⁻¹ ;

S représente la DCO ;

X = Concentration de la biomasse, masse.volume⁻¹ ;

μ = Taux de croissance bactérien, temps⁻¹ ;

$\hat{\mu}$ = Taux maximum de croissance bactérien, temps⁻¹ ;

K_s = Constante de saturation, masse.volume⁻¹ ;

a = Constante liée au rendement cellulaire ;

t = Temps ;

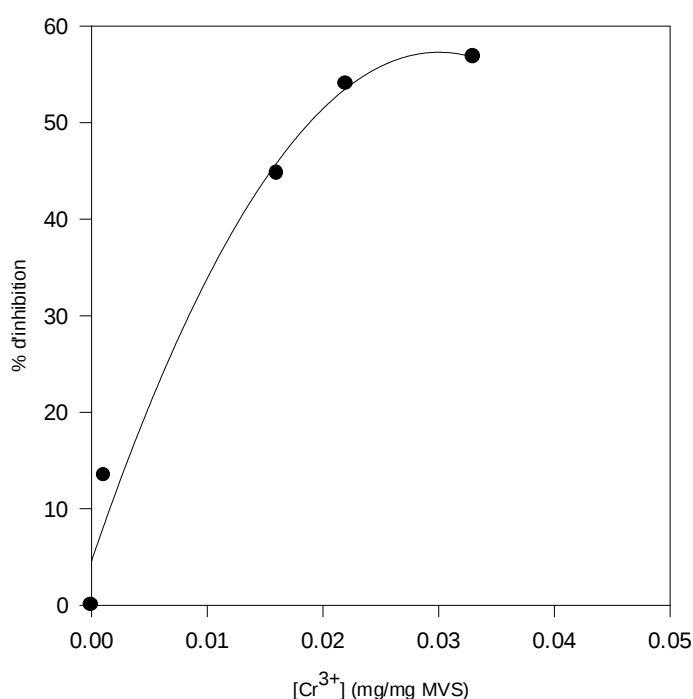
v = vitesse spécifique d'élimination du substrat, temps⁻¹.

Si la présence de Cr^{3+} , en concentration croissante dans le milieu expérimental, entraîne une atténuation de la vitesse de réaction (tableau 41.-), l'effet inhibiteur de ce métal est quantifié et représenté par la figure 37.- (Semsari, 1992).

Tableau 41.- Test de toxicité (durée = 4 heures).

$[\text{Cr}^{3+}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	0	5	75	100	150	200
$[\text{So}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	2015,52	1853,80	1800	1810	1817,92	2055,04
PH	7,5	7,5	7,2	7,5	7,6	7,4
$\left(\frac{ds}{dt}\right)_{4h} \text{ (mg.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$	434,72	375,95	240	200	187,72	207,48
Taux de réduction						
$\text{de} \left(\frac{ds}{dt}\right)_{4h}$	0	13,50	44,79	53,99	56,81	52,30

Cette évaluation quantitative (figure 37.-) permet de déterminer la concentration inhibitrice de 50% de l'activité des bactérienne pour une expérience de 4 h ; celle-ci étant égale à environ $0.022 \text{ mg Cr}^{3+}.\text{mg}^{-1} \text{ MVS}$ soit 100 mg Cr^{3+} par litre de liqueur mixte (Semsari, 1992) car la concentration en boues dans le réacteur est évaluée en moyenne à 4500 mg.L^{-1} . Cette valeur découpe l'inhibition en deux phases et permet de dresser un paramètre biologique pour lequel la littérature ne fait pas mention.

**Figure 37.** Evolution du taux d'inhibition en fonction de la concentration de Cr^{3+} .

Les propriétés biologiques des micro-organismes utilisés sont liées à l'homogénéité du substrat ; elles permettent d'expliquer l'utilisation de l'expression mathématique donnée ci- dessous, afin d'extraire de ce modèle, appliqué aux enzymes purs, un autre paramètre biologique pouvant exprimer la toxicité. D'après Aiba et *al.* (1973) ; nous citons :

$$v = \frac{v_{\max} \cdot S}{(K_S + S) \left(1 + \frac{[\text{inhibiteur}]}{K_i} \right)} \quad (1)$$

Avec :

v = vitesse spécifique d'élimination du substrat $\left(\frac{1}{X} \frac{ds}{dt} \right)$, temps⁻¹ ;

$\hat{v}_{\max}$ = vitesse maximale d'élimination du substrat, temps⁻¹ ;

$[\text{inhibiteur}]$ = Concentration de l'inhibiteur, masse. volume⁻¹ ;

K_i = Constante d'inhibiteur (caractéristique d'un substrat), masse. volume⁻¹ ;

K_s = Constante de saturation, masse. volume⁻¹.

Le fait qu'un inhibiteur en général constitue un frein aux différents métabolismes bactériens et à la vitesse d'absorption du substrat en particulier, nous représentons cette inhibition par :

$$i = \frac{\hat{v}_{\max} - v}{\hat{v}_{\max}} \quad (2)$$

En admettant que $K \ll S$ on a alors :

$$v = \frac{\hat{v} \cdot K_i}{K_i + [Cr^{3+}]} \quad (3)$$

Ce qui conduit à :

$$i = \frac{[Cr^{3+}]}{K_i + [Cr^{3+}]} \quad (4)$$

avec :

$$\frac{i}{1-i} = \frac{[Cr^{3+}]}{K_i} \quad (5)$$

La représentation de $\frac{i}{1-i}$ (Semsari, 1992) en fonction de la concentration de Cr^{3+} qui est fournie aux micro-organismes dans le cas d'un test de 4 heures, a permis de déduire la constante K_i égale à $119.4 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$ pour 4.730 g MV5 . Cette valeur obtenue est proche de la CI_{50} 4 heures (citée au paragraphe V.3.-). Sachant que K_i représente la constante de formation du complexe enzyme-inhibiteur, selon la réaction : $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$ et $\text{E} + \text{I} \rightleftharpoons \text{EI}$, où : $\text{ES} + \text{I} \rightleftharpoons \text{ESI}$, et si cette formation n'implique que 50% d'inhibition ($K_i = \text{CI}_{50}$ 4 heures), ceci permet de conclure que l'inhibition de la réaction de dégradation n'est pas seulement la conséquence de l'inhibition des enzymes. Nous pensons que le blocage total de l'activité des micro-organismes pourrait être situé à un autre niveau intracellulaire.

L'intérêt de cet état de connaissance sur l'inhibition des boues activées (Semsari, 1992) déterminée sur 4 heures, permet d'introduire l'étude du test prolongé avec la détermination de K_i lors d'une contamination par Cr^{3+} . De tels résultats seront présentés ultérieurement.

Par ailleurs, le suivi du chrome résiduel (tableau 42.-) en solution a permis de conclure qu'une partie du métal introduit en solution est adsorbable du fait de la nature de l'affinité des métaux pour les sites surfaciques d'échange.

Tableau 42.- Concentrations initiale et finale en Cr^{3+} (test 4 heures).

$[\text{Cr}^{3+}]$ initiale ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$[\text{Cr}^{3+}]$ résiduelle ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
5	05
75	8.0
100	21.5
150	19.0
200	74.0

Les quantités de métaux adsorbées par unité de biomasse croient pour des concentrations initiales croissantes de Cr^{3+} (figure 38.-). Les taux d'inhibition de l'activité des micro-organismes correspondant aux teneurs de Cr^{3+} résiduelles (tableau 42.-) sont regroupés dans le tableau 43.-, avec les quantités de Cr^{3+} adsorbées (au bout de 4 h d'expérience).

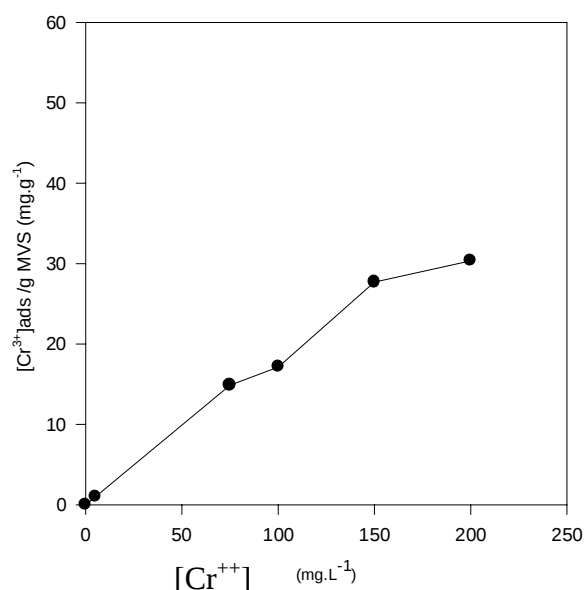


Figure 38 : Variation des quantités de Cr^{3+} adsorbées en fonction de $[\text{Cr}^{3+}]$ initiale.

Tableau 43.-Taux d'inhibition en fonction de $[\text{Cr}^{3+}]$ adsorbé.

$[\text{Cr}^{3+}]$ ads/MVS (mg.g^{-1})	0,978	14,88	17,14	27,70	30,36
% d'inhibition	13,5	44,75	53,99	56,81	52,38

L'accroissement parallèle des deux variables confirme le phénomène d'adsorption, mais une baisse du taux d'inhibition pour la plus grande quantité de Cr^{3+} , supposée adsorbée, nous laisse penser que rien ne prouve que l'intégralité de la fraction de Cr^{3+} retenue en solution correspond à une localisation de ce métal sur la biomasse. Cette observation peut mettre en évidence la complexation de Cr^{3+} en solution. La précipitation ne peut avoir lieu de manière significative dans la gamme de pH indiquée.

L'allure de la représentation schématique (figure 39.-) nous conduit à envisager une corrélation entre le taux d'inhibition des micro-organismes et la quantité de Cr^{3+} retenue dans le milieu d'essai. On peut supposer une relation du type $\% \text{ d'inhibition} = \alpha [\text{Cr}^{3+}]^\beta$ retenue. Les coefficients α et β sont déduits en portant $\text{Log } \% \text{ inhibition}$ en fonction de $\text{Log } [\text{Cr}^{3+}] \text{ retenu}$; le coefficient de corrélation de la régression linéaire est égal à 0.8985. La relation ainsi obtenue est la suivante : $\% \text{ d'inhibition} = 15,6 [\text{Cr}^{3+}]^{0.357}$

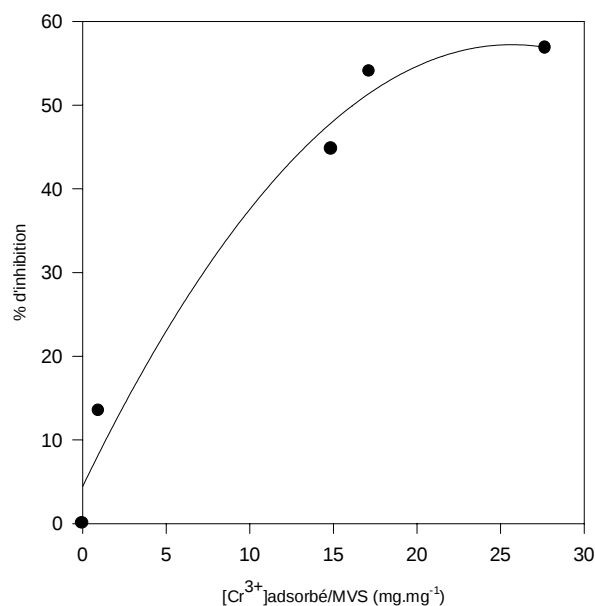
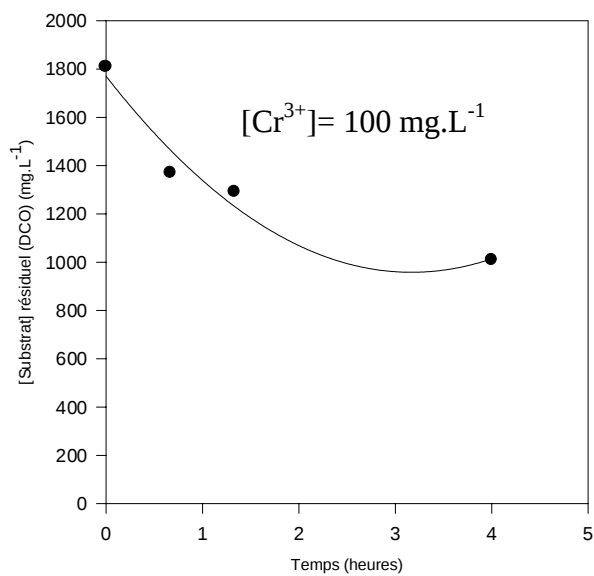
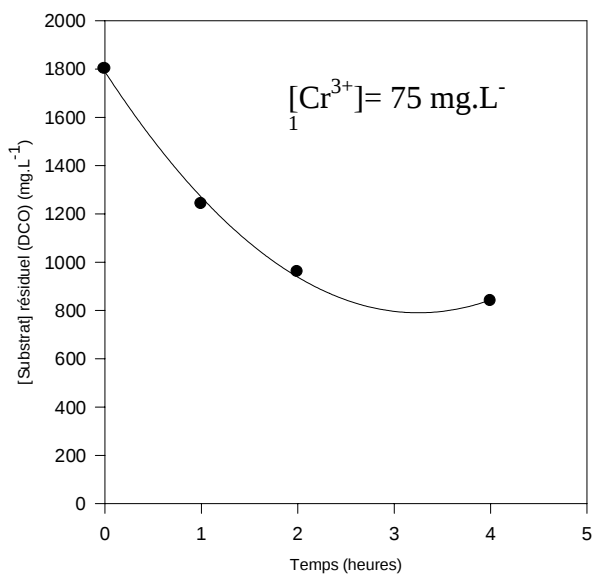
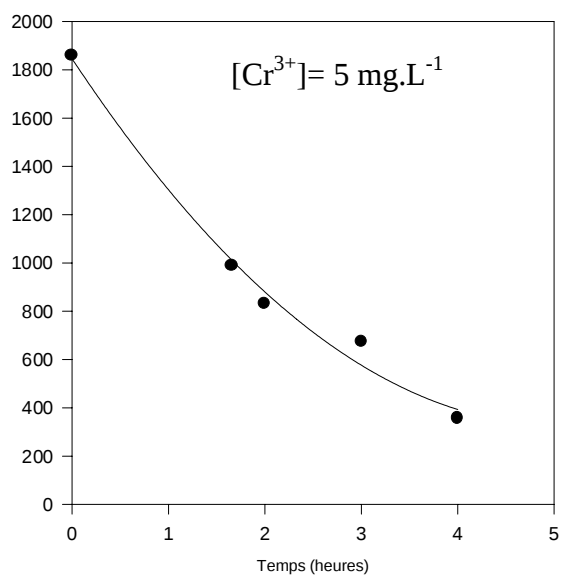
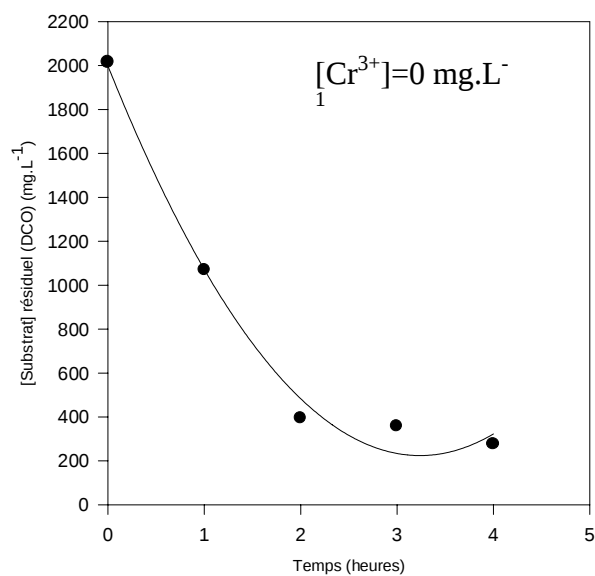
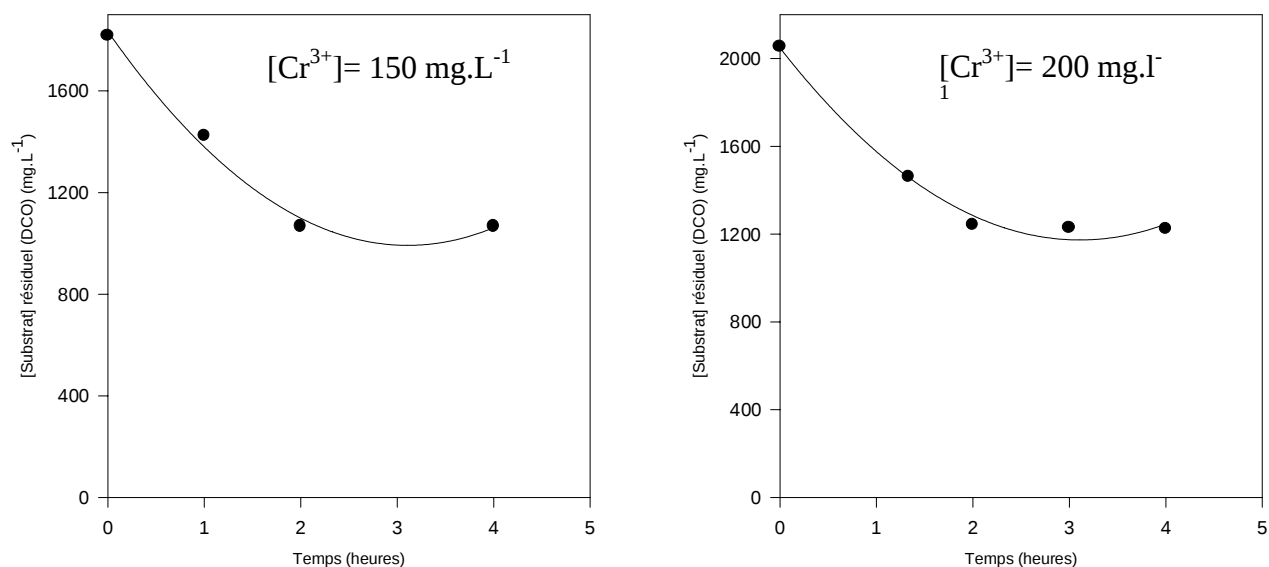


Figure 39.- Variation du taux d'inhibition par rapport à Cr³⁺ adsorbé.

