



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

6134213

S/MZ
98/19

THESE

présentée devant

l'UNIVERSITE de METZ

UFR Sciences Fondamentales et appliquées

pour l'obtention du grade de Docteur

spécialité : Toxicologie de l'Environnement

par Anne KOSMALA

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19980405
Cote	S/M3 98/19
Loc	Magasin

**Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de
stations d'épuration sur les cours d'eau :
intérêt d'une approche intégrée**

soutenue le 5 juin 1998

Après avis de :

M. Christian BLAISE, Professeur, Centre St Laurent de Montréal, Canada
M. Michel ECHAUBARD, Professeur à l'INA-PG. Paris

Devant le Jury formé de :

Mme. Paule VASSEUR, Professeur, Université de Metz, présidente
M. Christian BLAISE, Professeur, Centre St Laurent de Montréal, Canada
M. Michael DEPLEDGE, Professeur, Université de Plymouth, Angleterre
(Rapporteur pour le Label Européen)

M. Michel...
Mme. Je...
M. Jean I...
M. Marc...
...s
...gref, Lyon
...ce, Université de Metz
...alie

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 221275 3

(Rapporteur pour le Label Européen)

THESE

présentée devant

l'UNIVERSITE de METZ

UFR Sciences Fondamentales et appliquées

pour l'obtention du grade de Docteur

spécialité : Toxicologie de l'Environnement

par Anne KOSMALA

<p>Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau : intérêt d'une approche intégrée</p>

soutenue le 5 juin 1998

Après avis de :

M. Christian BLAISE, Professeur, Centre St Laurent de Montréal, Canada
M. Michel ECHAUBARD, Professeur à l'INA-PG. Paris

Devant le Jury formé de :

Mme. Paule VASSEUR, Professeur, Université de Metz, présidente
M. Christian BLAISE, Professeur, Centre St Laurent de Montréal, Canada
M. Michael DEPLEDGE, Professeur, Université de Plymouth, Angleterre

(Rapporteur pour le Label Européen)

M. Michel ECHAUBARD, Professeur, INA-PG. Paris

Mme. Jeanne GARRIC, Chargée de recherche, Cemagref, Lyon

M. Jean François MASFARAUD, Maître de conférence, Université de Metz

M. Marco VIGHI, Professeur, Université de Milan, Italie

(Rapporteur pour le Label Européen)

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	7
Abstract.....	8
Liste des abréviations.....	9
Introduction.....	10

Chapitre 1. Contexte et mise en place du travail

1. CONTEXTE.....	12
1.1 CARACTÉRISTIQUES D'UN REJET DE STEP.....	13
1.2 CARACTÉRISATION DE L'IMPACT D'UN EFFLUENT DE SORTIE DE STEP.....	15
1.2.1 Approche physico-chimique de l'impact d'un effluent de STEP sur le milieu récepteur.....	16
1.2.2 Approche biologique in situ de l'impact d'un effluent de STEP.....	16
1.2.3 Approche biologique en conditions contrôlées de l'impact d'un effluent de STEP.....	17
1.2.4 Intérêt d'une approche pluridisciplinaire dans l'évaluation de l'impact d'un effluent de STEP.....	19
2. MISE EN PLACE DU TRAVAIL.....	21
2.1 OBJECTIF ET DÉMARCHE SCIENTIFIQUE.....	21
2.2 JUSTIFICATION DES CHOIX EXPÉRIMENTAUX.....	23
2.2.1 Mesures physico-chimiques dans le milieu récepteur et dans l'effluent.....	23
2.2.2 Mesures biologiques sur des invertébrés et des poissons prélevés in situ.....	23
2.2.3 Mesures biologiques sur des organismes exposés à l'effluent en conditions contrôlées.....	25
2.2.4 Mesures enzymatiques sur des poissons prélevés in situ ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées.....	25

Chapitre 2. Sites étudiés. Matériels et méthodes

1. SITES ÉTUDIÉS.....	27
1.1 CHOIX DES SITES.....	27
1.2 DESCRIPTION DES SITES.....	27
2. MESURES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE MILIEU RÉCEPTEUR ET SUR L'EFFLUENT.....	33
2.1 MESURES HYDRAULIQUES.....	33
2.2 CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE L'EFFLUENT ET DU MILIEU RÉCEPTEUR.....	33
3. MESURES BIOLOGIQUES SUR LES INVERTÉBRÉS ET LES POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> ...	35
3.1 MESURES BIOLOGIQUES SUR LES INVERTÉBRÉS DU MILIEU RÉCEPTEUR.....	35
3.1.1 Etude du peuplement d'invertébrés.....	35
3.1.2 Etude du cycle de développement d'une espèce d'invertébrés.....	36
3.2 MESURES BIOLOGIQUES SUR LES POISSONS DU MILIEU RÉCEPTEUR.....	38
3.2.1 Etude du peuplement piscicole.....	38
3.2.2 Etude de la population de chevaine.....	38
3.2.3 Mesures biologiques à l'échelle de l'individu.....	39
4. MESURES BIOLOGIQUES EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	40

4.1 BIOESSAIS MENÉS AU LABORATOIRE	40
4.2 MODIFICATIONS DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR LA PRISE EN COMPTE DE LA COMPLEXITÉ DE L'EXPOSITION <i>IN SITU</i>	42
5. RÉSUMÉ DES MESURES UTILISÉES	44
6. PLANS EXPÉRIMENTAUX.....	44
6.1 PLAN EXPÉRIMENTAL D'ÉTUDE SUR 3 SITES : BOURG-EN-BRESSE, CHÂTILLON ET MONTBRISON.....	44
6.2 PLAN EXPÉRIMENTAL D'ÉTUDE TEMPORELLE SUR LE SITE DE CHÂTILLON	45

<p>Chapitre 3. Etude sur trois sites : Bourg-en-Bresse, Châtillon et Montbrison. Résultats et discussions.</p>

1. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU RÉCEPTEUR ENTRE L'AMONT ET L'AVAL DE LA STEP ET DE L'EFFLUENT	ERREUR! SIGNET NON DÉFINI.
1.1 ANALYSES EN CARBONE, AZOTE ET PHOSPHORE DANS LE MILIEU RÉCEPTEUR ET DANS L'EFFLUENT.....	47
1.1.1 Analyses en carbone, azote et phosphore dans l'eau de la rivière et dans l'effluent.....	47
1.1.2 Analyses en carbone, azote et phosphore dans les sédiments.....	49
1.2 ANALYSE DES MICROPOLLUANTS DANS LE MILIEU RÉCEPTEUR ET DANS L'EFFLUENT	51
1.2.1 Concentrations métalliques dans les sédiments	51
1.2.2 Analyse des micropolluants organiques dans l'effluent.....	52
2. MESURES BIOLOGIQUES SUR DES ORGANISMES PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> OU EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	53
2.1 MESURES BIOLOGIQUES SUR DES POISSONS ET DES INVERTÉBRÉS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> EN AMONT ET EN AVAL DE LA STEP	54
2.1.1 Indice de qualité mesuré sur les invertébrés : application de l'Indice Biologique Global.....	54
2.1.2 Structure des peuplements piscicoles.....	55
2.1.3 Facteurs de condition des loches, goujons et chevaines.....	58
2.2 MESURES BIOLOGIQUES SUR DES ORGANISMES EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES	59
2.2.1 Tests de toxicité.....	59
2.2.2 Modification du protocole du test de toxicité sur la cériodaphnie pour la prise en compte de la complexité de l'exposition <i>in situ</i>	60
3. MESURES BIOCHIMIQUES SUR DES POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> OU EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	62
3.1 MESURE DE L'ACTIVITÉ EROD SUR DES POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> OU EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	62
3.2 MESURE DE L'ACTIVITÉ AChE SUR DES POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> OU EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	63
4. SYNTHÈSE ET DISCUSSION.....	65
4.1 EVALUATION DE L'IMPACT DES EFFLUENTS DE STEP SUR TROIS SITES	65
4.2 VARIATIONS DE L'IMPACT DE L'EFFLUENT DE STEP EN FONCTION DU SITE	69

Chapitre 4. Etude temporelle sur le site de Châtillon.

Résultats et discussions

1. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU RÉCEPTEUR ENTRE L'AMONT ET L'AVAL DU REJET DE LA STEP ET DE L'EFFLUENT.....	71
1.1 ETUDE DES DÉBITS DE LA RIVIÈRE ET DE L'EFFLUENT DE STEP	71
1.1 ANALYSES EN CARBONE, AZOTE ET PHOSPHORE DANS LE MILIEU RÉCEPTEUR ET DANS L'EFFLUENT.....	73
1.1.1 Analyses mensuelles en carbone, azote et phosphore des eaux de la Chalaronne et de l'effluent	73
1.1.2 Analyse bisannuelle en carbone, azote et phosphore des sédiments de la Chalaronne prélevés sur plusieurs stations.....	79
1.2 ANALYSE DES MICROPOLLUANTS DANS LE MILIEU RÉCEPTEUR	82
1.2.1 Analyse des métaux dans les sédiments.....	83
1.2.2 Analyses des micropolluants organiques dans les sédiments et dans les chevaines.....	84
2. MESURES BIOLOGIQUES SUR DES INVERTÉBRÉS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> OU EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	87
2.1 MESURES BIOLOGIQUES SUR DES INVERTÉBRÉS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> ENTRE L'AMONT ET L'AVAL DU REJET DE LA STEP	87
2.1.1 Indice de qualité biologique mesuré à l'aide des invertébrés.....	87
2.1.2 Etude biocénotique approfondie	90
2.1.3 Evolution du peuplement d'Hydropsyche	94
2.1.4 Structure de la population d'Hydropsyche angustipennis.....	95
2.1.5 Etude morphologique d'Hydropsyche angustipennis.....	98
2.2 TOXICITÉ CHRONIQUE DE L'EFFLUENT MESURÉE AU LABORATOIRE SUR <i>CERIODAPHNIA DUBIA</i>	100
2.3 RELATIONS ENTRE LES MESURES BIOLOGIQUES SUR INVERTÉBRÉS <i>IN SITU</i> ET EN CONDITIONS CONTRÔLÉES ET LES ÉTUDES PHYSICO-CHIMIQUES.....	103
3. MESURES BIOLOGIQUES SUR DES POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> OU EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	105
3.1 MESURES BIOLOGIQUES SUR DES POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> ENTRE L'AMONT ET L'AVAL DU REJET DE LA STEP	105
3.1.1 Etude du peuplement piscicole.....	106
3.1.2 Structure de la population de chevaines	108
3.1.3 Facteur de condition mesuré sur les chevaines, les loches et les goujons.	111
3.2 MESURES DE L'ACTIVITÉ EROD DE POISSONS PRÉLEVÉS <i>IN SITU</i> ET DE POISSONS EXPOSÉS À L'EFFLUENT EN CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	112
3.2.1 Mesures de l'activité EROD chez des chevaines prélevés in situ.....	112
3.2.2 Mesures de l'activité EROD chez des loches prélevés in situ	115
3.2.3 Mesures de l'activité EROD chez des poissons exposés à l'effluent sur site, dans des bassins de dérivation.....	115
4. SYNTHÈSE ET DISCUSSION.....	119
4.1 EVALUATION DE L'IMPACT DE L'EFFLUENT DE LA STEP DE CHÂTILLON	119
4.2 VARIATIONS DE L'IMPACT DE L'EFFLUENT DE LA STEP DE CHÂTILLON DANS LE TEMPS.....	122

Chapitre 5. Discussion générale et conclusion

1. APPORT RESPECTIF DES DIFFÉRENTES MÉTHODES MISES EN ŒUVRE DANS LE CADRE DE NOTRE APPROCHE INTÉGRÉE	124
1.1 COMPARAISON DES DIFFÉRENTES MÉTHODES	124
1.1.1 <i>Comparaison des méthodes selon des critères d'ordre scientifique</i>	124
1.1.2 <i>Comparaison des différentes méthodes selon des critères d'ordre économique</i>	125
1.2 INTERPRÉTATION DE NOTRE APPROCHE INTÉGRÉE SELON LA TRIADE	126
2. PERSPECTIVES	128
2.1 PROPOSITION DE MÉTHODOLOGIES DE MESURE DE L'EFFET DES EFFLUENTS DE STEP	128
2.2 SOLUTIONS POUR LIMITER L'IMPACT DES EFFLUENTS DE STEP	131
2.3 AMÉLIORATION DES DIFFÉRENTES APPROCHES UTILISÉES	132
2.3.1 <i>Autres mesures à envisager pour l'évaluation de l'impact des effluents de STEP</i>	132
2.3.2 <i>Evolution de l'approche biologique in situ</i>	132
2.3.3 <i>Evolution de l'approche biologique en conditions contrôlées</i>	133
2.3.4 <i>Evolution de l'approche intégrée</i>	135
Références bibliographiques.....	136
Annexes.....	155

RESUME

Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau : intérêt d'une approche intégrée.

Les effluents de station d'épuration (STEP) se déversent continuellement dans les cours d'eau à l'aval des agglomérations. En plus de la matière organique, ils apportent à la fois des nutriments et des micropolluants. Si les effets des effluents dus aux matières organique et minérale sont relativement bien connus, on s'interroge encore sur l'impact des micropolluants. Pour caractériser l'impact d'un effluent de STEP, nous avons choisi une approche intégrée, combinant des analyses chimiques des nutriments et des micropolluants et des mesures biologiques sur les invertébrés et les poissons telles que des études de structure des communautés ou l'utilisation de marqueurs morphologiques, physiologiques ou biochimiques. Les études *in situ* utilisées conjointement avec les mesures en conditions contrôlées nous ont permis de proposer un lien de cause à effet entre les potentialités toxiques d'un effluent et les perturbations observées sur l'écosystème.

Un profil analytique et toxicologique de l'impact des effluents de STEP s'est dégagé de notre étude sur trois cours d'eau. Par les mesures *in situ*, nous avons mis en évidence l'impact de perturbations annexes et notamment de la pollution apportée par les déversoirs d'orage placés sur le réseau d'assainissement et rejetant en amont de la STEP. Ce premier travail a confirmé l'importance des variations de l'impact des effluents de STEP et nous a conduit à prendre en compte le facteur temps sur un seul site d'étude.

Grâce à l'utilisation de nombreuses méthodes, nous avons pu préciser l'impact d'un effluent. Des perturbations au niveau de la communauté d'invertébrés benthiques ont été mises en évidence et des relations ont pu être établies entre la présence de quelques contaminants et les effets constatés. De plus, nous avons observé que l'impact le plus important, mesuré en été, ne s'explique pas uniquement par une concentration plus élevée de l'effluent dans la rivière.

Nous avons classé nos méthodes selon leur pouvoir de discrimination de l'effet mais aussi selon leur pertinence écologique, leur capacité à identifier les agents polluants et leur simplicité d'utilisation. De plus, notre approche intégrée analysée selon la triade de Chapman (1986) a permis une meilleure interprétation de l'impact. Finalement, grâce à notre classement des méthodes, nous proposons une démarche intégrée opérationnelle d'évaluation de l'impact d'un effluent de STEP qui combine la mesure d'un indice biologique global (IBG), le test de toxicité chronique sur cériodaphnie et la mesure de la concentration en ammonium.

Mots-clés : effluent de station d'épuration, mesures biologiques, invertébrés, poissons, évaluation de l'impact, approche intégrée

ABSTRACT

Ecotoxicological assessment of wastewater treatment plant effluent in rivers : interest of an integrated approach.

Wastewater treatment plant (WWTP) effluents are continuously discharged in rivers downstream from towns. They bring organic matter, nutrients and micropollutants. If the effects of effluents due to organic and mineral matter are well known, doubts remain as to the impact of micropollutants.

In order to characterize the impact of a WWTP effluent, we chose an integrated approach combining both chemical analyses on organic matter, nutrients and micropollutants and biological measurements on invertebrates and fish such as community structure studies or the use of morphological, physiological or biochemical markers. We used both field assessments and controlled conditions experiments, which allowed us to propose a cause-effect relationship between observed ecosystem disturbances and potential effluent toxicity.

We identified an analytical and toxicological profile of WWTP effluent from our study on three rivers. Through field studies, we revealed side effects such as pollution brought by stormwater overflow upstream from the WWTP discharge.

This first part of our work confirmed the importance of WWTP effluents impact variations and led us to take into account the time factor on one site study. Thanks to various methods, we specified the impact of a WWTP effluent. We evidenced disturbances on invertebrates and we managed to link contaminants presence with observed effects. Moreover, we noticed that the most important impact, measured in summer, is not only due to the instream waste concentration.

We classified our methods according to their effect discrimination ability, their ecological relevance, their capacity to identify causative agents but also following their simplicity of use. Our integrated process using Chapman Triad's approach allowed for a better impact interpretation. Finally, thanks to our methods classification, we propose an operational integrated process to evaluate the impact of a WWTP effluent through a biological index, a chronic toxicity test and ammonium concentration measure.

Key-words : wastewater treatment plant effluent, biological measurements, invertebrates, fish, impact assessment, integrated approach

Liste des abréviations

ACHé :	Acétylcholinestérase
ACP :	Analyse en composantes principales
AFC :	Analyse factorielle des correspondances
ANOVA :	Analyse de variance
APEO :	Alkylphénolpolyéthoxylés
BA :	Boues activées
bNF :	β -naphthoflavone
CER :	Concentration de l'effluent dans la rivière
CE _x :	Concentration conduisant à un effet de x%
CIRSEE :	Centre international de recherche sur l'eau et l'environnement
COD :	Carbone organique dissous
COT :	Carbone organique total
DBO ₅ :	Demande biochimique d'oxygène en 5 jours
DCO :	Demande chimique en oxygène
DDT :	Dichlorodiphényltrichloréthane
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELS :	Stades embryo-larvaire
EH :	Equivalent-habitant
EROD :	Ethoxyrésorufine-O-dééthylase
FC :	Facteur de condition
GC-SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC-FID-ECD:	Chromatographie en phase gazeuse avec détection en ionisation de flamme et capture d'électrons
GPQEE :	Grand Programme Qualité - Epuration des Eaux
HAP :	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCB :	Hexachlorobenzène
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
IBG(N) :	Indice biologique global (normalisé NF T90-350)
IC _x :	Intervalle de confiance à x%
Ir :	Indice de résistance
LAS :	Alkylbenzènesulfonate linéaire
LDA :	Laboratoire départemental d'analyses
MES :	Matières en suspension
NOEC :	Concentration sans effet observé
NPEO :	Nonylphénolpolyéthoxylés
NTA :	Acide nitrilotriacétique
PCB :	Polychlorobiphényles
RHS :	Rapport hépatosomatique
RNB :	Réseau national de bassin
RNDE :	Réseau national de données sur l'eau
STEP :	Station d'épuration
TIE :	Identification et évaluation des toxiques
USEPA :	Agence de la protection de l'environnement des Etats-Unis

Introduction

Avec l'essor des activités humaines, notre environnement subit de nombreuses agressions physiques causées par les aménagements mais également chimiques dues aux pollutions. L'urbanisation qui a conduit à la concentration de l'habitat humain et de l'industrie a entraîné une difficulté croissante dans la gestion de nos déchets. Elément constitutif de notre environnement, l'eau est une ressource vitale pour tous les êtres vivants mais est aussi devenue, avec la concentration urbaine, le récepteur et le vecteur de nombre de nos déchets. A l'intérieur des villes s'est alors posé le problème du devenir des eaux usées collectées. Si, dans les pays en voie de développement, les eaux usées, peu contaminées par les déchets industriels, sont déversées directement dans le milieu récepteur ou servent à l'irrigation, dans les pays industrialisés, celles-ci sont épurées dans des stations d'épuration (STEP) avant d'être rejetées dans le milieu récepteur. L'épuration recherchée est loin d'être totale. Ainsi, nos cours d'eau et les communautés vivantes en place sont soumis à cette pollution résiduelle en plus de rejets industriels non raccordés à la STEP et des contaminations diffuses provenant de l'agriculture.

