

19624

DÉPARTEMENT DE GÉNIE RURAL  
INSTITUT DE GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT  
GÉNIE SANITAIRE - ÉCOTOXICOLOGIE

3<sup>ème</sup> cycle en Sciences de l'Environnement  
Spécialisation Ecotoxicologie



19624 RM

Agence de l'eau  
Suisse



ÉCOLE POLYTECHNIQUE  
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

**EFFETS DE TRICHLOROBRENZÈNES  
EN MILIEU AQUATIQUE**

**TEST CHRONIQUE  
SUR CERIODAPHNIA DUBIA**

Anne **LALIRE** (biologiste)

Isabelle **VALLET** (biologiste)

Collaborateur Scientifique Dominique **ROSSEL**

Professeur Joseph **TARRADELLAS**

Mars 1995

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
OBJECTIFS .....	2
<b>2. MATERIEL ET METHODE</b>	<b>3</b>
2-1 CONDITIONS D'ELEVAGE .....	<b>3</b>
1- Provenance de la souche .....	3
2. Lancement de la culture .....	3
3- Rendement .....	3
4- Nourriture.. .....	<b>3</b>
5. Temperature .....	<b>4</b>
6- Luminosité .....	4
2-2 PROTOCOLE D'ELEVAGE .....	4
1- Matériel .....	4
2. Milieu d'élevage MHW pour les Ceriodaphnia dubia .....	5
3. Préparation des autres suspensions <b>nécessaires à</b> la nutrition .....	<b>5</b>
4. Démarrage d'une culture de Ceriodaphnia dubia .....	6
2 3 PROTOCOLE DES TESTS .....	7
TEST DE TOXICITE AIGUE .....	7
1- Principe .....	7
2. Recommandation .....	<b>7</b>
3. <b>Déroulement</b> du test .....	7
4. Mesure effectuée .....	<b>7</b>
5 - Validité du test .....	8
TEST DE TOXICITE CHRONIQUE .....	<b>8</b>
1- Principe .....	8
2. Choix des concentrations .....	8
3. Recommandations .....	8
4. Déroulement du test .....	8
5. Mesures biologiques effectuées .....	9
6- Conditions de <b>validité</b> de l'essai .....	<b>10</b>
7 - Contrainte des <b>TCBs</b> .....	<b>10</b>
2 4 EXTRACTION ET ANALYSE DES <b>TCBs</b> .....	<b>10</b>
<b>3. RESULTATS</b>	<b>11</b>
3-1 TEST DE TOXICITE AIGUE .....	<b>11</b>
3-2 CONCENTRATIONS EN <b>TCBs</b> .....	<b>11</b>
3 3 TEST DE TOXICITE CHRONIQUE .....	<b>11</b>
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>13</b>
4 1 DISCUSSION DES RESULTATS .....	<b>13</b>
4-2 DIFFICULTES RENCONTREES .....	14
1- <b>Difficultés</b> d'élevage .....	14
2. <b>Difficultés</b> analytiques .....	14
4-3 VERS UNE DETERMINATION DE VALEURS LIMITES POUR L'ENVIRONNEMENT .....	<b>14</b>
<b>5. PERSPECTIVES</b>	<b>18</b>
<b>6 . BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>19</b>

## AVANT-PROPOS

Le **présent** rapport s'inscrit dans le cadre d'une recherche pour le **3<sup>ème</sup>** cycle en Sciences de **l'Environnement** de **l'Ecole Polytechnique Fédérale** de Lausanne. Le travail répond aux **préoccupations** de l'Agence de **l'Eau** Rhin-Meuse appliquant une politique de **prévention** de la pollution de **l'environnement** par les micropolluants organiques.

L'essentiel de la recherche se trouve dans une publication fournie dans un second rapport traitant des effets des trichlorobenzènes (**TCBs**) sur la **microflore** du **sol**.

Ce rapport, exclusivement interne au laboratoire, se limite à **l'évaluation** de la **toxicité** des **TCBs** en milieu aquatique.

## 1. INTRODUCTION

### OBJECTIFS

Le projet a pour but de fournir des **éléments** scientifiques quant à la **toxicité** des **chlorobenzènes**, notamment les **1,2,3** et **1,2,4** trichlorobenzènes contenus dans les boues **d'épuration**. Ces compods organiques proviennent de la fabrication de solvants, de **désodorisants** et **d'intermédiaires** dans la **synthèse** de pesticides. Cette étude cherche à **préciser** leur impact sur la microflore du sol ainsi que dans le milieu aquatique dulcicole.

**Le** domaine terrestre a **été étudié** à l'aide des paramètres suivants : mesure du cycle du carbone (**activité Déshydrogénasique** et **Adénosine TriPhosphasique**), du cycle de l'azote (concentration de nitrate et ammonium) et de cycles fonctionnels (dégradation de la cellulose et de la paille).

Peu de **données** sur la **toxicité** chronique des **TCBs** en milieu aquatique **étant** disponibles, ce rapport tente de combler ces lacunes : la **toxicité** chronique permet une meilleure évaluation d'un effet **écotoxique** qu'un test de **toxicité** aiguë car elle concerne un plus long temps d'exposition à de plus faibles concentrations. Les Cladocbres ***Ceriodaphnia dubia*** ont été choisis pour leur haute sensibilité et le temps **réduit** du test (1 semaine).