En considérant les vitesses spécifiques (d'élimination du substrat) initiales, $\frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_0$, et après 4 h de test, $\frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_f$ (Semsari, 1992), déduites des pentes (à l'origine et prises en fin de test) des courbes (figures 40.-), nous constatons (tableau 44.-), que dès les premiers temps, une dégradation significative même dans le cas de concentrations égales à 150 et 200 mg Cr³⁺ /L.



Figures 40.- Evolution de la DCO en fonction du temps et des concentrations en Cr^{3+} .



Figures 40.- Evolution de la DCO en fonction du temps et des concentrations en Cr³⁺.

Le processus d'inhibition en fin de test, représenté par le paramètre $\frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_f$ marque d'une part la toxicité de Cr³⁺ mais également une tolérance relative des boues activées à ce métal.

Tableau 44.- Les vitesses initiales et finales de dégradation du substrat.

[Cr ³⁺] (mg.L ⁻¹)	0	5	75	100	150	200
$\frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_0$ (h ⁻¹)	0,346	0,266	0,173	0,160	0,118	0,155
$\frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_f$ (h ⁻¹)	0,14	0,070	0,068	0,062	0,070	0,016

En effet, l'élimination du substrat demeure possible dans tous les cas de concentrations. Cette remarque nous laisse supposer qu'un phénomène d'adaptation des micro-organismes au Cr³⁺ pourrait se produire.

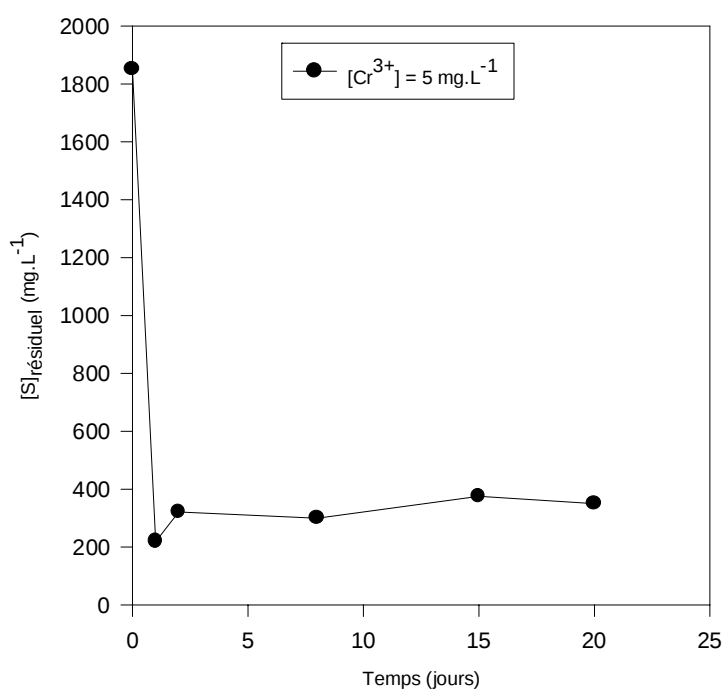
L'analyse du substrat résiduel (figure 41.-) confirme cette possibilité d'adaptation qui apparaît nettement pour 5 et 100 mg Cr³⁺.L⁻¹. Nous rappelons que pour ce test, le chrome est introduit chaque jour lors de l'alimentation du réacteur. La concentration moyenne des boues est évaluée à 4490,20 mg.L⁻¹. Le suivi du chrome résiduel n'a pas été effectué.

La contamination continue de la liqueur mixte par 200 mg $\text{Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$ ne montre pas d'adaptation des boues, mais une dégradation stable aux différents temps d'échantillonnage.

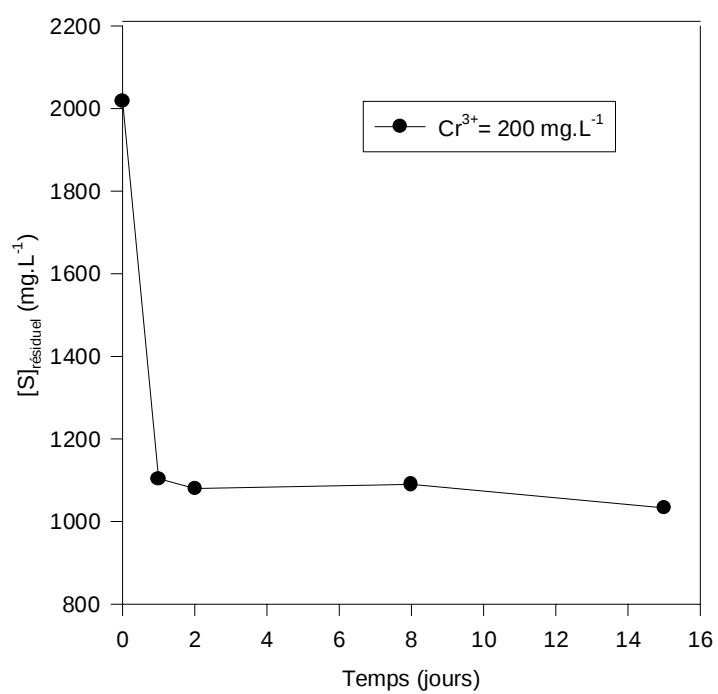
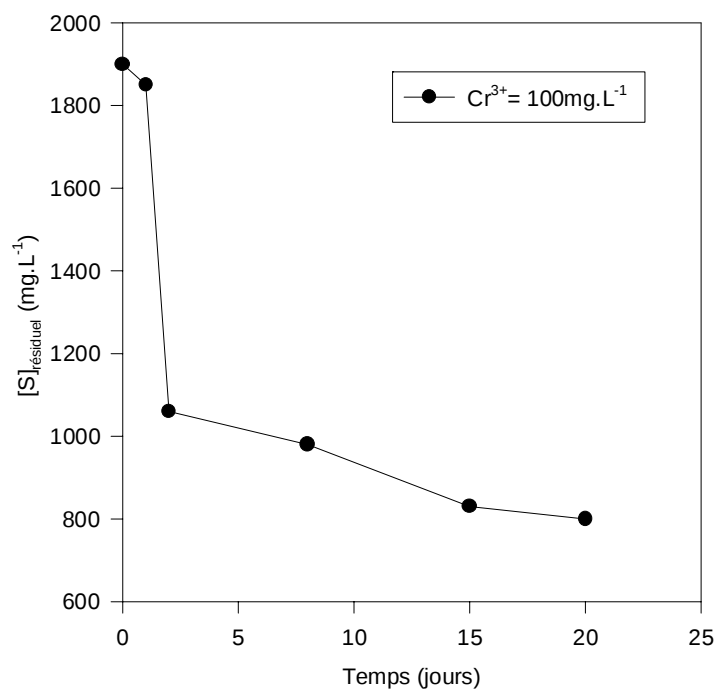
Si nous reprenons les mêmes considérations mathématiques qui permettent de déterminer la constante d'inhibition :

$$v = \frac{v_{\max} \cdot S}{(K_S + S) \left(1 + \frac{[\text{Cr}^{3+}]}{K_i} \right)}$$

nous pourrions établir la variation de K_i en fonction du temps.



Figures 41.- Evolution du substrat résiduel en fonction du temps.



Figures 41.- Evolution du substrat résiduel en fonction du temps.

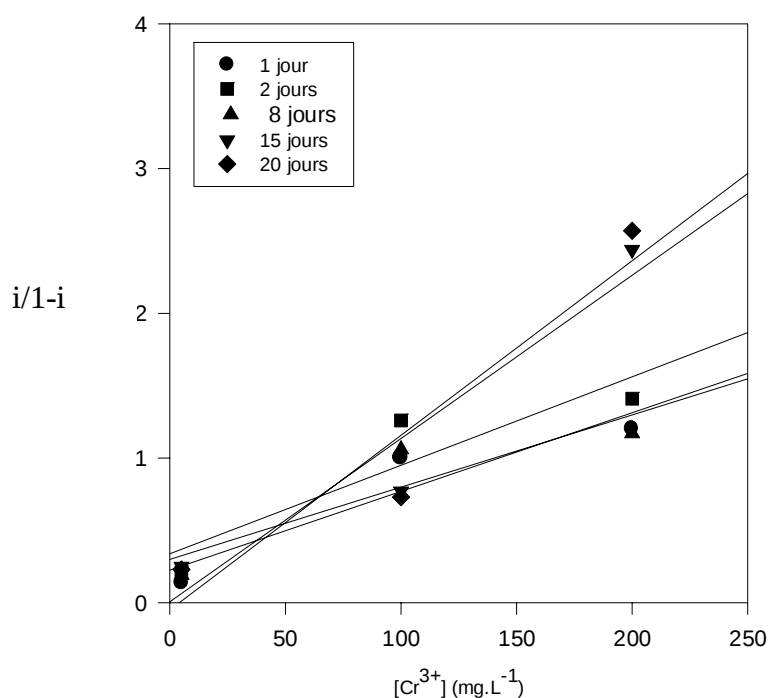


Figure 42.- Variation de K_i en fonction du temps et des concentrations en Cr^{3+} .

Les variations de K_i en fonction du temps figurent dans la représentation schématique (figure 42.-). Pour le calcul du temps d'inhibition, nous considérons que dans le témoin la dégradation est réalisée à 100%. Les constantes d'inhibition obtenues à partir de la figure 42.- (tableau 45.-) varient de 85 à 125 $\text{mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$. Celle obtenue dans le cas du test court (4 heures) est de 100 mg.L^{-1} .

Tableau 45.- K_i en fonction de la durée du test.

Temps (jours)	1	2	8	15	20
K_i ($\text{mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$)	111,42	100	125	90	85

Cette analogie des valeurs de K_i déduites des tests 1, 2, 8 jours et 4 heures est certainement due à la fois au fait que K_i ($K_i = 119 \text{ Cr}^{3+} \text{ mg.L}^{-1}$) est une caractéristique du substrat et que, jusqu'à 8 jours d'exposition, l'effet du temps est moins prononcé sur l'impact de la toxicité du Cr^{3+} vis-à-vis d'une biomasse épuratrice. La fugacité de la pollution empêche le phénomène d'adaptation au-delà d'une dose seuil et d'une durée de contamination limite. A cet effet, nous signalons que, dans la partie du réacteur soumise à 200 $\text{mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$, les boues sont complètement détruites au 27^{ème} jour d'expérimentation.

Nous concluons que le phénomène d'adaptation ne peut être indépendant des paramètres « temps-concentration » et que l'obtention de boues chromées n'est pas un problème à négliger.

Jackson et Kalff (1993) ont mis en évidence la possibilité de dégradation du substrat contenant des concentrations en chrome inférieures à 10 mg.L⁻¹ dans un réacteur biologique semi-continu, pour une durée de test de plusieurs semaines.

Nous venons de constater que le temps est un paramètre déterminant et que l'augmentation de l'effet d'inhibition (ou de réduction de K_i) est en corrélation positive avec celui-ci.

Une autre application de ce modèle de test permet d'évaluer l'effet de Cr³⁺ sur les paramètres biologiques caractérisant le floc microbiologique et qui sont : le rendement cellulaire « a » et le coefficient de respiration endogène « b ». La loi mathématique utilisée est donnée ci-après. Sachant que le temps est un paramètre déterminant pour ce genre de tests, nous avons alors choisi d'étudier, les variations de la DBO₅ (essai témoin) pour des intervalles de temps suivants: 0 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 ; 120 ; 180 ; 240 ; 300 ; 360 et 1440 min. La représentation de ces variations au cours du temps (figure 43.-) montre que le substrat résiduel tend vers un plateau d'équilibre à partir de 120 min de test. Cet équilibre nous a conduit à réaliser des cinétiques étalées sur 4 h (inclues dans le plateau d'équilibre). Les concentrations choisies pour cette étude sont : 0 ; 5 et 200 mg Cr³⁺.L⁻¹. L'expression décrite par Benefield et Clifford (1980) est :

$$\frac{1}{X} \frac{dx}{dt} = \frac{aS}{Xdt} - b \quad \text{avec :}$$

X: concentration en micro-organismes, mg.L⁻¹ ;

S : Substrat (DBO₅), mg.L⁻¹ ;

a : Rendement cellulaire ;

b : Coefficient de respiration endogène ;

t : temps, h.

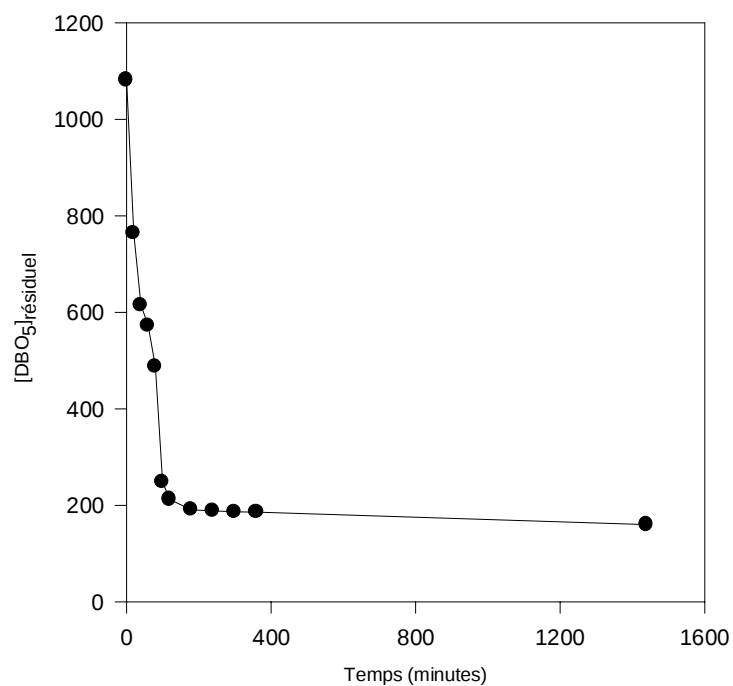


Figure 43.- Variation du substrat en fonction du temps.

Cette expression permet la détermination des coefficients a et b pour les variations obtenues (tableau 46.-) durant 1, 2 et 4 heures d'expérience.

Tableau 46.- variation de X en fonction de S.

