

Bioévaluation de la pollution des sédiments de la Seine (région parisienne) par l'emploi d'un bioessai basé sur la croissance à court terme de la micro-algue *Selenastrum capricornutum* Printz

Action of sediments in the River Seine (Paris area) on the short term development of cultures of the micro-alga *Selenastrum capricornutum* Printz

J.C. LACAZE (1), A. CHESTERIKOFF (2), B. GARBAN (2)

RÉSUMÉ

La bioévaluation de l'état de santé des fonds meubles dépend des conditions expérimentales du traitement des échantillons de sédiment conduisant à l'obtention de la phase aqueuse sur laquelle sont effectuées les analyses chimiques et toxicologiques.

Au cours de cette étude préliminaire nous avons considéré l'action de ces principales conditions ; nous constatons que l'effet inhibiteur d'un sédiment vis-à-vis de la croissance à court terme de la micro-algue *Selenastrum capricornutum* Printz n'est pas aisément levé, que ce soit par lessivages successifs du sédiment, par filtration plus fine de l'eau extraite à partir de ce dernier ou par autoclavage préalable de ce même sédiment, il peut l'être par contre après biodégradation.

Cette étude expérimentale a permis de comparer entre eux les pouvoirs inhibiteurs des fonds meubles de la Seine (région parisienne).

On note qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en métaux lourds souvent importantes des eaux issues des sédiments (Pb 70, Cu 100, Cr 150, Cd 9, Ni 280, Zn 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et le développement des algues : les polluants métalliques

(1) Institut Océanographique et Muséum national d'Histoire naturelle, 195, rue Saint-Jacques, 75005 Paris, France.

(2) Institut d'Hydrologie et de Climatologie, Université Pierre et Marie Curie, 4, place Jussieu, T. 26, 75252 Paris Cédex 05, France.

sont masqués par le pouvoir chélateur de ces biotopes riches en substances organiques.

Une conclusion à cette étude préliminaire est que l'analyse chimique des sédiments, utilisée seule, n'a qu'un intérêt limité : les données les plus fiables correspondent à celles fournies par les bioessais.

Mots clés : pollution des sédiments, bioessais par l'emploi de microalgues, qualité de l'eau.

SUMMARY

A bioevaluation of the state of health of soft bottoms depends on the experimental conditions in which samples of sediment are treated to obtain the water phase to be subjected to chemical and toxicological analyses.

In the course of this preliminary study we have considered the action of these principal conditions. We have noted that the inhibiting effect of a sediment on the short-term growth of a microalga *Selenastrum capricornutum* is not easy to eliminate, whether by a series of washes of the sediment, by a finer filtration of the water extracted from this sediment or by a previous autoclavage of this sediment.

This study quickly revealed which sediments in the River Seine (Paris area) inhibited most the test micro-alga *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) ; the cause of these inhibitions was then sought.

There is no correlation between the often high content of heavy metals in the sediment water (Pb 70, Cu 100, Cr 150, Cd 9, Ni 280, Zn 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and the development of the algae ; the metal pollutants are probably masked by the chelating capacity of these biotopes rich in organic substances. The experimental conditions under which the sediment samples are treated to obtain the water phase used for the chemical and toxicological analyses are also important.

One conclusion drawn is that a chemical analysis alone of the sediments is of limited interest. The most reliable data from the ecological point of view are those provided by the bio-assays.

Key-words : sediments pollution, microalgae bioassays, water quality.

INTRODUCTION

Les polluants déversés dans les eaux se retrouvent, pour une grande part, dans les sédiments, généralement après une fixation plus ou moins

temporaire par les organismes planctoniques. Les fonds meubles se comportent comme des indicateurs de pollution.

L'analyse chimique des polluants dans les sédiments constitue le moyen d'investigation habituel. Toutefois, elle ne rend pas toujours compte de l'effet réel de la pollution car elle n'est jamais exhaustive : tous les polluants ne peuvent être pris en compte. En outre, l'analyse chimique mesure la "pollution brute" non la "pollution nette" c'est-à-dire celle que nous définirons ici comme agissant réellement sur les organismes : le problème se pose aussi en cas d'eutrophisation, l'azote, et plus particulièrement le phosphore analysés dans les sédiments ne sont pas forcément biodisponibles.

L'emploi de bioessais est donc une nécessité comme plusieurs auteurs l'ont souligné (HANNAN et PATOUILLET, 1976, 1979 ; LACAZE, 1987 ; LACAZE et PAQUET, 1989).

La bioévaluation de l'état de santé des sédiments est réalisée ici par la mesure de la croissance à court terme (96 heures) de la micro-algue *Selenastrum capricornutum* Printz (Chlorophyceae), algue de référence pour l'étude des eaux douces polluées.

Dans presque tous les cas il est nécessaire d'extraire les eaux associées au sédiment ce qui peut être réalisé par centrifugation juste après les prélèvements (LACAZE, 1987) : cette opération n'était malheureusement pas réalisable ici, à proximité des lieux de récolte.

Il est également possible de brasser dans des conditions expérimentales parfaitement définies des quantités aliquotes d'eau et de sédiment. C'est cette méthodologie que nous employons dans ce travail exploratoire en fixant certains paramètres tels que l'intensité et la durée du brassage, la proportion eau/sédiment et en étudiant l'influence d'autres : évaluation de la toxicité du sédiment en fonction de lessivages successifs, influence du degré de filtration, de l'autoclavage ou de la biodégradation préalables.

En fonction des résultats obtenus, un protocole d'extraction provisoire est déterminé et appliqué à l'étude comparée des inhibitions et fertilisations potentielles de sédiments prélevés sur le fond de la Seine.

1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1-1 Choix des stations

Le test algue est utilisé sur du sédiment provenant de 9 localités de la région parisienne. Plusieurs de ces stations sont portées sur la figure 1. D'autres stations, situées dans la région de Montereau, donc beaucoup plus en amont, ne figurent pas sur cette carte. Parmi ces dernières on distingue :

Dans la ville de Montereau :

- Montereau - Seine (bras de la Seine).
- Montereau - Yonne (bras de l'Yonne).

A 15 km en amont de cette ville, à l'entrée d'une sablière :

- Balloy 1 (dominance sable) ;
- Balloy 2 (forte dominance vase).

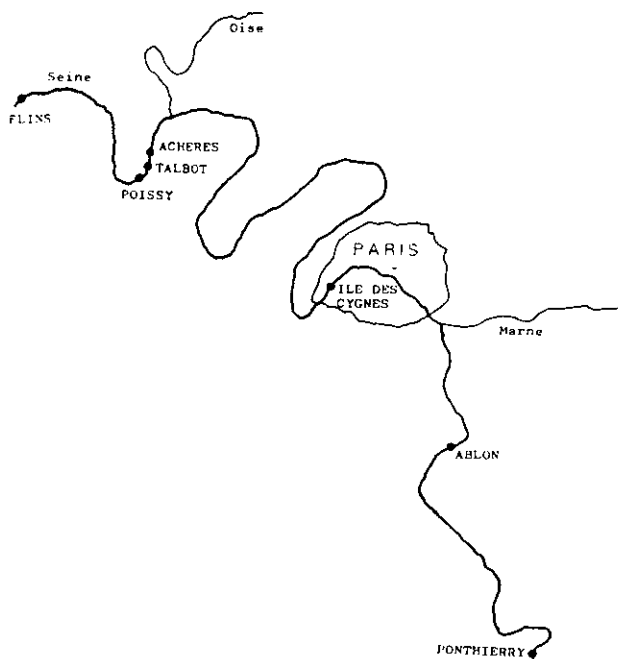


Figure 1.- Carte de la zone d'étude et localisation des sites de prélèvements.

Figure 1.- Map of the study area and localization of sampling sites.

Par ailleurs nous avons utilisé comme référence un échantillon de sol (terre de jardin, cf. tableau 3).

Plusieurs prélèvements sont réalisés pour les localités d'Achères (Station d'épuration), de Poissy (Usines Talbot), et de Flins (Usine Renault). Pour chacune d'entre elles la numérotation des stations croît d'amont en aval, le prélèvement numéro 1 étant effectué en amont des rejets d'eaux usées.