Le couplage de ces **expériences** à une recherche bibliographique **informatisée** devrait apporter des **éléments supplémentaires** pour cerner les risques écotoxicologiques de **l'épandage** des boues **d'épuration** contenant des **TCBs** et ainsi **définir** une "No Observed Effect Concentration" (**NOEC**) et une "Predicted No Effect Concentration" (**PNEC**).

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2-1 CONDITIONS D'ELEVAGE

#### 1 - Provenance de la souche

La souche **testée** a **été** fournie par le laboratoire du Professeur **Bitton** (University of Floride, Gainesville). Le protocole **d'élevage** est celui du laboratoire du CEMAGREF de Lyon (**1994**), le milieu d'élevage retenu (**MHW**) étant celui **conseillé** par l'**EPA** (1989).

#### 2 - Lancement de la culture

En conditions optimales, avec une **température à 25°C** et une **intensité** lumineuse de 300-500 lux, les *Ceriodaphnia dubia* se reproduisent par voie **asexuée**. Les mâles apparaissent en cas de surpopulation (plus de 10 mères par litre de milieu) : toute reproduction **sexuée** est à éviter afin de conserver la **stabilité génétique**.

La **présence** de mâles est **contrôlée** tous les deux jours sous la loupe binoculaire : le mâle est plus petit, plus colore et a deux antennes **très développées** (bien visibles de **profil**) au contraire de celles des femelles qui sont atrophiées. Ce contrôle s'effectue au moment du changement de milieu, au cours duquel le nombre d'individus est **vérifié** : les mères trop nombreuses sont **éliminées**, en **commençant** par les plus **agées** (taille maximale).

#### 3 - Rendement

En conditions optimales d'élevage, les organismes vivent en moyenne deux semaines. Les jeunes sont mûres au bout de **72 à 75 heures** et ont ensuite des **portées** de **10 à 15** jeunes par jour.

#### 4 - Nourriture

Ces organismes se nourrissent d'un **mélange** de deux souches d'algues, *Selenastrum capricornutum* et *Chlorella vulgaris* (en proportions **1/2**) fournies par Aquamer (**Mèze**), de levure **boulangère** (5 g/l) et de nourriture pour poissons **TROUVIT 000** (5 g/l).

Un **excès** de nourriture peut entraîner une mobilisation accrue de l'oxygène, une surpopulation (apparition de mâles), puis une diminution rapide de la population.

Le milieu **d'élevage** est le MHW (Moderately Hard Water), composé d'eau **bidistillée** **supplémentée** en

**NaHCO<sub>3</sub>** : 96 mg/l

**CaSO<sub>4</sub>** : 60 mg/l

**MgSO<sub>4</sub>** : 60 mg/l

**KCl** : 4 mg/l

## 5 - Température

La normalisation des tests (EPA) indique qu'il faut une **température** de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  afin d'obtenir une croissance et une reproduction optimale. Cette **température** peut cependant être **inférieure** pour l'élevage de routine (**20-22°C**).

## 6 - Luminosité

La **luminosité** de **300-500 lux** (**néons** Grolux) est **nécessaire** pour le **développement** des algues et la **photopériode** de 18h jour / 6 h nuit est optimale pour le **développement** des *Ceriodaphnia dubia*.

**L'éclairage** de l'élevage des **Cladocères** est **situé à** environ 80 cm au dessus des bocaux qui sont dans un bain-marie de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Chaque semaine, des **mères isolées** permettent le lancement de nouveaux **clônes**.

## 2-2 PROTOCOLE D'ELEVAGE

### 1 - Matériel

**béchers** de 2 l, de **50 ml**

verres de montre

tamis de maillage nylon de **100 µm**

pissette de 500 ml

bouteilles de stockage de 4 l.

pipettes pasteurs au bout **rodé**

pipettes de **3, 5, 10 ml**

erlenmeyers de **500 ml**

bulleurs

air comprime

**tube GROLUX**

boîtes de **pétri**

## 2 - Milieu d'élevage MHW pour les *Ceriodaphnia dubia*

- 2a - solutions stock : conservation six mois au froid (6°C)

1	<b>CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	<b>: 2 g/l</b>
2	<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>: 19.2 g/l</b>
3	<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>: 24.56 g/l</b>
4	<b>KCl</b>	<b>: 8 g/l</b>

- 2b - réalisation du milieu d'élevage

dans 4 litres d'eau **bidistillée**, ajouter 120 ml de la solution 1 et 20 ml des solutions **2, 3, et 4**.

## 3 - Préparation des autres suspensions **nécessaires à** la nutrition

- 3a - algues

Le milieu algue étant toxique pour les Ceriodaphnies, les algues sont **centrifugées** puis resuspendues dans le MHW.

Les algues doivent être **régulièrement comptées** sous le microscope **à** l'aide d'une cuve de **Malassez afin** de fournir aux *Ceriodaphnia dubia* le nombre de cellules algales exact :

60.106 cellules / ml de *Selenastrum c.* (croissant)

120.106 cellules / ml *Chlorella v* (ronde)

- 3b - nourriture pour poissons

**préparation** d'une suspension avec 5 g de nourriture **TROUVIT 000** dans 1 litre de milieu **pour Ceriodaphnia d.** qui est mise sous **aération** pendant 72 h. **La** suspension est ensuite **décantée** puis **filtrée**, le **filtrat** servira de nourriture.