(a) $[Cr^{3+}] = 0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Temps (heures) → Paramètres ↓	1	2	4
$X_0 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	4130	4130	4130
$X \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	4770	4500	4273
$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \text{ (mg.h}^{-1}\text{) / mg.L}^{-1}$	0,134	0,041	0,008
$S_0 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	1081,05	1081,05	1081,05
$\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \text{ mg.h}^{-1} \text{ / mg.L}^{-1}$	0,106	0,012	0,005

- L'indice 0 représente l'état initial (t = 0)

(b) : $[\text{Cr}^{3+}] = 5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Temps(heures) $\rightarrow$ Paramètres $\downarrow$	1	2	4
$X_0 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	4560	4560	4560
$X \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	4778	4878	4630
$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \frac{\text{mg.h}^{-1}}{\text{(mg.L}^{-1}\text{)}}$	0,044	0,032	0,0037
$S_0 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	997,5	997,5	997,5
$\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \frac{\text{mg.h}^{-1}}{\text{mg.L}^{-1}}$	0,065	0,056	0,043

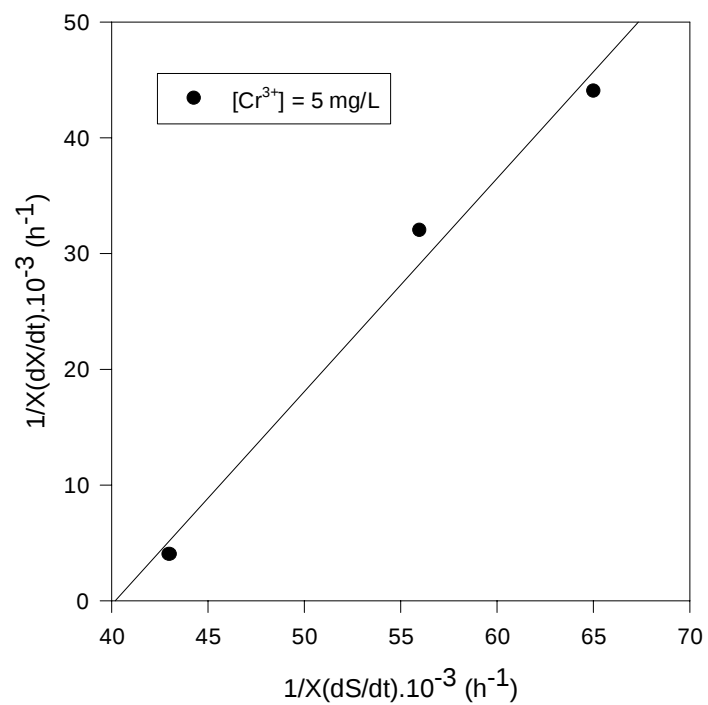
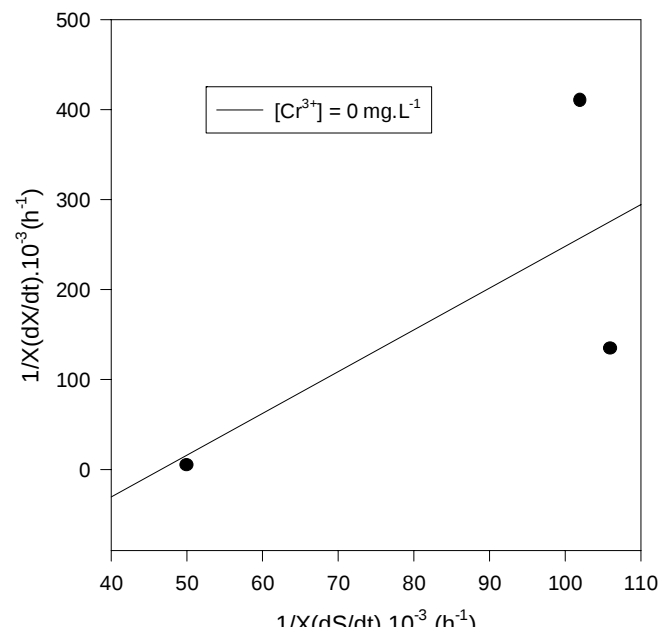
- L'indice 0 représente l'état initial (t = 0)
- S = DBO₅

(c): $[\text{Cr}^{3+}] = 200 \text{ mg.L}^{-1}$.

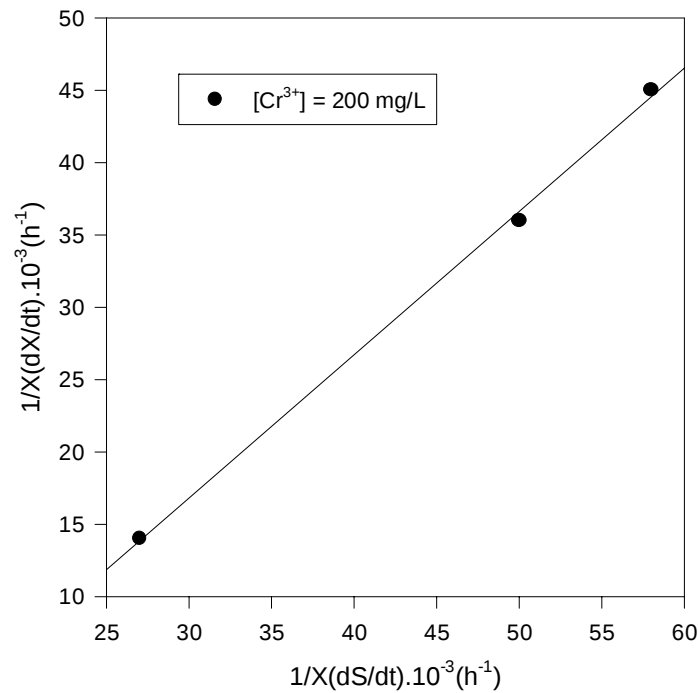
Temps(heures) $\rightarrow$ Paramètres $\downarrow$	1	2	4
$X_0 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	3910	3910	3910
$X \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	4100	4220	4150
$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \frac{\text{mg.h}^{-1}}{\text{(mg.L}^{-1}\text{)}}$	0,045	0,036	0,014
$S_0 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	1102,24	1102,24	1102,24
$\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \frac{\text{mg.h}^{-1}}{\text{mg.L}^{-1}}$	0,058	0,05	0,027

* L'indice 0 représente l'état initial (t = 0).

La représentation graphique (figure 44.-) des variations des paramètres $\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ en fonction de $1/X(dS/dt)$ nous permet de déduire les valeurs des constantes a et b pour les teneurs en chrome considérées. Nous notons que le coefficient de corrélation est très faible dans le cas du test témoin.



Figures 44.- Evolution des variations des concentrations en micro-organismes en fonction de la variation de la DBO₅ et du temps.



Figures 44.- Evolution des variations des concentrations en micro-organismes en fonction de la variation de la DBO₅ et du temps.

Les rendements cellulaires a et les coefficients de respiration endogène b déduits de la figure 44.- sont donnés au tableau 47.-. Cette détermination marque l'effet inhibiteur du chrome par une baisse des valeurs a et b . Toutefois, nous remarquons que la valeur témoin

Tableau 47.- Les coefficients a et b en fonction des concentrations en Cr^{3+} .

$[Cr^{3+}] (mg.L^{-1})$	0	5	200
a	1,59	1,85	0,99
b	0,077	0,075	0,01

du rendement cellulaire est assez proche de celles rencontrées dans la littérature qui donne « a », égale à 1,32 citée par Benefield et Clifford (1980) dans le cas d'une eau résiduaire mélangée aux rejets liquides d'abattoirs de volailles. Cette particularité serait due au fait que nos valeurs résultent d'un réacteur semi-continu, alors que les valeurs de référence citées en bibliographie correspondent aux boues d'une station d'épuration. Lawrence et McCarty (1975) indique la gamme comprenant les valeurs de b allant de 0,05 à 0,10 jours⁻¹

pour les eaux municipales à traiter, supposées exemptes de toxiques. Notre coefficient b est bien compris dans cette marge de valeurs ; nous observons alors une réduction de ce paramètre dans le cas où les solutions seraient contaminées par $200 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$.

Les différentes expériences ont permis de proposer une description de l'inhibition de certains paramètres caractérisant une boue activée. Dans une première étape de ce travail (Semsari, 1992), nous avons évalué les concentrations inhibitrices en Cr^{3+} situées à environ $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Les remarques suivantes sont notées :

- La vitesse spécifique d'utilisation du substrat $\left(\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \right)_0$ chute de $0,346 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (vitesse témoin) à $0,266 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ et ensuite à $0,173 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour respectivement 5 et $75 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$.
- La capacité adsorptive des bactéries vis-à-vis de Cr^{3+} est maximale pour $100 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{g}^{-1}$ MVS. Toutefois, nous corrigeons cette hypothèse évoquée, par le fait que la disparition du Cr^{3+} de la liqueur mixte ne peut se réduire à un simple échange physico-chimique entre la paroi cellulaire et le milieu environnant, mais que la complexation de Cr^{3+} pourrait être envisagée.

Dans une seconde étape, la CI_{50} 4 h du Cr^{3+} ($100 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$) des boues activées a été adaptée à un nouveau contexte expérimental simulant l'absorption du substrat par les micro-organismes d'une boue activée, à l'aide d'un test sur 20 jours, les observations suivantes sont déduites :

- Une tolérance des boues à $5 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$, une adaptation de ces boues à $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de chrome mais que $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ stoppe le processus de dégradation. La relation dose-durée est mise en évidence.
- La constante K_i est une caractéristique d'un substrat donné ; en effet, les valeurs obtenues pour les différents temps (4 heures, 1, 2, 8, 15 et 20 jours) varient entre 90 et $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Nous concluons à partir de cette évaluation que l'inhibition enzymatique (représenté par K_i) n'est pas l'unique cause du blocage de l'activité des micro-organismes épurateurs.

- L'analyse de la DBO_5 résiduelle marque un plateau d'équilibre à partir de 120 minutes.
- L'effet de Cr^{3+} sur les paramètres « a » (rendement cellulaire) et « b » (coefficient de respiration endogène) est remarqué pour $200 \text{ mg Cr}^{3+} \cdot \text{L}^{-1}$ et l'effet du chrome est plus prononcé sur « b ».

Dans le prochain chapitre sont utilisés d'autres éléments bioindicateurs qui sortent du règne animal et qui sont deux plantes aquatiques, *Lemna minor* (lentille d'eau) et *Salvinia natans*.

III.5.- Etude de l'inhibition de la croissance de *Salvinia natans* et *Lemna minor* par : Cd^{++} , Cu^{++} et Zn^{++}

Ces deux plantes très peu employées dans un contexte écotoxicologique sont cependant les réactifs biologiques de notre choix pour cette partie de l'étude.

L'expérimentation s'est déroulée au laboratoire d'ethnobotanique du Centre des Sciences de l'Environnement de l'Université de Metz.

III.5.1.- Etude de la croissance de : *Salvinia natans*, *Lemna minor* et *Lemna Polyrrhiza*.

Nous nous proposons dans un premier temps d'examiner la croissance de ces plantes choisies et de vérifier si notre méthode de culture présentée au chapitre I convient à une telle pratique.

Pour ce faire, nous avons suivi l'accroissement des feuilles une fois tous les deux jours, les dénombrements correspondant à chaque plante sont présentés aux tableaux 48.- à 50.-.

Tableau 48 -Test de croissance sur : *Salvinia natans*.

	Jours							
Nombre de feuilles	0	2	4	6	8	10	12	14
Min	30	39	48	56	75	84	88	98
Max	30	41	50	67	86	92	96	102
Moyenne	30	40	49,33	60,66	79,33	87	91	100
Ecart type	00	0,81	0,94	5,65	4,96	1,69	1,65	1,63

Tableau 49.- Test de croissance : sur *Lemna minor*.

	Jours							
Nombre de feuilles	0	2	4	6	8	10	12	14
Min	18	25	30	40	71	79	89	99
Max	18	28	35	46	70	84	101	130
Moyenne	18	27	36,66	43,33	71,33	81,33	100	118
Ecart type	00	1,41	2,94	2,49	7,40	7,5	7,87	13,58

Nous obtenons des évolutions de la croissance assez comparables de ces deux plantes. Les résultats obtenus pour *Lemna polyrhiza* ne montrent pas d'affinité à ce milieu de vie. Pour cette raison, nous ne présentons (tableau 50.-) que la multiplication des feuilles au 8^{ème} et 14^{ème} jours de culture.

Il ressort de ces résultats le choix de *Salvinia natans* et *Lemna minor* pour la suite de cette étude. La sédentarité de *Lemna polyrhiza* nous a conduit à arrêter son élevage en laboratoire. La représentation schématique (figure 45.-), du taux d'accroissement $\frac{dN}{dt}$.

Tableau 50.- Test de croissance sur *Lemna polyrhiza*.

	Jours				
Nombres de feuilles	1	2	3	4	Moyennes
8 ^{ème} jours	35	34	36	36	35,25
14 ^{ème} jours	40	39	38	41	39,5

des feuilles dans le temps, montre un optimum de multiplication au bout de 8 jours de croissance de *Salvinia*. En conséquence, nous nous sommes fixé une durée de test de 8 jours où les deux plantes sont exposées à des concentrations croissantes de cadmium, cuivre et zinc.

L'étude histologique est donc précédée d'un test de toxicité. La méthodologie du déroulement de la pratique de développement de *Salvinia natans* et *Lemna minor* au laboratoire, en présence de toxiques, demeure identique à celle décrite au chapitre I paragraphe I.5.2.4.-. Pour les tests de toxicité, ces plantes subissent un éclairage continu (observations personnelles, Bernard Clément, 1997) ; l'extinction intermittente de la lumière (photopériode) n'est réalisée que dans la partie de maintien des deux plantes.

VI.3.2.-Etude de la croissance de *Salvinia* en présence de Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ et Zn⁺⁺ et examen microscopique.

Les résultats relatifs à ces essais écotoxiques figurent dans les tableaux 51.-.

Pour ces évaluations nous n'avons considéré que les écart types correspondant au 8^{ème} jour. Nous relevons à partir des résultats des tableaux 51.- une différence significative ($p < 0,05$) entre le développement de *Salvinia* dans le milieu témoin et dans les solutions contaminées. Une autre comparaison relative à l'accroissement des feuilles de *Salvinia* au 8^{ème} jour (tableaux 51.-) montre que le cadmium est le métal qui a le plus d'influence sur le

développement de cette plante et que celle-ci résiste relativement plus au zinc. Nous ajoutons que $(\frac{dN}{dt})_{8 \text{ jours}}$ correspond au rapport entre la différence des nombres de feuilles à 0 jour (temps de démarrage) et celui du 8^{ème} jour. Nous assimilons cette fraction à une vitesse de multiplication du feuillage.

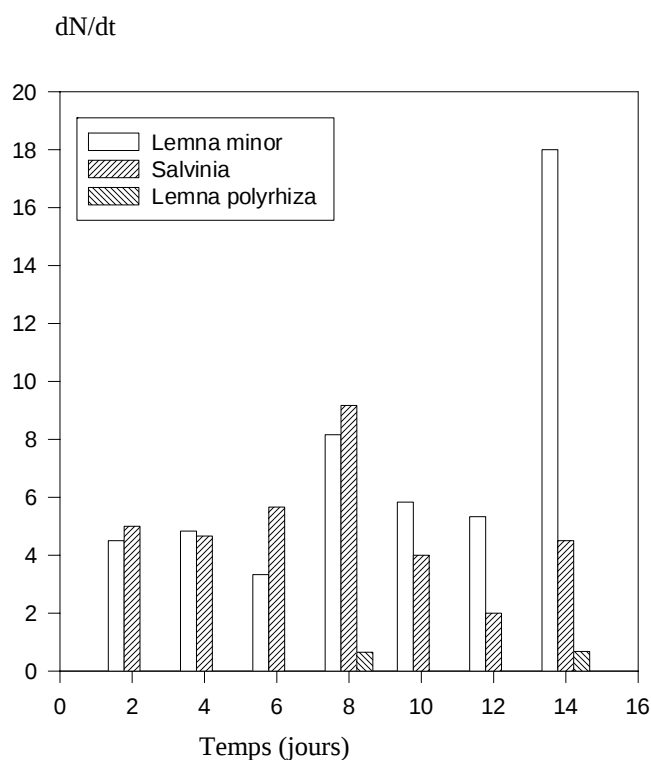


Figure 45.- Variation du taux de croissance en fonction du temps

Tableau 51.- Croissance de *Salvinia natans* (1) : dans le cas du cadmium.