1-2 Choix de l'algue

L'algue verte *Selenastrum capricornutum* Printz (Chlorophyceae) est retenue pour sa représentativité des milieux oligotrophes et eutrophes, la maintenance aisée des cultures avec de faibles variations morphologiques, ainsi que la facilité des dénombrements (absence de coenobes). Nous utilisons ici la souche référence NIVA CHL 1 (Norwegian Institute for Water Research). Cette algue est très employée pour les tests de fertilité en eaux douces polluées ; plus de 200 publications concernent

cette espèce qui constitue de ce fait une "référence" (BONIN *et al.*, 1986).

1-3 Réalisation du test

Deux paramètres, *taux de croissance* et *biomasse maximale* sont généralement utilisés lors de l'emploi d'algues en cultures non renouvelées (batch cultures), l'un plus apte à mesurer les inhibitions dues aux pollutions et lié à la phase exponentielle qui se présente au début du développement des cultures, l'autre indiquant le potentiel d'eutrophisation et obtenu pour des durées plus grandes (MAESTRINI *et al.*, 1984, *Passim*).

Le test à court terme (96 heures) utilisé dans le cadre de ce travail réalisé sur de nombreux échantillons, intègre donc la phase initiale du développement des cultures. La phase de plateau correspondant à la biomasse maximale et permettant de déterminer le potentiel maximal de croissance (AGP : algal growth potential) n'est pas encore atteint. Lors d'un travail complémentaire, que nous avons réalisé conjointement à celui-ci, cette 2ème phase est mise plus particulièrement en évidence sur les mêmes sédiments mais avec un protocole d'étude différent ; l'expérimentation est alors prolongée au-delà de 10 jours (LACAZE *et al.*, 1989). Ici, l'action inhibitrice d'un extrait aqueux obtenu à partir d'un sédiment s'exercera sur le taux de croissance et la durée de la phase de latence (BLANKLEY, 1973).

Ce test consiste à mesurer la capacité d'une eau, extraite d'un sédiment (cf. protocole d'extraction), à entretenir ou limiter la prolifération de l'algue verte *Selenastrum capricornutum*. On évalue le développement de l'algue dans l'extrait ou dans ses dilutions après une période de 96 heures. La biomasse, liée au développement de l'algue, est déterminée par dosage de la chlorophylle *a* (SCOR-UNESCO, 1986).

Lorsqu'on considère la surveillance du milieu aquatique, laquelle constitue aujourd'hui une priorité absolue, on doit comprendre, ce qui n'est pas évident pour beaucoup de chercheurs, que le choix des tests ne repose pas uniquement sur des concepts strictement scientifiques, ces derniers étant d'ailleurs parfaitement répertoriés dans le domaine des micro-algues (MAESTRINI *et al.*, 1984) mais aussi sur d'autres paramètres tels que la rapidité, le coût peu élevé, etc. (LACAZE, 1987). C'est aussi cet aspect qui est pris en compte pour l'élaboration des normes nationales et internationale (AFNOR, 1980).

Ainsi, certaines méthodes d'évaluation plus fines ou plus "scientifiques" mais nécessitant un matériel coûteux, une technologie sophistiquée ou l'implication de techniques très spécialisées ne présentent parfois que peu d'intérêt pratique. Des bioessais plus simples peuvent - dans l'état présent des recherches - permettre néanmoins de détecter les altérations de la qualité des milieux et guider les travaux futurs (BLANDIN, 1986) ; c'est cet objectif que nous avons tenté d'atteindre avec ce travail.

Les expérimentations sont conduites dans des flacons de verre (col vissé) de 100 ml. Ces derniers contiennent des quantités croissantes d'eaux à tester (extrait), à savoir, 0 (témoins), 5, 10, 15, 20 ml ; ces volumes sont, le cas échéant, portés à 20 ml par addition du milieu de culture comprenant tous les éléments à l'exception des macro et micro-nutriments (tableau 1) qui sont introduits ensuite afin de recons-

tituer le milieu de culture habituel (PAAP ; Provisional algal Assay Procedure ; EPA, 1978).

Tableau 1.- Composition du milieu de culture PAAP.
Concentrations finales en macro et micro-éléments.

Table 1.- Composition of the PAAP culture medium.
Final concentrations of macro- and microelements.

CONCENTRATION FINALE EN MACRO-ELEMENTS			
Composés	mg/l	Elément	mg/l
NaNO ₃	25,500	N	4,200
MgCl ₂ .6H ₂ O	12,164	Mg	2,904
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,410	Ca	1,202
MgSO ₄ .7H ₂ O	14,700	S	1,911
K ₂ HPO ₄	1,044	P	0,186
NaHCO ₃	15,000	Na	11,001
		K	0,469
		C	2,143

CONCENTRATION FINALE EN MICRO-ELEMENTS			
Composés	mg/l	Elément	mg/l
H ₃ BO ₃	185,520	B	32,460
MnCl ₂ .4H ₂ O	415,610	Mn	115,374
ZnCl ₂	3,271	Zn	1,570
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,428	Co	0,354
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,012	Cu	0,004
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,260	Mo	2,878
FeCl ₃ .6H ₂ O	160,000	Fe	33,051
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	300,000	-	-

Le milieu complet est élaboré à partir de 6 solutions mères de macro-éléments et d'une solution mère de micro-éléments contenant l'EDTA. Les dilutions sont effectuées à l'aide d'eau bidistillée stérile. Les algues se développent donc, dans tous les cas, avec des concentrations en nutriments au moins égales à celles du milieu de culture habituel ; par conséquent, un développement moindre par rapport aux cultures témoins ne peut être attribué à des carences en N et P : il indique une inhibition dont nous chercherons ici les causes.

Trois flacons sont utilisés par concentration. Les résultats présentés sur les figures sont la moyenne des valeurs obtenues.

On inocule ensuite 1 ml d'une culture de *Selenastrum capricornutum* se développant également en milieu PAAP.

Les flacons sont disposés sous une rampe constituée de tubes fluorescents Gro-lux. Photopériode 12/12. Energie lumineuse : 1,8 mW/cm². Température 20 °C ± 1 °C. Lors de 7 essais préliminaires (cf. ci-dessous ; intervalle de confiance p < 0,05) pour tester la croissance de l'algue dans nos conditions expérimentales nous obtenons des taux de croissance

(nombre de divisions par jour) de 1,1, proches de ceux relevés lors d'expériences complémentaires (LACAZE *et al.*, 1989) :

	Données initiales	Données après 96 heures
Chloro <i>a</i> µg.L ⁻¹	33 ± 6	549 ± 32
Nombre de cellules	97 857 ± 9 477	2,15.10 ⁶ ± 0,24.10 ⁶

1-4 Protocole d'extraction des eaux à étudier

Ce protocole est très proche de ceux précédemment utilisés par HANNAN et PATOUILLET (1979) et LACAZE (1987).

Les échantillons de sédiment sont congelés immédiatement après les prélèvements. Ceux-ci sont réalisés par carottages à partir d'un des bateau du service de la navigation de la Seine. Seuls les 3 premiers centimètres sont recueillis, car seule la partie superficielle est apte à être remaniée sous l'effet de l'hydrodynamisme naturel ou provoqué par le passage fréquent des bateaux à hélice et donc susceptible d'avoir un impact sur le milieu sus-jacent. Dans un cas (essais de biodégradation) on évite la congélation et on procède directement à l'essai.

Les sédiments sont décongelés juste avant la réalisation des tests. On brasse alors une part de sédiment dans 3 parts de milieu PAAP (exempt de macro et micro-nutriments) c'est-à-dire sans Azote et Phosphore ainsi que sans la solution de micro-éléments (tableau 1). puis on réalise une agitation mécanique durant 30 min. (appareil à agitation par va-et-vient). Ces proportions sont choisies pour des raisons pratiques. Elles conduisent à des concentrations suffisantes en nutriments et altéragènes pour pouvoir réaliser les analyses chimiques et toxicologiques dans de bonnes conditions.