- 3c - levure de boulanger

les marques Ancel ou Briochin sont **utilisées à** raison de 5 g. par litre de milieu pour *Ceriodaphnia d.*, la solution étant **aérée** pendant 20 minutes puis **filtrée** sur un tamis de 30 à 40 **µm**. La solution est **à** utiliser dans les 48 heures, avec une conservation **à 6 °C**.

4 - Démarrage d'une culture de *Ceriodaphnia dubia*

Les **élevages** sont **répartis** dans 4 **béchers** de 2 litres.

Les **différents** nutriments sont mis **à température** ambiante 1 heure avant le renouvellement du milieu.

**Le** milieu contenant les *Ceriodaphnia dubia* est **filtré** et les **Cladocères** sont resuspendues doucement dans une boîte de **pétri** à l'aide d'une pissette contenant du milieu **d'élevage**.

Une dizaine de **mères** et environ autant de jeunes sont **ajoutés** dans un **bécher** de culture contenant 1 l de milieu MHW (**délicatement**, à l'aide d'une pipette pasteur au bout rouge).

La nourriture est mise selon les proportions :

- 60.106 cellules / litre de *Selenastrum capricornutum*
- 120.106 cellules / litre de *Chlorella vulgaris*
- **2,5** ml de suspension de levure
- **2,5** ml de suspension de nourriture pour poissons

**Les bocal**s sont placés à  $25 \pm 1$  °C et sous 300 - 500 lux.

Ces **opérations** sont **répétées** quotidiennement.

Tableau 1: Calendrier sur 3 semaines (**turn over** de l'ensemble des manipulations)

	L	M	M	J	V	L	M	M	J	V	L	M	M	J	V
C milieu à changer et	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E nourriture															
R Climiner mères + 14 jours					+					+					+
1 vérifier absence de mâles	+		+		+	+		+		+	+		+		+
0 levure	+		+		+	+		+		+	+		+		+
d. nourriture pour poissons					+					+					+
d. milieu d'élevage (en litres)	4	4	4	8	0	4	4	4	8	0	4	4	4	8	0



## 2-3 PROTOCOLE DES TESTS

### TEST DE TOXICITE AIGUE

#### 1-Principe

Le test utilise (**OCDE n° 202, 1984**) est un essai d'immobilisation **immédiate**. Il a pour but de **déterminer** la **CE50**, concentration efficace qui provoque l'immobilisation de 50 % des *Ceriodaphnia dubia* en 24 heures. Le choix des concentrations **testées** se fait en deux **étapes** :

- test **préliminaire** donnant une indication de la gamme de concentration à utiliser pour cibler la **CE50**.
- test **définitif** permettant de **déterminer** avec **précision** la **CE50**.

#### 2 - Recommandation

La veille du test, les **mères** mûres sont **isolées** (chacune dans 50 ml de milieu MHW avec de la nourriture).

Les jeunes **âgés** de moins de 24 heures sont retenus pour le test s'ils sont issus de mères ayant pondu plus de 10 jeunes.

#### 3 - Déroulement du test

Pour chaque concentration à tester, 5 *Ceriodaphnia d.* sont **déposées** à l'aide d'une pipette pasteur à bout **rodé** dans les tubes tests (10 ml de milieu MHW, 4 **réplicats**).

Les dilutions sont **effectuées** avec le MHW.

#### 4 - Mesure effectuée

Après 24 heures d'exposition, le nombre de *Ceriodaphnia dubia* **immobilisées** est comptabilisé pour chaque concentration. Les organismes incapables de nager dans les 20 secondes **après** une **légère** agitation du tube sont **considérés** comme immobiles.

La courbe de **toxicité** est établie sur papier probit-logarithmique permettant de **déterminer** la CE50 selon la formule : % d'immobilisation = f (concentration). (annexe 1)

## 5 - Validité du test

- Le nombre de morts des **témoins** ne doit pas être **supérieur à 10 %**.
- La sensibilité de l'**élevage** doit correspondre à une CE50 de 250 à 264 **mg/l** pour le **KCl** (recommandation de l'**EPA**).

## TEST DE TOXICITE CHRONIQUE

### 1 - Principe

Le test cherche à mesurer la **toxicité** chronique d'une substance sur le micro **crustacé** **Cladocère** *Cerioduphnia dubia* pendant 7 jours et en conditions semi-statiques (renouvellement **périodique** du milieu d'essai, de la nourriture et des concentrations **étudiées**).

### 2 - Choix des concentrations

Les concentrations retenues sont **basées** sur des **données** environnementales de stations **d'épuration** : **10, 50** et 500 **µg/l** (Jauzein, 1995).

### 3 - Recommandations

Les Ceriodaphnies doivent être **âgées** de moins de 24 heures. Les **mères isolées** la veille doivent donner au moins 10 jeunes.

Les conditions **d'élevage** et de nourriture sont les mêmes que celles **citées précédemment**.

### 4 - Déroulement du test

#### - Matériel supplémentaire

Bouteilles en pyrex de 100 ml avec bouchons : s'il y a des risques d'adsorption des **composés** testés sur les parois, les bouteilles reçoivent la veille de l'essai une concentration **équivalente** de polluant teste.

- Calendrier

L'essai **commence** le vendredi et prend fin **après** la **4<sup>ème</sup>** port& (**généralement** le jeudi).