La prise de conscience des dangers que représentent les polluants pour la santé publique a conduit les gouvernements à une réflexion sur les problèmes de rejets urbains. La directive européenne du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires a imposé des niveaux d'épuration et une gestion intégrée des systèmes aquatiques reprise dans la loi sur l'eau de janvier 1992. En 1991, le gouvernement français, représenté par le Ministère de l'Environnement et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, a élaboré le « Grand Programme Qualité - Epuración des Eaux » (GPQEE) dans le but d'appréhender les effets des rejets urbains sur les écosystèmes aquatiques. Ont participé à ce programme intitulé « Caractérisation et impact des effluents liquides urbains dans le milieu récepteur », le CIRSEE (Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement) de la Lyonnaise des Eaux, Anjou-Recherche de la Compagnie Générale des Eaux, l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) et le Cemagref.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'impact des effluents de STEP sur le milieu aquatique. Pour connaître l'impact provoqué par un rejet à caractère ponctuel et pérenne qu'est un effluent de STEP, nous proposons une étude intégrée. Notre étude intégrée se définit comme une étude pluridisciplinaire où nous avons utilisé ensemble l'approche physico-chimique et l'approche biologique pour des observations de terrain et des expériences en conditions contrôlées.

Dans le chapitre 1, après avoir décrit les rejets de STEP et leur composition ainsi que les effets qu'ils génèrent, nous proposons une stratégie d'étude de l'impact des effluents de STEP sur le milieu naturel dont nous exposons les méthodes dans le chapitre 2.

Notre travail expérimental se divise en deux parties.

Dans un premier temps (chapitre 3), notre étude s'est portée sur trois sites. Les mesures des effets des effluents sur le milieu aquatique et l'évaluation de leur toxicité au laboratoire nous ont permis de caractériser l'impact des STEP en tenant compte des caractéristiques du milieu naturel et du rejet.

Compte tenu des résultats obtenus, nous avons, dans un second temps, essayé d'affiner notre étude en choisissant un site unique : la Chalaronne (chapitre 4). Nous avons tenu compte dans cette seconde étape de l'aspect temporel de l'impact, ce qui permet de travailler à des niveaux plus précis d'évaluation.

Dans les chapitres 3 et 4, nous discutons les résultats obtenus et les méthodes utilisées.

Dans le chapitre 5, nous discutons de l'intérêt d'une approche intégrée pour l'évaluation d'un impact de l'effluent de STEP sur le milieu dans la perspective d'une démarche opérationnelle.

Chapitre 1. Contexte et mise en place du travail

Dans ce chapitre, nous exposons ce qu'est un effluent de STEP et quelles sont les différentes approches mises en œuvre jusqu'à présent dans le cadre de l'évaluation de l'impact des rejets de STEP. Nous soulignerons l'intérêt d'une approche pluridisciplinaire par les exemples existants dans la littérature (contexte).

Le développement de ce dernier point nous amènera à justifier l'approche intégrée ainsi que les méthodes utilisées dans le cadre de ce travail de thèse (mise en place du travail).

1. Contexte

En France, le rendement d'épuration moyen des eaux usées dans une STEP atteint 70% (Gueltier, 1994). Les pays d'Europe les plus avancés dans le domaine de l'épuration des eaux usées sont les pays scandinaves et l'Allemagne (Botterweg & Risselada, 1993). Ainsi, il existe en Europe une opposition entre les pays de l'Europe du Nord et de l'Ouest où la recherche en épuration se fait sur des techniques innovantes et coûteuses et les pays d'Europe de l'Est, demandeurs de solutions simples et bon marché pour l'épuration de leurs eaux usées.

Il existe actuellement 11 000 STEP en France dont :

- quelques grandes unités de capacité supérieure ou égale à 10 000 EH (équivalent-habitant¹). Plus de 50% des eaux usées sont traitées dans seulement 160 STEP (2% des STEP),
- une majorité de petites usines de capacité inférieure à 10 000 EH.

Les STEP de plus de 10 000 EH atteignent un rendement compris entre 60 et 70% mais la moyenne tombe à 50% pour les STEP comprises entre 1 000 et 2 000 EH (Nadeau, 1995).

L'eau, provenant de l'usage domestique et industriel, est collectée puis acheminée puis épurée dans une STEP avant d'être rejetée en rivière. Les STEP sont conçues pour épurer les eaux usées et limiter ainsi l'apport en excès de matière organique et, dans certains cas, de substances minérales telles que les nitrates et les phosphates dans les milieux récepteurs (rivières, lacs, mers). Une STEP est dimensionnée en fonction de concentrations en matière en suspension, matière organique, matière azotée et phosphorée à ne pas dépasser dans l'effluent de sortie². Les problèmes relatifs à l'apport de micropolluants³ par les effluents de STEP sont encore peu étudiés. De plus, la prise en compte de l'impact des rejets de STEP sur le milieu récepteur dans le traitement des eaux usées est récente puisque la directive européenne de mai 91⁴ exige la définition de zones sensibles où une épuration plus complète des eaux usées est demandée notamment pour les nitrates et les phosphates.

¹ Correspond à 57 g de matières oxydables/j, 90 g de MES/j, 15 g d'azote/j et 4 g de phosphore/j.

² Fixés en France par le décret n° 94-469 du 3 juin 1994 du Ministère de l'Environnement.

³ Polluants chimiques présents en faible concentration (du mg/l au ng/l) mais pouvant être toxique.

⁴ Directive 91/271/CEE du 21 mai 1991.

L'épuration de l'eau est une transformation de la pollution puisqu'elle entraîne la production de boues constituées de matières sédimentées et de bactéries en excès provenant du traitement. Ces dernières ne pourront bientôt être qu'incinérées ou utilisées en agriculture, ce qui peut poser le risque de pollution à long terme du sol par les micropolluants présents (Robert *et al.*, 1994 ; Nadeau, 1995). Le fonctionnement des STEP est décrit dans l'annexe 1.

1.1 Caractéristiques d'un rejet de STEP

Il est entendu que, notre travail étant focalisé sur l'impact du rejet de STEP sur le milieu récepteur, le terme d'effluent utilisé seul tout au long de ce manuscrit désigne par défaut l'effluent de sortie de STEP.

• *Caractéristiques générales*

Après traitement en STEP, l'eau épurée est amenée par une conduite à la rivière où elle est déversée. Le rejet est bien localisé mais il peut y avoir, à proximité de ce rejet, des déversements annexes tels que les rejets ponctuels d'industriels non raccordés à la STEP. Peuvent aussi s'ajouter les flux épisodiques :

- des déversoirs d'orage⁵ placés sur le réseau amenant les eaux usées à la STEP, dans le cas d'un assainissement de type « unitaire » où les eaux usées et les eaux de pluie empruntent les mêmes tuyaux,
- des réseaux véhiculant l'eau de pluie, dans le cas d'un assainissement de type « séparatif » où les eaux de pluie et les eaux usées sont séparées.

De plus, un déversoir est souvent placé en tête de STEP pour réguler le débit en temps de pluie et permettre ainsi un traitement optimum de l'effluent qui rentre dans la STEP (Neiheisel *et al.*, 1988). Les eaux non épurées rejetées par ce déversoir rejoignent la rivière au niveau de la STEP par la même canalisation que l'eau épurée. Il est donc impossible de mesurer l'impact de l'eau épurée de STEP sans tenir compte des eaux de ce déversoir.

La STEP est placée à la périphérie de la ville qui produit les eaux usées et à proximité de la rivière. La rivière reçoit l'effluent de celle-ci après avoir généralement traversé la ville toujours située en amont de la STEP.

Un rejet de STEP se déverse continuellement dans la rivière. Sa composition est variable en quantité et en qualité à différentes échelles de temps : la journée, la semaine, le mois et l'année. Elle dépend de la quantité et de la qualité de l'effluent entrant dans la STEP. Cette dernière est souvent liée à l'activité industrielle (Bagot *et al.*, 1993 ; Kari & Giger, 1996) mais aussi à la pluie dans le cas des réseaux unitaires. La composition du rejet est également fonction de la qualité du traitement assuré par les bactéries. Il peut arriver que des bactéries soient rejetées dans la rivière avec l'eau épurée lors de dysfonctionnements dus à des conditions particulières (forte pluviométrie couplée à une conception non optimum de la STEP, problèmes biologiques,...) : on parle alors de fuite de boues.

• *Composition chimique d'un effluent de sortie de STEP*

Le pH de l'eau épurée est voisin de la neutralité. Sa conductivité est souvent plus élevée que celle du milieu récepteur (de l'ordre de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Les teneurs en oxygène dissous sont faibles ($<4 \text{ mg/l d'O}_2$).

Les effluents de sortie de STEP peuvent contenir :

- des algues qui se développent dans les décanteurs,
- des bactéries provenant du traitement par boues activées (Delsart *et al.*, soumis),
- des germes pathogènes (bactéries et virus) provenant des déchets humains (GPQEE, 1993 ; 1995a et b),
- des micropolluants,
- des composés phosphorés et azotés dont l'ammoniac (Burkhard & Jenson, 1993) et les substances eutrophisantes que sont les nitrates et les phosphates,
- des matières en suspension (MES),
- de la matière organique caractérisée par les demandes chimique et biochimique en oxygène (DCO et DBO_5) (House *et al.*, 1992). Les concentrations en MES, DCO et DBO_5 dépendent du procédé retenu et du dimensionnement de la STEP. Pour des STEP de traitement biologique de moyenne à faible charge⁶, les effluents de sortie contiennent entre 10 et 30 mg/l de MES, entre 50 et 100 mg/l de O_2 en DCO et entre 10 et 30 mg/l de O_2 en DBO_5 . La phase dissoute est plus importante que la phase particulaire puisque 90% des constituants s'y trouvent ce qui représente 70% de la matière organique totale (Rickert & Hunter, 1971). Cette matière organique est composée d'une partie difficilement biodégradable, mais aussi d'une partie biodégradable non biodégradée (Nguyen, 1995).

La Figure 1 résume les principaux micropolluants rencontrés dans un effluent de sortie de STEP classés en grandes familles ainsi que les concentrations correspondantes. Ces teneurs sont variables. La plupart des polluants organiques prioritaires (132 molécules de la liste I de la directive CEE 76/464) sont présents dans les effluents de STEP mais à de faibles concentrations (de l'ordre du $\mu\text{g/l}$) même si certains composés ont été détectés à des concentrations beaucoup plus fortes. La quantification précise de ces composés est difficile car ils sont présents à des concentrations souvent inférieures à la limite de détection des techniques analytiques (Petrasek *et al.*, 1983).

⁵ Ouvrage placé sur les réseaux d'assainissement unitaires permettant de rejeter directement dans le milieu une partie des effluents lorsque le débit dépasse une certaine valeur afin d'éviter de surcharger la STEP.

⁶ Charge volumique inférieure à 3 kg $\text{DBO}_5/\text{m}^3/\text{j}$.

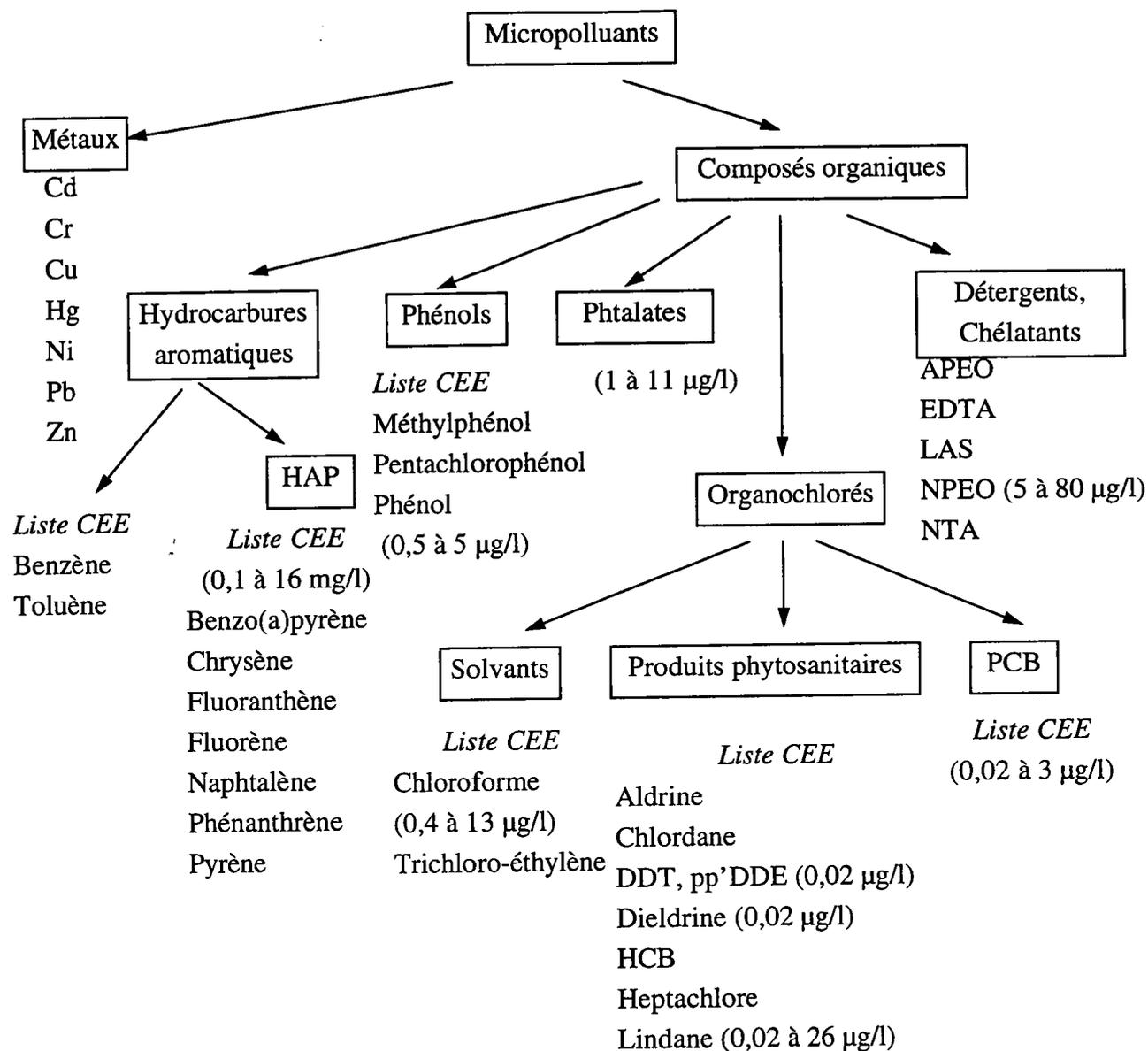


Figure 1 : Principaux micropolluants détectés dans les effluents épurés de STEP (d'après McIntyre et al., 1981 ; De Alencastro & Tarradellas, 1983 ; Petrasek et al., 1983 ; Melcer et al., 1995 ; Granier et al., 1990 ; Ahel et al., 1994a ; Guenter & Giger, 1996 ; Paxeus, 1996 ; Rogers, 1996 ; Stubin et al., 1996). Liste CEE : polluant appartenant à la liste des 132 polluants organiques prioritaires de la liste I de la directive CEE 76/464 (circulaire n°90-55, 1990).

Comparativement aux rejets de STEP, les rejets provenant des déversoirs d'orage ont une phase particulière importante qui contient de la matière organique, de l'ammoniac, des micropolluants (HAP - hydrocarbures aromatiques polycycliques - et métaux) et des bactéries pathogènes (Faucon, 1995 ; Mouchel, 1995 ; Ollivon et al., 1995).

1.2 Caractérisation de l'impact d'un effluent de sortie de STEP

Différentes approches permettent d'évaluer les effets des rejets de STEP sur le milieu récepteur.

1.2.1 Approche physico-chimique de l'impact d'un effluent de STEP sur le milieu récepteur

Relativement faciles à obtenir, les résultats de l'analyse chimique ont traditionnellement servi à l'élaboration des critères de qualité d'eau. Cependant, si la mesure des concentrations de composés dans les différents compartiments de l'environnement aquatique permet d'évaluer l'exposition des organismes aux polluants, celle-ci ne permet pas d'en prédire les effets. De plus, cette mesure est toujours très incomplète par rapport au nombre de polluants présents dans un effluent.

A l'aval des STEP, on constate un enrichissement des sédiments en matière organique (Servais *et al.*, 1993 ; van Dijk *et al.*, 1994), en composés azotés et phosphorés (Gaultier *et al.*, 1992 ; Martin, 1992 ; Garban *et al.*, 1995). D'autre part, dans les sédiments et les organismes à l'aval des STEP, il peut y avoir accumulation de :

- métaux et notamment cuivre, plomb et zinc (Brown *et al.*, 1986 ; Moon *et al.*, 1994 ; Bubb & Lester, 1994),
- molécules organiques biodégradables utilisées dans les détergents tels que les APEO (alkylphénolpolyéthoxylés) ou le LAS (alkylbenzènesulfonate linéaire) (Larson & Payne, 1981 ; Cavalli *et al.*, 1993 ; Ahel *et al.*, 1994b),
- molécules organiques peu dégradables telles que les PCB (polychlorobiphényles), des produits phytosanitaires (le DDT - dichlorodiphényltrichloréthane - , l'HCB - hexachlorobenzène - , le chlordane, la dieldrine,...), des HAP (Miskiewicz & Gibbs, 1994 ; Ollivon *et al.*, 1995).

1.2.2 Approche biologique *in situ* de l'impact d'un effluent de STEP

La biocénose⁷ du milieu récepteur peut être étudiée à travers différents niveaux d'organisation biologique : individu, population, communauté. L'étude à travers ces différents niveaux est préconisée par Ramade (1992) pour une approche écotoxicologique complète dans l'étude des effets des toxiques et par Karr (1993) pour mieux appréhender le fonctionnement d'un écosystème.

L'étude de la biocénose du milieu récepteur soumis à l'impact d'un effluent de STEP apporte les résultats les plus intégrateurs et les plus directement interprétables en terme de gestion dans la limite de la prise en compte des interactions multiples existant sur le terrain (Chapman, 1986 ; Krantzberg & Boyd, 1992).

Seules les études *in situ* permettent de connaître la dimension spatiale de l'impact d'un rejet. Elles peuvent également permettre d'estimer la dimension temporelle d'un impact à condition de prendre un minimum de précautions. Ainsi, la période d'échantillonnage d'un groupe d'organismes du milieu doit être choisie en fonction de la biologie de ce groupe, de sa réponse

⁷ Ensemble des être vivants composant un écosystème.

à la pollution et des facteurs environnementaux afin d'appréhender au mieux la variation de la réponse due à ces facteurs. Les variations saisonnières de la composition des effluents et celles qui sont constatées au niveau du milieu récepteur compliquent d'autant l'appréciation de l'impact (Monda *et al.*, 1995a).

La difficulté de trouver des sites de référence, de sélectionner les critères permettant la détection d'une perturbation, d'établir les relations de cause à effet directes entre les niveaux de contaminants et les effets biologiques utilisés constitue les limites des études *in situ*.