Après une décantation de 3 heures on centrifuge le surnageant (5 000 t/min., 5 min.) puis on filtre la phase supérieure sur papier Whatman GF/C. Dans quelques cas on procède à une deuxième filtration sur millipore GS, porosité 0,22 µm.

1-5 Analyses chimiques

Une partie aliquote des eaux à tester est analysée chimiquement pour les substances suivantes :

- sels nutritifs. Méthodes spectrophotométriques (Normes AFNOR, T 90013, T 90015, T 90023) ;
- azote total (méthode INRA - SHL, Thonon) et azote organique (différence entre l'azote total et la somme des formes minérales de l'azote) ;
- métaux lourds par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

Au cours de cette étude préliminaire nous considérerons l'action de plusieurs paramètres importants du traitement des sédiments notamment l'influence de lessivages successifs, la filtration plus fine des extraits, et l'autoclavage préalable du sédiment ; puis, en s'appuyant sur les résultats obtenus nous déterminerons un protocole provisoire d'extraction afin de comparer entre elles les caractéristiques inhibitrices et fertilisantes de 14 échantillons de sédiments provenant du lit de la Seine.

2-1 Influence des conditions de traitement des sédiments

Le traitement des échantillons de sédiment qui conduit à l'obtention de la phase aqueuse sur laquelle sont effectuées les analyses chimiques et toxicologiques est une opération capitale car il conditionne en grande partie ces analyses. Déjà, dans le cas des essais portant sur les eaux, cette question est l'objet d'importantes divergences entre les auteurs (CROUZET et VILLESSOT, 1987). En premier lieu la question de la congélation ou de la décongélation du sédiment se pose car il n'est généralement pas possible d'analyser immédiatement les sédiments souvent prélevés en grand nombre ; ce type de conservation dont nous n'étudierons pas ici l'incidence est susceptible de modifier le résultat des essais.

Toutefois le vrai problème est de savoir comment, à partir d'un sédiment, obtenir une image réaliste, au plan écologique, de son caractère inhibiteur ou fertilisant. L'état physico-chimique et par conséquent toxicologique de la phase aqueuse extraite du sédiment dépendra de nombreux paramètres, notamment : intensité et durée du brassage, proportions eau/sédiment. Il dépendra également du traitement subi par l'extrait, le plus souvent pour assurer sa stérilisation (filtration, autoclavage).

Dans le cas d'un sédiment "frais" n'ayant subi aucun traitement il est également possible de soumettre le mélange eau-sédiment à une biodégradation en réacteur et de réaliser des analyses chimiques et toxicologiques à intervalles réguliers. Ce protocole a été utilisé ici pour la localité de Balloy 2 dans le cas d'un échantillon de vase très riche en matières organiques.

Quels sont les principaux paramètres intervenant sur les effets biologiques ?

2-1-1 Influence de lessivages successifs

Afin d'évaluer l'efficacité du protocole d'extraction nous avons répété les différentes phases de l'opération de lessivage pour 3 stations (Montereau-Seine, Montereau-Yonne, Poissy).

Lorsque on réalise un deuxième lessivage, l'analyse toxicologique (fig. 2) donne des résultats identiques dans tous les cas. Le tableau 2 nous indique que les analyses chimiques relatives aux nutriments et concernant les eaux issues du premier et du deuxième lessivage sont différentes : le deuxième extrait étant un peu moins riche. Par contre, les concentrations en métaux ne présentent pas d'évolution caractéristique ; elles augmentent même dans 2 cas sur 3.

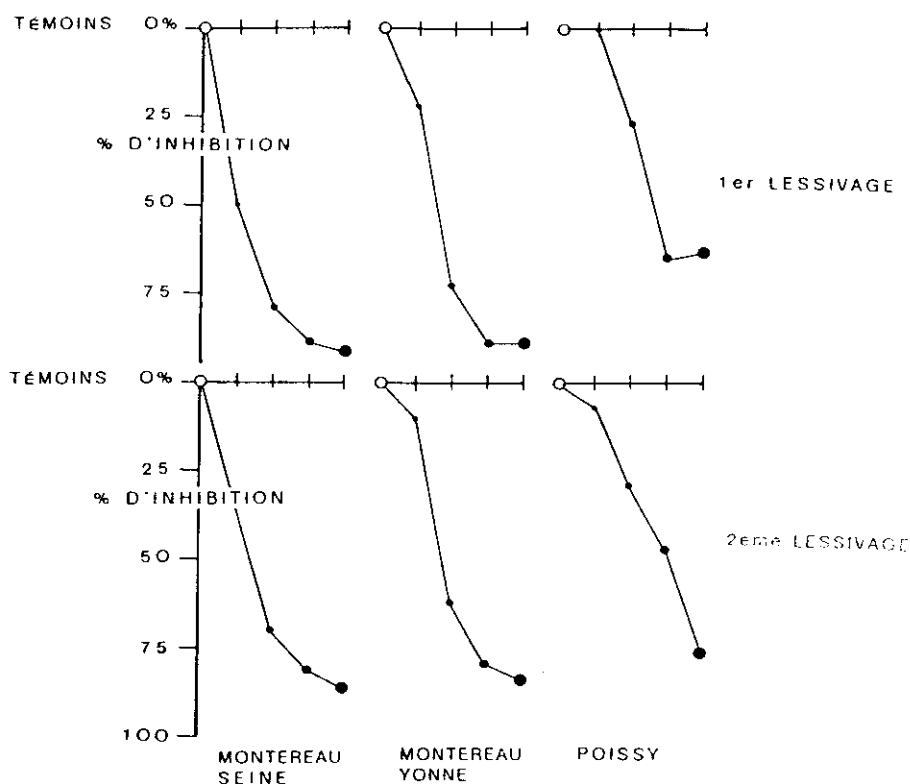


Figure 2.- Influence d'extractions aqueuses successives sur le degré de multiplication de *Selenastrum capricornutum*.

Figure 2.- Influence of successive water extracts on the rate of multiplication of *Selenastrum capricornutum*.

Tableau 2.- Nutriments (mg.L^{-1}) et métaux lourds ($\mu\text{g.L}^{-1}$) des extraits aqueux après lessivages successifs : (1) : premier lessivage. (2) : deuxième lessivage.

Table 2.- Nutrients (mg.L^{-1}) and heavy metals ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in water extracts after successive washings : (1) : first washing ; (2) second washing.

		N-NH ₄	P-PO ₄	Pb	Cd	Cu	Cr	pH
Montereaue Seine	(1)	50	0,25	33	1	63	19	7,16
	(2)	34,4	0,14	24	1	13	4	-
Montereaue Yonne	(1)	22	0,08	13	1	8	7	7,27
	(2)	16,4	0,07	16	1	9	18	-
Poissy	(1)	70	5,9	32	1	31	17	7,60
	(2)	46	4,2	60	4	82	56	-

Quoi qu'il en soit ces données nous indiquent que deux lavages successifs seulement n'épuisent pas les sédiments en substances inhibitrices.

2-1-2 Influence d'une filtration plus fine des extraits aqueux

Au cours de ce travail nous avons pratiqué (cf. protocole d'extraction) en routine, une filtration à 0,45 μm environ (Whatman GF/C). Celle-ci, généralement réalisée dans le cas des essais portant sur les eaux, élimine la matière organique du plancton préexistant.

Dans 4 cas une filtration plus poussée (millipore GS, porosité 0,22 μm) est réalisée ; on constate alors par rapport aux données habituelles obtenues par filtration sur 0,45 μm , une augmentation moyenne de l'ordre de 15 % de la biomasse chlorophyllienne pour toutes les concentrations (fig. 3), ce qui signifie que, si la filtration sur 0,22 μm augmente quelque peu le développement des algues, elle n'élimine, pas, pour autant, les composés responsables de l'inhibition.