[Cd ⁺⁺] mg.L ⁻¹	0	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	1
jours ↓					
0	10	10	10	10	10
2	20	12 ^(a)	10,33 ^(a)	11 ^(a)	10 ^(a)
4	30	14 ^(a)	13,33 ^(a)	12 ^(a)	10 ^(a)
6	35,33	17 ^(a)	13,66 ^(a)	12,66 ^(a)	10 ^(a)
8	42	19 ^(a)	16,66 ^(a)	13,66 ^(a)	10 ^(a)
Moyenne (8 ^{ème} jours)	42	19	16,66	13,66	10
Ecart-type	2,52	1,00	1,67	0,882	0
P < à	-	0,001	0,012	0,014	0,000

^(a) : différence significative en comparaison avec le témoin (ANOVA) .

Tableau 51.- (2) : dans le cas du cuivre.

[Cu ⁺⁺] mg.L ⁻¹	0	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	10
jours ↓					
0	10	10	10	10	10
2	20	12,33 ^(a)	10,33 ^(a)	10,33 ^(a)	10 ^(a)
4	30	18 ^(a)	12,33 ^(a)	10,33 ^(a)	10 ^(a)
6	35,33	20,66 ^(a)	12,66 ^(a)	10,33 ^(a)	10 ^(a)
8	42	25,33 ^(a)	14,33 ^(a)	10,33 ^(a)	10 ^(a)
Moyenne (8 ^{ème} jours)	42	25,33	14,33	10,33	10
Ecart-type	2,52	0,667	0,577	0,333	0
P< à	-	0,000	0,002	0,003	0,000

^(a) : différence significative en comparaison avec le témoin (ANOVA) .

Tableau 51.- (3) : dans le cas du zinc.

[Zn ⁺⁺] mg.L ⁻¹	0	10	50	70	80
jours ↓					
0	10	10	10	10	10
2	20	12	11	10 ^(a)	10 ^(a)
4	30	22 ^(a)	13 ^(a)	12,66 ^(a)	10 ^(a)
6	35,33	24,33 ^(a)	13,66 ^(a)	13 ^(a)	10,33 ^(a)
8	42	30,66 ^(a)	15,66 ^(a)	14 ^(a)	10,33 ^(a)
Moyenne (8 ^{ème} jours)	42	30,66	15,66	14	10,33
Ecart-type	2,52	4,16	1,76	1,00	0,667
P< à	-	0,004	0,033	0,033	0,001

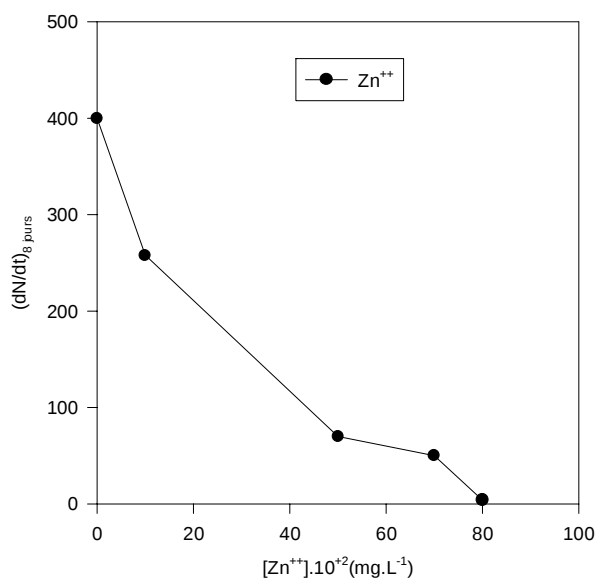
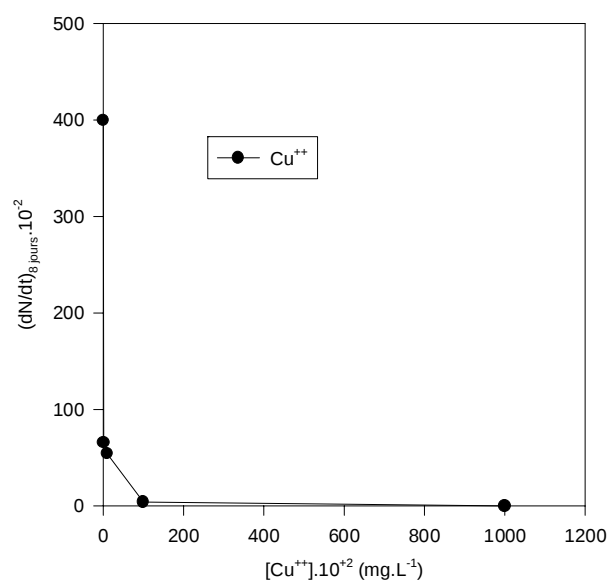
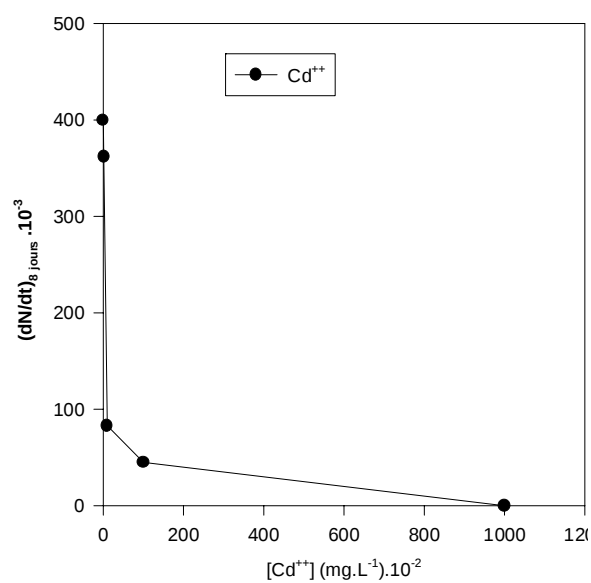
^(a) : différence significative en comparaison avec le témoin (ANOVA) .

Une autre détermination $\frac{dF_0^8}{dF_c^8}$ (tableau 52.-) représente la différence des feuilles de *Salvinia* dans le témoin au 8^{ème} jour, par rapport au feuillage de la plante immergée, pendant 8 jours, dans les solutions contaminées.

Tableau 52.- Détermination des $\frac{dF_0^8}{dF_c^8}$.

$Cd^{++} (mg.L^{-1})$	0	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1
$\frac{dF_0^8}{dF_c^8}$	-	3,55	4,48	8,48	-
$Cu^{++} (mg.L^{-1})$	0	10^{-2}	10^{-1}	1	10
$\frac{dF_0^8}{dF_c^8}$	-	2,08	7,40	95,96	-
$Zn (mg.L^{-1})$	0	10	50	70	80
$\frac{dF_0^8}{dF_c^8}$	-	1,5	5,65	8	96,96

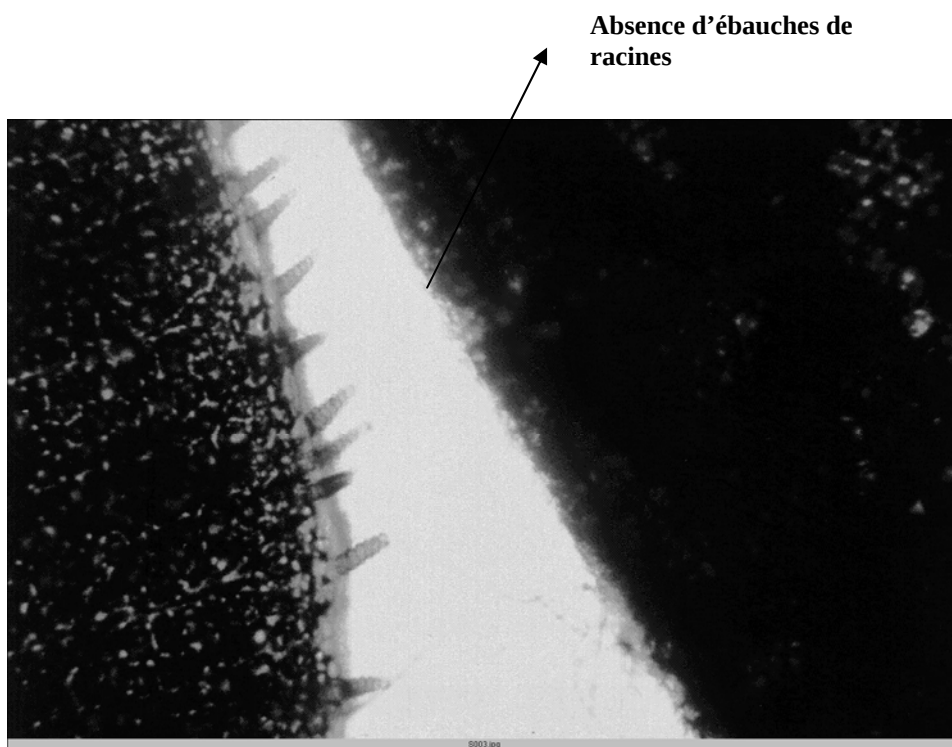
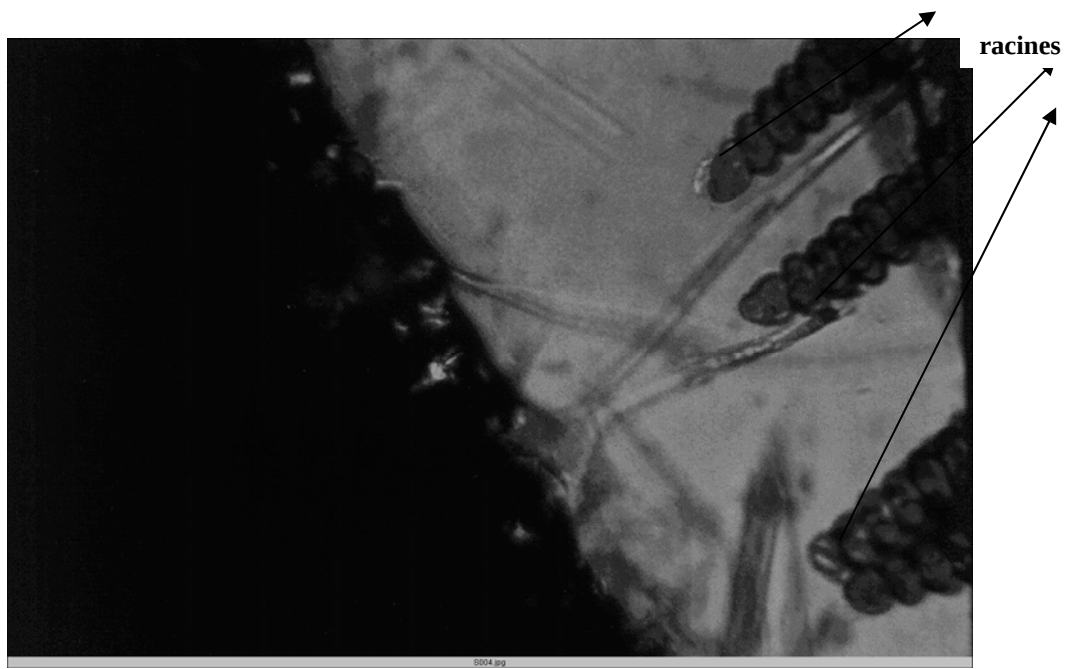
Ces rapports, montrent une réduction de la croissance pour une concentration de 10^{-2} $mg.L^{-1}$ de cadmium et de cuivre respectivement est de 4,48 et 2,08 (tableau 52.-). A une teneur de 10^{-2} $mg.L^{-1}$ de chaque cation, les effets de Cd^{++} et Cu^{++} tendent à se rapprocher. Du point de vue écotoxicologique, ceci montre la possibilité de détermination de doses seuils et de la CI 50.



Figures 46.- Evolution de la vitesse d'accroissement des feuilles en fonction des concentrations de Cd^{++} , Cu^{++} et Zn^{++} .

Nous observons également pour la concentration commune de cuivre et de zinc (1 mg.L^{-1}), une inhibition de 1,5 par rapport au témoin, causée par le zinc et un arrêt total de la croissance dans le cas du cuivre. Cette dernière constatation s'ajoute à celles citées auparavant lors du classement de ces trois métaux par ordre de toxicité décroissante : Cd^{++} , Cu^{++} et Zn^{++} . Par ailleurs, il n'apparaît aucune corrélation entre les effets de ces trois métaux par rapport à cette plante. Il s'agit tout simplement d'un phénomène d'inhibition de la croissance de *Salvinia*, lorsque les concentrations métalliques croissent. Les différences par rapport aux témoins sont apparents et majoritairement significatives ($p < 0,05$).

Nous rappelons que l'un de nos objectifs est d'effectuer l'examen microscopique sur des feuilles de *Salvinia* et ou de *Lemna minor* après une immersion, de 08 jours dans des solutions contaminées. La faible épaisseur des feuilles de *Lemna minor* ne nous a pas permis de réaliser l'étude histologique. Nous nous contenterons alors de présenter dans le paragraphe suivant, les résultats des toxicités de Cd^{++} et Cu^{++} seulement, tout en sachant, d'après les résultats sur *Salvinia*, que le zinc affecte dans une gamme de concentrations très différente de celles du cadmium et du cuivre. Les observations microscopiques des feuilles de *Salvinia natans* contaminées par Cd, Cu et Zn sont indiquées et regroupées dans le tableau 53.-. Nous joignons à nos déductions deux représentations (figure 47.-) correspondant à la vue d'une coupe de feuille témoin et d'une autre exposée durant 08 jours à $1 \text{ mg Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$. Les autres photos prises à cet effet (dans le cas de Cu et Zn) évoquent des signes plus ou moins comparables que nous citons dans le tableau 53.-.



-b-

Figures 47.- Coupes sur deux feuilles de Salvinia.
(a) : sans contamination ; (b) : avec contamination.

Tableau 53.-Résumé des observations au microscope.

Echantillons (numéros)	CONSTATATIONS : Effets du cadmium (Cd), du cuivre (Cu) et zinc (Zn) sur <i>Salvinia</i> .
T + Cd 4 1 mg.L ⁻¹	La photo (figure 47.-) est très significative
Témoin	CT - Poils tecteurs sur la face supérieure pluricellulaire - face inférieure présence de racines pluricellulaires en bouquet - cellules épidermiques pourvues de chloroplastes.
Cd 1 10 ⁻³ mg.L ⁻¹	CT - présence de poils tecteurs pluricellulaires - les ébauches de racines en petit nombre/témoin - apparition sur la face inférieure d'éléments filiformes longs enchevêtrés - les ébauches des cellules épidermiques pourvues de chloroplastes.
Cd 1 10 ⁻³ mg.L ⁻¹	CL - apparition des éléments filiformes longs sur les bords de la feuilles, apparition de taches brunes nécrotiques dans les parenchymes.
Cd 2 10 ⁻² mg.L ⁻¹	CL - augmentation des éléments filiformes et diminution sensibles des ébauches de racines - des zones nécrosées visualisées par dépigmentation de l'épiderme dans certaines zones.
Cd 2 10 ⁻² mg.L ⁻¹	CL - augmentation des zones nécrosées (brunissement et dépigmentation / témoin) - déformation légère de la paroi cellulaire au niveau des zones nécrosées - cellules à paroi légèrement sinueuses.
Cd 3 10 ⁻¹ mg.L ⁻¹	CT - autant d'éléments filiformes que précédemment ou même un peu plus - l'allure générale de la coupe est identique à la précédente - nombre de zones nécrosées presque identiques au précédent.
Cd 3 10 ⁻¹ mg.L ⁻¹	CL - les filaments sont beaucoup plus importants sur les bords - cellules sinueuses - les tâches marron sont nettement plus larges que dans Cd 2.
Cd 4 1 mg.L ⁻¹	CT - absence totale d'ébauches de racines - abondance des éléments filiformes - feuilles entièrement nécrosées. - chloroplastes non apparents.
Cd 4 1 mg.L ⁻¹	CL - brunissement total de la feuille - nombre considérable d'éléments filiformes

CT : coupe transversale ; CL : coupe longitudinale

Echantillons	CONSTATATIONS (suite)
Cu 1 10 ⁻² mg.L ⁻¹	pas de dégradation histologique /témoin
Cu 1 10 ⁻² mg.L ⁻¹	CL - Dépigmentation de certaines zones
Cu 2 10 ⁻¹ mg.L ⁻¹	CT - Absence d'ébauches de racines - important développement des éléments filiformes - la feuille est partiellement nécrosée - absence de cuticule - nombre de chloroplastes pas très important par rapport au témoin
Cu 2 10 ⁻¹ mg.L ⁻¹	CL - les vaisseaux conducteurs sont nécrosés - zones dépigmentées importantes - développement considérable des éléments filiformes
Cu 2 10 ⁻¹ mg.L ⁻¹	CL - même constatations que précédemment
Cu 3 1 mg.L ⁻¹	CT - destruction totale de la cuticule - dépigmentation - manque partiel des ébauches de racines - présence d'éléments filiformes
Cu 3 1 mg.L ⁻¹	CL - nécrose importante des vaisseaux - dépigmentation très importante - cellules à parois très sinueuses
Cu 4 10 mg.L ⁻¹	CT - destruction de la cuticule et d'une partie de l'épiderme - destruction totale des tissus - éléments filiformes assez restreints.
Cu 4 10 mg.L ⁻¹	CT - nécrose importante des vaisseaux - dépigmentation importante par rapport au précédent - parois parenchymateuses atteintes.