- **préparation** des concentrations

Dans une fiole de 500 ml sont ajout& :

- **3/4** du volume en milieu **d'élevage**

- 50 ml de mélange nutritif

- le volume calculé de **polluant**

la fiole est **ajustée à 500** ml avec le milieu **d'élevage** puis **agitée vigoureusement**. Le **mélange** est reparti en fraction de 50 ml dans les bouteilles test

- mise en place

Chaque **bouteille préparée** reçoit **une Ceriodaphnia dubia** de moins de 24 heures (**déposée à** l'aide d'une pipette pasteur **à** bout rude, en prenant un minimum de milieu et en manipulant doucement). Les bouteilles sont **placées à 25°C ± 1**.

- suivi de l'essai

**Quotidiennement**, le milieu est **renouvelé** dans une nouvelle bouteille. **La mère** est remise dans le nouveau milieu avec la même concentration de toxique tandis que les jeunes, **recupérés** par aspiration sur le **filtre 100 µm**, sont comptés sous la **loupe** binoculaire.

Si moins de **60 %** des **témoins** n'a pas eu de **portées** le mardi, le test est abandonné.

- **fin** de l'essai

Le test finit le jeudi. Si les témoins sont aux limites de conditions de **validité** du test, l'essai peut éventuellement être prolongé de 24 heures.

## 5 - Mesures biologiques **effectuées**

Chaque jour, on note le nombre de **mères** vivantes et le nombre de jeunes produits par mère vivante (annexe 2).

## 6 - Conditions de **validité** de l'essai

- le nombre de morts dans le **témoin** ne doit pas **excéder 20 %**.
- au moins **60 %** des **mères témoins** vivantes en **fin** de test doivent avoir produit au minimum trois **portées**.
- le nombre moyen de jeunes produit par les mères **témoins** vivantes doit être au moins Cgal **à 10** en **fin** d'essai.
- la **sensibilité** de l'**élevage** au **KCl répond** aux recommandations de l'**EPA**.

## 7 - Contrainte des **TCBs**

La forte **hydrophobicité** des **TCBs** nécessite une dilution **intermédiaire** dans l'isopropanol avec un seuil maximum de 0.1 mg de solvant par litre de MHW (Nicollerat, 1989).

Un test de **toxicité** aiguë de 24 heures a **été** effectuée pour évaluer la **toxicité** de 0.1 mg/l d'isopropanol .

### 2-4 **EXTRACTION ET ANALYSE DES TCBs**

Les extractions des **TCBs** du milieu **MHW** contaminé ont **été réalisées** afin de **connaître** les concentrations **réelles** lors du dopage (T<sub>0</sub>) et au bout de 24 heures d'exposition (T<sub>24</sub>). Une seule extraction a **été réalisée** pour chaque concentration et cette manipulation a **été répétée** 5 fois pour chaque concentration.

Pour chacune des extractions, un volume de 50 ml (**MHW** et **TCBs**) est versé dans un ballon jauge puis extrait par de 2 ml d'isooctane (**Mallinckrodt** Nanograde). Après 1 minute d'agitation manuelle, l'extrait est dilué dans l'isooctane puis analysé sur **GC/ECD** (**Varian** Atar **3400** Cx, colonne **J&W Scientific** DB-5 \*60m x 0.25mm x 0.25 µm, température initiale 80°C pendant 10 min, **3°C/min** pour atteindre 130°C pendant 0 min, **10°C/min** pour atteindre 200°C pendant 4.34 min, total de l'injection 38 min, 35 Psi, Injecteur SPI, 85°C pendant 0.1 min, **100°C/min** pour atteindre 200 °C pendant 35 min).

Dans ces conditions, le rendement d'extraction est de **63 % ± 4 % (n=3)** pour les concentrations minimales (**1 µg/l**), de **45 % ± 2.5 % (n=3)** pour les concentrations moyennes (**50 µg/l**) et de plus de **100 % (n=3)** pour les concentrations maximales (**500 µg/l**).

### 3. RESULTATS

#### 3-1 TEST DE TOXICITE AIGUE

- La sensibilité de l'élevage au **KCl** donne une CE50 de 270 **mg/l**, concentration acceptable par rapport aux recommandations de l'**EPA**.
- Le test de **toxicité** aiguë pour l'isopropanol à 0.1 **mg/l** ne donne pas d'immobilisation significative.

#### 3-2 CONCENTRATIONS EN TCBs

Les **résultats** de l'extraction au temps **T24** sont **récapitulés** dans le tableau **II** : les pertes croissent avec la concentration

Tableau II : Pertes des **1,2,4** TCB et **1,2,3** TCB après 24 heures d'exposition.  
(valeurs **corrigées** selon le rendement d'extraction)

Concentration TCBs ( $\mu\text{g/l}$ )	Pertes (%) sur 24 heures
1	48
<b>50</b>	<b>51</b>
<b>500</b>	<b>59</b>

#### 3-3 TEST DE TOXICITE CHRONIQUE

Pour chaque concentration, le nombre de jeunes par **mères** vivantes a **été** additionné puis **moyenné**.

Les **résultats** obtenus ont été **vérifiés statistiquement** à l'aide d'un test t comparant la **différence** entre la moyenne du nombre de jeunes du **témoin** et la moyenne de jeunes à chaque concentration.