Une hypothèse doit être prise en compte. On sait que le phosphore est adsorbé sur le matériel particulaire et alors peu biodisponible, cette fixation dépendant de la nature des sédiments et du pH (CROUZET et VILLESSOT, 1987). C'est ce que nous observons ici : l'analyse chimique réalisée dans un cas (BALLOY 1, tableau 3) indique une baisse de la concentration en nutriments et une légère augmentation du pH, ce qui laisserait supposer que les particules de taille située entre 0,45 et 0,22 μm absorbent une partie des nutriments. Il est probable que ces particules absorbent également des inhibiteurs : la croissance plus importante des algues après une filtration poussée tend à le montrer.

2-1-3 Influence de l'autoclave préalable des échantillons de sédiment

La stérilisation par autoclavage minéralise les cellules mais cette technique brutale cause un dégazage susceptible de précipiter des quantités importantes de certains composés tels que le phosphore qui devient indisponible biologiquement. Nous avons donc étudié lors d'une nouvelle série d'expériences portant sur 7 stations choisies selon un gradient de pollution, l'influence de l'autoclavage des échantillons de sédiment sur la toxicité (fig. 4).

Dans le cas des sédiments conduisant à une eutrophisation pour toutes les dilutions (Sol, Balloy, Ponthierry) on note, que l'autoclavage augmente fortement celle-ci.

Lorsque, par contre, cette eutrophisation est limitée ou nulle (Ablon, Achères, Poissy) l'autoclavage est sans effet, voire freine le développement des cultures.

Au plan de l'analyse chimique réalisée pour 4 des stations (tableau 3), on note que l'autoclavage augmente la concentration en azote organique ce qui peut favoriser l'eutrophisation dans certains cas ou la limiter dans d'autres selon la nature des composés organiques et leur degré de minéralisation.

2-1-4 Influence de la biodégradation préalable d'un sédiment sur ses potentialités inhibitrices ou fertilisantes

Le sédiment étudié (Balloy 2) est prélevé à la fin de l'automne ; il est alors très riche en microalgues en cours de décomposition. Cette station est dépourvue de toute pollution d'origine humaine.

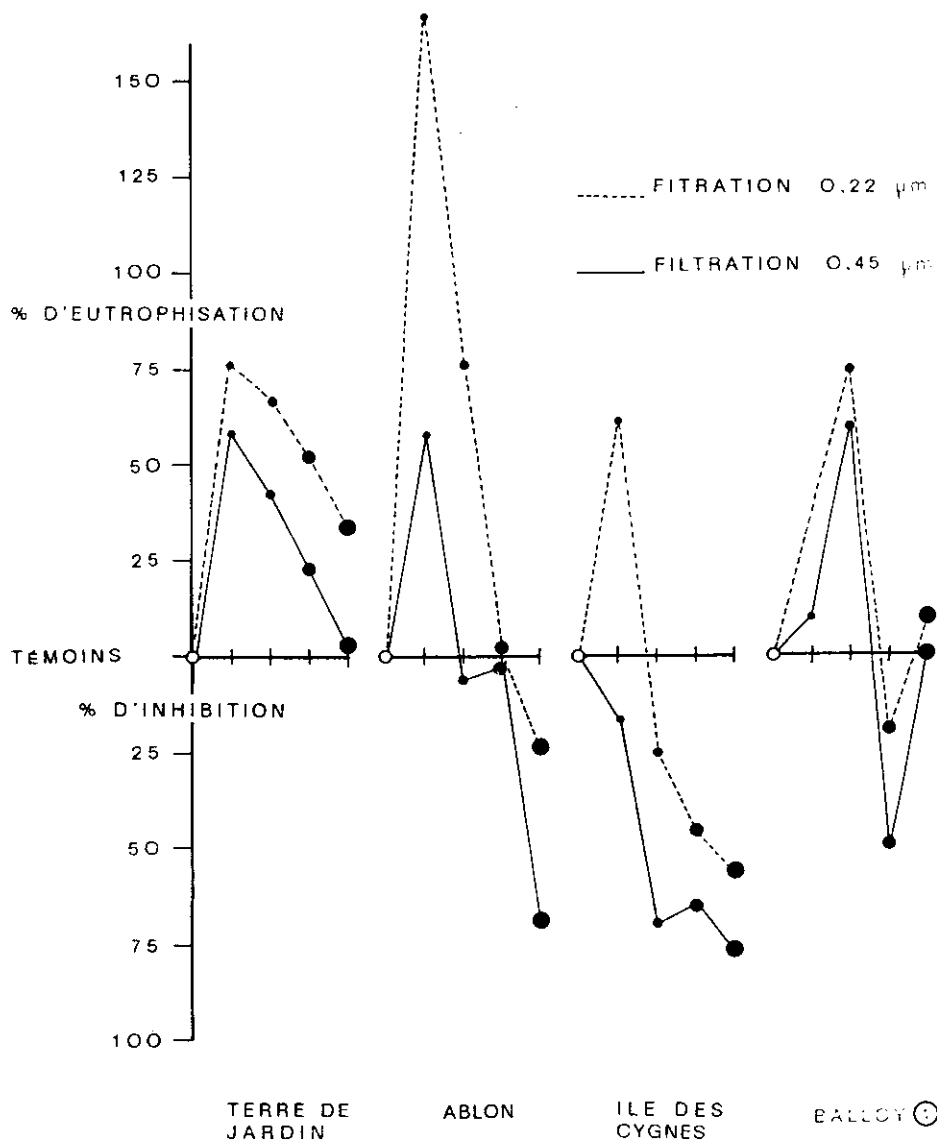


Figure 3.- Influence d'une filtration plus fine (0,22 µm) des extraits aqueux sur le degré de multiplication de *Selenastrum capricornutum*.

Figure 3.- Influence of a finer filtration (0.22 µm) of water extracts on the rate of multiplication of *Selenastrum capricornutum*.

Tableau 3.- Influence de l'autoclavage des échantillons de sédiments sur la composition de leurs extraits en nutriments (mg.L^{-1}) et en métaux lourds ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

Table 3.- Effect of the autoclavage of the sediment samples on the nutrient (mg/L^{-1}) and heavy metal ($\mu\text{g/L}^{-1}$) composition.

		N.NH ₄	N.NO ₃	N.ORG.	P.PO ₄	Pb	Cu	Cr	Cd	Ni	Zn	pH
TERRE DE JARDIN	A	1,1	1,4	15	1,1	170	60	30	1	100	80	-
BALLOY 1	NA	0,85	0,3	8	0,21	15	60	4	1	40	100	8,06
	+ 0,22	0,7	0,21	8	0,19	5	80	4	1	80	80	8,25
	A	0,43	0,16	13,6	0,09	15	40	6	1	100	80	8,23
ACHERES 1	NA	28	0,14	5	1,35	56	60	153	9	120	300	7,74
	A	20	0,2	25	1,75	50	12	30	-	80	200	7,56
ACHERES 2	NA	95	0,28	0	4,32	13	20	42	2	280	300	7,47
	A	79	0,2	53	3,8	4	10	42	4	120	400	7,41
POISSY	NA	50	0,3	-	2,4							7,60
	A	40	0,23	22	2,4	131	100	144	2	68	400	7,95

A : autoclavé ;

N.A. : non autoclavé ;

+ 0,22 : filtration complémentaire sur 0,22 μm .