Zn 1	CT
10 mg.L ⁻¹	- aucune dégradation visible.
Zn 1	CL
10 mg.L ⁻¹	- aucune dégradation visible.
Zn 2	CT
50 mg.L ⁻¹	- Absence de cuticule
Zn 2	CL
50 mg.L ⁻¹	- absence <i>de</i> cuticule et apparition de zones nécrosées
Zn3	CT
70 mg.L ⁻¹	- idem à Zn 2 - plus vaisseaux légèrement atteints - absence de cuticules - présence modérée de filaments
Zn 3	CL
70 mg.L ⁻¹	- idem que la coupe transversale.
Zn 4	CT
80 mg.L ⁻¹	- absence de cuticule - absence des ébauches de racines. - jaunissement de l'ensemble.
Zn 4	CT
80 mg.L ⁻¹	- deuxième mise au point du précédent.
Zn 4	CL
80 mg.L ⁻¹	- jaunissement, taches jaunes - jaunissement de l'épidémie.

Comme nous l'avons déjà cité, la fragilité de la feuille de *Lemna minor* a présenté l'inconvénient de l'impossibilité d'effectuer des coupes pour des observations au microscope.

L'étude de l'inhibition de sa croissance en présence de cadmium et de cuivre est présentée ci-après.

III.5.3.- Etude de la croissance de *Lemna minor* en présence de : Cd et Cu.

Nous démarrons nos cultures avec un nombre de feuille initial égal à 10, ce qui correspond à 5 colonies.

Le suivi du développement du feuillage (tableau 54.-) une fois tous les deux jours et ce, pendant 8 jours met en évidence l'influence de Cd^{++} et Cu^{++} sur la croissance de cette plante. Le cadmium se révèle toujours plus inhibiteur, étant donné qu'il affecte significativement ($p < 0,01$) l'accroissement des feuilles pour $10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ alors que le cuivre à cette teneur ne témoigne pas de la même action. Le cuivre devient significativement toxique à partir de $10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Les variations du taux d'accroissement des feuilles de *Lemna* pendant 8 jours lorsque les concentrations de Cd^{++} et Cu^{++} augmentent sont illustrées par la figure 48.- Le développement du feuillage est nettement ralenti dans le cas des intoxications, ce qui se traduit par une baisse de dN/dt (tableau 54.-) de 12,75 à 8,00 et 8,79 respectivement pour $10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{++} et $10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{++} . Néanmoins, les pouvoirs inhibiteurs du cadmium et du cuivre n'apparaissent pas de manière distincte mais plutôt proches dans la majorité des cas de concentrations. Ceci peut expliquer les sensibilités différentes de *Salvinia* et *Lemna* aux deux produits métalliques testés.

Tableau 54.- Croissance de *Lemna minor*

(a) : en présence de cadmium.

$[\text{Cd}^{++}] \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ jours	0	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1
0	10	10	10	10	10
2	28	26,33	21	20 ^(a)	17,66 ^(a)
4	46	45,33	35,66	35,33 ^(a)	28,66 ^(a)
6	79	66,33	56,33 ^(a)	50,66 ^(a)	34,66 ^(a)
8	112	82,66	74 ^(a)	70,33 ^(a)	40,66 ^(a)
Ecart type ⁽¹⁾	1,42	2,96	2,49	5,50	1,40

(b) : en présence de cuivre.

[Cu ⁺⁺] mg.L ⁻¹ jours	0	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	10
0	10	10	10	10	10
2	28	28	22	20 ^(a)	19 ^(a)
4	46	40	37 ^(a)	32,33 ^(a)	31,33 ^(a)
6	79	60,66	49,66 ^(a)	48 ^(a)	37,66 ^(a)
8	112	80,33	64,33 ^(a)	55,33 ^(a)	45,33 ^(a)
Ecart type ⁽¹⁾	2,50	2,40	3,89	5,50	2,96

- chaque colonne comporte le nombre moyen de feuilles sur 3 essais.

-⁽¹⁾ : les écart-types du 8^{ème} jour.

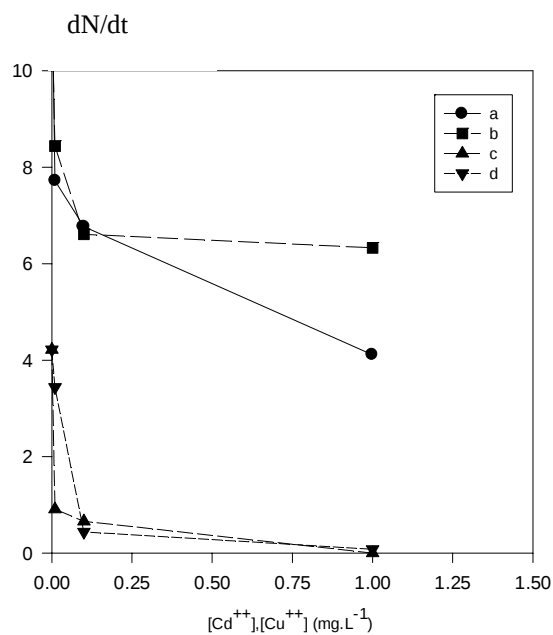
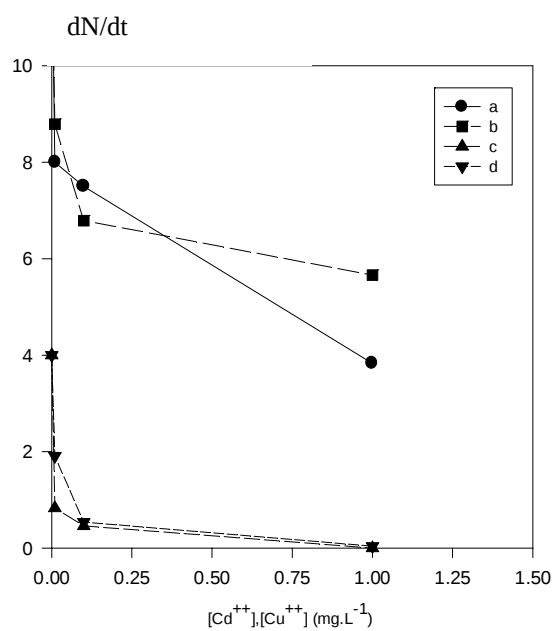
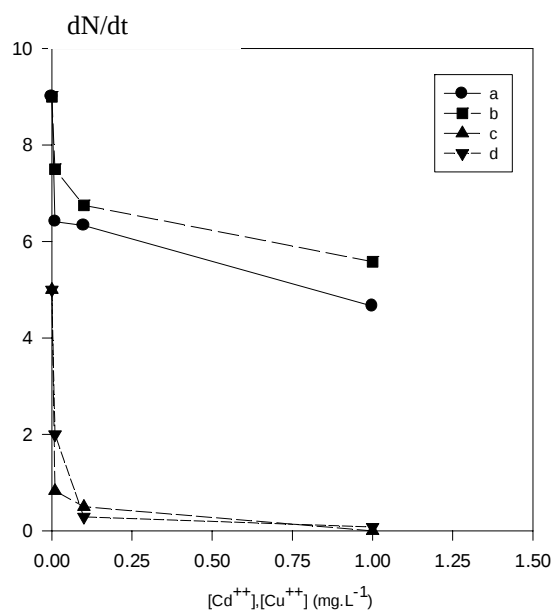
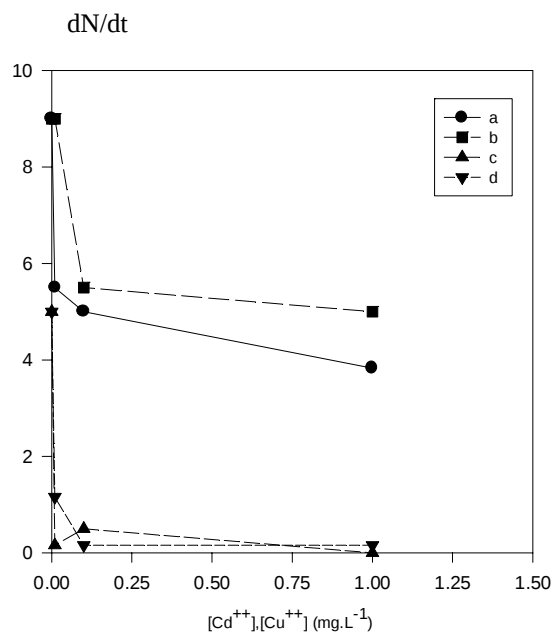
-^(a) : différences significatives par rapport au témoin.

En ce qui concerne les sensibilités de ces plantes et pour plus de clarté, nous représentons schématiquement les variations de dN/dt (vitesse d'accroissement des feuilles) pour les différentes concentrations de Cd⁺⁺ et Cu⁺⁺ et différents temps d'observations du développement des feuilles (figure 48.-).

Ce cas de figure (figure 48), exprime, encore une fois, l'inhibition des fonctions physiologiques des deux plantes en présence de cadmium et de cuivre et la persistance de cette intoxication qui devient de plus en plus diffuse au cours du temps. L'expression de la toxicité croissante avec le temps est justifiée par une baisse de la vitesse de multiplication des feuilles (dN/dt) qui se montre plus prononcée pour *Salvinia*.

Dans le cas de la croissance de la *Salvinia natans*, sans agent toxique, nous obtenons une réduction de l'accroissement des feuilles au bout de six jours de culture, ce qui nous laisserait penser que le milieu « Hoagland » ne représente pas le milieu de vie optimal de cette plante, mais que l'inhibition est obtenue de manière significative.

Nous retrouvons sur la représentation graphique (figure 48.-) la remarque habituelle liée aux pouvoirs toxiques du cadmium et du cuivre qui demeurent majoritairement et respectivement le premier supérieur au second.



Figures 48.- Evolution de la croissance des feuilles pour 2,4,6 et 8 jours.

- (a) : *Lemna minor*, cadmium
- (b) : *Lemna minor*, cuivre
- (c) : *Salvinia natans*, cadmium
- (d) : *Salvinia natans*, cuivre

La présente étude appuie la recommandation de l'exploitation des plantes aquatiques dans les études de perturbation par les métaux lourds.

Il reste à confirmer les observations microscopiques par des analyses de l'accumulation du métal par les plantes.

L'isolation des chloroplastes et l'examen de l'influence des métaux sur leur fonction (photosynthèse, respiration) serait un objectif idéal et très intéressant de part l'originalité de cette idée qui pourrait sans doute être réalisée pour fournir une explication satisfaisante à notre schéma descripteur du phénomène d'inhibition de *Salvinia natans*, en particulier.

Conclusion générale.-

Les objectifs de notre étude se situent dans un cadre écotoxicologique. L'emploi de la daphnie et des plantes aquatiques, dans le cadre de réseaux de surveillance ou d'études ponctuelles, montre l'intérêt porté à ces organismes traceurs de la contamination métallique des eaux continentales.

Au plan expérimental, les résultats dans une première étape de ce travail, nous ont conduit à postuler certaines hypothèses relatives à l'intoxication de *Daphnia magna* par certains métaux lourds : Cd et Cu et/ou Ni et Zn. Cet organisme, dans les tests aigus, s'est révélé sensible, en présence de métaux lourds, aux grandes variations de la température et que la gradient de concentration seul justifie l'influence de la température sur la toxicité du cadmium, du cuivre, du nickel et du zinc.

Au regard des essais complémentaires, à court terme, portant notamment sur la forme du métal la plus toxique, l'effet de complexation des métaux par le Na₂ EDTA, un acide humique et les phosphates, l'influence de la dureté et de la salinité, les résultats de telles études, confirment certaines conclusions déduites de notre analyse bibliographique.

Les essais en alimentation continue nous ont permis d'adapter les daphnies à une nouvelle méthode de mesure ou d'évaluation de la survie. De nombreux tests et mises au point du protocole ont abouti à certaines corrélations, telles que celles, exprimant les quantités de métaux entrant (C_e) en fonction des quantités de métaux sortant (C_s) de l'appareil de détection de l'inhibition de la survie.

A cet effet, nous présentons ces résultats dans le tableau suivant :

	Cd^{++}	Cu^{++}	Zn^{++}	Ni^{++}
Corrélations	$C_s = 0,21 C_e^{1,29}$	$C_e = 0,32 C_e^{1,41}$	$C_s = 0,18 C_e^{0,88}$	$C_s = 0,64 C_e^{0,46}$

Nous notons cependant, que les résultats obtenus à partir de notre schéma descripteur d'une installation de contrôle de la toxicité des eaux, ne doivent pas être pris comme des valeurs absolues mais comme des valeurs guides dans les futures études dont l'objectif est la mise en fonction des appareils de biomonitoring.

Des essais écotoxiques à l'aide de daphnies élevées dans des conditions homogènes, proches des conditions naturelles et de daphnies soumises à des conditions de nourriture et d'éclairage strictement artificielles, ont permis de dégager l'hypothèse d'une action neutre du type de nourriture sur la toxicité aiguë de Cd, Cu et Ni.

Le test prolongé (21 jours) sur la même souche et espèce de daphnie élevée en milieu quasiment artificiel, nous a permis d'établir les sensibilités de la survie et de la reproduction à la fixation des fractions de métaux (Cd, Cu et Ni) sur cet organisme test.

Sur un autre plan, plutôt écologique, nous avons élaboré une nouvelle méthodologie profitant au mieux des potentialités de notre indicateur. A l'aide d'un aspect génétique, spécifique à la daphnie, différentes expériences de laboratoire ont permis de proposer une description intervenant lors du processus de la migration verticale des daphnies en présence de cadmium. A partir du dispositif expérimental et du clone phototactique positif dont nous disposons, nous avons testé la validité d'un tel outil biologique qui pourrait comporter un biomonitor ou un biocapteur phototactique. La présence de cadmium au sein du milieu de vie de *Daphnia-magna*, permet de rendre l'effet phototactique un test plutôt fiable de l'état de contamination du milieu.

En effet, l'aptitude des daphnies à suivre le faisceau lumineux aurait tendance à faiblir au détriment de l'agent polluant. Les mécanismes à l'origine de cette inhibition, en accroissant les teneurs en cadmium ont montré qu'il existe des réponses au toxique qui semblent univoque d'un point de vue temps d'interaction (métal-daphnie) et du déclenchement des signes d'intoxication sur le comportement phototactique.

L'activité épuratrice des micro-organismes d'une boue activée a été inhibée à 50% pour 100 mg.L⁻¹ de chrome trivalent. Toutefois, la possibilité d'adapter ces boues aux faibles doses de Cr³⁺ (5 mg.L⁻¹) a été mise en évidence mais l'obtention des boues chromées n'est pas un problème à négliger.

De nombreux essais des mises aux points d'un protocole d'adaptation des deux espèces végétales *Lemna minor* et *Lemna polyrrhiza* et *Salvinia natans* à un milieu de culture en conditions de laboratoire ont montré des croissances différenciées. Une telle observation nous a renseigné sur le choix des espèces à tester en vue d'une étude histologique, ce qui a conduit à l'élimination de *Lemna-polyrrhiza* de nos travaux.