L'hypothèse de départ suppose que la différence entre la moyenne des **témoins** et celle des concentrations **testées** n'est pas significative, l'hypothèse alternative impliquant le contraire. Le test est significatif à 95 %.

Tableau III : Test de toxicité chronique sur le **1,2,4 TCB** (norme EPA)

Concentration	témoin	1 µg/l	50 µg/l	500 µg/l
moyenne jeunes/mères vivantes n = 10	32	25.89	24.6	
"t" valeur		1.13	2.37	
Reproduction significative (95% confiance) t = 2.12		non	oui	effet létal

Tableau IV : Test de toxicité chronique sur le **1,2,3 TCB** (norme EPA)

Concentration	témoin	1 µg/l	50 µg/l	500 µg/l
moyenne jeunes/mères vivantes n = 10	26.5	26	32.25	17.4
"t" value		0.16	-0.74	5.61
Reproduction significative (95% confiance) t = 2.12		non	non	oui

Un effet significatif est **observé à 50 µg/l** pour le **1,2,4 TCB** et **à 500 µg/l** pour le **1,2,3 TCB**.

## 4. DISCUSSION

Le test chronique **étudie** l'effet d'un polluant sur la reproduction des organismes testés avec des exigences strictes de laboratoire sur le maintien de la culture et les conditions de test. In **situ**, les conditions environnementales sont plus complexes et l'**équilibre de l'écosystème dépend** de nombreuses **espèces** ainsi que des conditions biotiques et abiotiques. Le test de **toxicité** chronique est plus **représentatif** qu'un test de **toxicité** aiguë car il Cvalue un effet à plus long terme et à une moindre concentration.

Le **désavantage** de l'utilisation de *Ceriodaphnia dubia* est celui de son faible **réalisme** écologique de part sa faible distribution en eau douce. L'avantage de ce test est sa haute **sensibilité** et sa **rapidité** (7 jours) par rapport à la durée de 21 jours pour le test de toxicité chronique sur *Daphnia magna*.

### 4-1 DISCUSSION DES RESULTATS

Le **1,2,4** TCB semble **être** plus toxique que l'isomère **1,2,3** sur *Ceriodaphnia dubia*.

Les **résultats** des extractions **réalisées à To dépendent** du rendement estimé à **80 %** pour une seule extraction. Le taux de **récupération** serait **supérieur** avec une double extraction. On peut ainsi supposer que les concentrations **mesurées à To** majorées par rapport au rendement de l'extraction reflètent la **réelle** concentration d'exposition.

La forte diminution des concentrations **observée** au cours de 24 heures d'essai est en relation directe avec la haute **volatilité** des **TCBs** facilitée par la **température** de **25 °C** (condition du test chronique).

Différentes **études** ont **évalué** les effets d'autres **mélanges** d'algues sur les **résultats** de test de **toxicité** chronique avec *Ceriodaphnia dubia*. Un apport unique de *Selenastrum capricornatum* entraîne à long terme une augmentation de la **sensibilité** de la population aux **métaux** lourds (Cerde, 1992). Par contre, le **mélange** *Selenastrum c.*, levure, nourriture pour poissons et **céréale** permet une culture correcte des **Cérioraphnies** (Patterson, 1992). Pour notre Clevage, un apport unique de *Chlorella v.* (levure et poisson) entraînait une diminution de la reproduction. Inversement, l'apport unique de *Selenastrum c.* (levure et poisson) permettait un maintien optimum de la culture.

## 4-2 DIFFICULTES RENCONTREES

### 1 - Difficultés d'élevage

L'obtention d'un **élevage** fiable en routine a été long (environ 4 mois).

Pour obtenir un **élevage** sans brusque chute de population, avec un taux de reproduction suffisant, il faut **être** vigilant sur plusieurs **paramètres** :

- luminosité, **photopériode** (changer le **néon** tous les 6 mois maximum)
- **nourriture** (importance de la **température à 6 °C** limitant le **développement** bactérien)
- **température** (thermoplongeur se **détériorer** très vite)
- pas de surpopulation, pas d'organismes de plus de 14 jours
- pas de stress (pas de chute de plus de 2 cm au moment du **filtrage** ; pas de **détergents** ni de solvants ou de parfums dans le local . . .)
- toujours rincer la vaisselle avec le milieu **d'élevage** avant le contact avec les ***Ceriodaphnia dubia***.

Les deux semaines suivant un stress, les jeunes n'auront pas les conditions requises pour être soumis à un test : taux de reproduction restreint, **résistance** moindre.

### 2 - Difficultés analytiques

La pression de vapeur des **TCBs**, 17.3 Pa (à 25°C) pour **1,2,3 TCB** et 45.3 Pa (à 25°C) pour **1,2,4 TCB (IPCS)**, implique des contraintes d'analyse difficiles à maîtriser vis à vis de la **volatilisation**.

Le stockage des solutions à -20°C limite les pertes en **TCBs** dans les solutions standards qui doivent être **renouvelées** toutes les 3 semaines.