A : autoclavé ;

N.A. : non autoclavé ;

+ 0,22 : additional filtration on 0,22 μm

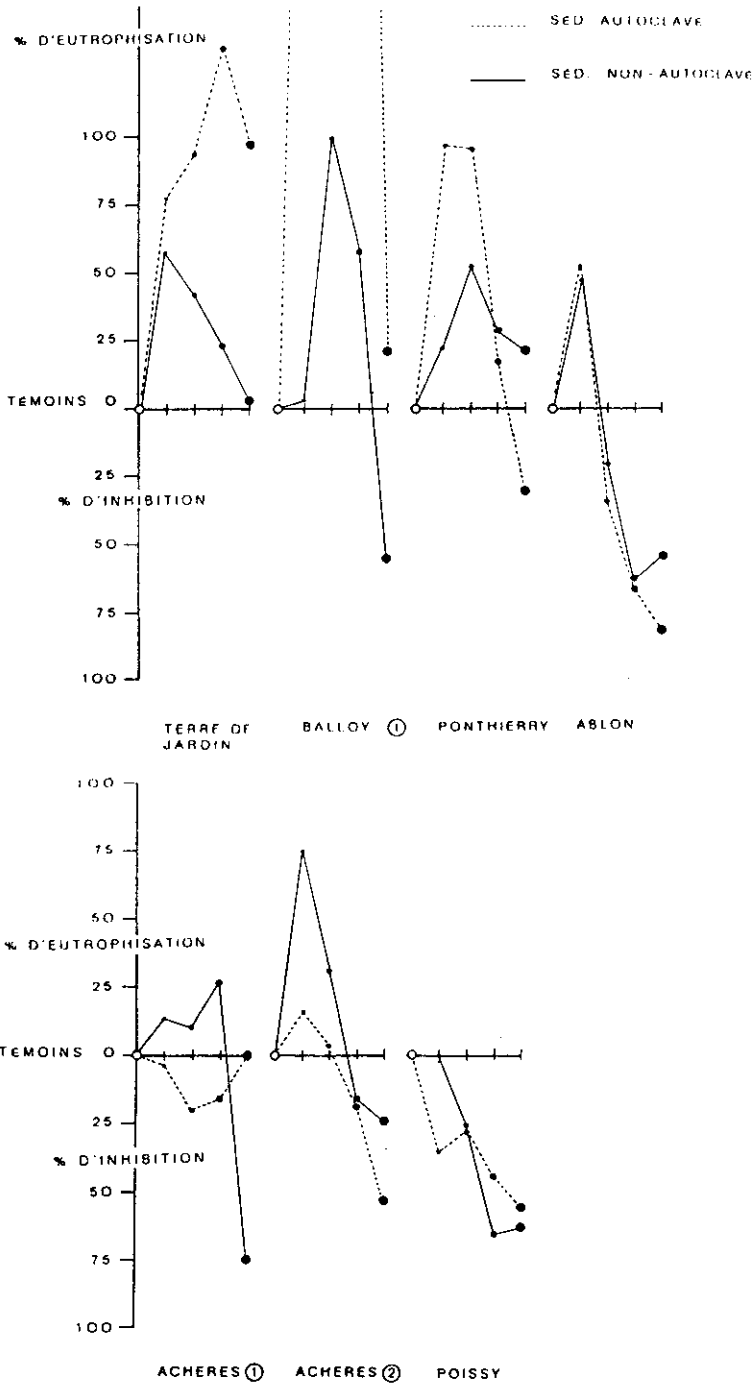


Figure 4.- Influence de l'autoclavage préalable des sédiments sur le degré de multiplication de *Selenastrum capricornutum*.

Figure 4.- Influence of the prior autoclavage of sediments on the rate of multiplication of *Selenastrum capricornutum*.

Lors de cette étude, on évite la congélation et on procède directement à l'essai avec une microflore intacte. Cette pratique appelée méthode microcosmique (LACAZE, 1973, 1976) constitue une des voies que ce travail préliminaire nous permettra de privilégier ultérieurement. Le réacteur qui contient le mélange sédiment/eau (proportion 1/3) compose donc un microécosystème expérimental qui va évoluer durant les 10 jours de la période expérimentale. Un brassage de 30 min. par agitation mécanique est réalisé initialement et chaque jour. Des extraits sont prélevés après 3 heures, 2 et 10 jours pour effectuer les analyses chimiques (tableau 4) et toxicologiques (fig. 5).

Tableau 4.- Concentration en nutriments (mg.L^{-1}) et métaux lourds ($\mu\text{g.L}^{-1}$) des extraits aqueux du sédiment de la station Balloy 2 en fonction de la durée de biodégradation en milieu réduit et oxydé.

Table 4.- Nutrient (mg/L^{-1}) and heavy metal ($\mu\text{g/L}^{-1}$) concentration in water extracts from sediment at station balloy 2 as a function of the duration of biodegradation in a reduced and oxidated medium.

		N.NH ₃	N.NO ₃	N.ORG.	P.PO ₄	Pb	Cu	Cr	Cd	Ni	Zn	pH
2 heures	réduit	9,3	0,04	32	0,44	8	33	4	1	170	300	7,52
	oxydé	6,9	0,09	19	0,13	18	80	15	1	160	200	7,77
2 jours	réduit	0,3	0,07	-	-	19	10	4	4	100	50	7,70
	oxydé	0,1	0,16	-	-	9	13	6	18	120	50	7,86
10 jours	réduit	2	0,2	3,6	-	4	2	1	1	140	50	7,35
	oxydé	0,11	0,09	0,9	-	4	7	2	1	160	50	7,86

Pour un élément : $1 \text{ g} = (1/\text{masse atomique}) \text{ mol}$;
pour un composé moléculaire ou ionique : $1 \text{ g} = (1/\text{masse moléculaire ou ionique}) \text{ mol}$.

For one element : $1 \text{ g} = (1/\text{atomic mass}) \text{ mol}$;
For a molecular or ionic component : $1 \text{ g} = (1/\text{molecular or ionic mass}) \text{ mol}$.

On observe trois phases :

- 1 - L'eau à étudier après 3 heures de contact avec le sédiment en condition d'agitation par va-et-vient présente une forte inhibition qui peut être partiellement levée lorsque le sédiment est autoclavé préalablement (fig. 5). Cette constatation semble contradictoire avec les exemples cités plus haut ; toutefois nous noterons que le sédiment est ici exempt de toute pollution d'origine industrielle ou urbaine.
- 2 - Une phase intermédiaire après 2 jours d'incubation du sédiment et de l'eau indique un début d'eutrophisation, et une diminution de l'inhibition.
- 3 - Une phase finale obtenue après 10 jours d'incubation ; une forte eutrophisation est alors apparente.

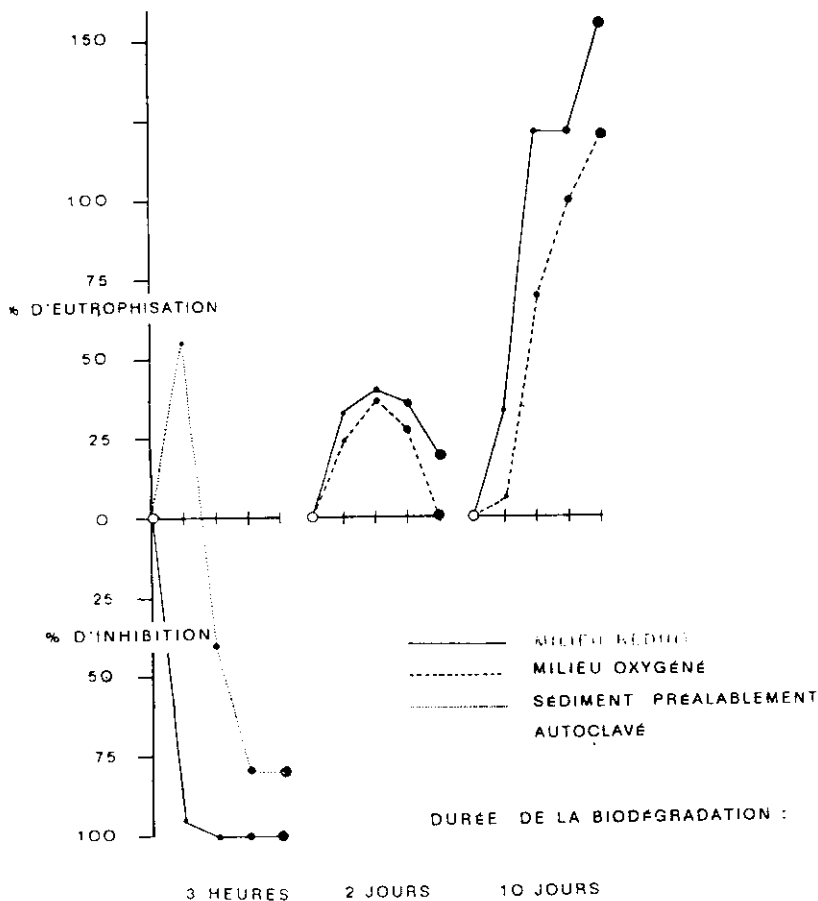


Figure 5.- Multiplication de *Selenastrum capricornutum* en fonction du degré de biodégradation d'un sédiment (Balloy 2). Influence de l'oxygénation.