Lemna-minor et *Salvinia-natans* ont répondu de façon significative à la présence du cadmium et du cuivre additionnés en proportions variables dans le milieu nutritif ; le zinc s'est révélé moins réducteur de la croissance de *Salvinia*. Ainsi, le transfert des fractions métalliques de cadmium, de cuivre et de zinc du milieu environnant au milieu intercellulaire sont assujettis aux mécanismes biologiques. L'examen microscopique des feuilles de *Salvinia* exposées préalablement à des gradients de concentrations de Cd, Cu et Zn a justifié l'impact de ces métaux sur le processus biologique du matériel végétal. Les différents compartiments de l'organisme test apparaissent détériorés au moins en partie dans le cas des faibles concentrations. Nous citons, entre autre effets, la nécrose des vaisseaux et la disparition des chloroplastes.

Les méthodes, utilisant la daphnie et/ ou ces deux plantes aquatiques permettent de fournir par l'intermédiaire du modèle expérimental choisi, une estimation quantitative de la contamination de l'eau. Ces méthodes peuvent s'avérer une alternative intéressante, notamment dans le cadre d'études ponctuelles et localisées qui vise à évaluer la pollution toxique des rejets d'industries.

Références bibliographiques.-

Abel P. D. 1974.–Toxicity of synthetic detergent to fish and aquatic invertebrates. J Fish. Biol., 6: 279-298.

Adema M.M. 1978.– *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronique toxicity tests. Hyrobiologia, 59 (2) : 125-134.

Aiba S., Humprey A. E. & Mills N.F. 1973.- Biochemical Engineering, Edition Academic Press, New York, 97 p.

Amoros C. 1984.– Crustacées cladocères. Bulletin de la société limnienne de Lyon, n°3 :71-79

Anderson B. G. 1980.– Aquatic anvertebrates in tolerance investigations from Aristotle to Naumann. In : A.L. Buikema, Jr. and J.Cairns, Jr. (eds). Aquatic invertebrates bioassays., ASTM/STP, 715 : 3-35

Association Française de Normalisation 1983.– Essais des eaux, détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*. NFT 90-301, AFNOR: 11 p.

Association Française de Normalisation 1992.– Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN). NFT 90-350, AFNOR, Paris: 9 p.

ASTM (American Society for testing and Matrials) 1987.– Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity tests with *Daphnia magna*, Annual book of ASTM Standars, 14(02), E: 1193 p.

Avillo A., Margiocco C., Melodia F & Mensi F. 1982.– Biochemical effects of long-terme exposure to Cr, Cd, Ni, on rainbow trout, (*Salmo gairdneri rich*) : Influence of sex and seaon. Chemosphere, 11: 47-57.

Baird D.J., Barber I., Soares A.M.V.M & Calow P. 1991.– A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna strauss*. Ecotoxicology Environmental safety, 21: 1-9.

Baudo R. 1987.– Ecotoxicological testing with daphnia. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 45: 461-482

Bayley I.A.E. 1986.– Aspects of diel vertical migration in zooplankton and its enigma variations, in : « Limnology in Australia ». Eds. De Deckker P. and Williams W.D. Junk, Dordrecht : 349-368.

Belabed W., Kestali N., Semsari S. & Gaïd A. 1994.–Evaluation de la toxicité de quelques métaux lourds à l'aide du test daphnie. TSM N° 6 : 331-335.

Bellan G. 1984.– Indicateurs et indices biotiques dans le domaine marin. Bull. Ecol., 15(1) : 13-20.

Bellavere C. & Gorbi J. 1981.– A comparative analysis of acute toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Bionphalaria glabrata* and *Brachydanio rerio*. Environm. Tech. letters, 2: 119-128.

Benefield L.D. & Clifford W.R. 1980.- Biological process design for wastewater treatment. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, NJ 07632, Granville H. Sewell, editor, 526 p.

Besch W.K., Kemball A., Meyer – Waeden K. & Scharf B. 1977.– A biological monitoring system employing rheotaxis in fish. In J. Cairns, Jr. K.L. Dickson and G.F. Westlake (eds) : Biological monitoring of water and effluent quality, ASTM STP 607: 56 p.

Bessi H. 1988.– Toxicité des rejets de tanneries dans la région de Meknes, mémoire de C.E.A : 80 p.

Biesinger K.E. & Christensen M.G. 1972.– Effect of various on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. J. Fish. Res. Bd. Canada, 29: 1691-1700.

Biesinger K.E., Christensen M.G. & Fiandt J.T. 1986.– Effects of metal salt mixtures of *Daphnia magna* reproduction. Ecotox. Environm. Safety, 11 : 9-14.

Blandin P. 1986.– Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. Bull. Ecol., 17(4): 215-307.

Blust R., Eva K. & Baillieul M. 1992.– Effect of salinity on the uptake of cadmium by the brine shrimp *Artemia franciscana*. Mar. Ecol. Prog. Ser. (84): 245-254.

Bodar C.W.M. 1989.– Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 17: 333-338.

Borgmann U. 1983.– Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota. In : *Aquatic toxicology*, edited by J.O. Nriagu. Wiley series in advances in environmental Science and Technology, Vol. 13. J. Wiley and sons, New York: 47-72.

Borgmann U., Millard E.S. & Charlton C.C. 1989.– Effect of cadmium on stable large volume, laboratory ecosystem containing *Daphnia* and phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 399-405.

Bouquegneau J.M., Joris C. & Delbeke K. 1985 a.– Marine ecotoxicology : field in laboratory approaches. In : Grieken R., Van. Wollast R., (eds). *Progress in Belgian oceanographic research*. Univ. Antwerp, Antwerpen, Wilryk, Belgium: 380-392.

Boyle E.A., Sclater F.R. & Edmond J.M. 1976.– On the marine geochemistry of cadmium. *Nature*, Lond. 263 : 42-44.

Brichon M.H. 1978.– Approche physiologique et conditions d'exécution d'un certain nombre de tests d'écotoxicologie appliqués à différentes espèces de poissons. Thèse, Doct. Sci. Biol. Université Claude Bernard (Lyon) : 128 p.

Brown L.A. 1929.– *American Naturalist*. Vol. 63: 248-264.

Brungs W.A., Leonard E.N. & Mc Kim J.M. 1973.– Acute and long-term accumulation of copper by the brown bullhead *Ictalurus nebulosus*. *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 583-586.

Bryan G.W. 1976 a.– Heavy metal contamination in the sea . In :R. Johnston, ed., *Marine pollution*. Academic Press, London: 185-302.

Bryan G.W. 1976 b.– Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. In A.P.M. Lockwood (Ed.), *effects of pollutants on aquatic organisms*. Cambridge University press, Cambridge.

Bryant V., New Bery D.M. & Campbell R. 1985 b.– Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc to two estuarine invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 24: 139-154.

- Buffle J.A.E. 1977.– Tech. Sci. Municipales, n°1: 3-10.
- Buikema A.L., Geiger J.G. & Lee D.R. 1980.– *Daphnia* toxicity tests, In : A.L. Buikema Jr and Cairns J., Jr (eds) : Aquatic invertbrate bioassays, ASTM STP 715. American Society for Testing and Materials, Philadelphia: 48 p.
- Burton D.T., Jones A.H. & Cairns J. 1972.– Acute zinc toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : Confirmation of the hypothesis that is related to tissue hypoxia. J. Fish. Res. Board Can., 29: 1463-1466.
- Butler G.C. 1978.– Principales of ecotoxicology. (eds). SCOPE Report 12, Wiley, New York.
- Cabridenc R. & Ludahl P. 1974.– Intérêt et limites d'un test daphnie pour l'étude des nuisances des polluants vis à vis de l'environnement. T.S.M, l'eau n°6 : 340-345.
- Calabresse A. & Nelson D.A. 1974.– Inhibition of embryonic development of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* by heavy metals. Bull. Envir. Comtam. Toxic. 11: 92-97.
- Calabresse A., Thurberg F.P., Dawson M.A. & Wenzloff D.R. 1975.– Sulethal physiological stress unduced by cadmium and mercury in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. In, Sublethal effects of toxic chemicals on aquatic animals, edited by J.H. Koeman and J.J.T.W.A. Strik, Elsevier scientific Publishing Company, Amesterdam, the Netherlands: 15-21.
- Campbel J.H. & Evans R.D. 1987.– Inorganic organic ligand binding of lead and cadmium and resultant implications for bioavailability. Sci. Total environ. Pollut., B , 10 : 1-18.
- CEE (Communautés Economiques européennes) 1986.– Prolonged toxicity study with *Daphnia magna* : Effects on reproduction. Test guideline, Draft, 4. XI/681/8: 20 p.
- Chapman G.A., Otas., Recht F. 1980.– Effects of water hardness on the toxicity of metals to *Daphnia magna*. Sheffield University: 11-12.
- Claus C. 1976.– Effects of 2,4 – D on survival and reproduction of *Daphnia magna* strauss. Med. Fac. Landboww. Rijksuniv. Gent., 41(2) : 1467-1476.

Claveri B., Morhain E. & Mouvet C. 1994.– A methodology for the assesement of accidental pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparoides*. Chemosphere, 28 (11): 2001-2010.

Coniglio L.& Baudo R. 1989.– Life-tables of *Daphnia Obtusa* (Kurz) surviving exposure to toxic concentrations of chromium. Hydrobiologia, 188/189: 407-410.

Connell W.D. & Miller G.J. 1984.– Chemistry and ecotoxicology of pollution. Copyright by J. Wiley and sons, U.S.A: 444 p.

Cotton F.A. & Wilkinson G. 1972.– Advanced inorganic chemistery, 3 rd Ed., Interscience Publishers, New York: 830-845.

Coulon P.Y., Charras J.P., Chasse J.L., Clement P., Cornillac A., Luciani A. & Wurdak E. 1983.– An experimental system for the automatic traking and analysis of rotifer swimming behaviour. Hydrobiologia 104: 197-202.

Cowgill U.M., Williams D.M. & Esquivael J.B. 1984.– Effects of maternal nutrition on fat content and longevity of neonates of *Daphnia magna*. Journal Crustacen biology, 4(2): 173-190.

Cowgill U.M. 1987.– Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproductibility of toxicity test results. Wat. Res ., 21 (12): 1453-1462.

Cushing D.H. 1951.– The vertical migration of planctonic crustacea, in : Biol. Rev., 26: 158-192.

Dave G. 1978.– Anannotated literature survey of mathods for determination of effects of pollutants in aquatic environment.(ed) Blanck H., Dave G., Gustafsson K., Swedish Environment, SNV PM: 1050 p.

Dave G., Andersson K.A.J., Berlind R. & Hasselrot B. 1981.– Toxicity of eight solvent extraction chemical and of cadmium to water fleas, *Daphnia magna*, rainbow trout, *Salmo gairdneri* and zebrafish, *Brachydanio rerio*. Bull. Biochem. Physiol., Vol 69: 83-98.

Davies A.G. 1973.– In radioactive contamination of the marine environment. International Atomic Energy Agency, Vienna.

De Lisle P.F. & Roberts M.H. Jr. 1988.– The effects of salinity on cadmium toxicity to the mysid *Mysidopsis bahia* : role of chemical speciation. *Aquatic Toxicol.*, 12: 357-370.

Demayo A., Taylor M.C. & Taylor K.W. 1982.– Effect of copper on humans, laboratory and farmanimals, terrestrial plants and aquatic life. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*: 183-255.

De Meester L. 1991.– An Analysis of the phototactic behaviour in *Daphnia magna* clones and their sexual descendants. *Hydrobiologia*, 225: 217-227.

De Meester L. 1993 a.– Genotype fish-mediated chemicals and phototatic behaviour in *Daphnia magna*. *Ecology*, 74: 1467-1474.

De Meester L. 1993 b.– Phototactic behaviour in *Daphnia magna*. *Academiae Analecta*, 55: 145-187.

De Meester L. 1996 a.– Evolutionary potential and local genitic differentiation in phenotypically plastic trait of cyclical parthenogen *Daphnia magna*. *Evolution* 50: 1293-1298.

De Walf W., Canton J.H., Deneer J.W., Wegman R.C. & Hermans J. 1987.– Quantitative structure-activity relation ships and mixtures studies of alcohols and chlorohydrocarbons : reproductibility of effects on growth and reproductionof *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 7: 87-95.

Diamond J.M., Winchester E.L., Mackler D.G., Rasnake W.J., Fanelli J.K. & Gruber D. 1992.– Toxicity of cobalt to freswater indicator species as a function of water hardness. *Aquatic Toxicology*, 22: 163-180.

Didelupis G.D. & Rotondo V. 1988.– Phototaxis in aquatic invertebrates : possible uses in ecotoxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 16: 189-193.

Eckert J.M. & Sholkouitz E.R. 1976.– The flocculation of iron, aluminium and humates from river waters by electrolytes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 40: 847-853.

Enserink L., Luttmer W. & Maas – Diepeveen H. 1990.– Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. Aquatic Toxicology, 17: 15-26.

Enserink L., De La Haye M. & Maas – Diepeveen H. 1993.– Reproductive strategy of *Daphnia magna* : Implication for chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology, 25: 111-124.

FAO / SIDA 1976.– Training course on aquatic pollution in relation to protection of living resources. Bioassays and toxicity testing. FAO, Rome, TF – INT 173, suppl. 1: 273 p.

Finney D.J. 1971.– Probit analysis. Cambridge University Press, London: 333 p.

Flickinger A.L., Bruins R.J.F., Winner R.W. & Skillings J.H. 1982.– Filtration and phototactic behaviour as indices of chronic copper stress in *Daphnia magna* strauss. Arch. Environm. Contam. Toxicol., 11: 457-463.

Florence T.M., Morrison G.M. & Stauber J.L. 1992.– Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. Sci. Total Environ., 125 : 1-13.

Förstner U. & Wittman G.T.W. 1981. Metal pollution in the environment. 2nd ed, Springer – Verlag, Berlin: 486 p.

Foster I.D.L., Charlesworth S.M. & Keen D.H. 1991.– A Comparative study of heavy metal contamination and pollution in four reservoir in the english midlands, UK. Hydrobiol., 214 : 155-162.

Gandais V. & Marchandise P. 1992.– Behaviour of micro pollutants in soils amended with river cleaning out sludge in northern France. Water. Sci. Technol., 25 (11): 433-440.

Gauss J.D., Woods P.E., Winner R.W. & Skillings S.H. 1985.– Acute toxicity of copper to three live stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness and alkalinity. Environ. Pollut. Scr. A. Ecol. Biol., 37: 149-157.

Girling A.E., Pascoe D., Janssen C.R. & Persoone G.D. 2000.- Development of methods for evalating toxicity to freshwater ecosystems. Ecotoxicol. Environ. Saf., 45 (2), 76- 148.

Goodrich M.S. & Lech J.J. 1990.– A behavioral screening assay for *Daphnia magna* : A method to assess the effects of Xenobiotics on spiral orientation. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 9: 21-30.

Goss L.B. 1980.– Temperature tolerance determinations for *Daphnia*. Aquatic toxicology, ASTM STP 707: 354-365.

Goss L.B. & Bunting D.L. 1983.– *Daphnia* development and reproduction : response to temperature. J. Therm. Biol., 4: 375-380.

Goulden G.E., Comotto R.M., Hendrikson Jr. J.A., Hornig L.L. & Johnson K.L. 1982.– Procedures and recommendations for the culture and use of *Daphnia* in bioessay studies. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, ASTM, STP 766: 139-160.

Green J. 1955.– Haemoglobin in the fat cells of *Daphnia*. Quarterly Journal of Microscopical Sciences, 96: 173-176.

Groth P. 1971.– Untersuchungen über einige spurenelemente in seen. Arch. Hydrobiol., 68: 305-314.

Grothe D.R. & Kimerle R.A. 1985.– Inter and intralaboratory variability in *Daphnia magna* effluent toxicity test results. Environm. Toxicol. Chem., 4 : 189-192.

Guilhermino L., Sorbal O., Chastinet C., Ribeiro R., Gonclaves F., Silva M.C. & Soares M.C. 1999.- A *Daphnia* first-brood chronic test: An alternative to the conventional 21 days chronic bioassays. Ecotoxicol. Environ. Saf., 42 (1), 67 - 74.