Dans certains cas, entre l'amont et l'aval des STEP, on peut constater :

- une modification des activités enzymatiques des bactéries et donc des capacités d'auto-épuration (Martin, 1979 ; GPQEE, 1993 ; Montuelle & Volat, sous presse) et une différence dans la composition des populations bactériennes (GPQEE, 1995b ; Kang & Goulder, 1996 ; GPQEE, 1997).
- une modification des peuplements de végétaux
- des changements dans la faune d'invertébrés benthiques allant parfois jusqu'à la disparition des organismes en aval. Le plus souvent, on observe une diminution de la diversité spécifique et une prolifération de quelques espèces tolérantes (Kondratieff & Simmons, 1982 ; Pontash *et al.*, 1989 ; Monda *et al.*, 1995b). Ces changements peuvent être détectés à différents niveaux taxonomiques⁸ de la faune benthique. Des changements auraient même été décelés au niveau des groupes fonctionnels trophiques qui rendent compte de modifications dans les modes de nutrition (Birge *et al.*, 1989 ; Wright *et al.*, 1995). Ainsi, selon Birge *et al.*, la fonction de collecteur-ramasseur serait favorisée en l'aval de STEP contrairement à celle de collecteur-filtreur qui se trouve minoritaire,
- l'apparition de poissons parasités, hermaphrodites (Purdom *et al.*, 1994) et des modifications dans la communauté piscicole et notamment une diminution du nombre d'espèces allant parfois jusqu'à la disparition totale des poissons (Karr *et al.*, 1985 ; Neihsel *et al.*, 1988).

1.2.3 Approche biologique en conditions contrôlées de l'impact d'un effluent de STEP

Les bioessais sur effluent brut sont utilisés pour mesurer la toxicité effective de ces effluents et pour estimer les impacts potentiels d'effluents complexes sur les écosystèmes aquatiques (Birge *et al.*, 1989).

Ces tests sont relativement faciles à utiliser, reproductibles et standardisés ce qui permet des comparaisons directes entre les espèces et les effluents et la détermination de relations dose - effet. Depuis les années 80, il est admis sur le plan international que ces essais sont des outils indispensables pour le contrôle de la toxicité de rejets (OCDE, 1987). L'intérêt des tests de laboratoire repose sur la possibilité de maîtriser certaines conditions biotiques (espèce, âge, prédation) et abiotiques (photopériode, température, composition physico-chimique des

⁸ Unité systématique homogène à un niveau de détermination fixé.

milieux) qui autorise une standardisation des méthodes et donc une comparaison des résultats obtenus sur différentes espèces et par plusieurs laboratoires. Leur caractère évidemment réducteur peut être amélioré par l'exploitation des informations apportées par une batterie d'essais regroupant des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques.

Ces essais se caractérisent aussi par l'échelle de temps durant laquelle l'impact d'un échantillon est observé et par le type de perturbation suivi. Certains tests visent à déterminer les effets à court terme d'un effluent, d'autres s'intéressent à des effets sublétaux à plus long terme ou bien à des effets spécifiques.

Les bioessais utilisent des espèces de laboratoire souvent non indigènes et dont l'homogénéité génétique masque les capacités d'adaptation des populations naturelles qui présentent une variabilité génétique plus grande ; ils ne prennent pas en compte les interactions entre les espèces et sont conduits dans des conditions physico-chimiques différentes de celles de l'habitat naturel (Pontasch *et al.*, 1989). Ainsi, les tests de toxicité sont critiqués pour leur manque de réalisme écologique et leur incapacité à estimer les effets directs ou indirects des contaminants à des niveaux supérieurs d'organisation biologique (Cairns, 1983 ; Odum, 1984). De plus, à cause des variations temporelles de la qualité de l'eau, les tests de toxicité chronique conduits avec l'eau prélevée à un moment donné peuvent ne pas refléter les conditions moyennes d'exposition d'un écosystème d'eau douce. Alors que l'écotoxicologie, jusque dans les années 80, s'est contentée de fournir un grand nombre de tests de toxicité en vue d'une normalisation, il semble donc aujourd'hui important de réfléchir sur la réalité écologique de tels tests (Sloof, 1983 ; Gilbertson, 1984 ; Lafont, 1989 ; Lafont & Mouthon, 1990 ; Forbes & Forbes, 1994).

Il existe plusieurs catégories de tests de toxicité, les plus simples étant les tests monospécifiques, et les plus complexes étant ceux réalisés *in situ* sur des communautés entières. Pour tous ces essais, il existe une relation inverse entre la simplicité et la réalité écologique (Calamari *et al.*, 1985). En effet, un bioessai réalisé au laboratoire est plus simple à mettre en oeuvre et donc beaucoup plus utilisé qu'un test *in situ* sur une communauté, mais il fournit des résultats beaucoup plus difficilement extrapolables au milieu naturel (Kimball & Levine, 1985). Ceci explique que plus de 90% des études de toxicité réalisées entre 1979 et 1987 se rapportent à des bioessais monospécifiques de laboratoire (Maltby & Calow, 1989). Des approches expérimentales *in situ* ajoutent un réalisme de terrain qui permet d'établir un lien direct entre les contaminants et les effets biologiques. Cependant, parce qu'ils intègrent les variations du milieu, les résultats obtenus par ces approches en sont d'autant plus divers et plus délicats à interpréter.

La toxicité d'un effluent est fonction de sa composition. Même si les teneurs en matières en suspension, matières organiques, azotées et phosphorées, principaux polluants contenus dans les rejets de STEP, sont inférieures aux normes retenues (voir § 1.1), un effluent peut se révéler toxique (Neiheisel *et al.*, 1983 ; Neiheisel *et al.*, 1988 ; Latif *et al.*, 1995). Le choix des méthodes de détection de la toxicité d'un effluent vis-à-vis des espèces vivantes est important. Actuellement en France, les autorisations de rejet ne reposent que sur un test de toxicité aiguë

normalisé sur *Daphnia magna* peu adapté à des pollutions faibles et à caractère pérenne que représentent les rejets de STEP (Vasseur *et al.*, 1991). En effet, alors que peu d'effluents de STEP montrent une toxicité à court terme⁹, beaucoup présentent une toxicité à long terme (Schroder *et al.*, 1991 ; Arbuckle & Alleman, 1992).

Par l'utilisation de tests, il a été montré que les effluents de STEP pouvaient provoquer différents effets biologiques et notamment altérer le patrimoine génétique des organismes testés et avoir un effet mutagène¹⁰ et cancérigène (Rappaport *et al.*, 1979 ; Saxena & Schwartz, 1979 ; Hrubec *et al.*, 1983 ; Meier & Bishop, 1985 ; Meier *et al.*, 1986).

Sur les poissons, on a observé que les effluents de STEP pouvaient :

- modifier l'activité d'enzymes (Förlin & Hansson, 1982b ; Bucher & Hofer, 1990),
- avoir des effets œstrogénisants qui peuvent être à l'origine de dysfonctionnements de la reproduction (Jobling & Sumpter, 1993 ; Purdom *et al.*, 1994),
- provoquer des lésions histologiques (Mitz & Giesy, 1985 ; Goede & Barton, 1990),
- causer une diminution de leur croissance (Foster *et al.*, 1994),
- entraîner l'augmentation de la taille de leur foie (Grizzle *et al.*, 1988).

1.2.4 Intérêt d'une approche pluridisciplinaire dans l'évaluation de l'impact d'un effluent de STEP

Chaque approche présentée dans les paragraphes précédents (approche physico-chimique, biologique *in situ* et conditions contrôlées) a ses limites (Tableau 1).

Tableau 1 : Analyse critique des mesures chimiques et biologiques *in situ* ou en conditions contrôlées utilisées dans le cadre de l'évaluation d'une pollution. D'après Johnson (1996).

Approche	Avantages	Inconvénients
Physico-chimique	<ol style="list-style-type: none"> 1. Détermination possible de critères de qualité 2. Approprié pour de simples rejets bien définis 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tous les contaminants présents ne peuvent pas être détectés 2. L'interaction entre les contaminants n'est pas considérée 3. Les normes peuvent ne pas être protectrices de l'environnement
Biologique <i>in situ</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tous les stress sont mesurés 2. Expression finale de la pollution 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Les normes ne sont pas définies 2. La cause de l'impact n'est pas identifiée
Biologique en conditions contrôlées	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tous les contaminants présents sont considérés 2. Les interactions sont considérées 3. Des normes peuvent être appliquées 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Données incomplètes sur l'agent responsable 2. Les mesures peuvent ne pas être prédictives de la réponse de l'écosystème

L'utilisation conjointe de ces différentes approches permet de palier à certains inconvénients de chaque approche prise isolément.

⁹ Temps d'exposition inférieur ou égal à 48h.

¹⁰ Qui engendre des mutations.

On peut noter que l'utilisation conjointe de l'approche chimique et biologique a permis l'identification des agents responsables des perturbations due aux rejets de STEP. Il a été relativement facile de montrer que :

- la prolifération excessive des végétaux aquatiques est due aux nitrates et aux phosphates (Garnier *et al.*, 1993 ; Barroin, 1995),
- la diminution d'oxygène est plutôt entraînée par la biodégradation de composés organiques,
- l'ammoniac contenu dans les effluents de STEP (Lloyd, 1989), qui est un produit de dégradation de la matière organique, explique, sous sa forme non ionisée, une grande part de la toxicité des effluents vis-à-vis des poissons et des invertébrés benthiques (Thurston *et al.*, 1986 ; Karr *et al.*, 1985 ; Monda *et al.*, 1995a),
- les rejets de microorganismes pathogènes (bactéries, virus) peuvent entraîner des pathologies sur la faune en place alors que les rejets de bactéries par les STEP modifient la composition bactérienne du milieu récepteur et par conséquent l'évolution des composés organiques et minéraux (GPQEE, 1995a).

Si, pour les composants majoritaires des rejets, la relation de cause à effet est relativement évidente, il n'en est pas de même pour les micropolluants. L'approche TIE (Toxicity Identification Evaluation) basée sur des techniques analytiques et des bioessais permet de parvenir à l'identification des agents responsables de la toxicité des rejets. Cette approche a permis de montrer, outre celle de l'ammoniac (Monda *et al.*, 1995b), la contribution respective des métaux (Nimmo *et al.*, 1989) et des composés organiques apolaires (Morris *et al.*, 1992 ; Burkhard & Jenson, 1993 ; Garric *et al.*, 1996) à la toxicité globale de l'effluent. L'analyse chimique couplée aux bioessais a permis d'identifier quelques produits responsables de la mutagénicité (dichlorométhane et APEO), de l'effet inducteur d'enzymes de détoxification (HAP) et de l'effet œstrogénisant (pesticides, PCB et NPEO - Nonylphénolpolyéthoxylés, produits de dégradation des APEO) des effluents de STEP (Förlin & Hansson, 1982b ; Purdom *et al.*, 1994).

Par contre, les relations de causes à effet *in situ* sont plus difficiles à déterminer à cause de l'influence de facteurs du milieu récepteur dans l'expression finale de la toxicité. A titre d'exemple, entre autres, de la complexité de la réalité de terrain, Rosso (1995) a montré que l'effet toxique des micropolluants sur les peuplements d'oligochètes dépendait du potentiel complexant des sédiments, que l'auteur définissait par les teneurs en carbone organique total, en fer, en manganèse et par l'abondance des sables.

Du fait du manque de réalisme des tests de laboratoire et des incertitudes associées aux mesures chimiques et biologiques *in situ*, des chercheurs ont recommandé des approches intégrées utilisant à la fois des analyses chimiques, des tests de toxicité et des mesures biocénologiques de terrain (Birge *et al.*, 1989; Eagleson *et al.*, 1990; Dickson *et al.*, 1992; Marshall *et al.*, 1992a et b ; Clements & Kiffney, 1994b ; Rizzoni *et al.*, 1995 ; Hartwell *et al.*, 1997). Les trois approches (analytique, toxicologique et biocénologique) apparaissent

indispensables et complémentaires (triade de Chapman, 1986). L'évaluation de la santé d'un écosystème doit faire appel à une telle approche pluridisciplinaire qui inclut, des évaluations chimiques, physiques, biologiques et statistiques de l'écosystème, et doit être perçue d'un point de vue structurel et fonctionnel (Munawar, 1992). Enfin, selon Bervoets *et al.* (1993, 1996), seule la combinaison de tests de laboratoire et d'études de terrain rend possible l'estimation de l'impact de l'effluent sur les organismes aquatiques et la discrimination entre l'effet du rejet ponctuel et la pollution d'autres origines.

Si certains auteurs se sont limités à utiliser une approche pluridisciplinaire, l'effort de conceptualisation en revient à Chapman (1986) qui présente un modèle de mesure de l'état de santé des sédiments : la triade. Celle-ci propose l'utilisation conjointe d'analyses physico-chimiques, de bioessais sur les sédiments prélevés *in situ* et de l'examen des biocénoses. En complément de la triade, Chapman (1990) propose une grille d'interprétation des résultats en fonction des réponses obtenues pour chaque approche (Tableau 2).

Tableau 2 : Informations apportées par l'analyse triadique (Chapman, 1990). Réponse significative (+) ou non significative (-) par rapport aux conditions de références.

Situation	Contamination du milieu	Bioessai	Mesure de la qualité biologique <i>in situ</i>	Conclusions possibles
1	+	+	+	Pollutions évidentes induites par les contaminants
2	-	-	-	Pas de pollution évidente
3	+	-	-	Contaminants non biodisponibles
4	-	+	-	Présence de contaminants non analysés ou de contaminations capables d'induire une dégradation du milieu
5	-	-	+	L'altération n'est pas due à des contaminants toxiques
6	+	+	-	Éléments toxiques stressant le système
7	-	+	+	Dégradation causée par des contaminants toxiques non mesurés
8	+	-	+	Éléments toxiques non biodisponibles, ou altération qui n'est pas due aux éléments toxiques

2. Mise en place du travail

2.1 Objectif et démarche scientifique

L'objectif de cette thèse est d'évaluer les effets de rejets de STEP sur le milieu aquatique d'eau douce et d'essayer d'en retirer une démarche opérationnelle de détection de l'impact de ce type de rejet sur le milieu récepteur.

Ainsi, dans notre travail, l'utilisation des approches physico-chimique, toxicologique et biocénotique pour évaluer l'impact d'un rejet de STEP sur le milieu récepteur est apparue intéressante pour tendre vers une description la plus complète possible des effets d'un effluent

de STEP sur le milieu. Nous avons donc suivi une approche pluridisciplinaire ou intégrée permettant :

- d'estimer le niveau de contamination chimique de différents compartiments (matrice vivante et inerte) du milieu ainsi que sa contamination potentielle en étudiant la composition de l'effluent
- d'évaluer *in situ* les perturbations biologiques liées au rejet et de déterminer la toxicité potentielle de l'effluent dans des conditions contrôlées.

Par la comparaison de mesures biologiques sur le milieu récepteur et sur l'effluent, nous avons tenté de distinguer l'impact de l'effluent de STEP des autres perturbations (Figure 2). Par le couplage des mesures physico-chimiques et biologiques, nous avons essayé d'identifier les agents polluants responsables des effets du rejet de STEP.

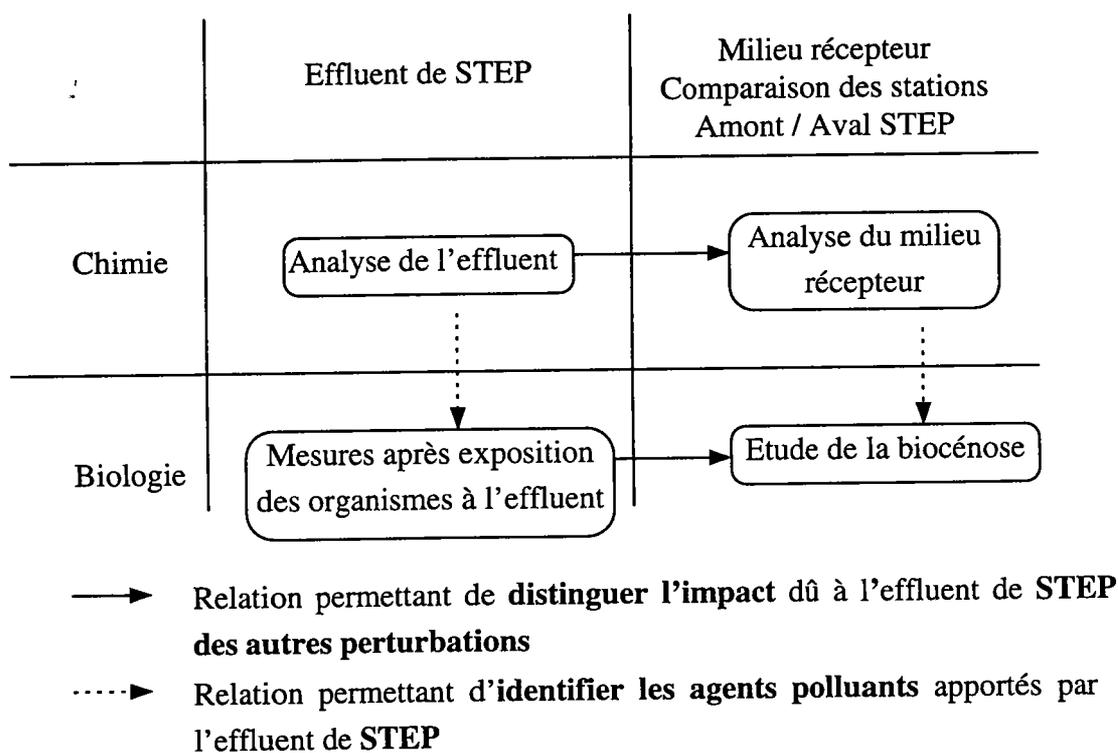


Figure 2 : Démarche utilisée pour évaluer l'impact des effluents de STEP sur le milieu.

Différentes mesures ont été utilisées telles que :

- analyses physico-chimiques de l'effluent et du milieu récepteur,
- étude de la structure des peuplements d'invertébrés et de poissons du milieu récepteur,
- étude de la morphologie de différentes espèces d'invertébrés et de poissons du milieu,
- bioessais sur invertébrés et poissons au laboratoire,
- mesures d'activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des polluants chez le poisson sur le terrain et en laboratoire.

Nous avons étudié l'effet du rejet de STEP sur le milieu récepteur à différents niveaux d'organisation (individu, population, communauté) afin d'avoir la caractérisation la plus

complète possible de l'effet de l'effluent sur le milieu récepteur. En effet, un stress peut affecter chaque niveau d'organisation, de l'individu à l'écosystème, les conséquences et les mécanismes étant différents à chaque niveau hiérarchique (Kosala & Pickett, 1992).

De plus, nous avons voulu prendre en compte deux facteurs : l'espace (choix du site) et le temps (suivi régulier d'un site).

La prise en compte du facteur espace (étude sur trois sites) est destinée à valider une méthodologie simple d'évaluation de l'impact d'un rejet de STEP dans différentes situations de terrain (sites et STEP différents).

L'étude dans le temps sur un seul site a pour objectif de connaître l'impact d'un effluent de STEP à travers ses variations temporelles. Un programme d'échantillonnage fréquent est alors nécessaire (Hicks *et al.*, 1991 ; Clements & Kiffney, 1994a).

2.2 Justification des choix expérimentaux

2.2.1 Mesures physico-chimiques dans le milieu récepteur et dans l'effluent

Le débit de la rivière a un rôle important sur la qualité du milieu récepteur, notamment sur la qualité des sédiments et la répartition de la faune. Dans le cas d'un rejet ponctuel à caractère pérenne tel que le rejet d'une STEP, il est intéressant de connaître la concentration de l'effluent dans la rivière (CER). La CER est une variable importante dans l'expression de l'impact global enregistré. Elle peut être utilisée à la fois pour expliquer les variations de l'impact dans le temps et en fonction du site et pour estimer le risque d'altération potentielle du milieu à l'aide des tests de toxicité.