Figure 5.- Multiplication of *Selenastrum capricornutum* as a function of the degree of biodegradation of a sediment (Balloy 2). Influence of oxygenation.

On note donc, en fonction du temps et de la biodégradation de la matière organique, la levée de l'inhibition, principalement pour les concentrations les plus fortes ; il y a après 10 jours proportionnalité entre l'effet eutrophisant et les concentrations (tableau 4). Après 10 jours de biodégradation en milieu oxydé, la concentration en NH_4^+ est passée de $493 \mu\text{M}$ à $8 \mu\text{M}$ et celle de l'azote organique de $1357 \mu\text{M}$ à $64 \mu\text{M}$, alors que la concentration de l'ion nitrate reste constante ($6,4 \mu\text{M}$). La question se pose de savoir sous quelle(s) forme(s) les $1778 \mu\text{M}$ ont disparu ; ou tout au moins ne se trouvent plus dans la phase aqueuse après la filtration habituelle sur $0,45 \mu\text{m}$. Un développement bactérien important sur les particules sédimentaires est certainement responsable de cette consommation d'azote.

Les fortes concentrations en azote organique peuvent expliquer l'inhibition initiale ; la minéralisation progressive pourrait favoriser l'eutrophisation - l'autoclavage réalisé lors de la première phase est un premier pas - bien limité - vers celle-ci, qui est plus importante en milieu réducteur (d'environ 10 %), le milieu réduit étant toujours plus riche en azote et phosphore donc conduisant à une production algale plus grande.

2-2 Effets comparés des différents sédiments

L'action inhibitrice des sédiments vis-à-vis de la croissance de *Selenastrum capricornutum* n'est donc pas facilement levée, que ce soit par des lessivages successifs du sédiment, une filtration plus fine de l'eau d'extraction ou par l'autoclavage préalable du sédiment.

Nous suivrons ici le protocole d'extraction tel qu'il a été défini initialement (cf. Matériel et Méthodes). La fixation des conditions : (1) de lessivage (pratiqué une seule fois), (2) de filtration (0,45 µm), (3) d'autoclavage (non pratiqué), nous permet de comparer les pouvoirs inhibiteurs et fertilisants des fonds meubles de la Seine.

Les eaux du lessivage des 14 échantillons de sédiments contiennent à la fois des produits inhibiteurs et eutrophisants. Cette double influence se présente pour chaque station (fig. 6).

Avec l'augmentation des concentrations, on observe, selon les localités, une inhibition (Montereau, Ile des Cygnes, Poissy) ou une eutrophisation (Flins 1). Généralement les concentrations faibles sont eutrophisantes (maximum d'eutrophisation pour 25 et 50 % de l'extrait. Par contre, pour les fortes concentrations et dans le cas de l'extrait pur, l'eutrophisation est moindre, ou une inhibition apparaît : c'est le cas de la plupart des échantillons. La séquence suivante se présente donc habituellement en fonction des concentrations : eutrophisation puis progressivement inhibition.

Quels sont les agents responsables de ces effets ?

L'azote et le phosphore ne peuvent être limitants puisque tous les essais sont réalisés avec une concentration en nutriments au moins égale à celle du milieu de culture PAAP employé comme témoin (N : 300 µM.L⁻¹ ; P : 6,2 µM.L⁻¹). Ces doses sont systématiquement ajoutées aux extraits et à leurs dilutions déjà riches en ces deux éléments (tableau 1).

La non-toxicité apparente de NH₄ (jusqu'à des concentrations de 140 mg.L⁻¹) peut s'expliquer par l'oxydation en NO₃ durant les 4 jours du test (tableau 5).

Par ailleurs une partie du phosphore est susceptible d'être adsorbée sur les particules donc non biodisponible ; néanmoins les teneurs des extraits et de leurs dilutions en substances nutritives sont généralement suffisantes pour assurer le développement des algues. En outre, comme nous l'indiquons plus haut, les plus fortes inhibitions se présentent pour les concentrations maximales c'est-à-dire lorsque les nutriments, mais aussi les substances altérageènes, sont le plus abondants.

Tableau 5.- Nutriments (mg.L⁻¹) et métaux lourds (µg.L⁻¹) des extraits aqueux réalisés à partir des sédiments de la Seine.

Table 5.- Nutrients (mg/L⁻¹) and heavy metals (µg/L⁻¹) in water extracts taken from sediments in the River Seine.

	N.NH ₄	N.NO ₃	N.ORG.	P.PO ₄	Pb	Cu	Cr	Cd	Ni	Zn	pH
BALLOY	0,7	0,21	8	0,19	5	80	4	1	80	80	8,25
MONTEREAU	28	0,12	12	0,16	48	-	48	2	140	300	7,16
PONTHIERRY	5,1	0,21	26	2,1	70	-	67	1	53	-	7,70
ABLON	57	0,19	57	2,6	58	100	10	1	200	-	7,84
ILE DES CYGNES	26	0,12	24	0,28	27	40	47	2	120	400	7,56
ACHERES 1	28	0,14	5	1,35	56	60	153	9	120	300	7,74
ACHERES 2	95	0,28	0	4,32	43	20	42	2	280	300	7,47
ACHERES 3	46	2	18,5	4,8	29	40	57	3	40	400	7,40
ACHERES 4	40	0,2	43	2,8	24	40	48	1	100	300	7,14
TALBOT AMONT	140	-	-	5,8	10	32	35	3	140	300	-
TALBOT AVAL	65	-	-	1,7	56	59	50	2	-	-	-
POISSY	50	0,3	-	2,4	-	-	-	-	-	-	7,60
FLINS AMONT	13,5	-	-	2,5	20	15	27	1	140	400	-
FLINS AVAL	50	-	-	1,7	17	26	61	3	280	300	-