Gulati R.D., Bodar C.W.M., Schuurmans A.L.G., Faber J.A.J. & Zandee D.I. 1988.– Effects of cadmium exposure on feeding of freshwater planktonic crustaceans. Comp. Biochem. Physiol., 90 c, (2): 335-340.

Gupta P.K., Khangarot B.S. & Durve V.S. 1981.– The temperature dependence of the acute toxicity of copper to a freshwater pond snail, *Viviparus bengalensis* L. Hydrobiologia 83: 461-464.

Gutknecht J., 1965.– Uptake and retention of cesium-137 and zinc-65 by seaweeds. Limnol. Oceanogr, 10: 58-63.

Guy R.O. & Chakrabarti C.L. 1975.– Distribution of metal ions between soluble and particulate forms. Ab str. Int. Conf. Heavy Met. Environ., Toronto, Canada: 29 p.

Hammond P.B. & Foulkes E.G. 1986.– Metal ion toxicity in man and animals, in Stiegel, 1986, metal ions in biological systems – volume 20: concepts on metal ion toxicity, Marcel Dekker, New – York: 386 p.

Haney J.F. 1988.– Diel patterns of zooplankton behaviour, in: Bull. Mar. Sci., 43: 583-603.

Hart B.T. & Davies S.H.R. 1978.– A study of the physicochemical forms of trace metals in natural waters and wastwaters. Australian water resources council technical paper n° 35. Australian Government Publishing service, Canberra.

Havas M. 1985.– Aluminium bioaccumulation and toxicity to *Daphnia magna* in soft water at low pH. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1741-1748.

Hebert P.D.N. 1978.– The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). Biol. Rev., 53: 387-426.

Hellawell J.M. 1978.– Biological surveillance of rivers. Water Research Centre. Stevenage, England.

Hem J.D. 1970.– Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water. U. S. Geol. Surv. Water supply Pap. 2nd ed. 1473: 363 p.

Herman A.N. 1971.– Hydrogéochimie, Ed. Cebedoc, Liège.

Herman J., Broekhuysen E., Canton H. & Wegman R. 1985.– Qualitative structure activity relationships and mixture toxicity studies of alcohols and chlorohydrocarbons: Effects on growth of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicol., 6: 209-217.

Holcombe G.W. & Andrew R.W. 1978.– The acute toxicity of zinc to rainbow and brook trout: Comparison in hard and soft water, EPA – 600/3 – 78 – 094, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota: 3-78.

Homer D.H. & Waller W.T. 1983.– Chronic effects of reduced dissolved oxygen on *Daphnia magna*. Heridity, 33: 327-337.

Hueck – Van der Plas E.H. 1978.– Experiences with an inventory of ecological test based on an enquiry by the OECD chemicals groupe. In: Tests for the ecological effects of Chemicals. Proc. Research Seminar: 7-9.

Husak S., Sladeczek V. & Sladekova A. 1989.– Freshwater macrophytes as indicators of organic pollution. Acta hydrochim. Hydrobiol., 17: 693-697.

Hutchinson G.E. 1967.– A treatise on limnology. Vol. II. Introduction to lake biology and limnoplankton, Wiley and Sons, New York.

Ingersoll C.G. & Winner R.W. 1982.– Effect of *Daphnia pulex* (Degeer) of daily pulse exposures to copper or cadmium. Environm. Toxicol. Chem., 1 : 321-327.

Iserentant R. & De Sloover J.R. 1976.– Le concept de bioindicateur. Mem. Soc. Voy. Belg., 7: 15-24.

Jakson L.J. & Kalff J. 1993.– Patterns in metal content of submerged quatic macrophytes: the role of plant growth form. Freshwater Biol., 29: 351-359.

Jonasson I.R. 1977.– Geochemictry of sediment/water interactions of metals, including observations of aviability. In H. Shear and A.E.P watson (Eds.), the fluvial transport of sediment-associated nutriment and contaminant. IJC/Pluarg, Windsor, Ontario: 255-271.

Jouany J.M., Vaillant M., Blazer B., Cabrioenc R., Ducloux M. & Scmits S. 1982.– Approach to hazard assesment by a aquatitave system based on interaction concept between variables, les tests d'écotoxicité pour l'évaluation des molécules toxiques. Journées de formation continue, Metz : 1-25.

Jouany J.M., Vasseur P. & Ferard J.F. 1982.– Ecotoxicité directe et intégrée du chrome hexavalent sur deux niveaux trophiques associés : *Chlorella vulgaris* et *Daphnia magna*. Environm. Pollut., 27: 207-221.

Keating K.I. 1985 a.– A system of defined (*sensu stricto*) media for daphnid (cladocera) culture. Water Res., 19 (1): 73-78.

Khangarot B.S. & Ray P.K. 1987.– Correlation between heavy metal acute toxicity in *Daphnia magna* and fish. Bull. Envir. Contam . Toxicol., 38: 722-726.

- Klaassen C.D., Amdur M.O. & Doull J. 1986.– Casarett and Doull's toxicology, the basic science of poisons, Mc Milan publishing company, New York, chapitre 19, 3^{ième} edition.
- Kleiers P.L. & Weis J.S. 1987.– Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms. A review. Environ. Pollut., 45: 173-205.
- Klein L.A., Lang M., Nash N. & Kirshner S.L. 1974.– Sources of metals in New York city waste-water. J. Water Polluti. Control Fed., 46: 2653-2657.
- Klüttgen F.V., Birgit & Ratte H.T. 1983.– Longterm effects of cadmium to *Daphnia magna* : modelling the population dynamics using life table data. Technical University Aachen, Kopernikusstrasse. 16, D –5100 Aachen, FRG.
- Knie J. 1978.– Der dynamischen *Daphnia* test-ein automatischer biomonitor zur überwachung von gewässern and abwässern. Wasser and Boden, 12: 310-312.
- Knoll J. & Fromm P.O. 1960.– Accumulation and elimination of hexavalent chromium in rainbow trout. Physiol. Zool., 33: 1-8.
- Kobayachi M. & Nezu T. 1986.– Variation of hemoglobin content in *Daphnia magna*. Physiol. Zool., 59 (1): 35-42.
- Kolkwitz R. & Marson M. 1908.– Ökologie der pflanzlichen Saprobien. BER. Deutsch. Bot. Ges., 26: 505-519.
- Kolkwitz R. & Marson M. 1909.– Ökologie des tierischen Saprobien. Internat. Rev. Hydrobiol., 2: 126-152.
- Kolkwitz R. 1950.– Ökologie des Saprobie über die beziehung Wasser-organismen zur Umwelt. Ver. Wa. Bo. Lu. Hyg.: 4- 64.
- Kooijman S.A.L.M. 1981.– Parametric analyses of mortality rates bioassays. Water Res., 15: 107-119.
- Kooner Z.S. 1992.– Adsorption of copper into goethite in aqueous systems. Enviro . Geol. Water Sci., 20 (3): 205-212.

Korpelainen H. 1986.– Intraspecific variation in life span and fecundity under controlled conditions in the cyclic parthenogen, *Daphnia magna*. Arch. Hydrobiol., 105, 3: 321-327.

Kubitz J.A., Leweke E.C., Besser J.M., Drake III J.B. & Giesy J.P. 1995.– Effects of copper contaminated sediments on *Hyalella azteca*, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* : survival, growth and enzyme inhibition. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 29: 97-107.

Kühn R., Pattard M., Pernak K.D. & Winter A. 1989.– Results of the harmful effects of water pollutants to *Daphnia magna* in the 21 day reproduction test. Wat. Res., 23 (4): 501-510.

Lampert W. 1986.– Response of the respiratory rate of *Daphnia magna* to changing food conditions. Oecologia, Berlin, 70: 495-501.

Lange C.R. & Lambert K.E. 1994.– Biomonitoring. Water Environ. Res., 66 (4) : 642-651.

Laouedj A. 1994.- La culture cellulaire végétale en écotoxicologie : conception d'un modèle expérimental ; application à la phytotoxicité et la génotoxicité ponctuelle de Xénobiotiques. Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg : 107 p.

Lauth J.R., Dyer S.A., Belanger S.E. & Cherey D.S. 1996.– A novel flow-through method for toxicity assessment using *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Water Quality. Vol. II : 335-343.

Lawrence A.W. & McCarty 1970.- Unified basis for biological treatment design and operation. J. Sanit. Engng. Div. Am. Soc. Civ. Engrs., 96, 5A3, 757 – 777.

Le Blanc G.A. 1979.– Utilization of bacterial colony counters to count early instar water fleas (*Daphnia magna*) . Bull. Environ. Contam. Toxicol., 23: 837-839.

Leckie J.O. & James R.O. 1974.– Control mechanisms for trace metals in natural waters. In A.J. Rubin (Ed.), Aqueous-Environmental Chemistry of metals. Ann. Arbor Science, Ann Arbor, Michigan: 1-3.

Lee G.F. 1975.— Role of hydroxous metal oxides in the transport of heavy metals in the environment. In P.A. Krenkel (Ed.), Heavy metals in the aquatic environment. Pergamon Press. Oxford: 137-147.

Leonahard S.L. S.L. & Lawrence S.G. 1981.— *Daphnia magna* (Strauss), *Daphnia pulex* (Leydig) Richard. In : S.G. Lawrence (Ed.). Manual of the culture of selected freshwater invertebrate. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat.Sci., N°54: 31-50.

Lehtonen J. 1989.— Effects of acidification on the metal levels in macrophytes in Espoo, S. Finland. Ann. Bot. Fenn., 26: 39-50.

Levesque L. 1978.— Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales. Rapport N° 4 : le zinc, le cadmium, A.F.E.E., Eds, Paris.

Levesque L. 1979.— Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales. Rapport N° 6 , chrome, cuivre, nickel, A.F.E.E., Eds, Paris.

Lewandowski Z. 1987.— Behaviour of biological reactors in the presence of toxic compounds. Wat. Res., 21 (2): 147-153.

Lewis S.D. & Lewis W.M. 1971.— The effect of zinc and copper on the osmolality of blood serum of the channel est fish *Ictalurus punctatus rafinesque* and the golden shiner *Notemigonus crysolencas mitchill*. Trans. Am. Fish. Soc., 100: 639-643.

Lewis M.A. & Maki A.W. 1981.— Effect of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna strauss* in laboratory culture. Hydrobiologia, 85: 175-179.

Lichtfild J.F. & Wilcoxon F. 1949.— A simplified method of evaluating dose effect experiment. J. Pharmac. Exp. Ther., 96: 99-113.

Liebmann H. 1962.— Handbuch der frischwasser und abwasser biologie. I. II, München, 588: 1149 p.

Livens F.R. 1991.— Chemical reactions of metals with humic material. Environ. Pollut., 70 : 183-208.

Lock R.A.C. 1979.– Effect of mercuric chloride and methylmercuric chloride on mucus production and osmoregulatory function on the gills in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. P.H.D. Thesis Unver. of Nijmegen, the Netherlands, Stichting Studententempers, Nijmegen: 88 p.

Lotka A.J. 1913.– A naturel population. Norm. J. Wash. Acad. Sci., 3: 241-248; 289-293.

Lundahl P. 1973.– Etude de la toxicité des effluents au moyen d'un test « daphnie ». Bull. de l'Association Pharmaceutique Française pour l'Hydrologie, 12 : 9-15.

Lydersen E. 1990.– The solubility and hydrolysis of aqueous aluminium hydroxides in dilute fresh waters and different temperatures. Nordic. Hydrol., 21: 195-204.

Maki A.W. & Brishop W.E. 1979.– Studies on the acute toxicity of surfactants to *Daphnia magna* trauss and *Daphnia pulex*. Archs. Environ. Contam. Toxicol., 8: 599-612.

Mantel L.H. & Framer L.L. 1983.– Osmotic and ionic regulation. In : Bliss D.E., Mantel L.H., (eds), the biology of crustacea, Vol.5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, New York: 53-161.

Mantoura R.F.C., Dikson A. & Riley J.P. 1978.– The complexations of metals with humic materials in natural waters. Est. Coast. Mar. Sci., 6 : 387-405.

Market B. & Weckert V. 1989.– Use of *Polytrichum formosum* (moss) as a passive biomonitor for heavy metal pollution (cadmium, copper, lead and zinc). Sci. Total Environ., 89 (86) : 289-294.

Marquis J.K. & Boston Mass 1989.– A guide to general toxicology, 2nd edition, chapitre 11, Karger, Paris: 223 p.

Martoja M. & Martoja R. 1984.– La bioaccumulation des métaux, processus physiologique naturel normal et conséquences de la pollution. Courrier du CNRS, n° 54 : 32-37.

Matthiesen P. & Brafield A.E. 1973.– The effect of dissolved zinc on the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L). J. Fish. Biol., 5: 607-613.

Matthiesen P. & Brafield A.E. 1977.– Uptake and loss of dissolved zinc by the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L). J. Fish. Biol., 10: 399-410.

Mattice J.S., Burch M.B., Tsai C.S. & Roy W.K. 1981.– A toxicity testing system for exposing small invertebrates and fish to short square-wave concentrations of chlorine. Water Res., 15: 923-927.

Mc Carty L.S. & Houston A.H. 1976.– Effects of exposure to sublethal levels of cadmium upon water-electrolyte status in the gold fish (*Carassius auratus*). J. Fish. Biol., 9: 11-13.

Mc Elroy A.D., Chiu S.Y., Nebgen J.W., Aleti A. & Vandegrift E. 1975.– Water pollution from non-point source. Water Res., 9: 675-679.

Mc Kim J.M. & Benoit D.A. 1974.– Duration of toxicity tests establishing « No effect » concentration for copper with brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Can., 33: 2726-2739.

Meador J.P. 1991.– The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. Aquat. Toxicol., 19: 13-32.

Meador J.P., Taub F.B. & Sibley T.H. 1993.– Copper dynamics and the mechanism of ecosystem level recovery in standardized aquatic microcosm. Ecol. Appl., 3, 1: 139-155.

Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 45: 461-482.

Michels E., Leynen M., Cousyn C., De Meester L. & Ollevier F. 1998.– Phototactic behaviour of *Daphnia magna* as a tool in the continuous monitoring of water quality : experiments with a positively phototactic *Daphnia magna* clone. Wat. Res. Vol. 00: 1-8.

Michels E., Semsari S., Bin C. & De Meester L. 2000.–Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 47: 261-265.

Milan B., Sabrija B. & Subakov G. 1995.– Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* : comparative investigation and the practical application. Wat. Res. Vol. 29 (2): 497-503.

Morgan J.J. 1970.– Aquatic Chemistry on introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. Wiley Interscience, New York, 295-297.

Mouvet C. 1986.– Métaux lourds et mousses aquatiques: synthèse méthodologique. Rapport de contrat Lab. Ecol. Univ. Metz/Agence de l'eau Rhin-Meuse/Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse : 1-104.

Muller J.A., Anderson A.R. & Jeris J.S. 1976.– Contaminants entering the New York bight : sources, man loads, signifiante. Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp. 2: 162-173.

Muller H. G. 1980.– Acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia magna* as function of the quality. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25 : 113-117.

Muller S. 1995.– Les bioindicateurs végétaux de pollution. ANPP Colloque International Marqueurs Biologiques de Pollution, Chinon 21-22 septembre 1995, Actes du colloque : 227-239.

Münzinger A. 1990.– Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposare and alteration in the toxicity to generations pre-exposed in nickel. Water . Res., 24: 845-852.

Münzinger A. 1991.– A comparaison of sensitivity of three *Daphnia magna* populations under heavy metal stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 22: 24-31.

Münzinger A. & Monicelli F. 1992.– Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 23: 203-216.

Myrand B. & De La Noue 1982.– Croissance individuelle et dynamique de population de *Daphnia magna* en culture dans les eaux usées traitées. Hydrobiologia, 97: 1967-177.

National Academy of Sciences 1975.– Principles for evaluating chemicals in the environment. Natl. Acad. Press. Washington, DC (USA):100 p.

National Academy of Sciences 1978.– Testing for effects of chemicals on ecosystems.. Natl. Acad. Press. Washington, DC (USA): 103 p.

National Research Council 1987.– Committee on biological markers. Environ. Health. Perspect. 74: 3-9.

Nebeker A.V., Savonen C. & Stevens D.G. 1985.– Sensitivity of rainbow trout early life stages to nickel chloride. Environ. Toxic. Chem., 4: 233-239.