La pollution actuellement mesurée et contrôlée en matière de rejet de STEP est la pollution organique mais aussi minérale. Nous avons voulu caractériser cette pollution apportée par la STEP en mesurant les concentrations en carbone, azote et phosphore dans l'eau et les sédiments en amont et aval de la STEP ainsi que dans l'effluent. Pour caractériser l'effluent, nous avons également mesuré des paramètres utilisés couramment dans le domaine de l'épuration des eaux usées.

Au niveau du milieu récepteur, les micropolluants, potentiellement présents en aval des STEP, ont été recherchés dans les compartiments où l'accumulation est possible comme le sédiment mais aussi les organismes vivants, ce qui permet d'appréhender la biodisponibilité des polluants.

2.2.2 Mesures biologiques sur des invertébrés et des poissons prélevés *in situ*

Les mesures biologiques ont été effectuées sur les communautés d'invertébrés et de poissons,

organismes du milieu sensibles à la fois aux paramètres physiques (modifications du débit et de l'habitat) et chimiques (Bergman *et al.*, 1986). Nous avons structuré nos mesures biologiques de réponse à la pollution selon différents niveaux d'intégration (Figure 3).

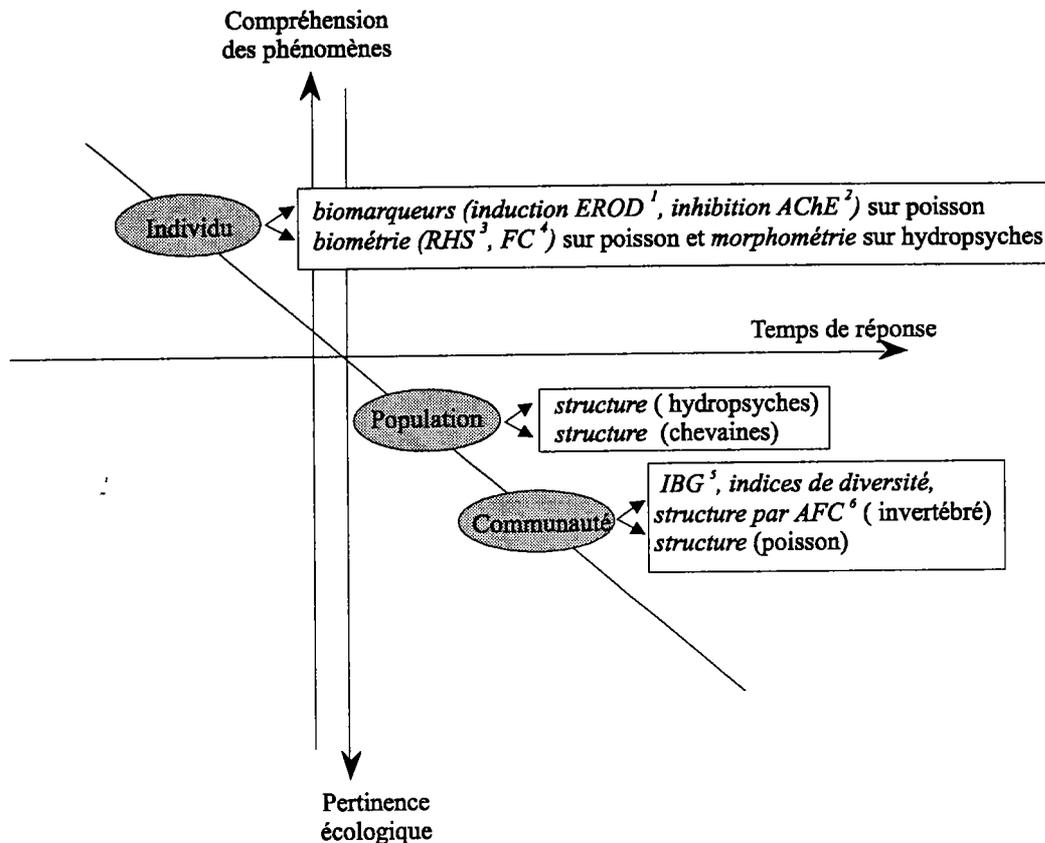


Figure 3 : Mesures utilisées sur l'écosystème à différents niveaux d'intégration de l'impact. D'après Adams (1990).¹ EROD : éthoxy-résorufine-O-dééthylase. ² AChE : acétylcholinestérase. ³ RHS : rapport hépatosomatique. ⁴ FC : facteur de condition. ⁵ IBG : indice biologique global. ⁶ AFC : analyse factorielle des correspondances.

• Etude sur les invertébrés

Nous avons étudié les macroinvertébrés car ceux-ci sont couramment utilisés pour apprécier la qualité des eaux depuis 1900 (Carpenter, 1924). A cause de leur cycle de vie relativement court, de leur immobilité relative et de leur large spectre de sensibilité à la pollution organique, ce sont des organismes idéaux pour étudier les effets d'une pollution telle qu'un rejet de STEP sur le milieu notamment à l'échelle de la communauté.

L'intérêt d'un indice biologique global (IBG), qui est une méthode qualitative simplifiée, est son application en routine. De plus, cet indice permet de comparer nos stations avec des stations de référence. Nous avons cependant souhaité approfondir notre étude des communautés d'invertébrés en poussant la détermination et en proposant une étude dans le temps qui nous permet entre autre de mettre en évidence d'éventuelles différences dans le cycle de développement et la morphologie d'une espèce.

- *Etude sur les poissons*

Le poisson est un organisme mobile qui peut éviter la pollution plus facilement qu'un invertébré, l'activité du poisson étant de l'ordre de la centaine de mètres selon l'espèce et la saison alors que le mouvement des invertébrés benthiques est de l'ordre du mètre (Grothe *et al.*, 1995). Cependant, la taille d'un poisson et sa place dans la chaîne trophique en font un organisme bioindicateur intéressant de la pollution notamment à l'échelle de l'individu.

L'étude de la structure de la communauté de poissons est moins utilisée en France comme méthode de bioindication de l'état de santé d'un cours d'eau qu'aux Etats-Unis où l'Indice Biotique d'Intégrité (IBI) de Karr *et al.* (1986) est notamment utilisé. Cela est dû, entre autre, au faible nombre d'espèces de poissons qui vivent dans nos rivières. Parce qu'il n'existe pas encore en France d'indice applicable à la communauté piscicole, nous avons tenté de décrire cette dernière par la diversité et l'abondance des espèces de poissons.

Nous avons voulu également rechercher d'éventuelles perturbations au niveau de la population et de l'individu. Nous avons ainsi étudié la structure de la population d'une espèce à l'aide de classes de taille et mesuré un indice morphologique : le facteur de condition (FC). Le FC est simple à mesurer et peut rendre compte de l'état de santé du poisson. Une diminution du FC traduit une diminution des réserves d'énergie, reflétant un changement des habitudes alimentaires ou une augmentation du métabolisme en réponse à un stress (Skadsen *et al.*, 1980 ; Brown *et al.*, 1987).

2.2.3 Mesures biologiques sur des organismes exposés à l'effluent en conditions contrôlées

A cause des résultats obtenus dans la littérature (Schroder *et al.*, 1991 ; Arbuckle & Alleman, 1992), il nous a semblé important de privilégier des mesures de toxicité chronique. Nous avons tout de même utilisé des tests de toxicité à court terme car, rapidement et à moindre coût, ils nous permettent de déceler des effluents très toxiques et de préparer les gammes de concentrations des tests de toxicité à long terme.

2.2.4 Mesures enzymatiques sur des poissons prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

Certains biomarqueurs¹¹ ont été utilisés pour évaluer l'exposition des organismes aux polluants. Ils rendent compte de la réaction de l'organisme à la présence de certains xénobiotiques. Ils peuvent parfois typer la pollution et offrent l'avantage de répondre rapidement à des changements d'exposition (Jimenez & Stegeman, 1990 ; Mc Carthy & Shugart, 1990). Ils sont des indicateurs d'exposition plus que d'effet car il est difficile de relier la réponse positive des biomarqueurs étudiés aux effets sur l'état de santé de l'organisme.

¹¹ Indicateur d'une perturbation au niveau cellulaire ou tissulaire d'un organisme.

L'activité Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase (EROD) caractérise la famille des enzymes monooxygénases à cytochrome P450¹² 1A, lesquelles jouent un rôle dans la biotransformation des xénobiotiques (Payne *et al.*, 1987 ; Bucheli & Fent, 1995). Ces enzymes sont induites par certains HAP, PCB coplanaires et dioxines, dont elles facilitent l'élimination grâce à des transformations chimiques. Les HAP et les PCB sont des micropolluants susceptibles d'être présents dans les effluents de STEP (Andersson *et al.*, 1988). La mesure d'activité EROD peut être accompagnée d'une mesure du rapport hépatosomatique (RHS) qui rend compte d'une atteinte du foie (Sloof *et al.*, 1983).

L'acétylcholinestérase (AChE), enzyme-clé dans le fonctionnement du système neuro-transmetteur, est inhibée par des insecticides de type organophosphoré et carbamate (Galvani *et al.*, 1992). Son inhibition révèle donc l'exposition d'un organisme à ce type de composés dont la présence dans l'eau des rivières témoigne plutôt d'une pollution diffuse de type agricole. L'utilisation de l'AChE dans notre étude nous a cependant semblé pertinente pour vérifier la présence dans nos sites de pollutions autres que celles apportées par les STEP qui pourraient interférer avec celles-ci au niveau des effets.

Si les biomarqueurs enzymatiques sont plutôt mesurés sur des poissons prélevés *in situ* (Masfaraud *et al.*, 1990) comme c'est le cas dans notre travail, ils ont également été évalués sur des poissons exposés à l'effluent au laboratoire mais aussi dans des bassins placés sur le site protégé de la STEP.

Contrairement aux pêches, l'utilisation de bassins permet de s'assurer de la durée et de la concentration d'exposition, des caractéristiques des animaux (taille, âge, sexe) et de l'exposition permanente des poissons, animaux capables de comportement de fuite.

Par rapport aux tests de laboratoire, cette expérimentation prend en compte la variation de la qualité de l'effluent dans le temps ainsi que la température, facteur important dans l'action des toxiques sur les organismes.

Notre méthode d'exposition à l'aide de bassins s'apparente à la technique plus couramment utilisée de mise en cage des poissons à l'aval du rejet (Fenet, 1997). Par rapport à la mise en cage, notre méthode permet de fixer la concentration d'exposition et de nourrir les poissons et limite le vandalisme, les bassins étant placés dans l'enclos de la STEP. Cependant, il faut reconnaître qu'elle est moins représentative de l'exposition des organismes du milieu et est plus complexe à utiliser, beaucoup de matériel étant nécessaire.

¹² 450 réfère à la longueur d'onde d'absorption de la forme réduite de ces enzyme après complexation avec le monoxyde de carbone.

Chapitre 2. Sites étudiés, Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous présentons les secteurs de rivière et les STEP retenus pour notre étude ainsi que les différentes méthodes mises en oeuvre. De plus, nous nous sommes attachés à décrire la démarche expérimentale dans laquelle les différentes méthodes s'inscrivent.

1. Sites étudiés

1.1 Choix des sites

Nos exigences dans le choix des sites d'étude ont été de deux types :

- des exigences de représentativité au niveau de la STEP : type, qualité du rejet, qualité du traitement, qualité de l'effluent d'entrée,... Pour éviter la présence de rejets annexes dans la rivière à proximité de la STEP, nous nous sommes assurés qu'un maximum d'industries soient raccordées à la STEP et nous avons recherché des réseaux d'assainissement de type unitaire où les eaux pluviales sont récoltées avec les eaux usées. Les STEP étudiées ont été choisies pour leur traitement par boues activées, traitement le plus utilisé en France. De plus, nous avons choisi des STEP urbaines de grande capacité (d'au moins 10 000 eqhab) dont les effluents contiennent des micropolluants provenant de l'activité urbaine et industrielle.
- des exigences de qualité au niveau du milieu récepteur : taille de la rivière, qualité de la faune,... Nous avons essayé de travailler sur des portions de petite rivière (débit < 2 m³/s) soumises au seul rejet de la STEP et où les mesures biologiques sont relativement faciles à obtenir.

Pour évaluer l'impact des effluents de STEP sur le milieu récepteur, nous avons comparé les caractéristiques du milieu aquatique entre une station située en amont du rejet de la STEP et une station située en aval de ce rejet. Ces stations, relativement faciles à isoler dans le cas d'un rejet ponctuel se jetant dans un système d'eaux courantes, ont été choisies les plus proches possible en amont et en aval de la STEP pour éviter toute autre source de perturbation du cours d'eau. Elles ont été recherchées sur la base de caractéristiques physiques similaires (substrats, vitesses de courant, profondeurs).

Des stations supplémentaires ont parfois été étudiées en amont de la ville à la recherche d'une station peu perturbée tenant lieu de station de référence mais aussi à l'aval lointain de la STEP pour observer la récupération du cours d'eau.

1.2 Description des sites

Tableau 3 : Caractéristiques des trois STEP à boues activées étudiées (voir annexe 2).

	STEP de Bourg-en-Bresse Rivière : Reyssouze	STEP de Châtillon-sur-Chalaronne Rivière : Chalaronne	STEP de Montbrison Rivière : Vizezy
Réseau	pseudo-séparatif by-pass	unitaire by-pass	unitaire by-pass
Taux de collecte ^a	45%	54%	57%
Capacité	95 000 EH 22 000 m ³ /j 4320 kg MES /j 4120 kg DBO ₅ /j 10550 kg DCO /j	10 000 EH 1 500 m ³ /j 840 kg MES /j 320 kg DBO ₅ /j	30 000 EH 7 000 m ³ /j 1 300 kg DBO ₅ /j
Domaine de charge	forte charge	faible charge aération prolongée	faible charge aération prolongée
Rendement d'épuration ^b	70%	30%	60%
MO	84%		
MES	80%		
Azote	32%		
Phosphore	33%		
Objectif de qualité	MES<30 mg/l 90<DCO<120 mg/l 30<DBO ₅ <40 mg/l	MES<30 mg/l 90<DCO<120 mg/l 30<DBO ₅ <40 mg/l	MES<30 mg/l 90<DCO<120 mg/l 30<DBO ₅ <40 mg/l
Problèmes	eaux parasites	eaux parasites	eaux parasites
Taux d'industriels raccordés	33%	50%	40%
Type d'industries	agro-alimentaire (volailles, laiterie, abattoirs) mécanique (tréfilerie, automobile)	pharmaceutique décolletage pièces plastiques roues en alliage	imprimerie peinture laiterie petite mécanique
Débit STEP	13 à 20 000 m ³ /j (0,20 m ³ /s)	1 500 m ³ /j (0,02 m ³ /s)	7 000 m ³ /j (0,08 m ³ /s)
Concentration de l'effluent dans la rivière (CER)	13 à 50%	1,4 à 30%	11,6 à 58%
Qualité de la rivière ^c :			
amont STEP	3	2	1
aval STEP	3	3	3

^a pollution entrant à la STEP / pollution brute, la pollution étant estimée en EH. Source OIE, 1995.

^b pollution éliminée par la STEP / pollution entrant à la STEP station Source OIE, 1995.

^c Classes de qualité définies par les agences de l'eau en fonction de la qualité physico-chimique et hydrobiologique. 1 : bonne qualité ; 2 : qualité moyenne ; 3 : qualité médiocre.

Trois STEP ont été retenues pour notre étude : Bourg-en-Bresse (Ain), Châtillon-sur-Chalaronne (Ain), Montbrison (Loire). Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 3.

Les rivières qui reçoivent les effluents de Bourg-en-Bresse et de Châtillon-sur-Chalaronne sont la Reyssouze et la Chalaronne, des affluents de la Saône. Ces deux cours d'eau de plaine traversent respectivement la Bresse et la Dombes, deux régions agricoles. La Bresse et la Dombes sont des zones de culture puisque 40% des terres sont plantées en maïs. La Dombes est également une zone de pisciculture d'étang. Les zones où coulent la Reyssouze et la Chalaronne ont été déclarées zones sensibles dans le SDAGE (schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux) du bassin Rhône-Méditerranée-Corse de décembre 1996 selon la directive européenne de 1991.

Le Vizezy traversant Montbrison descend des monts du Forez, région peu agricole. Rivière de montagne à l'amont de la STEP, elle devient rivière de plaine à l'aval. Les caractéristiques des trois rivières sont présentées dans le Tableau 4 et détaillées dans l'annexe 3.

Tableau 4 : Caractéristiques des trois rivières étudiées.

Paramètres mesurés	Chalaronne	Reyssouze	Vizezy
Longueur (km)	48	74	37
Altitude source (m)	280	233	1320
Altitude embouchure (m)	170	174	340
Pente moyenne (‰)	2,3	0,8	amont ville : 45 aval ville : 2,9
Surface du bassin versant à la station hydrométrique (km ²)	175	130	43
Débit à l'étiage (VCN10 ^a) (m ³ /s)	0,04	0,20	0,06
Débit annuel (m ³ /s)	1,2	1,5	0,6

^a VCN10 : débit moyen minimum sur une durée continue de 10 jours.

Les portions de rivière étudiées, les stations échantillonnées ainsi que les stations hydrométriques sont indiquées sur la Figure 4 pour la Reyssouze, la Figure 5 pour la Chalaronne et la Figure 6 pour le Vizezy.