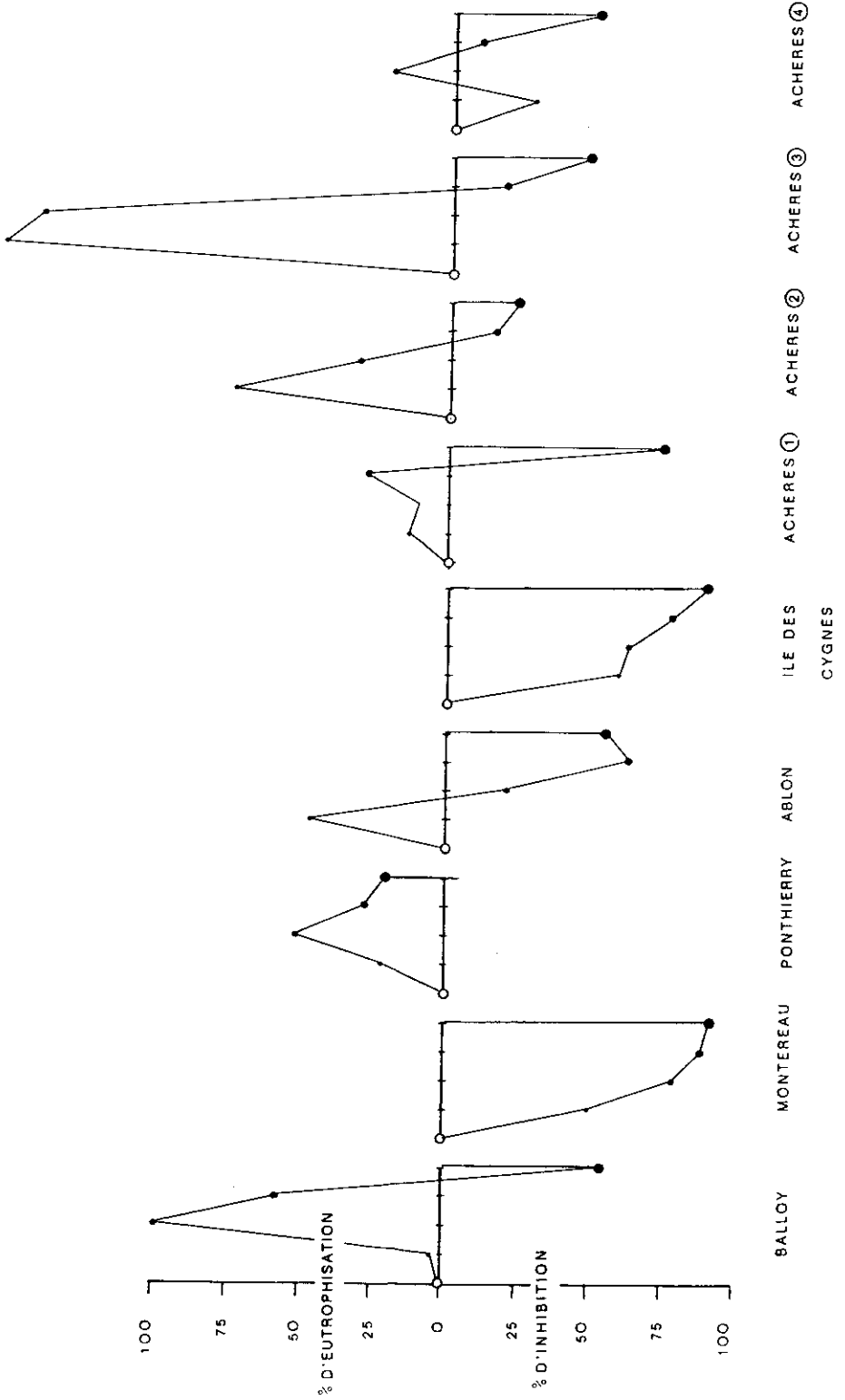
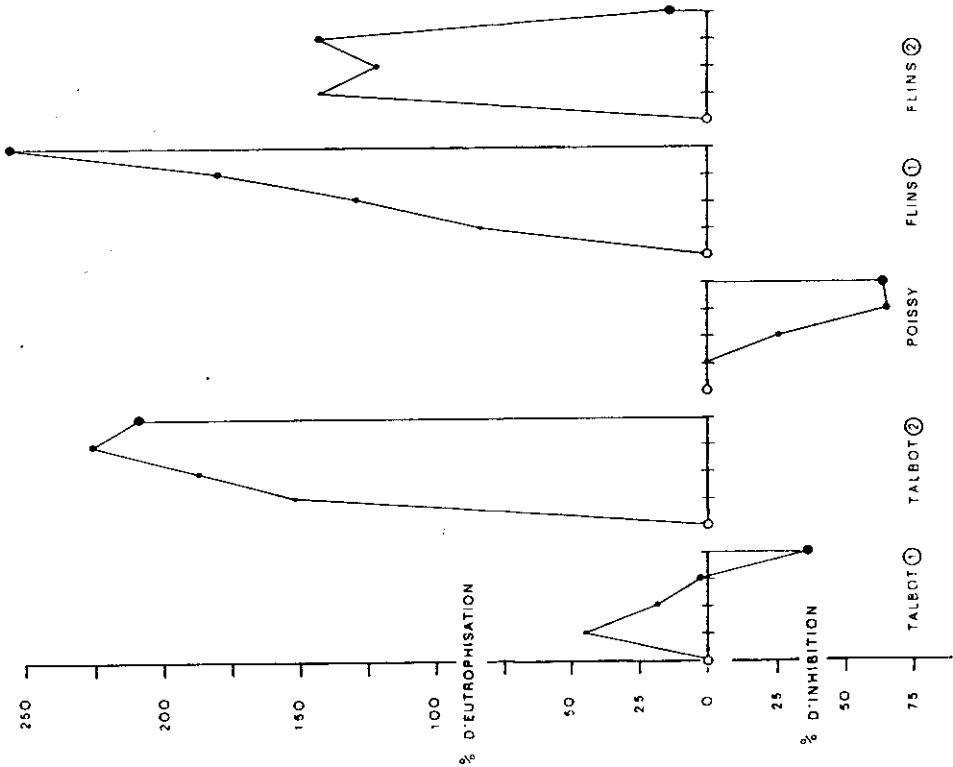


Figure 6.- Effets comparés des différents échantillons de sédiment sur la multiplication de *Selenastrium capricornutum* en fonction des concentrations (0, 25, 50, 75, 100 % d'extrait). Cercles clairs : témoins. Cercles pleins : traités (les concentrations sont proportionnelles aux diamètres des cercles). Les effets sont exprimés en pourcentage d'eutrophisation ou d'inhibition par rapport aux témoins (0 %) : ces derniers croissent dans le milieu de culture habituel (FAAP).

Figure 6.- Comparative effects of different samples of sediments on the multiplication of *Selenastrium capricornutum* as a function of the concentrations (0, 25, 50, 75, 100 % of the extract). Light circles: tests; dark circles: experimental samples (concentrations are proportional to the diameters of the circles). The effects are expressed in a percentage of eutrophisation or inhibition in relation to the tests (0 %). The latter grow in the usual culture medium (FAAP).



Il ne semble pas, en regard de la figure 6 et du tableau 5, que l'on puisse clairement attribuer les inhibitions constatées aux métaux. Ceux-ci sont dosés sur les échantillons d'eau avant dilution. D'autres substances sont donc en cause. Ci-dessous les concentrations maximales en métaux lourds :

Pb	jusqu'à	70 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Cu	jusqu'à	100 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Cr	jusqu'à	150 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Cd	jusqu'à	9 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Ni	jusqu'à	280 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Zn	jusqu'à	400 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Pourtant, CHIAUDANI et VIGHI (1978) au cours d'expériences réalisées avec la même algue indiquent des toxicités plus importantes. Or ces auteurs utilisent le même chélateur (EDTA) à la même concentration ($300 \mu\text{g.L}^{-1}$). Rappelons que ce produit est introduit ici avec les micro-éléments métalliques en début d'expérience pour toutes les eaux étudiées (tableau 1).

Nous noterons cependant que les expériences de CHIAUDANI et VIGHI (1978) sont conduites avec le milieu de culture habituel (tableau 1) ; or, celui-ci est sans rapport au plan physico-chimique avec les milieux complexes constitués par les extraits de sédiments. Ces derniers contiennent des composés organiques en quantités importantes susceptibles d'avoir des propriétés chélatrices supplémentaires affectant l'activité des ions métalliques et par ce biais d'avoir une action sur les producteurs primaires (BARBER et RYTHER, 1969 ; LACAZE et VILLEDON de NAÏDE, 1977). HANNAN et PATOUILLET (1979) à l'occasion de travaux portant sur des sols et des sédiments de l'Etat de Washington indiquent qu'il n'y a pas de corrélation entre la teneur des sédiments en Pb, Cu et Zn et le développement des algues. Ils indiquent par ailleurs (1976) que l'analyse chimique des extraits de sédiment n'a que peu d'intérêt : les données les plus fiables correspondent à celles fournies par les bioessais. En bref, d'après ces auteurs (communication personnelle), le test n'est pas très sensible à la pollution des sédiments car les métaux lourds leur sont étroitement liés et ne sont pas aisément relâchés dans le milieu ; quelle est alors l'origine des inhibitions décelées par ces bioessais ?

Les fortes concentrations en azote organique observées ici pourraient expliquer certaines des inhibitions observées (actions de complexation voire antibiotiques).