## 4-3 VERS UNE DETERMINATION DE VALEURS LIMITES POUR L'ENVIRONNEMENT

Les **données** d'inhibition de la reproduction **nécessaires à la détermination** d'une "No Observed Effect Concentration" (**NOEC**) et d'une "Lowest Observed Effect Concentration" (**LOEC**) sont les suivantes :

**1,2,4 TCB** : NOEC = 1 µg/l

LOEC = 50 µg/l

**1,2,3 TCB** : NOEC = 50 µg/l

LOEC = 500 µg/l



Les *Ceriodaphnia d.* sont plus sensibles aux **TCBs** par rapport aux *Daphnia magna* dont la NOEC est de 630  $\mu\text{g/l}$  pour le **1,2,3 TCB** et de 400  $\mu\text{g/l}$  pour le **1,2,4 TCBs (IPCS)**.

**Les** calculs de “Predicted No **Effect** Concentration” (**PNEC**) doivent être **réalisés** avec plusieurs données **écotoxiques afin** d’obtenir une **évaluation** fiable en tenant compte de facteurs **d’**extrapolation (**et/ou de sécurité**).

Dans le cas d’un test de toxicité chronique sur une seule **espèce**, un facteur de **sécurité** de 10 (CSTE, 1987 et EEC, 1993) doit être **appliqué** aux NOEC **évaluées**.

Les **PNEC calculées** sont : **1,2,4 TCB**:  $\text{PNEC} = 0.1 \mu\text{g/l}$   
**1,2,3 TCB** :  $\text{PNEC} = 5 \mu\text{g/l}$

**L’établissement** des **PNECs** pour les **TCBs** dans le secteur “eaux souterraines” n’a pas **été établi** : l’entraînement gravitaire des **TCBs** en profondeur est exclu car les **TCBs** se lient fortement aux particules **minérales** ou organiques du sol, ou se volatilisent. Bien qu’un risque **théorique** de contamination des eaux souterraines par des cheminements **préférentiels** ne puisse être totalement **écarté**, le secteur “eaux souterraines” n’implique pas de mesures **particulières**.

**Les** valeurs limites dans les boues **d’épuration** ont **été déterminées** grâce aux **PNECs**, **établies** pour le secteur “milieux aquatiques”, **corrigées** par deux facteurs de dilution **cumulés** : **1/250 (sol/eau)** et **1/1000 (boue/sol)** ; ces facteurs se **réfèrent** au règlement **européen 1488/94 (EEC, 1994b)** et aux conditions **d’épandage définies** par la norme française **NFU 44-041 (AFNOR, 1985)**. Ces estimations sont effectuées dans le cas suppose du “worst case” :

- pas de volatilisation des **TCBs**
- pas de **dégradation**
- pas d’infiltration ni de ruissellement
- pas **d’adsorption (biodisponibilité totale)**
- **présence** d’organismes sensibles.

Les **résultats** bases sur cette situation de “worst case” sont indiqués dans le tableau V

Tableau V : Valeurs limites dans les boues d'épuration **proposées** pour le secteur “milieux aquatiques”

	<b>PNEC</b> ( $\mu\text{g TCB/l}$ eau douce)	Valeurs limites ( $\text{mg TCB/kg}$ boues)
<b>1,2,4 TCB</b>	0.1	25
<b>1,2,3 TCB</b>	5	1250

La valeur retenue est plus stricte pour l'isomère **1,2,4 TCB** (polluant prioritaire pour l'EPA), ce qui correspond aux **préoccupations** environnementales actuelles.

Les niveaux de contamination des boues d'épuration en France dorment une moyenne de 0.089 **mg/kg** MS de boue pour le **1,2,3 TCB** et 0.23 **mg/kg** MS de boue pour le **1,2,4 TCB**. Ces valeurs sont nettement **inférieures** aux valeurs limites **proposées** dans le tableau V : les **quantités** actuelles moyennes de **TCBs** dans les boues **d'épuration** ne constituent pas un danger potentiel pour les milieux aquatiques.

Cependant, les valeurs **calculées** ne tiennent compte que de 3 tests chroniques **réalisés** en laboratoire sur *Ceriodaphnia dubia*.

Des **données** bibliographiques permettent de **compléter** ces calculs. L'**établissement** des **PNECs** est **basée** sur des tests de toxicité aiguë avec d'autres organismes d'eau douce, faute de **données** en **toxicité** chronique : la CE50 (96 heures) pour *Selenastrum capricomatum* est égale à 0.9 **mg/l** pour **1,2,3 TCB** et 1.4 **mg/l** pour **1,2,4 TCB** (Calamar-i et al., 1983). Les **LC50** pour *Salmo gairdneri* sont **estimées** à 0.71 **mg/l** et 1.95 **mg/l** respectivement pour le **1,2,3 TCB** et le **1,2,4 TCB** (Calamari et al., 1983).

Après l'application de facteurs de **sécurité** (/1000, CSTE, 1987 et EEC, 1993) et de facteurs de dilutions **sol/eau** et **boue/sol** cites **précédemment**, les valeurs limites dans les boues **d'épuration** obtenues sont : *Selenastrum* c. : **1,2,3 TCB** : 225 **mg/kg** MS boue

**1,2,4 TCB** : 350 **mg/kg** MS boue

*Salmo g.* **1,2,3 TCB** : 178 **mg/kg** MS boue

**1,2,4 TCB** : 488 **mg/kg** MS boue

Ces valeurs limites dans les boues **d'épuration calculées à** partir de la **littérature** sont comprises entre **celles proposées à** partir des tests de toxicité chronique *sur Ceriodaphnia dubia réalisés dans ce travail.*

La comparaison des **différentes PNECs** montre que *Ceriodaphnia d.* serait l'organisme le plus sensible **à l'isomère 1,2,4** TCB tandis que *Salmo g.* serait **celui** au **1,2,3** TCB.