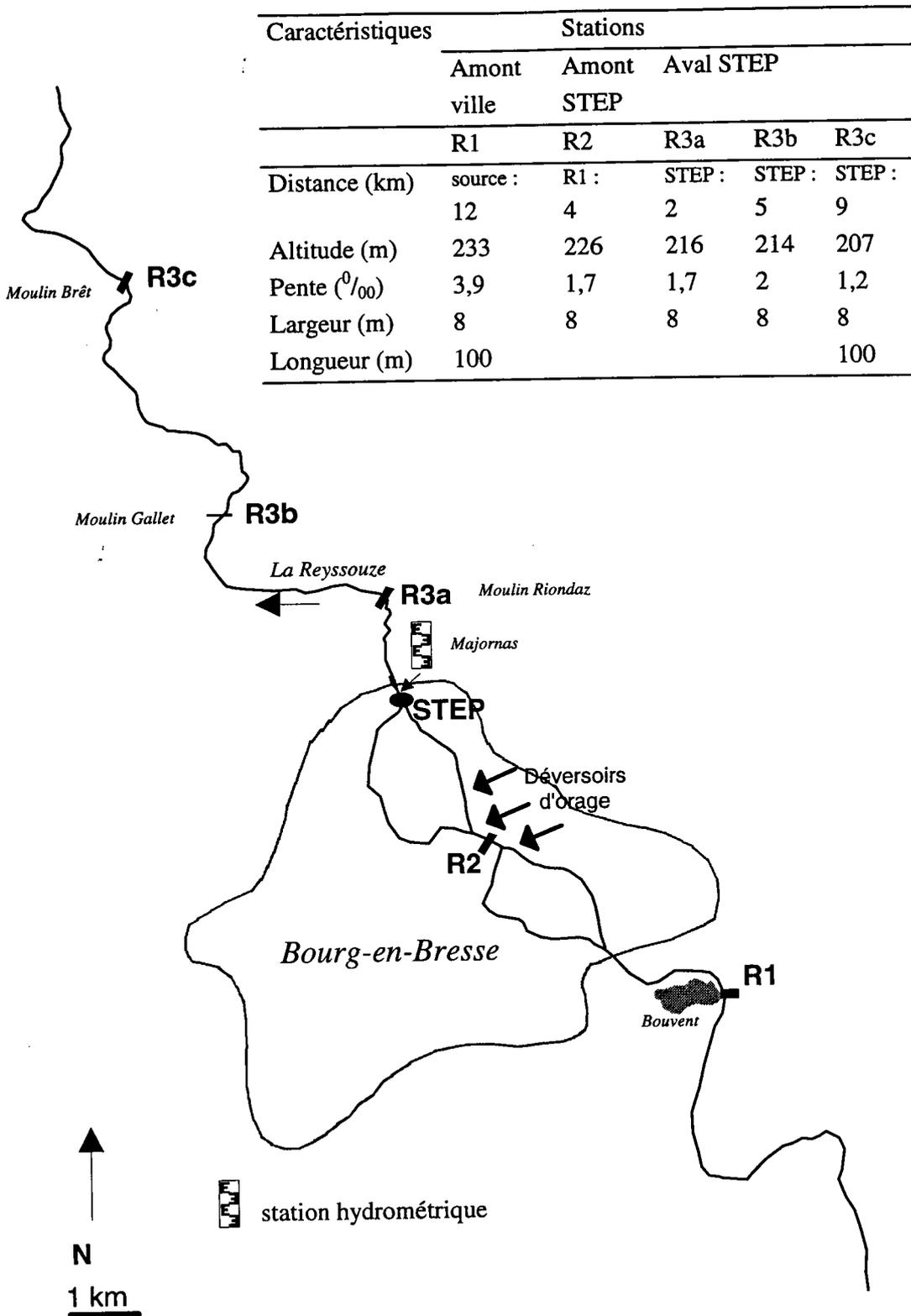
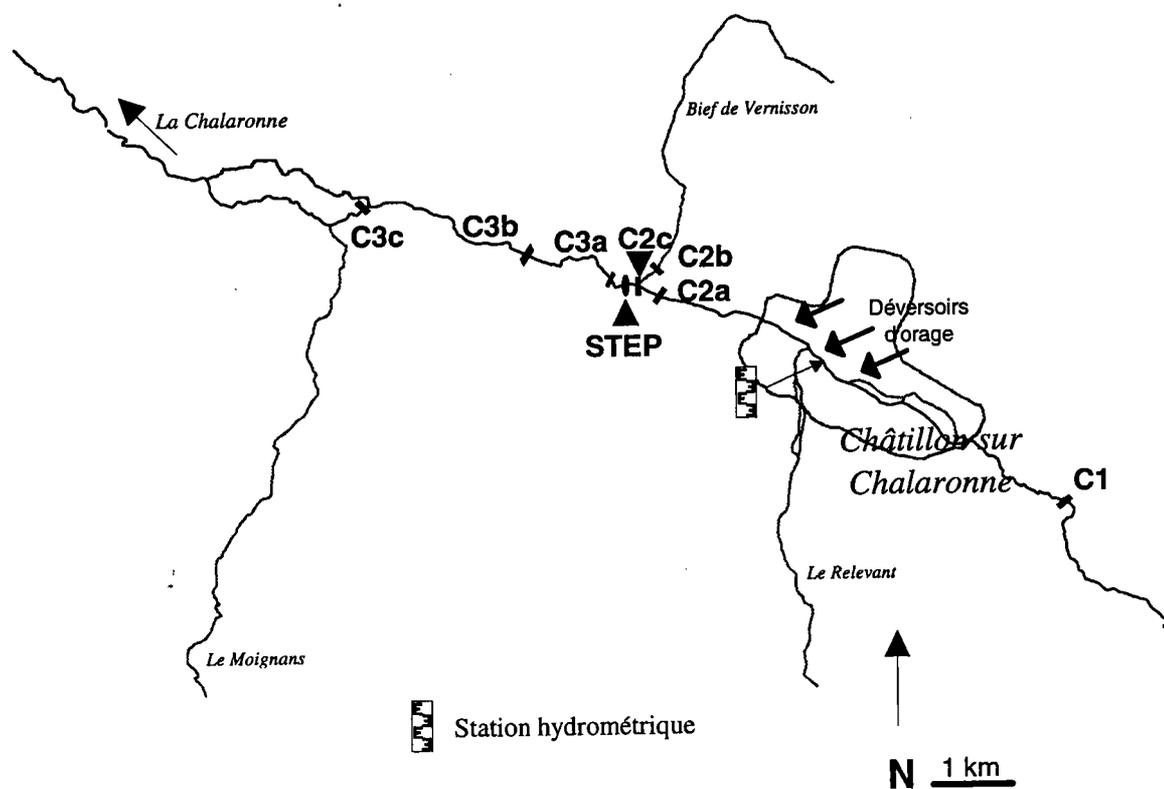
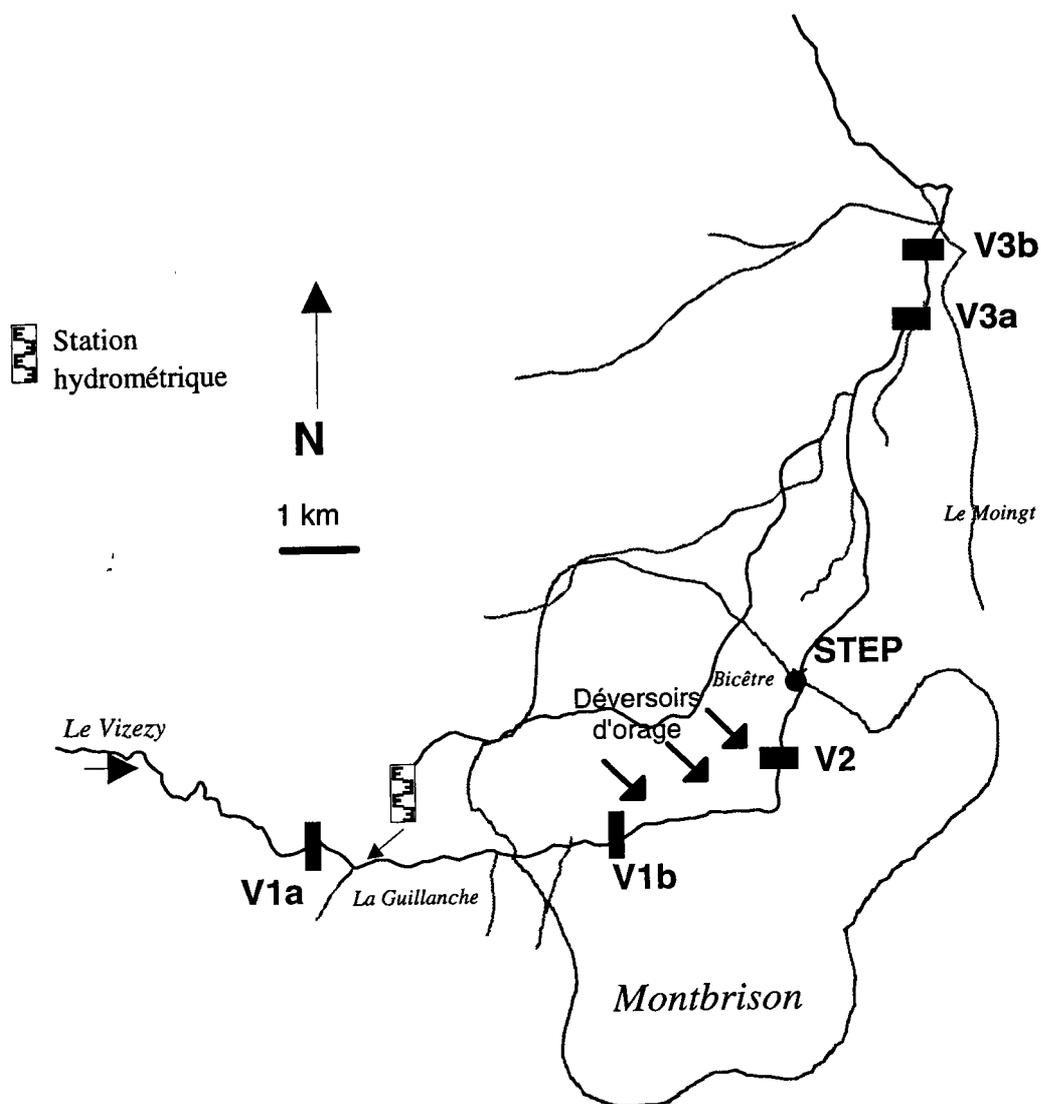


Figure 4 : Site de la Reyssouze aux environs de Bourg-en-Bresse, les stations d'étude et leur caractéristiques physiques.



Caractéristiques	Stations				
	C1	C2(a,c)	C3a	C3b	C3c
Distance (km)	source : 27	C1 : 4,5	STEP : 0,1	STEP : 1,5	STEP : 3
Pente(‰)	1,8	3	2,4	2,4	4
Altitude (m)	230	215	214	212	206
Largeur (m)	6	7	7	7	7
Longueur (m)	109	90		94	79
Faciès (%) de la longueur					
radier-rapide	21	31		21	25
plat	17	11		11	18
mouille	62	58		68	57

Figure 5 : Site de la Chalaronne, stations d'étude et leurs caractéristiques physiques



Caractéristiques	Stations				
	V1a	V1b	V2	V3a	V3b
Distance à la source (km)	source : 15	V1a : 4	V1a : 7	STEP : 5	STEP : 6
Altitude (m)	453	440	390	360	359
Pente (‰)	25	11,2	11,2	5,9	1
Largeur (m)	5	5	6	6	6
Longueur (m)		100	100		100

Figure 6 : Site du Vizezy aux environs de Montbrison, stations d'étude et leurs caractéristiques physiques.

2. Mesures physico-chimiques sur le milieu récepteur et sur l'effluent

Les mesures physico-chimiques décrites ici comprennent les analyses physico-chimiques sur les différents compartiments du milieu récepteur et sur les effluents mais aussi les mesures de débit des rivières et des effluents de STEP.

2.1 Mesures hydrauliques

Les débits moyens journaliers des rivières ont été calculés à partir des débits enregistrés (toutes les 6 minutes) dans les stations hydrométriques gérées par le SEMA (Service de l'Eau et des Milieux Aquatiques).

Pour l'étude sur le site de Châtillon, un débitmètre que nous avons placé en sortie de STEP nous a permis d'évaluer quotidiennement la concentration de l'effluent dans la rivière (CER). Pour l'étude sur les autres sites, nous avons pu obtenir une idée de la CER à l'aide de données fragmentaires sur les débits des STEP provenant d'études antérieures.

$$CER(\%) = \frac{Q_{\text{effluent}}}{Q_{\text{rivière}} + Q_{\text{effluent}}} \text{ avec } Q = \text{débit (moyen journalier)}$$

Pour les expérimentations dans les bassins de dérivation (voir § 4.2), nous avons exposé des poissons entre 4 et 16 jours à l'effluent à une CER maximale calculée à partir du 7Q10, un débit d'étiage critique de la rivière défini par l'USEPA (Agence de la protection de l'environnement des Etats-Unis) (Bergman *et al.*, 1986). Le 7Q10 est le débit minimal moyen durant 7 jours consécutifs ayant une période de retour de 10 ans. Il est calculé à partir de chroniques antérieures de débit de la rivière.

2.2 Caractérisation chimique de l'effluent et du milieu récepteur

Compte tenu de la variabilité de la qualité de l'effluent de sortie de STEP durant 24h, un échantillon d'effluent instantané n'a que peu de représentativité. Un échantillon moyen d'effluent de sortie de STEP sur 24h et proportionnel au débit est donc prélevé pour les tests et conservé à 4°C pendant le prélèvement grâce à un préleveur réfrigéré Contronic PSW 2000 conformément aux normes ISO 5667-16 (1997) et NF T90-370. Les échantillons sont conditionnés dans des bouteilles de 1l en polyéthylène et réfrigérés pendant le transport.

Les échantillons d'eau de rivière prélevés sont des échantillons instantanés conservés dans des bidons de 1l en polyéthylène. Ils sont réfrigérés durant le transport.

Les sédiments sont prélevés à l'aide d'un carottier lorsque l'épaisseur de sédiment le permettait ou à l'aide d'une drague et conditionnés dans des flacons en verre de 1l. Les analyses chimiques sont effectuées sur le sédiment entier. D'autres analyses sont éventuellement effectuées sur une fraction du sédiment lorsque celui-ci se révèle être un sédiment de texture différente de la texture moyenne observée pour la majorité des sédiments prélevés (particules < 50 µm = 50% du poids sec).

Les mesures des concentrations en carbone, azote et phosphore ont été effectuées dans l'eau et les sédiments en amont et aval de la STEP ainsi que dans l'effluent (Tableau 5). Pour caractériser l'effluent, nous avons également mesuré la demande chimique en oxygène (DCO) et l'azote Kjeldahl (NK¹³).

Les méthodes de mesure ou les normes utilisées sont mentionnées en annexe 5.

Tableau 5 : Analyses effectuées sur les eaux de surface, les effluents et les sédiments.

Eaux de surface	Indices globaux (mg/l)	Matière en suspension MES, Carbone organique total COT, Carbone organique dissous COD, Azote total Ntot ¹⁴ , Phosphore total Ptot ¹⁵
	Substances eutrophisantes (mg/l)	Ammonium NH ₄ ⁺ , Nitrite NO ₂ ⁻ , Nitrate NO ₃ ⁻ , Phosphate PO ₄ ³⁻
Effluent	Indices globaux (mg/l)	idem eaux de surface + DCO, NK
	Substances eutrophisantes (mg/l)	idem eaux de surface
Sédiments	Répartition granulométrique (%)	
	Fraction solide (% du poids sec ¹)	COT, Ntot, Ptot
	Eau interstitielle (mg/l)	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , COD

¹ : 1% = 10 g/kg de poids sec.

Les micropolluants ont été analysés à la fois dans l'effluent et dans le milieu récepteur.

Les métaux ont été recherchés uniquement dans les sédiments car ils semblent plus s'y accumuler que dans la chair des poissons (Brown *et al.*, 1986) même si d'après Mason (Mason, 1987 ; Mason & Barak, 1990), les concentrations métalliques dans les anguilles prélevées dans des sites proches de rejets d'égouts sont comparables à celles mesurées dans les sédiments de la rivière. Cependant, le taux d'accumulation des métaux dans les organismes est complexe en raison de leurs différentes formes chimiques : ions ou molécules, organiques ou inorganiques et des possibles effets de synergie et d'antagonisme entre métaux (Bruslé, 1990). Les métaux contenus dans les sédiments ont été déterminés par spectrophotométrie d'absorption atomique au LDA (Laboratoire Départemental d'Analyses) (Drôme) et au Cemagref de Lyon. Ils sont exprimés en mg/kg de poids sec.

La détection de micropolluants organiques sur l'effluent en sortie de STEP a été faite par le CIRSEE selon un protocole décrit par Nguyen *et al.* (1993).

Les analyses de micropolluants organiques ont été effectuées sur les sédiments et les poissons par le LDA (Drôme) selon une procédure « multirésidus » utilisable pour la détermination des

¹³ NK quantifie l'azote sous forme réduite (NH₄⁺ + Norg)

¹⁴ Ntot prend en compte l'azote sous toutes ses formes (Norganique, NH₄⁺, NO₂⁻ et NO₃⁻)

¹⁵ Ptot rassemble le P organique et les orthophosphates organiques et minéraux.

132 molécules de la liste I de la directive CEE 76/464 (LDA26, 1995, 1997). Pour les mesures de bioaccumulation dans les tissus de poissons, nous avons utilisé le muscle bien que différents auteurs (Brown *et al.*, 1986 ; Miskiewicz & Gibbs, 1994) choisissent le foie ou les gonades. En effet, de précédents résultats nous ont démontré qu'il n'y avait pas de différence entre la contamination du foie et celle des muscles par ces composés lipophiles exprimée par rapport à la teneur en lipides de l'organe. De plus, le muscle est présent en grande quantité et le dosage y est moins perturbé par la matière grasse que le dosage dans le foie (laboratoire LDA, communication personnelle). Les muscles de poissons, carpes (*Cyprinus carpio*) ou chevaines (*Leusciscus cephalus*), sont prélevés et mélangés à raison de 10 individus par station. Ils sont conservés à 4°C pendant le transport puis congelés à -18°C avant analyse. Les extraits organiques ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse avec une détection en spectrométrie de masse (GC-SM) ou à ionisation de flamme et à capture d'électrons (GC-FID-ECD), et en chromatographie en phase liquide (HPLC). Les résultats sont exprimés en µg/kg de poids frais pour les poissons et µg/kg de poids sec pour les sédiments. Les seuils de détection vont de 50 µg/kg de poids de sédiment sec à 1 µg/kg de poids frais pour les poissons.

3. Mesures biologiques sur les invertébrés et les poissons prélevés *in situ*

Les mesures sur la faune d'invertébrés et de poissons se font sur deux stations : une station en amont de la STEP et une en aval.

3.1 Mesures biologiques sur les invertébrés du milieu récepteur

Les stations retenues pour les prélèvements d'invertébrés sont situées sur des sections de rivière de part et d'autre du rejet de la STEP. Elles ont été retenues pour leur similarité d'habitat (substrat, débit, profondeur d'eau) afin de se soustraire autant que possible d'un effet éventuel de conditions physiques différentes dans la répartition des invertébrés.

La méthode de prélèvement des invertébrés utilisée est une méthode dérivée de la norme française NF T90-350. Pour les zones à courant rapide, les invertébrés sont prélevés sur une surface de 0,5 m² à l'aide d'un filet Surber de vide de maille de 250 µm. Pour les zones calmes, les invertébrés sont prélevés en raclant le sédiment sur une surface de 0,5 m² à l'aide d'un troubleau. Les échantillons prélevés sont conservés en bocaux formolés à 10%.

3.1.1 Etude du peuplement d'invertébrés

Au laboratoire, les échantillons sont lavés à travers une colonne de trois tamis de maille de taille 2,5, 1,25 et 0,63 mm et le gravier est retiré. Les invertébrés sont prélevés, identifiés sous une loupe binoculaire et comptés. Pour les échantillons provenant du tamis 0,63 mm, nous avons parfois procédé à un sous-échantillonnage : seule une partie des invertébrés de

l'échantillon est triée et déterminée et permet d'estimer la totalité du peuplement contenu dans cet échantillon.

Pour traduire l'information apportée par les invertébrés, nous avons utilisé un indice de qualité du milieu : l'indice biologique global IBG¹⁶. Les animaux ont été déterminés jusqu'au niveau de la famille et l'indice IBG a été calculé à partir de la grille de la norme NF T90-350 qui s'appuie sur la détermination d'un groupe indicateur et du nombre de taxons présents.

Nous avons poussé notre diagnostic de la communauté d'invertébrés en déterminant les invertébrés jusqu'au genre voire jusqu'à l'espèce lorsque les avancées de la systématique le permettent. Les invertébrés n'ayant pas tous été déterminés à l'espèce, nous avons utilisé le terme de taxons pour la description de la faune benthique. Nous avons, entre autres, effectué une analyse multivariée de la communauté d'invertébrés.

3.1.2 Etude du cycle de développement d'une espèce d'invertébrés

En plus des prélèvements d'invertébrés pour les études sur les communautés, un prélèvement supplémentaire de 0,5 m² dans le faciès lotique est effectué pour les études sur le cycle de développement d'une espèce qui nécessitent un matériel biologique suffisant.

Pour ce type d'étude, les Hydropsychidae sont une famille d'insectes (ordre des Trichoptères) intéressante du fait de leur large distribution et de leur abondance (Vuori & Parkko, 1996). De plus, elles sont résistantes à la matière organique. La famille Hydropsychidae compte 3 genres : le genre *Hydropsyche* est le plus important car il regroupe environ 15 espèces en France contre une à deux espèces pour les autres genres. Parmi les espèces d'*Hydropsyche*, *H. angustipennis* a été retenue pour l'étude des cycles de développement car elle est présente en amont et aval du rejet de la STEP de Châtillon. Afin d'étudier son cycle de développement et la morphologie de ses larves, nous avons mesuré la largeur de la capsule céphalique, la surface et parfois le poids des organismes (Figure 7).