Par ailleurs, à l'aide d'expériences réalisées avec des milieux dans lesquels différentes concentrations de matières organiques d'origine aquatique sont dissoutes dans un substrat synthétique (PAAP) ainsi qu'en utilisant de l'eau naturelle, VISSIER et COUPURE (1981) ont démontré que la croissance et le taux de photosynthèse de l'algue *Selenastrum capricornutum* sont influencés par les propriétés de la matière organique et que celles-ci varient au cours des saisons. Il apparaît, d'après ces auteurs, que la matière organique servirait comme source d'éléments nutritifs aussi bien que comme agent stimulateur ou inhibiteur de processus physiologiques. Les fractions à poids moléculaires faibles seraient physiologiquement plus actives que celles à poids moléculaires plus élevés.

D'autres substances peuvent agir sur la production d'algues. CROUZET et VILLESSOT (1987) signalent que le développement des algues est

d'autant plus important que les eaux sont plus minéralisées. "Il est évident que le calcium, le magnésium et l'alcalinité des eaux naturelles sont essentiels à la formation de la biomasse", néanmoins dans le cas des eaux de lessivage étudiées ici, les teneurs en Ca et Mg ne semblent pas être excessives puisque du même ordre que celles que l'on rencontre habituellement dans les eaux de la Seine et par conséquent avoir d'influence (tableau 6).

Tableau 6.- Degré de minéralisation des eaux d'extraction du sol de référence et de 6 types de sédiments (mg.L⁻¹).

Table 6.- Degree of mineralization of extraction waters from the reference soil and from six types of sediment (mg/L⁻¹).

	Ca	Mg	SO ₄
Sol	31,6	2	60
Balloy 1	34,1	3,2	17
Balloy 2	20,8	6,6	35
Ponthierry	35,8	5	20
Ablon	63,3	6,6	23
Achères 4	133,3	18	40
Poissy	39,1	6,5	-

CONCLUSION

Comment, à partir d'un sédiment, obtenir une image réaliste, au plan écologique de son caractère inhibiteur ou fertilisant ? Bien que l'étude "in toto" du sédiment ne doit pas être écartée (LACAZE *et al.*, 1989), une extraction est généralement nécessaire. L'état physico-chimique et par conséquent toxicologique de la phase aqueuse extraite du sédiment dépendra des conditions de l'extraction. Au cours de cette étude exploratoire nous avons considéré certaines d'entre elles : ainsi, nous constatons que l'action inhibitrice du sédiment vis-à-vis de la croissance à court terme de la micro-algue *Selenastrum capricornutum* n'est pas aisément levée, que ce soit par des lessivages successifs du sédiment, par une filtration plus fine de l'eau extraite à partir de ce dernier ou par un autoclavage préalable de ce même sédiment.

En fonction des résultats précédents nous avons déterminé un protocole provisoire d'extraction pour comparer entre eux les pouvoirs inhibiteurs des sédiments provenant de plusieurs localités du lit de la Seine.

Cette étude nous permet de mettre rapidement en évidence les sédiments les plus inhibiteurs de la Seine (région parisienne), c'est le cas notamment des échantillons provenant de Poissy, Montereau, Ile des

Cygnés, Ablon qui sont inhibiteurs même pour les plus faibles concentrations. Quelle est l'incidence de ces effets sur les chaînes trophiques ? Y a-t-il une relation entre ces résultats et les altérations de la faune piscicole que nous observons depuis quelques années dans certaines localités telle que Montereau ? Notons que la pollution d'origine humaine n'est pas toujours en cause puisque des stations non polluées à ce point de vue (Balloy 2) présentent également une forte inhibition (fig. 5).

Une constatation déjà faite par HANNAN et PATOUILLET (1976) est ici confirmée : il n'y a pas corrélation entre la teneur en métaux lourds des eaux du lessivage des sédiments et le développement des algues. Sur un plan plus général on peut affirmer que l'analyse chimique, jamais exhaustive, ne rend pas toujours compte de l'effet réel de la pollution des sédiments : l'utilisation de tests est donc une nécessité comme l'ont souligné les auteurs précités et LACAZE (1987).

Dans le cas de l'organisme de référence *Selenastrum capricornutum*, ces travaux nous indiquent donc que l'eutrophication de la Seine, à laquelle participent les sédiments, puisque riches en nutriments, n'est pas freinée par la présence de métaux lourds. Si ces derniers ne sont pas directement en cause il convient de déterminer l'origine des inhibitions observées. La matière organique, qui par ailleurs a une influence comme source d'éléments nutritifs et comme agent stimulateur, agit probablement ici par ses propriétés antibiotiques ou de complexation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR (1980). Détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatum* par une substance. Norme expérimentale T 90-304, 6 p..
- BARBER R.T., RYTHER I.H. (1969). Organic chelators factor affecting primary production in the Cromwell Current upwelling. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*; 3: 191-199.
- BLANDIN P. (1986). Bioessais et bioévaluation, 233-243, In : Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bull. Ecol.*, 17, 4.
- BLANKLEY W.F. (1973). Toxic and inhibitory materials associated with culturing, 207-229. Handbook of Phycological methods : Cambridge University Press.
- BONIN D.J., DROOP M.R., MAESTRINI S.Y., GONIN M.C. (1986). Physiological features of six micro-algae to be used as indicators of sea water quality. *Cryptogamie, Algologie*, 7(1): 23-83.
- CHIAUDANI G., VIGHI M. (1978). The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 21: 316-329.
- CROUZET F., VILLESOT D. (1987). Biodisponibilité du phosphore. Aspects chimiques, biochimiques et environnementaux 107-135, In : *Point sur l'épuration et le traitement des effluents*. Volume 3. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- EPA (1978). The *Selenastrum capricornutum* algae assay bottle test. National eutrophication research program. EPA Pacific northwest laboratory, Corvallis, Oregon.
- HANNAN P.J., PATOUILLET C. (1976). Lack of Correlation between the composition of sediments and their toxicity to algal N.R.L. Report 8019, Washington DC, 18 p..
- HANNAN P.J., PATOUILLET C.E. (1979). Results of an algal toxicity test applied to sediment elutriates. N.R.L. Report 3952, Washington DC, 24 p..
- LACAZE J.C. (1973). Influence de l'éclairément sur la biodégradation d'un tensioactif non ionique utilisé pour la dispersion des nappes de pétrole en mer. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 277: 409-412.

- LACAZE J.C. (1976). Expériences de pollution en écosystèmes marins contrôlés. Applications aux produits pétroliers. *Oceanis*, 2: 1-115.
- LACAZE J.C. (1987). Evaluation du degré de pollution des sédiments marins au moyen d'un test sublétal, l'effet sur l'activité photosynthétique de l'algue planctonique *Phaeodactylum tricornutum* mesurée par assimilation de ^{14}C . *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 305(III): 515-520.
- LACAZE J.C., VILLEDON DE NAÏDE O. (1977). Effect of Organic Excretion by Benthic Annelida on the Productivity of Phytoplankton. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, 62(1): 153-155.
- LACAZE J.C., PAQUET F. (1989). Tests d'évaluation du degré de pollution des sédiments marins : effets sur la production de larves et la consommation d'algues chez le copépode *Tigriopus brevicornis*. *Rev. Sci. Eau*, 2(1): 1-12.
- LACAZE J.C., BORDALO A.A., CHESTERIKOFF A., OLLIVON D. (1989). Evaluation de l'état de santé des sédiments de la Seine (région parisienne) par l'emploi d'enceintes dialysantes. Effets sur le taux de croissance et la biomasse maximale de cultures de la microalgue *Selenastrum capricornutum*. *C.R. Acad. Sc.*, Paris, 308(III), 49-54
- MAESTRINI S.Y., DROOP M.R., BONIN D.J. (1984). Test algae as indicators of sea water quality : prospects In : L.E. Shubert (Ed.), *Algae as ecological indicators*. Academic Press London, pp. 133-188.
- SCOR-UNESCO (1966). Working group 17. Determination of photosynthetic pigments in sea water. *Monogr. Oceanogr. Method*. Unesco, (1).
- VISSER S.A., COUTURE P. (1981). Les effets de la matière organique dissoute d'une eau douce sur la croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.*, 15: 1355-1361.