**Malgré** les **données** de la littérature ainsi que celles du **présent** travail, des tests supplémentaires doivent être entrepris, notamment des tests de **toxicité** chronique, afin de **compléter** le manque de **données** existantes.

## 5. PERSPECTIVES

Les **données** actuelles de **toxicité** aiguë ne nous paraissent pas assez **représentatives** des **conditions** environnementales (temps court d'exposition, forte concentration ponctuelle, pas de nourriture) pour qu'une recherche sur les **TCBs** soit établie dans ce sens. Le test de **toxicité** chronique avec *Ceriodaphnia dubia* sur les **TCBs** est à confirmer car cet organisme est nettement plus sensible que *Daphnia magna*. Compte tenu de cette haute **sensibilité**, ce test paraît plus **intéressant malgré** son faible **réalisme écologique**.

La poursuite de ces tests au laboratoire sera **facilitée** par une armoire thermostatée ainsi qu'un autoclave et une hotte **stérile** si une **culture** d'algues est mise en place.

**La reproductibilité** des tests implique une **très** bonne maîtrise des conditions d'élevage, une grande attention et de la patience : il est vrai que de nombreux laboratoires ont abandonné les **élevages** de *Ceriodaphnia dubia*, mais ceux qui ont su prendre le temps de les adopter obtiennent de **très** bons **résultats**.

Le manque de **données** suffisantes pour établir l'**écotoxicité** des **TCBs** en milieu aquatique ne permet qu'une approche de la **détermination** des **PNECs** et des valeurs limites dans les boues **d'épuration** : afin de **déterminer** plus exactement ces valeurs, il serait **intéressant** de confirmer les **résultats** de la **présente** recherche et **d'élargir** la base de données en **toxicité** chronique (par exemple avec le test de **toxicité** chronique de **48 heures** avec *Brachionus calyciflorus*).

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON S.L. et **NORBERG-KING** T.J., 1991. **Precision** of short-term chronic toxicity tests in the real world, 10 : 143-145.
- ARBUCKLE W.B. et ALLEMAN J.E., 1992. Effluent Toxicity **Testing** using Nitrifiers and **Microtox™**. Water **Environment** Research, 64 : 263-267.
- BAILER J.A. et **ORIS** J.T., 1993. Modeling reproductive toxicity in Ceriodaphnia dubia tests. Environmental Toxicology and Chemistry, 12 : 787-791.
- BARBOUR M.T., GRAVES C.G. et MCCULLOCH W.L., 1989. Evaluation of the Intrinsic Rate of Increase as an Endpoint for Ceriodaphnia Chronic Tests. Aquatic Toxicology and Environmental Fate, 11: 273-288.
- CALAMARI** D., **GALASSI** S. et **VIGHI** M., 1983. Toxicity of selected chlorobenzenes to aquatic organisms. Chemosphere, 12 (2) : 253-262.
- CERDA B. et OLIVE J. H., 1993. **Effects** of diet on seven-day Ceriodaphnia dubia Toxicity Tests. OHIO J: **SCI.**, 3 : 4447.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES DIRECTORATE- GENERAL ENVIRONMENT, NUCLEAR SAFETY AND CIVIL PROTECTION**, 1992. Updating of data concerning the impact on the aquatic environment of **certain** dangerous substances, 2nd part : chlorinated **benzenes**.
- COONEY J.D., DEGRAEVE G.M., MOORE E.L., **LENOBLE** B.J., POLLOCK T.L. et SMITH G.J., 1992. Effects of environmental and **experimental desing** factors on **culturing** and toxicity testing of Ceriodaphnia dubia Environmental Toxicology and Chemistry, 11 : 839-850.
- COWGILL U.M. et **MILAZZO** D.P., 1989. New approach to the seven-day Ceriodaphnia dubia test with additional **comments** pertaining to the **same** test for Daphnia magna. Environmental Contamination and Toxicity, 42 : 749-753.
- CUI Y., 1993. **Détermination** de valeurs limites pour des micropolluants organiques dans les boues d'épuration. Rapport cours Postgrade de l'**Ecole Polytechnique Fédérale** de Lausanne.
- DAENS I.S., **DAVIDSON** C.M. et **LITTLEJOHN** D., 1993. Factors affecting solid-phase extraction of semi-volatile organic **pollutants from** acidic **industrial** effluent for analysis by gas chromatography. **Analyst**, 118 : 1375-1382.
- DEGRAEVE **G.M.**, COONEY J.D., MARSH B.H., POLLGCK T.L. et REICHENBACH N.G., 1992. Variability in the performance of the 7-d Ceriodaphnia dubia survival and reproduction test : an intra and interlaboratory study. Environmental Toxicology and Chemistry, 11 : 851-866.