¹⁶ issu de l'IBGN Indice Biologique Global Normalisé NF T90-350, les prélèvements d'invertébrés effectués au cours de notre étude étant légèrement différents de ceux réalisés dans la norme

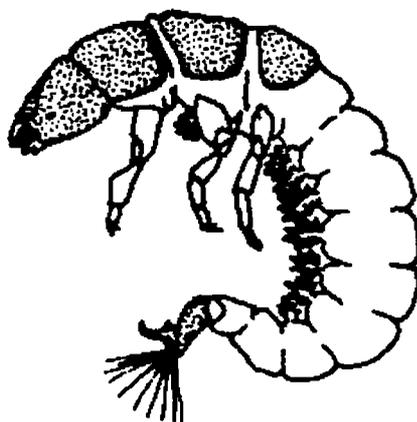


Figure 7 : Vue de profil de *Hydropsyche* sp. Correspond à la surface mesurée par analyse d'image. Grossissement : *5 pour un individu au dernier stade larvaire. Capsule céphalique : partie grisée portant les yeux.

Les largeurs de capsule céphalique ont été mesurées à l'aide d'une loupe binoculaire munie d'un viseur micrométrique. Nous avons ainsi identifié 4 stades larvaires pour *H. angustipennis* avec des tailles de capsule céphalique comparables à celles mesurées par Edington & Hildrew (1995) (Tableau 6).

Tableau 6 : Classes de taille de capsule des 4 derniers stades larvaires de *Hydropsyche angustipennis* (Edington & Hildrew, 1995).

Stade larvaire	Taille de la capsule céphalique (mm)
2	0,3 - 0,5
3	0,5 - 0,7
4	0,7 - 1,1
5	1,1 - 1,7

Nous avons également étudié la répartition des stades larvaires et leur évolution dans le temps grâce aux prélèvements mensuels.

La surface a été obtenue par un analyseur d'image comprenant une caméra monochrome et un ordinateur muni d'une carte d'acquisition de données (512 * 512 pixel). Les organismes sont placés de profil par rapport à l'objectif de la caméra. Les images sont prises et traitées grâce au logiciel Visilog 4.1 (Noesis, France).

Le poids des larves a été estimé à l'aide d'une balance Sartorius RC 210 D (précision : 0,1 mg).

Nous avons recherché les relations entre la surface, le poids et la largeur de la capsule céphalique.

3.2 Mesures biologiques sur les poissons du milieu récepteur

A chaque campagne, les poissons ont été pêchés à l'électricité sur les stations choisies en deux passages successifs séparés par un délai d'au moins une heure. Les stations ont été choisies avec des faciès comparables afin d'éviter le plus possible dans notre étude les variations dues aux conditions physiques du milieu. Le matériel de pêche utilisé, de type « Héron », fabriqué par Dream Electronic délivre du courant continu de 400 à 600 volts et de 1 à 2 ampères. Compte tenu de la largeur des stations, deux anodes ont été utilisées en parallèle.

3.2.1 Etude du peuplement piscicole

La technique d'estimation de l'effectif piscicole repose sur deux passages successifs sur la station étudiée délimitée par des filets. Tous les poissons pêchés sont identifiés à l'espèce puis remis à l'eau après le deuxième passage.

Une estimation de l'effectif total présent dans la station étudiée est obtenue grâce à la méthode d'estimation de Carle & Strub (1978) adaptée par Valentin (1995). Cette méthode renseigne sur l'efficacité de pêche en terme de probabilité de capture (p), calculée à partir de l'écart relatif entre les effectifs de chaque passage, permettant de juger de la qualité de l'estimation. Une confiance limitée doit être accordée à un résultat pour lequel $p < 0,25$, les effectifs étant alors nettement surestimés par la méthode. Pour $p < 0,1$, les résultats sont considérés comme très peu fiables.

3.2.2 Etude de la population de chevaine

Pour des études de population, nous avons retenu le chevaine (*Leuciscus cephalus*) pour son ubiquité et sa large gamme de taille permettant la distinction de plusieurs classes de taille. C'est un poisson pélagique qui ne fait pas l'objet de réintroduction.

Des classes de taille ont été définies en fonction des distributions de chevaines obtenues et de la littérature (Philippart, 1972 ; Persat, 1988 ; Pouilly, 1994). Les classes de taille dépendent de la saison de pêche, la période de reproduction du chevaine étant comprise entre avril et juin.

Nous avons étudié les poissons de petite taille (âge 0^+ et 1^+) car il est difficile de distinguer facilement des classes d'âge supérieur. De plus, l'appartenance des poissons juvéniles à la station étudiée et donc leur exposition au rejet de la STEP sont moins aléatoires que pour les adultes, les jeunes chevaines étant plus sédentaires que les adultes. Il faut noter cependant que les poissons juvéniles sont, à cause de leur taille, plus difficiles à pêcher.

Avant la période de reproduction, nous avons étudié la classe de poisson de taille < 130 mm représentée par les poissons d'âge < 1 an (0^+). Après la période de reproduction, en octobre, nous avons pu travailler sur deux classes de poisson relativement faciles à distinguer des autres poissons : une classe de poissons nés dans l'année (0^+), de taille < 60 mm, et celle des poissons ayant plus d'un an (1^+), de taille comprise entre 60 et 150 mm.

3.2.3 Mesures biologiques à l'échelle de l'individu

La taille suffisamment grande du poisson adulte ou juvénile permet de réaliser aisément plusieurs mesures sur cet organisme.

- *Facteur de condition*

Il existe un paramètre pour décrire la relation taille - poids du poisson : le facteur de condition (FC) avec $FC = [\text{poids (g)} / \text{longueur}^3 \text{ (cm)}] * 100$.

Le FC est fonction de l'espèce de la saison et de la localisation géographique (Le Cren, 1951). Pour sa mesure, nous avons retenu, en plus du chevaine, la loche franche (*Barbatula barbatula*) et le goujon (*Gobio gobio*). Ces trois espèces sont ubiquistes et assez résistantes à la pollution (Verneaux, 1981). La loche et le goujon sont des poissons benthiques alors que le chevaine est pélagique. Leur période de reproduction s'étend d'avril à juin. Les poissons ont été pesés et mesurés lors de la pêche puis relâchés dans le milieu. Une étude préliminaire ayant montré que le FC n'était pas dépendant du sexe, nous avons étudié le FC sans distinction entre les mâles et les femelles, ce qui nous a dispensé de sacrifier les poissons.

- *Biomarqueurs enzymatiques d'exposition aux polluants*

Nous avons dosé les activités Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase (EROD) et acétylcholinestérase (AChE) chez des poissons prélevés *in situ*. A cause de leur habitat différent et donc de leur exposition différente aux toxiques, chevaines et loches franches ont été les espèces de poissons choisies pour les mesures d'activité EROD. Le chevaine est largement utilisé pour la mesure de l'activité EROD notamment dans notre laboratoire (Vindimian *et al.*, 1991 ; Flammarion, 1997) et la loche est un poisson au contact des sédiments, ubiquiste, et déjà utilisé dans notre laboratoire pour cette mesure (Richert, 1994). Par contre, nous avons effectué des mesures d'activité AChE uniquement sur les chevaines.

L'activité EROD est dosée dans le foie des poissons. Les poissons sont disséqués et le sexe des poissons est identifié afin de pouvoir différencier les activités enzymatiques des poissons mâles et des poissons femelles, l'activité EROD étant sexe-dépendante (Förlin & Haux, 1990 ; Goksøyr & Förlin, 1992).

Le foie des poissons est prélevé, homogénéisé à 4°C, congelé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C. Le protocole de dosage de l'activité EROD utilisé est adapté de Burke (1974) et Pohl & Fouts (1980) et présenté dans différentes publications issues de notre laboratoire (Vindimian *et al.*, 1991 ; Richert, 1994). On décongèle l'échantillon de foie et on le centrifuge à 9000g à 4°C pendant 10 minutes. L'activité EROD est alors dosée sur le surnageant (fraction S9). On mesure la transformation d'un substrat (7-éthoxyrésorufine) en résorufine. L'activité EROD s'exprime en picomoles/min/mg de protéine. Nous avons parfois calculé le taux d'induction qui correspond au rapport entre l'activité EROD des poissons exposés à l'effluent et l'activité EROD de poissons témoins.

La mesure de l'activité EROD est accompagnée de l'estimation du rapport hépatosomatique (RHS). Le poisson puis le foie, prélevé pour la mesure d'activité EROD, ont été pesés afin de

calculer le RHS avec $\text{RHS} = [\text{poids du foie (g)} / \text{poids total (g)}] * 100$. Le RHS a été estimé en différenciant les mâles et les femelles. Comme l'activité EROD, il semble dépendre du sexe des poissons (Arukwe & Goksøyr, 1997).

L'activité enzymatique acétylcholinestérase (AChE) est dosée dans le muscle des poissons. Le muscle est prélevé puis congelé dans l'azote liquide et ensuite stocké à -80°C . L'activité de l'AChE est mesurée par sa capacité à transformer un substrat en un produit dont on mesure l'absorbance. Elle s'exprime en nanomoles/min/mg de protéine. Le protocole est présenté dans différentes publications issues de notre laboratoire (Richert, 1994 ; Flammariion *et al.*, 1996). Contrairement aux mesures de l'activité EROD, nous avons regroupé l'activité AChE des poissons mâles et femelles, aucune influence du sexe sur cette activité enzymatique n'ayant été décelée dans nos expérimentations.

4. Mesures biologiques en conditions contrôlées

4.1 Bioessais menés au laboratoire

La conservation des échantillons dépend de la nature des échantillons et de l'activité biologique possible dans ces échantillons (norme ISO 5667-10). Il n'existe donc pas de recommandations de conservation absolues (modes et temps de conservation). Cependant, compte tenu de l'évolution de la toxicité des effluents conservés à 4°C (Woodiwiss & Fretwell, 1974 ; Naudin *et al.*, 1995), nous avons choisi la congélation comme mode de conservation quand c'était possible.

L'effluent et l'eau de surface prélevés pour les tests sont homogénéisés et stockés congelés dans des bidons de 1l en polyéthylène puis décongelés au fur et à mesure de l'essai. Une courte décantation de 1h est prévue en début de test pour l'effluent pour des problèmes pratiques de visibilité des organismes. Il faut savoir que le cycle congélation - décongélation modifie les équilibres physico-chimiques de l'effluent (Jean, 1991) et peut affecter la qualité de l'eau (norme ISO 5667-10).

Les tests débutent au maximum 24h après le prélèvement.

• Bioessais de toxicité à long terme

La cériodaphnie *Ceriodaphnia dubia* a été retenue pour notre étude car c'est un organisme largement utilisé pour tester la toxicité des effluents. Elle appartient à la batterie de tests proposés par l'USEPA (Agence de protection de l'environnement aux Etats-Unis) pour le contrôle biologique des effluents (Weber *et al.*, 1989). De plus, le test de toxicité à long terme basé sur la reproduction de *C. dubia* est plus sensible que d'autres tests à long terme sur des poissons (Neiheisel *et al.*, 1988).

Un test semi-statique de 7 jours est mis en place avec *C. dubia* en comparant la survie, la reproduction et la croissance d'individus exposés à des concentrations différentes d'effluent

selon le protocole de USEPA (1991) repris dans Garric *et al.* (1994). Les cériodaphnies sont nourries tous les jours au cours du test. Les données de reproduction sont analysées indépendamment des données de survie : le nombre moyen de jeunes par mère est le nombre de jeunes rapportés au nombre de mères vivantes à la fin du test.

Les résultats du test sont considérés comme valides si au moins 80% des cériodaphnies témoins (exposées à de l'eau de laboratoire) ont survécu à la fin du test et que leur reproduction a atteint en moyenne 15 jeunes par mère survivante.

Dans un souci d'étudier les effets de STEP à différents niveaux de la chaîne trophique, nous avons tout de même intégré les résultats d'un test de toxicité à long terme sur poisson. Nous avons utilisé des tests sur les stades embryo-larvaires du poisson zèbre (*Danio rerio*), poisson non indigène des rivières européennes mais le plus utilisé en Europe dans les tests de toxicité. Ce test de 11 jours, bien maîtrisé dans notre laboratoire (Naudin, 1996), a été adapté du protocole de l'OCDE (1992) et de l'USEPA (1991). D'éventuels effets inhibiteurs des effluents sont recherchés sur l'éclosion des œufs et la survie des embryons de poissons au cours de ce test.

• *Bioessais de toxicité à court terme*

Exposée à court terme à des effluents, la cériodaphnie s'est montrée plus sensible que la daphnie et que la bactérie du test Microtox (Schroder, 1991 ; Arbuckle & Alleman, 1992).

Pour les tests de toxicité à court terme, nous avons retenu :

- *C. dubia*, déjà utilisé pour le test de toxicité chronique,
- *D. magna*, seul organisme utilisé dans la législation française pour le contrôle des rejets,
- le test Microtox, basé sur l'inhibition de la luminescence d'une bactérie marine, car ce test est court, peu cher et très utilisé pour le dépistage de la toxicité d'effluents (Vasseur *et al.*, 1984 ; Garric *et al.*, 1993).

Le test sur Microtox permet la détermination de la concentration de l'effluent qui inhibe 50% de la luminescence de *Vibrio fischeri* en moins de 30 min. Le protocole du test Microtox fait l'objet d'une norme NF T90-320. (Sim *et al.*, 1994).

Des tests de toxicité aiguë et chronique ont été mis en œuvre sur deux microcrustacés cladocères (*Daphnia magna* Straus et *Ceriodaphnia dubia*). Ceux-ci sont maintenus au laboratoire dans un mélange d'eau naturelle et d'eau ultrapure et nourris quotidiennement à l'aide d'un mélange d'algues enrichi de levures et de nourriture pour poisson pour les cériodaphnies.

Le test sur *D. magna* détermine la concentration d'effluent qui, en 24h, immobilise 50% des daphnies. Le protocole utilisé est celui de la norme NF T90-301. Le même test est effectué avec comme organisme test *C. dubia*.

- *Suivi de biomarqueurs enzymatiques chez des truitelles exposées à l'effluent au laboratoire*
Des mesures d'activité EROD et AChE ont été effectuées sur des poissons exposés à l'effluent de STEP en laboratoire pour détecter la présence de familles de polluants dans l'effluent.

La nécessité d'obtenir un volume important d'effluent (300l) nécessaire à ce bioessai, réfrigéré et représentatif d'un effluent de 24h nous a conduit à utiliser un tank à lait muni d'un système d'horloge permettant de prélever une quantité constante d'effluent à intervalles réguliers pendant 24h. L'effluent est conditionné au laboratoire dans des bidons de 10l et stocké en chambre froide pour être utilisé dans les 4 jours au fur et à mesure de l'essai.

Pour s'affranchir de l'influence de la maturité sexuelle sur les paramètres mesurés et faciliter la manipulation et le stockage des animaux, nous avons choisi des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) de moins d'un an mesurant environ 10 cm pour ces tests. Ces truitelles, provenant d'une pisciculture de la Drôme, sont maintenues au moins deux semaines avant l'expérimentation au laboratoire et nourries régulièrement. Les truitelles acclimatées sont exposées à différentes concentrations d'effluent pendant 96h. Nous avons procédé à l'injection de β -naphtoflavone, inducteur de référence de l'activité EROD, à une concentration de 0,5 mg/kg sur quelques individus que nous avons utilisés comme témoins positifs pour cette activité. Chaque jour durant l'expérience, les poissons sont nourris et les concentrations d'effluent sont renouvelées. Les aquariums sont aérés et thermostatés. A la fin du temps d'exposition, les poissons sont sacrifiés et un morceau de foie et de muscle est prélevé. Le protocole de ce bioessai sur truite est détaillé dans Garric *et al.* (1994). Les protocoles de dosage de l'activité EROD et AChE sont décrits précédemment.

4.2 Modifications des conditions expérimentales pour la prise en compte de la complexité de l'exposition *in situ*

Afin de mesurer la toxicité de l'effluent tout en cherchant à mieux prendre en compte la réalité de terrain, deux expérimentations ont fait l'objet de modifications concernant le scénario d'exposition : le test de toxicité à long terme sur la cériodaphnie et la mesure de l'induction EROD (et de l'inhibition AChE) sur poisson.

Les facteurs pris en compte sont :

- l'eau de la rivière comme eau de dilution de l'effluent,
- la concentration d'effluent dans la rivière (CER),
- l'évolution de la qualité de l'effluent et de l'eau de la rivière dans le temps dues aux variations climatiques (température, pluie,...) et aux variations de l'activité humaine pour le test sur poisson uniquement.

- *Bioessai sur Cériodaphnie*

Dans l'essai sur les cériodaphnies, l'eau de la rivière prélevée en amont de la STEP est testée. Elle sert également comme eau de dilution de l'effluent pour reproduire les conditions d'exposition de la rivière en aval de la STEP. Ainsi, l'effluent est testé pur mais aussi à sa

concentration réelle dans la rivière (CER). Pour ce faire, nous avons calculé la CERj le jour du prélèvement à l'aide des données hydrométriques correspondantes. Nous avons conservé un lot de témoins exposés à de l'eau de laboratoire.

- *Suivi de biomarqueurs enzymatiques chez des poissons exposés à l'effluent dans des bassins de dérivation*

Des poissons ont été placés dans des bassins alimentés en continu avec de l'eau de la rivière prélevée en amont du rejet et de l'effluent. Ils sont nourris quotidiennement et une aération est prévue pour maintenir l'oxygène à un taux viable. L'oxygène et la température ont été mesurés en continu dans les bassins et l'ammoniac a été régulièrement dosé. Les poissons provenant de chaque bassin sont sacrifiés après 4, 8, 12 ou 16 jours d'exposition. Un lot de poissons est sacrifié au début de l'expérience pour servir de lot témoin pour les activités enzymatiques.

Sur le site de Montbrison, nous avons mesuré l'activité AChE de chevaines et de truitelles arc-en-ciel placées dans 2 bassins alimentés en continu, l'un avec de l'eau du Vizezy prélevée en amont de la STEP, et l'autre avec un mélange à 50% d'eau et d'effluent, 50% correspondant au 7Q10 calculé sur le Vizezy. Nous avons choisi d'exposer des chevaines afin de pouvoir comparer les activités AChE mesurées chez les chevaines pêchées *in situ*. Les chevaines ont été pêchées par électricité sur le Rhins, rivière peu polluée proche du Vizezy et conservés au laboratoire pendant deux semaines avant l'expérience. Nous avons également exposé des truites, poisson déjà utilisé pour les expositions à l'effluent en laboratoire : leurs caractéristiques sont semblables à celles des truites utilisées en laboratoire.

Sur le site de Châtillon, nous avons dosé l'activité EROD de carpes miroir (*Cyprinus carpio*) et de truitelles placées dans 3 bassins alimentés en continu avec respectivement l'eau de la Chalaronne prélevée en amont de la STEP, l'effluent à 100% et l'effluent à 50%, 50% correspondant au 7Q10 calculé sur la Chalaronne.

En plus des truitelles, nous avons choisi d'exposer des carpes pour leur résistance aux températures élevées et aux conditions d'hypoxie (Van der Weiden, 1993) rencontrées dans les effluents. Provenant d'une pisciculture proche du site d'expérimentation, elles sont d'origine plus contrôlée que celle des poissons prélevés *in situ* et n'ont pas subi de stress dû à la pêche électrique. Ce sont des juvéniles d'environ 1 an de 15 cm de long. Sur ces carpes, nous avons également effectué des mesures de bioaccumulation.