Neubecker T.A. & Allen H.E. 1983.– The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. Water Res., 17: 1-14.

Nieboer E. & Richardson D.H.S. 1980.– The replacement of the nondescript term «heavy metals» by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. Ser. B1 : 3-26.

Nissenbaum A. & Swaine D.J. 1976.– Organic matter-metal interactions in recent sediments : the role of humic substances. Geochim. Cosmochim. Acta 40: 809-813.

OCDE, 1984.– OCDE guidelines for testing of chemicals. N°. 202. *Daphnia sp.* Acute immobilisation test and reproduction test.

Olson K.R., Bergmann H.L. & Fromm P.O. 1973.– Uptake of methyl mercuric chloride and mercuric chloride by trout : a study of uptake pathways into the whole animal and uptake by erythrocytes in vitro. J. Fish. Res. Board Can. 30 : 1293-1299.

O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé) 1979.– Critères d'hygiène de l'environnement 6, principes et méthodes d'évaluation de la toxicité des produits chimiques, partie I, Genève.

Orebamjo T.O. & Stewart G.R. 1975.– Ammonium inactivation of nitrate reductase in *Lemna minor*. Planta (Berl.), 122: 37-440.

O'shea T.A. & Mancy K.H. 1978.– The effect of pH and hardness metal ions on the competitive interaction between trace metal ions and inorganic and organic complexing agents found in natural waters. Water Res., 12: 703-711.

Ouddane B., Fischer J.C. & Wartel M. 1992. Statistical evaluation of the distribution of trace metals Cd, Pb, Cu, Zn and Mn in the Seine river and estuary. Oceanol. Acta, 15 (4): 347-354.

Pagenkopf G.K., Russo R.C. & Thurston R.V. 1974.– Effect of complexation on toxicity of copper to fishs. J. Fish Res. Board Can., 31: 462-465.

Pagenkopf G.K. 1976.– Metal ion speciation and toxicity in aquatic system, in Stiegel, 1986, Metal ions in biological systems-volume 20 : Concepts on metal ion toxicity, Marcel Dekker, New York: 386 p.

Patrick R. 1949.– A proposed biological measure of stream conditions based on a survey of the Conestoga basin, Lancaster County, Pennsylvania. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, 101: 277-341.

Perrodin Y. 1988.– Proposition méthodologique pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents aqueux. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon : 176 p.

Persoon G., Van De Vel A., Van Steertegem M. & De Nayer B. 1989.– Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates influence of experimental conditions. Aquatic Toxicol., 14: 149-166.

Peters R.H., Bernardi R. 1987.– Metabolism in *Daphnia*. Eds. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 45: 495 p.

Pettine M., Camusso M., Martinotti W., Marchetti R., Passino R. & Queirazza G. 1994.– Soluble and particulate metals in the Po river : factors affecting concentrations and partitioning. Sci. Total Environ., 145 : 243-265.

Phillips D.J.H. 1977.– The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments-a review . Environ. Pollut., 13 : 281-314.

Phillips D.J.H. & Rainbow P.S. 1993.– Biomonitoring of aquatic contaminants. Elsevier, London: 371 p.

Pickering Q.H. 1974.– Chronic toxicity of nickel to the fathead minnow. J. Wat. Pollut. Control Fed., 46 : 760-765.

Pillai T.N.V., Desai M.V.M., Mathew E., Ganapathy S. & Ganguly A.K. 1971.– Organic materials in the marine environment and the associated metallic elements. *Curv. Sci.*, 40: 75-81.

Poldoski J.E. 1979.– Cadmium bioaccumulation assays. Their relation ship to various ionic equilibria in lake superior. *Water Environ. Sci. Technol.*, 13 : 701-706.

Pommery J., Imbenotte M. & Erb F. 1983.–Test daphnie moyen terme, évaluation de la toxicité de quelques métaux traces en présence d'acides humiques. *Toxicological European Research*, 6: 257-264.

Pommery J., Imbenotte M. & Erb F. 1984.– Incidence de la complexation sur la toxicité du cadmium et du cuivre vis à vis de *Daphnia magna*. *Environmental Technology Letters*, Vol. 5 : 109-120.

Pommery J., Imbenotte M. & Erb F. 1985.– Relation entre toxicité et formes libres de quelques métaux traces. *Environ. Pollut.*, B, 9 : 127-136.

Porter K.G., Orcutt Jr.J.D.& Gerriste N. 1983.– Functional response and fitness in generalist filter feeder, *Daphnia magna* (Cladocera : crustacea). *Ecology*, 64 (4): 735-742.

Projet de norme AFNOR NFT 90-337 1997.– Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de croissance de *Lemna minor* par une substance ou un effluent : 11 p.

Prosi F. 1979.– Heavy metals in aquatic organisms. In U. forstner and G.T.W. Wittman (Eds.) metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin: 271-323.

Proulx D., Lesel R. & De La Noüe J. 1984.– Growth of *Daphnia magna* in ascenic, monoxenic and holoxenic conditions. *Revue Française des Sciences de l'eau*, 3 : 83-91.

Puls R.W., Powell R.M., Clark D. & Eldred C.J. 1991.– Effects of pH, solide solution ratio, ionic strength and organic acids on Pb and Cd sorption on kaolinite. *Water and Soil pollut.*, 57 (8): 423-430.

Ramade F. 1977. *Ecotoxicologie*. Ed. Masson, Paris : 228 p.

Ramade F. 1992.– *Précis d'écotoxicologie*. Ed. Masson, Paris : 300 p.

- Rand G.M. & Perocelli S.R. 1984.– Fundamentals of aquatic toxicology : methods and applications. (Ed.) Hemisphere Publishing Corporation, Washington: 666 p.
- Rashid M.A. 1971.– Role of humic acids of marine origin and their different molecular weight fractions in complexing di and tri-valent metals. Soil Sci., 111 : 298-305.
- Rashid M.A. 1973.– Modifications in the solubility and precipitation behavior metals as a result of their interaction with sedimentary humic acid. Chem. Geolo., 11: 89-98.
- Ravera O. 1984.– Cadmium in freshwater ecosystems. Experientia, 40: 2-14.
- Ribeye F. & Boudou A. 1994.– Experimental study of inorganic and methylmercury bioaccumulation by four species of freshwater rooted macrophytes from water and sediment contamination sources. Ecotoxicol. Environ. Saf., 28 : 270-286.
- Ringelberg J. 1995.– An Account of preliminary mechanistic model swimming behaviour in *Daphnia* : its use in understanding diel vertical migration. Hydrobiologia, 307: 161-165.
- Rodier J. 1984.– L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. 7^{ième} édition Dunod, Paris : 1365 p.
- Sangalang G.B. & Freeman H.C. 1979.– Tissue uptake of cadmium in brook trout during chronic sublethal exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 8: 77-84.
- Schwartz S.S. 1984.– Life history strategies in *Daphnia* : a review and predictions. Oikos., 42: 114-122.
- Sellers C.M., Heath A.G. & Bass M.L. 1975.– The effect of sublethal concentration of copper and zinc on ventilatory activity, blood oxygen and pH in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Water Res., 9: 401-408.
- Semsari S. 1992.– Impact écotoxicologique du chrome trivalent et des sulfures présents dans les effluents de tanneries : Application à l'unité de tannerie-mégisserie de Rouiba (Alger). Thèse de magister université des Sciences et de la Technologie Houari Boumédiène, Alger : 156 p.

Semsari S. & Gäid A. 1994.– Inhibition de l'activité des boues activées en présence du chrome III. *Environmental Technology*, Vo. 15 255-262.

Semsari S. & Aït Amar H. 2001.–Effet de la salinité et de la dureté de l'eau sur la toxicité des métaux vis à vis de *Daphnia magna strauss*. *Ann. Limnol.*, 37 (2): 75-83.

Sholkovitz E.R. 1976.– Flocculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 40: 831-838.

Sholtz S., Seaman M.T. & Pieterse A.J.H. 1988.– Effects of turbidity on life history parameters of two specis of *Daphnia*. *Feshwater Biology.*, 20: 177-184.

Shwa G.R. & Connell D.W. 1983.– Factors influencing concentrations of polychlorinated biphenyls in organisms from an estuarine ecosystem. *Aust. J. Mar. Freswater Res.*, 33: 1057-1060.

Skidmore J.F. 1970.– Respiration and osmoregulation in rainbow trout withgills damaged by zinc sulfate. *J. Exp. Biolo.*, 52: 481-491.

Solbe J.F. & Cooper V.A. 1976.– Studies on the toxicity of copper suffate to stone loach *Neomacheilus barbatulus (L.)* in hard water. *Water Res.*, 10: 523-527.

Spencer D.F. & Greene R.W. 1981.– Effects of nickel on seven specis of freshwater algae. *Envir. Pollut. Ser., A* 25 : 241-247.

Spry D.J. & Wiener J.G. 1991.– Metal bioavailability and toxicity to fisch in low-alklinity lakes : a critical review. *Environ. Pollut.*, 71 : 243-304.

Stackhouse R.A. & Benson W.H. 1988.– The influence of humic acid on the toxicity and bioavailability of selected trace metals. *Aquatic Toxicology*, 13: 99-108.

Stadler M. & Schindler P.W. 1993.– Modeling of H^+ and Cu^{2+} adsorption on calcium montmorillonite. *Clays Clay Miner.*, 41 (3): 288-296.

Steinnees E., Hanssen J.E., Rambaek J.P. & Vogt N.B. 1994.– Atmospheric deposition of trace elements in Norway : temporal and spatial trends by moss analysis. *Water Air and Soil Pollut.*, 74: 121-140.

Stephenson R.R. & Watts S.A. 1984.– Chronic toxicity tests with *Daphnia magna* : the effects of different food and temperature regimes on survival, reproduction and growth. Environmental Pollution, serie A, 36 : 95-107.

Stiegel P.& Klee O. 1974.– Plus d'eau potable pour demain, Robert Laffont, Paris.

Stiff M.J. 1971.– Copper/Bicarbonate equilibria similar to those found in natural waters. Water Res., 5: 171-176.

Stirling D.G., Mc Queen D.J. & Johannes M.R.S. 1990.– Vertical migration in *Daphnia galeata mendotae* (Brooks) : Demo-graphic responses to changes in planktivore abundance, in: Can. J. Fish. Aquat. Sci, 47: 395-400.

Stumm W. & Morgan J.J. 1970.– Aquatic Chemistry, on introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. Wiley Interscience, New York: 295-297.

Stumm W. & Belinski H. 1972.–Trace metal in natural waters : difficulties in interpretation arising from our ignorance in their speciation. In S.H. Jenkins (Ed.), Advances in water Pollution Research, proceeding of the 6th International Conference, Jerusalem. Pergamon press, New York: 39-52.

Suarez D. & Langmür D. 1976.– Heavy metal relationships in a pennsylvania soil. Geochim. Cosmochim. Acta, 40: 583-593.

Sunda W.G., Engel D.W. & Thutotte R.M. 1978.– Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass Shrimp *Palaemonetes pugio* : Importance of free cadmium ion. Environ. Sci. Technol., 12 : 409-413.

Suter G.W., Rosen A.E., Linder E. & Parkhurst D.F. 1987.– Endpoints for responses of fish to chronic toxic exposures. Environmental Toxicology and Chemistry, 6: 733-809.

Taub F.B. & Dollar A.M. 1994. A *Chlorilla-Daphnia* food chain study : the design of a compatible chemically defined culture medium. Limnol. Oceanog.,: 61-74.

Taylor M.C., Reeder S.W. & Demayo A. 1979.– Guidelines for surface water quality. Vol. 1. Inorganic chemical substances chromium. Irland water directorate, water quality Branch, Ottawa, Canada: 9 p.

Tinsley I.J. 1979.– Chemical concepts in pollutant behaviour. John Wiley and Sons, New York.

Trama F.B. & Benoit R.J. 1960.– Toxicity of hexavalent chromium to bluegills. J. Water Pollu. Control Fed., 32: 868-877.

Trémolières M., Eglin I. Roeck U.& Carbiener R. 1993.– The echange process between river and groundwater on the Central Alsace floodplain (Eastern France). I. The case of the canalised river rhine. Hydrobiologia, 254: 133-148.

Trémolières M., Roeck U., Klein J.P. & Carbiener R. 1994.– The exchange process between river and groundwater on the Central Alsace floodplain (Eastern France). I. The case of a river with functional floodplain. Hydrobiologia, 273: 19-36.

Van Daalen J. 1991.– Air quality and deposition of trace element in the province of south holland. Atmospheric Environ., 25 A (3/4): 691-698.

Van Den Berg C.M.G. 1991.– Monitoring of labile copper and zinc in estuarine waters using cathodic stripping chronopotentiometry. Mar. Chem., 34 (3-4): 211-223.

Van Der Putte, Lubbers J. & Kolar Z. 1981.– Effect of pH on uptake, tissue distribution and retention of hexavalent chromium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology. 1: 3-18.

Van Leeuwen C.J., Luttmer W.J. & Griffionen P.S. 1985 a.– The use of cohorts and population in chronic toxicity studies with *Daphnia magna* : a cadmium example. Ecotoxicology and Environmental Safety, 9: 6-39.

Van Leeuwen C.J., Moberts F. & Niebeek G. 1985 c.– Aquatic toxicological aspects of dithiocarbonates and related compounds II. Effect of surviva, reproduction and growth of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 7: 165-175.

Van Leeuwen C.J., Rijkebder M. & Niebeek G. 1986.– Population dynamics of *Daphnia magna* as modified by chronic bromide stress. Hydrobiologia, 133: 277-285.

Vardia H.K., Raop S. & Durve V.S. 1988.– Effects of copper, cadmium and zinc on fish-food organisms, *Daphnia lumholzi* and *Cyprinus subglobosus*. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.), 97: 175-180.

Wang W. 1986.– Toxicity tests of aquatic pollutants by using *Common duckweed*. Envir. Pollut. Ser., B11: 1-4.

Wang W. 1987.– Toxicity of nickel to *Common duckweed* (*Lemna minor*). Environ. Toxic. Chem., 6 : 961-967.

Whitton B.A., Say P.J. & Wehr J.O. 1981.– Use of plants to monitor heavy metals in river. In heavy metals in Northern England : environment and biological aspects (P.J. Say and B.A. Whitton, ed), Univ. Durham Depart. Bot. (England): 135-146.

Whitton B.A. 1991.– Aims of monitoring. In B.A. Whitton, E. Rott and G. Friedrich (Ed.). Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Innsbruck.

Williams S.L., Aulenbach D.B. & Clesceri N.L. 1974.– Sources and distribution of trace metals in aquatic environments. In A.J. Rubin (Ed.), Aqueous-Environmental Chemistry of metals. Ann. Arbor Science, Ann Arbor, Michigan: 77 p.

Winner R.W. 1981.– Evaluation of the relative sensitivities of 7-D *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests for cadmium and sodium pentachlorophenate. Environ. Toxicol. Chem., 7 : 153-159.

Winner R.W. 1981.– A comparison of body length, brood size and longevity as indices of chronic copper and zinc stress in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. Ser. A, 26 : 33-37.

Winner R.W. 1984.– The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. Aquatic Toxicology, 5: 267-274.

Winner R.W. 1985.– Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. Water Res., 19 (4): 449-455.

Winner R.W. & Gauss J.D. 1986.– Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. Aquat. Toxicol., 8: 149-161.

Winner R.W. 1989.– An Evaluation of some myths concerning the culture daphnids. *Aquatic Toxicology*, 14: 323-330.

Winnerand R.W. & Farrel M.P. 1976.– Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33: 1685-1691.

Wittmann G.T.W. 1979.– Toxic metals. In U. Förstenr and G.T.W. Wittmann (Eds), *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer-Verlag, Berlin: 322 p.

Xiu R., Xiu Y. & Gaos S. 1989.– Toxicity of the new pyrethroid insecticide, deltamethrin to *Daphnia magna*. *Hydrobiologia*, 188/189: 411-413.

Zitko P., Cason W.V. & Carson W.G. 1973.– Prediction of incipient lethal levels of copper to juvenile atlantic salmon in the presence of humic acid by cupric electrode. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 10 : 265-271.

Zumwalt D.C., Dwyer F.G., Greer I.E. & Ingersoll C.G. 1994.– A water-renwal system that accurately delivers small volumes of water to exposure chambers. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 : 1311-1314.