- EAGLESON K.W., LENAT D.L. et AUSLEY L.W., 1990. Comparison of measured **instream** biological responses with responses predicted using the **Ceriodaphnia dubia** chronic toxicity test. *Environmental Contamination and Toxicity*, 9 : 1019-1028.
- E.P.A.**, Short-term methods for estimating chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.
- FATHEPURE **B.Z.**, TIEDJE J.M. et BOYD **S.A.**, 1988. Reductive dechlorination of **hexachlorobenzene** to tri- and **di-chlorobenzenes** in anaerobic sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 : 327-330.
- FERNANDEZCASALDERREY A, FERRANDO M.D. et ANDREU MOLINER E., 1994. **Effect** of sublethal concentrations of pesticides on feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 27 : 82-89.
- 4TH INTERNATIONAL WORKSHOP IN **BASLE** (CH), 1988. **Recommended** laboratory tests for assessing **side-effects** of pesticides on soil microflora.
- FORST C., SIMON H. et **STIEGLITZ L.**, 1993. **Determination** of chlorophenols and chlorobenzenes in leachate by headspace analysis. *Chemosphere*, 26 (7) : 1355- 1364.
- IGE EPFL et ACTE, 1995. **détermination** de Valeurs Limites pour 7 **congénères** de PCB dans les boues **d'épuration**. Rapport cours Postgrade de **l'Ecole Polytechnique Fédérale** de Lausanne.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, EHC 128. **Chlorobenzenes** other than **Hexachlorobenzenes**. **World Health Organization**.
- JANDA V., BARTLE K.D. et CLIFFORD AA, 1993. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography*, 642 : 283-299.
- KELLER AE., **DUTTON R.J.**, **BITTON G.** et **CRISMAN T.L.**, 1988. Chronic toxicity of hydrothol-191 to *Ceriodaphnia dubia* at 25 and **15°C**. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 233-240.
- KNIGHT J.T.** et **WALLER W.T.**, 1987. Incorporating *Daphnia magna* into **the** seven-day **Ceriodaphnia** Effluent Toxicity Test Method. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6 : 635-645.
- KNIGHT J.T.** et **WALLER W.T.**, 1992. Influence of the addition of Cerophyl \*on the *Selenastrum capricornutum* diet of **the** Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 521-534.
- KSZOS AL. et STEWART AJ., 1991. Effort Allocation Analysis of the seven-day **Fathead Minnow** (*Pimephales promelas*) and *Ceriodaphnia dubia* Toxicity Tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 : 67-72.
- McNAUGHT D.C.** et **MOUNT D.I.**, 1984. Appropriate durations and measures for *Ceriodaphnia* toxicity tests. **U.S. Environmental Protection Agency** .
- MASTERS J.A.**, **LEWIS M.A** et **DAVIDSON D.H.**, 1991. Validation of fourday *Ceriodaphnia* toxicity test and statistical **considerations** in data analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 : 47-55.

- NISHINO S.F., SPAIN J.C. et **PETTIGREW** C.A., 1994. Biodegradation of Chlorobenzene by indigenous Bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (6) : 871 -877.
- NORBERG-KING T.J. et SCHMIDT S., 1993. Comparison of effluent toxicity **results** using *Ceriodaphnia dubia* **cultured** on several **diets**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12 : 1945-1955.
- OJALA **M.I.**, 1993. **Simultaneous** separation and determination of chlorobenzenes, **PCBs** and chlorophenols using **silica** gel fractionation and GC-ECD analysis. *Journal of high Resolution Chromatography*, 16 : 679-682.
- ORIS J.T., WINNER R.W. et MOORE M.V., 1991. A four day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicity and Chemistry*, 10 : 217-224.
- PAGE D. et LACROIX G., 1993. Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods. *Journal of Chromatography*, 648 : 199-211.
- PATTERSON P.W., DICKSON K.L., WALLER W.T. et RODGERS **J.H.**, Jr., 1992. The **effects** of **nine** diet and **water** combinations on preculture health of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 1023-1035.
- PAWLISZ AV. et PETERS RH., 1993. A test of the equipotency of **burdens** of **nine** narcotic chemicals using *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 27 : 2801-2806.
- PAWLISZ AV. et PETERS RTH., 1993. A radioactive tracer technique for study of lethal body **burdens** of narcotic organic **chemicals** in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 27 : 2795-2800.
- ROSSEL D., 1992. Utilisation de l'**activité déshydrogénasique** de la microflore du sol dans les tests **écotoxicologiques**. **Thèse** no 1059 de l'**Ecole Polytechnique Fédérale de lausanne**.
- SANDER P., **WITTIG** R.M., FORTNAGEL P., WLIKES H. et FRANCKE W., 1991. Degradation of **1,2,4** trichloro- and **1,2,4,5** tetrachlorobenzene by pseudomonas strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 : 1430-1440.
- SCHEUNERT I., TOPP E., **SCHMITZER** J., KLEIN W. et KORTE F., 1985. Formation and fate of bound **residues** of (**<sup>14</sup>C**) benzene and (**<sup>14</sup>C**) chlorobenzenes in soil and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9 : 159- 170.
- SMITH D. L. et KEITH L. H., 1992 . Sampling and analysis methods. Compilation of **E.P.A's**.
- SMITH **J.A.**, **WITKOWSKI** P.J. et **CHIOU** C.T., 1988. Partition of nonionic organic compounds in aquatic systems. *Reviews of Environmental Contamination*, 103 : 130-136.
- SPECHT W.L., 1992, **F/H area ETF** effluent (H-016 OUTFALL) *Ceriodaphnia survival/reproduction* test, Wetingshouse Savannah River Company.