Un lot de témoins positifs est constitué par des poissons auxquels on a injecté par voie intrapéritonéale de la β -naphthoflavone à raison de 0,5 mg/kg pour les truites et 25 mg/kg pour les carpes.

5. Résumé des mesures utilisées

Du fait de la multiplicité des méthodes utilisées, nous avons tenu à lister les mesures effectuées sur les échantillons prélevés (Tableau 7). Les techniques d'échantillonnage et de conservation utilisées en fonction des mesures faites sur place ou au laboratoire sont détaillées en annexe 4. Les traitements statistiques utilisés pour l'analyse des résultats sont mentionnés en annexe 6.

Tableau 7 : Mesures effectuées sur les différents échantillons.

Approche	Echantillon	Mesures
Physico-chimique	Effluent	Débit, conductivité, pH C, N, P* (MES, DCO, COT, Ntot, Norg, NK, Ptot + NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻) Micropolluants, métaux
	Eau de rivière	Débit, conductivité, O ₂ , température, pH C, N, P (MES, COT, Ntot, Ptot + NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻) Micropolluants, métaux
	Sédiments	C, N, P (granulométrie + Corg, Ntot, Ptot sur phase solide + COD, NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ sur eau interstitielle) Micropolluants, métaux
	Poissons	Micropolluants
Biologique en conditions contrôlées	Effluent	Toxicité aiguë sur bactérie (<i>V. fischeri</i> Microtox NF T90-320) et invertébrés (<i>D. magna</i> NF T90-301, <i>C. dubia</i>) Toxicité chronique sur invertébré (<i>C. dubia</i>) et sur poisson (<i>D. rerio</i>) (USEPA, Weber <i>et al.</i> , 1989) Mesure EROD et AChE sur poisson (<i>O. mykiss</i>)
	Effluent, eau de rivière	Toxicité chronique sur invertébré (<i>C. dubia</i>) Mesure EROD et AChE sur poisson (<i>O. mykiss</i> , <i>L. cephalus</i> et <i>C. carpio</i>) placés dans des bacs de dérivation
Biologique in situ	Invertébrés	Morphométrie sur Hydropsyches Structure de population de <i>H. angustipennis</i> IBG (NF T90-350) et analyse biocénotique par AFC
	Poissons	EROD, AChE, RHS, FC sur <i>L. cephalus</i> et <i>N. barbatulus</i> Structure de population de <i>L. cephalus</i> et analyse du peuplement piscicole

* : carbone, azote et phosphore.

6. Plans expérimentaux

6.1 Plan expérimental d'étude sur 3 sites : Bourg-en-Bresse, Châtillon et Montbrison

Nous avons étudié l'impact de rejets de STEP sur trois rivières. Nous avons voulu prendre en compte plusieurs situations afin d'observer les éventuelles différences et généraliser les résultats.

Tableau 8 : Echantillons, mesures et stations étudiés sur les trois sites : Reyssouze, Chalaronne et Vizezy. Calendrier des prélèvements en annexe 7.

			Nombre de prélèvements et éventuellement sites prélevés : amont STEP / aval STEP		
Approche	Echantillons utilisés	Paramètres mesurés	Reyssouze STEP de Bourg-en-Bresse (amont ville au lieu de amont STEP)	Chalaronne STEP de Châtillon	Vizezy STEP de Montbrison
Physico-chimique <i>in situ</i>	Eau	C, N, P ¹	1	5	2 + amont ville :
	Sédiments	C, N, P, métaux	1	1	1 : amont ville au lieu de amont STEP
Physico-chimique	Effluent	C, N, P	2	7	2
		Micropolluant		1	1
Biologique <i>in situ</i>	Invertébré	IBG	2 + amont STEP	5	2 + amont ville
	Poisson	Structure	1	1	1 + amont ville
	Chevaine	EROD, AChE	1	1	1 + amont ville
	Chevaine, goujon, loche	FC	1	1	1 + amont ville
Biologique en conditions contrôlées	Effluent	Toxicité aiguë sur invertébré	1	2	2
		Toxicité chronique sur invertébré et sur poisson	1	1	1
		Biomarqueur sur poisson	1	1	1

¹ : carbone, azote et phosphore.

6.2 Plan expérimental d'étude temporelle sur le site de Châtillon

Après l'étude sur trois sites, il nous a paru important de nous focaliser sur un seul site pour avoir un diagnostic plus complet d'impact du rejet et pour étudier ses variations temporelles. La prospection sur trois sites nous a permis de retenir un seul site sur lequel nous avons pu utiliser les méthodes envisagées. Une fréquence d'échantillonnage qui puisse nous permettre de détecter au mieux les variations de l'effet du rejet sur le milieu a été recherchée.

Pour l'étude des invertébrés du milieu, l'examen du cycle de développement d'une espèce nous a amené à effectuer des prélèvements mensuels, ceux-ci étant également utilisés pour étudier l'évolution temporelle des biocénoses. A ces prélèvements, nous avons couplé une étude toxicologique sur effluent à l'aide d'un bioessai sur invertébré. Ce bioessai ne rend compte que de la toxicité d'un effluent déversé dans le milieu que pendant une journée.

Sur poisson, nous avons choisi une étude bisannuelle avant et après l'étiage estival (période la plus stable et suspectée la plus critique pour la faune). Nous avons couplé nos études sur la structure de la faune piscicole et sur l'activité enzymatique EROD des poissons de la rivière avec des mesures de l'activité enzymatique EROD de poissons exposés à l'effluent dans des bassins sur le site.

Nous avons estimé que les facteurs les plus importants dans les variations des mesures physico-chimiques étaient respectivement le temps pour les analyses faites sur l'eau et l'espace pour les analyses réalisées dans les sédiments. Nous avons donc effectué des analyses chimiques mensuelles de l'eau en amont et en aval de la STEP. Par contre, compte tenu de son caractère accumulateur, le sédiment n'a été caractérisé que deux fois dans l'année, avant et après l'étiage estival, mais sur plusieurs stations en amont et en aval du rejet. Les analyses des micropolluants dans les différents compartiments ont été effectuées une seule fois dans l'année.

Tableau 9 : Echantillons, mesures et stations étudiés sur Châtillon-sur-Chalaronne. Calendrier des prélèvements en annexe 7.

Approche	Echantillon utilisé	Paramètre mesuré	Nombre de prélèvements et éventuellement sites de prélèvement : amont STEP / aval STEP
Physico-chimique	Eau de rivière	C, N, P ¹	13
	Sédiments	C, N, P	2 : 5 stations
		Métaux	1 + amont ville
		Micropolluants	1 + amont ville
	Poissons	Micropolluants	1 + amont ville
Physico-chimique	Effluent	C, N, P	13
Biologique <i>in situ</i>	Invertébré	IBG	13
		Taxon, densité, structure, AFC	2 : 5 stations
	Hydropsyche	Structure, distribution et morphométrie	13
		Poissons	Structure
	Chevaine	Effectif et distribution	2 + amont ville
		EROD, RHS, FC	2 + amont ville
	Loche	EROD, FC	2 + amont ville
	Goujon	FC	2 + amont ville
Biologique en conditions contrôlées	Effluent (+ eau de rivière)	Toxicité chronique sur invertébré	13
		EROD sur carpe et truite	2
		Micropolluants sur carpe	2

¹ : carbone, azote et phosphore

Chapitre 3. Etude sur trois sites : Bourg-en-Bresse, Châtillon et Montbrison. Résultats et discussions.

Ce chapitre présente l'étude de l'impact des effluents des STEP de Bourg-en-Bresse, Châtillon et Montbrison respectivement sur la Reyssouze, la Chalaronne et le Vizezy.

1. Etude physico-chimique du milieu récepteur entre l'amont et l'aval de la STEP et de l'effluent

Des analyses en carbone, azote et phosphore ont été effectuées à la fois dans l'eau des rivières et dans les sédiments entre l'amont et l'aval du rejet de la STEP et sur l'effluent. De plus, nous avons dosé les métaux dans les sédiments et les micropolluants dans les effluents.

1.1 Analyses en carbone, azote et phosphore dans le milieu récepteur et dans l'effluent

1.1.1 Analyses en carbone, azote et phosphore dans l'eau de la rivière et dans l'effluent

Les CER calculées pour chaque site vont de 13 à 50% pour le site de la Reyssouze, de 1 à 30% pour le site de la Chalaronne et de 12 à 58% pour le site du Vizezy (voir tableau 1, chapitre 2). Les débits des rivières sont présentés dans l'annexe 8. Les CER sont importantes ainsi que leur variations : les CER les plus fortes sont observées en été pendant la période d'étéage. Selon ce critère, l'impact de la STEP de Montbrison sur le Vizezy est plus important que celui de la STEP de Bourg-en-Bresse sur la Reyssouze et de la STEP de Châtillon sur la Chalaronne.

Tableau 1 : Analyses chimiques de l'eau des trois rivières étudiées en amont et aval des STEP en 94. Reyssouze (stations R2 et R3a), Chalaronne (stations C2c et C3b), Vizezy (stations V2 et V3b).

Paramètre	Station	Reyssouze sept	Chalaronne							Vizezy sept
			juil	août	sept	oct	nov	déc	moy ¹	
pH	Amont	7,7	7,7	6,7	7,9	7,7	7,5	8,0	7,6	7,0
	Aval	7,9	7,6	6,8	8,0	7,7	7,9	8,1	7,7	7,3
Cond µS/cm	Amont	315	360	369	200	175	185	350	273	35
	Aval	360	368	345	210	200	220	400	290	150
O ₂ mg/l	Amont	9,2	5,2	4,9	10,2	9,8	11	13,0	9,0	10,1
	Aval	6,6	4,8	3,8	9,8	9,7	10,8	13,2	8,7	14,1
MES mg/l	Amont	7	15	12	36	48	29	11	25	7
	Aval	6	9	15	43	44	26	13	25	51
COT mg/l	Amont	12,0	6,9	5,1	18,3	11,9	16,2	6,8	10,9	13,3
	Aval	13,2	7,1	4,7	17,9	11,5	14,1	8,8	10,7	21,6
Ntot mg/l	Amont	6,7			5,1	4,1	6,5	5,7	5,4	
	Aval	13,3			4,9	4,8	7,3	6,4	5,9	
NH ₄ ⁺ mg/l	Amont	0,1	0,8	0,4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1
	Aval	12,0	1,3	0,6	0,4	0,3	0,3	0,2	0,5	2,5
NO ₂ ⁻ mg/l	Amont	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1
	Aval	2,3	0,8	0,8	0,5	0,3	0,2	0,3	0,5	1,3
NO ₃ ⁻ mg/l	Amont	23,5	14,8	12,6	10,2	5,8	8,6	19,6	11,9	3,4
	Aval	11,5	12,9	7,0	9,2	6,2	9,4	21,4	11,0	7,6
Ptot mg/l	Amont				0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,1
	Aval				0,3	0,3	0,3	0,6	0,4	1
PO ₄ ³⁻ mg/l	Amont	0,5	0,4	1,3	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	
	Aval	3,8	0,8	1,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,8	

¹ : moyenne des 6 échantillons. Tableau complet en annexe 9.

Il existe une différence de qualité d'eau des trois rivières entre l'amont et l'aval de la STEP pour les concentrations NH₄⁺ et PO₄³⁻, l'écart étant moins marqué pour la Chalaronne (Tableau 1). Pour le Vizezy, la différence de qualité d'eau entre l'amont et l'aval de la STEP est notée pour tous les paramètres sauf le pH.

Une grande variation des paramètres est observée sur la Chalaronne en fonction de la saison. La conductivité et les concentrations en MES de la Chalaronne semblent liées au régime hydraulique de la rivière, septembre à novembre ayant été une période pluvieuse.

Tableau 2 : Niveaux de pollution par l'azote et le phosphore sur les trois rivières en 94 traduits selon la grille de qualité des agences de l'eau.

Paramètre	Reyssouze (septembre)		Chalaronne (moyenne entre juillet et décembre)		Vizezy (moyenne entre août ¹ et septembre)	
	Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval
NH ₄ ⁺	1	4	1	2	0	2
NO ₂ ⁻	2	4	1	2	1	3
NO ₃ ⁻	1	1	1	1	0	1
PO ₄ ³⁻	1	4	2	2	0	3

¹ : échantillon présenté en annexe 9. Situation normale : 0. Pollution modérée : 1, nette : 2, importante : 3 et excessive : 4.

La transcription en classe de qualité des concentrations en azote et phosphore des rivières (Tableau 2) montre une qualité d'eau de la Reyssouze en aval de la STEP qui est plus dégradée que celle du Vizezy, celle-ci étant elle-même plus mauvaise que celle de la Chalaronne.

A l'aide des analyses physico-chimiques effectuées sur le milieu récepteur, l'impact peut être mis en évidence pour des STEP où le débit du rejet est important par rapport à celui de la rivière.

En plus de l'eau de rivière, nous avons étudié les concentrations en carbone, azote et phosphore dans les effluents (Tableau 3).

Tableau 3 : Analyses physico-chimiques des effluents des 3 STEP.

Analyses	Bourg-en-Bresse	Châtillon-sur-Chalaronne							Montbrison
	sept	juil	août	sept	oct	nov	déc	moy ¹	sept
pH	7,7	7	6,8	8,1	7,5	7,6	7,7	7,4	7,2
Cond. (µS/cm)	525	477	475	485	420	580	605	507	320
MES (mg/l)	17	8	9	38	10	51	34	25	29
COT (mg/l)	18,8	11,8	7,4	47,5	8,7	23,3	33,4	22,0	25,9
Ntot (mg/l)	37,5	-	3,2	21,9	8,4	18,7	11,5	11,2	20,4
NH ₄ ⁺ (mg/l)	34,5	12,4	1,77	19,5	5,4	16,8	10,2	11,0	3,8
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0,1	0,5	0,4	3,3	0,3	0,2	0,1	0,8	6,6
NO ₃ ⁻ (mg/l)	<0,2	0,3	0,6	9,1	1,8	0,2	0,1	2,0	34,5
Ptot (mg/l)	5,4	-	1,67	2,7	0,5	3,4	2,5	2,2	1,3
PO ₄ ³⁻ (mg/l)	12,2	18,7	4,2	5,7	1,0	6,6	4,2	6,7	-

¹ : moyenne des 6 échantillons. En gras : > normes de rejet de la directive de 1991 : MES = 35 mg/l et en zone sensible (cas de Châtillon et de Bourg) Ptot < 2 mg/l et Ntot < 15 mg/l.

Nous observons des différences de composition des effluents en fonction des STEP, l'effluent de Bourg-en-Bresse ayant des concentrations en ammoniac et en phosphates particulièrement importantes (Tableau 9).

Les concentrations en NH₄⁺ et PO₄³⁻ dans l'effluent expliquent les concentrations de ces composés dans l'eau des rivières pour les sites de Bourg-en-Bresse et de Montbrison et pour le site de Châtillon en été. Seul l'effluent de la STEP de Montbrison contient une concentration importante en NO₃⁻ marquant un processus de nitrification dans cette STEP.

Les concentrations importantes en MES, Ntot, Ptot dans l'effluent de la STEP de Châtillon semblent provenir du départ de boues pendant des périodes pluvieuses (septembre et novembre).

1.1.2 Analyses en carbone, azote et phosphore dans les sédiments

Les analyses en carbone, azote et phosphore des sédiments des 3 sites sont reportées dans la Figure 1.

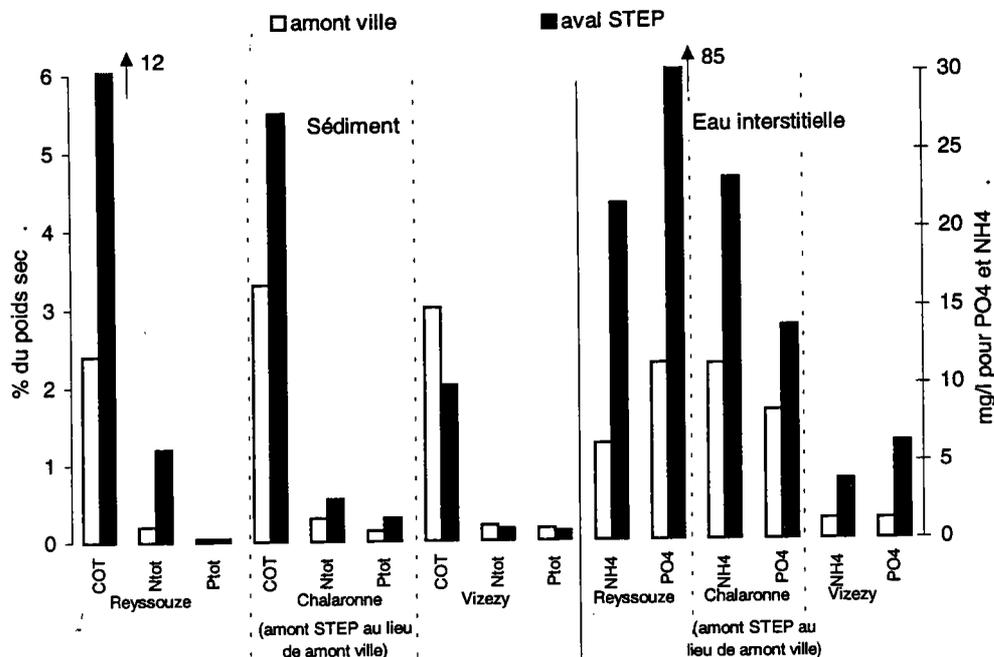


Figure 1 : Concentration en carbone, azote et phosphore dans les sédiments de la Reyssouze (R1, R3b), de la Chalaronne (C2c, C3b) et du Vizezy (V1a, V3b), en amont et en aval des STEP en septembre 94.

Sur les 3 sites, nous avons noté entre les stations amont et aval du rejet de STEP (Figure 1) :

- une augmentation de la concentration en NH_4^+ et en PO_4^{3-} dans l'eau interstitielle
- une augmentation de la concentration en COT, Ntot et Ptot dans le sédiment sauf pour le Vizezy où l'échantillon en aval de la STEP s'est révélé de texture grossière et donc susceptible de contenir moins de matière organique.

Ces augmentations sont les plus importantes pour la Reyssouze.

Grâce à l'application de la grille de qualité (Tableau 4), nous révélons une situation très dégradée sur la Chalaronne et la Reyssouze à l'aval de la STEP, les sédiments prélevés à l'amont étant déjà pollués et notamment celui de la Chalaronne.

Tableau 4 : Classes de pollution par l'azote et le phosphore observées dans les sédiments des trois rivières en septembre 94 et calculées selon Rofes (1994).

	Reyssouze		Chalaronne		Vizezy	
	Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval*
COT	2	4	3	4	2	1
Ntot	2	4	2	4	2	1
NH_4^+	2	4	3	4	1	2
Ptot	1	1	1	3	2	2
PO_4^{3-}	4	4	4	4	4	4

Situation normale : 0. Pollution modérée : 1, nette : 2, importante : 3 et excessive : 4. * : sédiment grossier

1.2 Analyse des micropolluants dans le milieu récepteur et dans l'effluent

Nous avons analysé les métaux dans les sédiments et les micropolluants organiques dans l'effluent.

1.2.1 Concentrations métalliques dans les sédiments

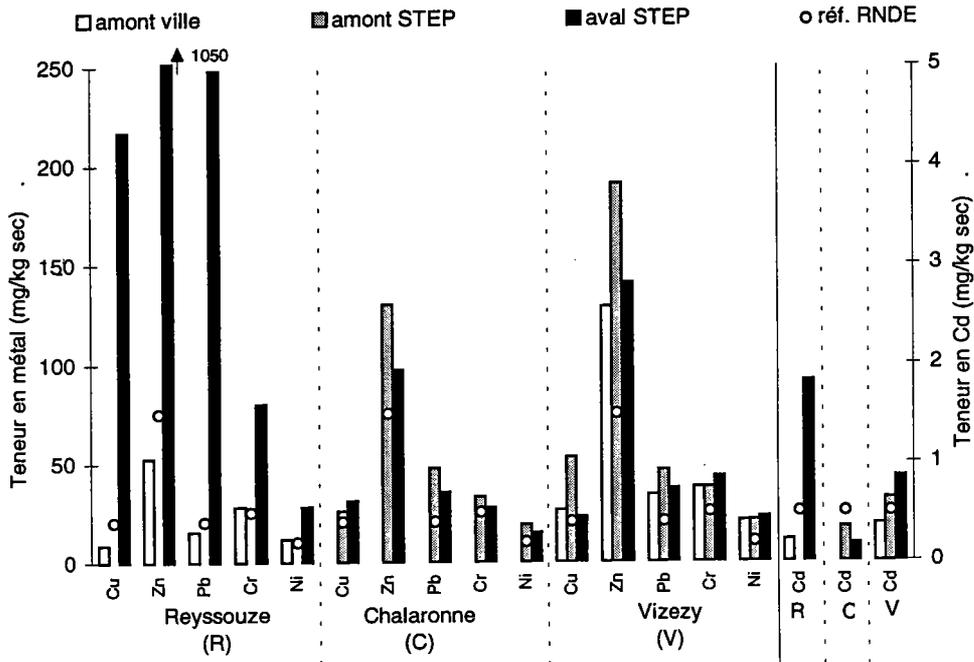


Figure 2 : Concentration en métaux des sédiments de la Reyssouze (R1, R3b), de la Chalaronne (C2c, C3b) et du Vizezy (V1a, V2, V3b), en amont et en aval des STEP (septembre 1994) et références du Réseau National de Données sur l'Eau RNDE (1994)¹⁷.

Les sédiments à l'aval des STEP contiennent de nombreux métaux à des concentrations relativement élevées comparées aux références RNDE (1994) (Figure 2). Différents auteurs ont déjà observé l'accumulation des métaux et notamment du Hg (mercure), Cu (cuivre), Zn (zinc), Pb (plomb) et Cd (cadmium) dans les sédiments à l'aval des STEP (Mason, 1987 ; Mason & Barak, 1990 ; Moon *et al.*, 1994).

Les concentrations métalliques rencontrées dans les sédiments de la Reyssouze à l'aval de la STEP de Bourg-en-Bresse sont 5 fois plus élevées que celles des sédiments des deux autres rivières à l'aval des STEP. La STEP de Bourg-en-Bresse traite un volume d'effluent de 3 à 10 fois supérieur aux deux autres STEP.

¹⁷Un sédiment est dit contaminé si les concentrations mesurées sont deux fois supérieures aux niveaux de référence RNDE

Les contaminations en Cu et Zn observées sur la Chalaronne (site de Châtillon) et sur le Vizezy (site de Montbrison) sont comparables à d'autres sites exposés à des effluents de STEP (Brown *et al.*, 1986). Il est à noter que ces derniers auteurs ont également enregistré la présence des métaux dans la chair des poissons pêchés à proximité de la STEP.

Grâce à l'analyse de stations supplémentaires en amont des STEP sur la Chalaronne et le Vizezy, nous avons montré une concentration plus importante de métaux à l'amont qu'à l'aval des STEP. Cette contamination métallique en amont des STEP serait due aux rejets des déversoirs d'orage présents entre la ville et le rejet de la STEP. Selon Granier *et al.* (1990), ces derniers apporteraient une charge en métaux tels que le Zn et le Pb non négligeable en comparaison avec la charge apportée par les eaux épurées de STEP.

Nous suspectons tout de même une contamination des sédiments de la Chalaronne à l'aval de la STEP par du cuivre présent dans l'effluent à des concentrations particulièrement élevées (Garric *et al.*, 1996). Des concentrations en cuivre et en zinc ont également été décelées dans l'effluent de la STEP de Montbrison.

Une diminution de la concentration métallique des sédiments entre l'amont et l'aval de la STEP malgré un apport de métaux dans l'effluent peut s'expliquer par une solubilisation des métaux des sédiments sous l'action de la matière organique provenant de l'effluent (Bubb & Lester, 1995).

En résumé, la mise en évidence de l'impact d'une STEP par la comparaison des teneurs en métaux entre une station à l'amont de la STEP et une station à l'aval de la STEP est rendue délicate par la présence de déversoirs d'orage à l'amont de la STEP connus pour apporter des métaux (Granier *et al.*, 1990). Le dosage des métaux dans les sédiments reste pertinent dans le cas de STEP recevant les effluents d'industrie ou d'une ville de taille importante.

1.2.2 Analyse des micropolluants organiques dans l'effluent

Des analyses de micropolluants ont été réalisées par le CIRSEE sur des échantillons d'effluent des STEP de Châtillon et de Montbrison. Seules les concentrations des détergents, micropolluants en quantité relativement importantes, sont reportées dans le Tableau 5. Il faut noter que la concentration en LAS retrouvée dans l'effluent de Montbrison est proche d'une concentration toxique pour la reproduction de la daphnie (Biesinger *et al.*, 1974).

Tableau 5 : Liste des micropolluants organiques identifiés dans les échantillons moyens prélevés sur 24h des effluents de sortie des STEP de Châtillon^C (mars 94) et de Montbrison^M (juin 94).

Détergents et chélatants	Hydrocarbures	Composés sulfurés et nitrogénés
LAS (30 ^C -590 ^M µg/l)	Toluène	Indole
NTA (160 ^C -460 ^M µg/l)	Alkylbenzènes	Méthylindole
EDTA (290 ^C -290 ^M µg/l)	Styrène	Caféine
	Naphthalène	
Composés oxygénés		
Phénol		
Butyrate		
Phtalate	Composés halogénés	Terpènes
Nonylphenolpolyéthoxylates (NPEO)	Trichloroéthane	
Coprostanol	Trichloroéthylène	
Cholestérol	Tétrachloroéthylène	
	Chloroforme	

Certains composés parmi les solvants halogénés, les hydrocarbures aromatiques et les phtalates figurent dans la liste 1 des substances dangereuses de la directive 76/464/CEE. Les concentrations de ces molécules ont été différentes entre les deux échantillons analysés, ne dépassant pas quelques µg/l. La toxicité de tous ces composés n'est pas connue et, pour les composés référencés, les concentrations mesurées étaient inférieures aux seuils de toxicité (Garric *et al.*, 1996).

2. Mesures biologiques sur des organismes prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

Dans ce paragraphe, nous décrivons les modifications engendrées par les rejets de STEP sur la structure du peuplement d'invertébrés et de poissons ainsi que sur la morphologie de trois espèces de poissons. En parallèle, nous étudions au laboratoire les effets potentiels de l'effluent sur la survie, la croissance et la reproduction d'invertébrés et de poissons.

Dans les mesures biologiques, nous incluons les mesures biocénétiques, morphologiques et physiologiques mais nous excluons les mesures enzymatiques ou biochimiques que nous exposerons dans le paragraphe suivant.

2.1 Mesures biologiques sur des poissons et des invertébrés prélevés *in situ* en amont et en aval de la STEP

2.1.1 Indice de qualité mesuré sur les invertébrés : application de l'Indice Biologique Global

Les valeurs d'IBG sont presque toujours inférieures en aval de la STEP par rapport à l'amont, les différences sont faibles sauf pour le Vizezy en décembre 93 (Tableau 6 et Tableau 7). Dans un seul cas, sur la Reyssouze en octobre 93, la note d'IBG est légèrement supérieure en aval de la STEP par rapport à l'amont.

Tableau 6 : Etude spatiale de l'IBG sur la Reyssouze (R1, R2, R3a) et le Vizezy (V1, V2, V3a, V3b).

Site	Date	Amont ville	Amont STEP	Aval STEP	Aval lointain
Reyssouze	Oct-93	11	5	6	6
	Sept-94	8	-	2	
Vizezy	Déc-93	18	15	3	6
	Août-94	13	6	-	5

Tableau 7: Etude temporelle de l'IBG sur la Chalaronne entre l'amont et l'aval de la STEP. (stations C2c, C3b)

Date	Amont STEP	Aval STEP
Déc-93	15	13
Fév-94	14	12
Avr-94	10	9
Juin-94	9	8
Août-94	10	7

On peut également noter les variations importantes de l'IBG sur les deux stations prélevées de la Chalaronne, l'IBG révélant une meilleure qualité biologique en hiver qu'en été (Tableau 7) (Barthélémy, 1994).

Par comparaison entre deux stations encadrant le rejet de la STEP, la mesure de l'IBG a permis de déceler des différences dues à l'apport de la STEP. Ces différences sont faibles notamment à cause d'une faible note d'IBG en amont de la STEP révélant une faune étant déjà polluo-résistante. L'étude de l'IBG le long de la Reyssouze et du Vizezy a montré une dégradation de la qualité biologique entre l'amont et l'aval de la ville et une récupération entre l'aval immédiat et l'aval lointain de la STEP (Tableau 6).

2.1.2 Structure des peuplements piscicoles

Les structures des peuplements de poissons des trois sites ont été représentées sur les Figures 10, 11 et 12. Les effectifs ont été estimés par la méthode de Carle & Strub (chapitre 2, § 3.2.1.) et ramenés à 100 m de linéaire pour chaque station.

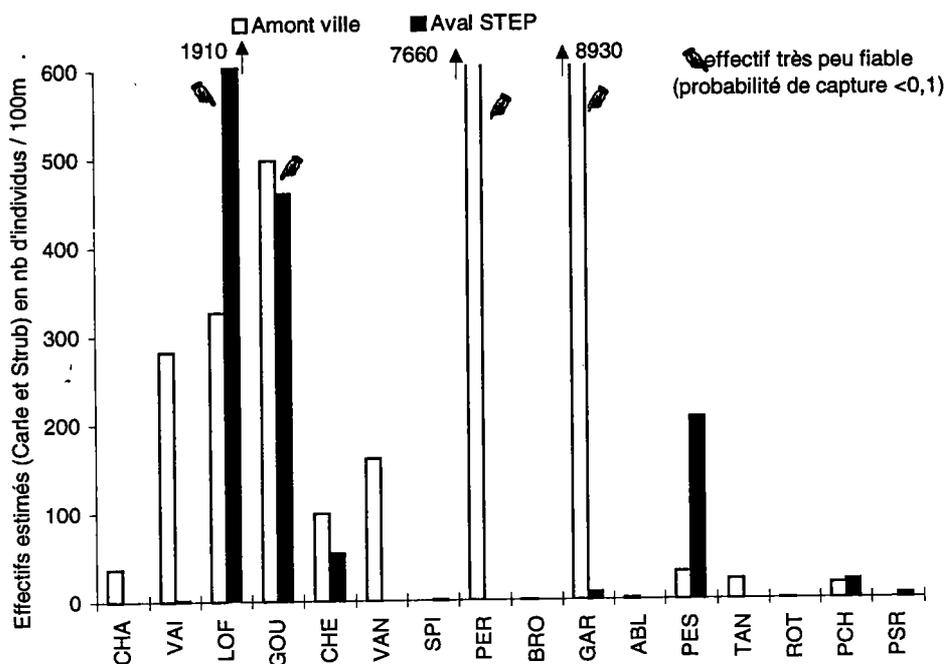


Figure 3 : Composition spécifique des peuplements de poissons pêchés sur la Reyssouze en amont de la ville de Bourg-en-Bresse (R1) et en aval de la STEP (R3c) en novembre 93. Liste des abréviations des espèces en annexe 11.

Alors qu'il y a 14 espèces à l'amont de la STEP dans la Reyssouze, seules 9 espèces sont présentes à l'aval (Figure 3 et annexe 12). La disparition presque totale de la faune piscicole à l'aval jusqu'à 9 km après le rejet a été constatée grâce à des sondages de pêche sur différentes stations à l'aval de la STEP. A 9 km après le rejet, il y a une modification non seulement quantitative mais aussi qualitative du peuplement piscicole à l'aval de la STEP : les perches soleil et les loches prolifèrent au détriment des chabots, vairons et vandoises.

Il faut noter également l'absence de faune piscicole sur une station en amont de la STEP dans la ville, station étudiée dans le but de nous permettre de séparer l'impact de la STEP de l'impact de la ville et des déversoirs d'orage. On peut conclure à un fort impact de la ville sur le peuplement piscicole dû à une contamination chimique du milieu mais surtout à une dégradation de l'habitat, la rivière étant canalisée dans la ville (Allardi *et al.*, 1996).

D'autre part, il est important de noter qu'il a été impossible d'estimer correctement les effectifs de certaines espèces de poissons sur la Reyssouze, rivière la plus importante de notre étude. Il faut en effet rappeler qu'il est d'autant plus difficile d'étudier la communauté

piscicole que la rivière est grande (Allardi, 1994).

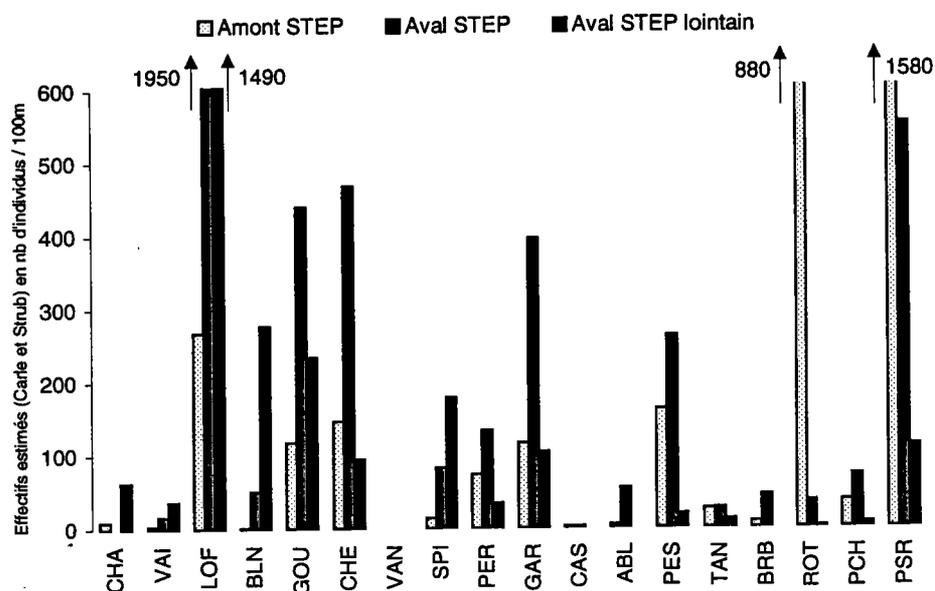


Figure 4 : Composition spécifique des peuplements de poissons pêchés sur la Chalaronne en amont de la STEP (C2c) et en aval de la STEP (C3b et C3c) en mars 94. Liste des abréviations des espèces en annexe 11.

Dans la Chalaronne, de 19 espèces de poissons à l'amont de la STEP, on passe à 18 espèces à l'aval immédiat et 15 espèces à l'aval lointain (annexe 12).

Dans la Figure 4, les espèces rares¹⁸ ne sont pas représentées sauf le carassin dans un souci d'exposer les mêmes espèces pour les pêches de 94 et de 95 (voir chapitre 4, § 3.1.1).

Peu de modifications sont enregistrées dans la structure du peuplement piscicole de la Chalaronne entre l'amont et l'aval de la STEP sauf la prolifération de loches et de perches soleil.

¹⁸ <0,1% de l'effectif total.

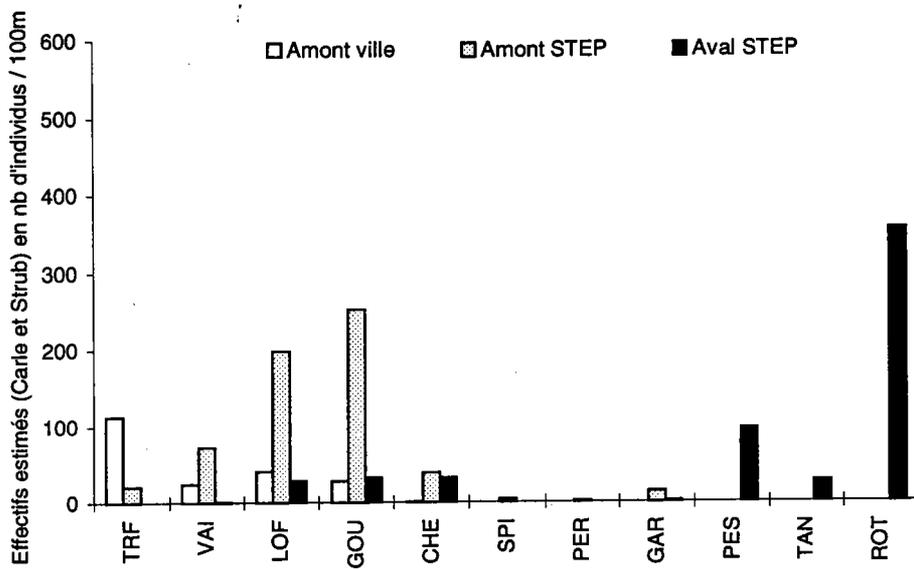


Figure 5 : Composition spécifique des peuplements de poissons pêchés sur le Vizezy en amont de la ville de Montbrison (V1b), en amont de la STEP (V2) et en aval de la STEP (V3b) en juin 94. Liste des abréviations des espèces en annexe 11.

Contrairement aux deux autres rivières, le nombre d'espèces de poissons augmente sur le Vizezy entre l'amont et l'aval de la STEP passant de 5 à 8 (Figure 5 et annexe 12).

Il faut noter que le peuplement piscicole en amont de la STEP est totalement différent de celui des autres rivières où le nombre d'espèces est supérieur à 10 et où les espèces les plus abondantes sont caractéristiques de zones calmes.

De plus, le peuplement piscicole de l'amont de la STEP est différent de celui de l'aval. Entre l'amont et l'aval, il y a apparition d'espèces indicatrices d'une zone à faible courant, la pente de la rivière passant de 10 à 1‰.

Ainsi, les changements dans la structure du peuplement piscicole du Vizezy semblent plus liés à la zonation du cours d'eau qu'à une contamination chimique du milieu due au rejet de la STEP.

Nous avons associé nos espèces de poissons rencontrées à leur indice de résistance à la dégradation (Ir) défini par Verneaux (1981). La dégradation comprend les contaminations chimiques et les modifications physiques de l'habitat. Son estimation est basée sur un indice de qualité biologique déterminé à l'aide de l'étude de la faune d'invertébrés benthiques. On constate ainsi une prolifération d'espèces résistantes à la dégradation du milieu au détriment d'espèces sensibles.

Une étude de la structure de la population de chevaines dans le cadre de la mesure de l'impact de la STEP sur la faune piscicole a été envisagée. Cependant, on peut remarquer que la densité de chevaines entre l'amont et l'aval des STEP a diminué sauf pour la Chalaronne. Ainsi, les

faibles abondances de chevaines sur le Vizezy et sur la Reyssouze en aval de la STEP rendent difficile les comparaisons de structure de population.

2.1.3 Facteurs de condition des loches, goujons et chevaines

Les facteurs de condition des loches, des goujons et des chevaines pêchés dans la Reyssouze, la Chalaronne et le Vizezy sont présentés dans la Figure 6.

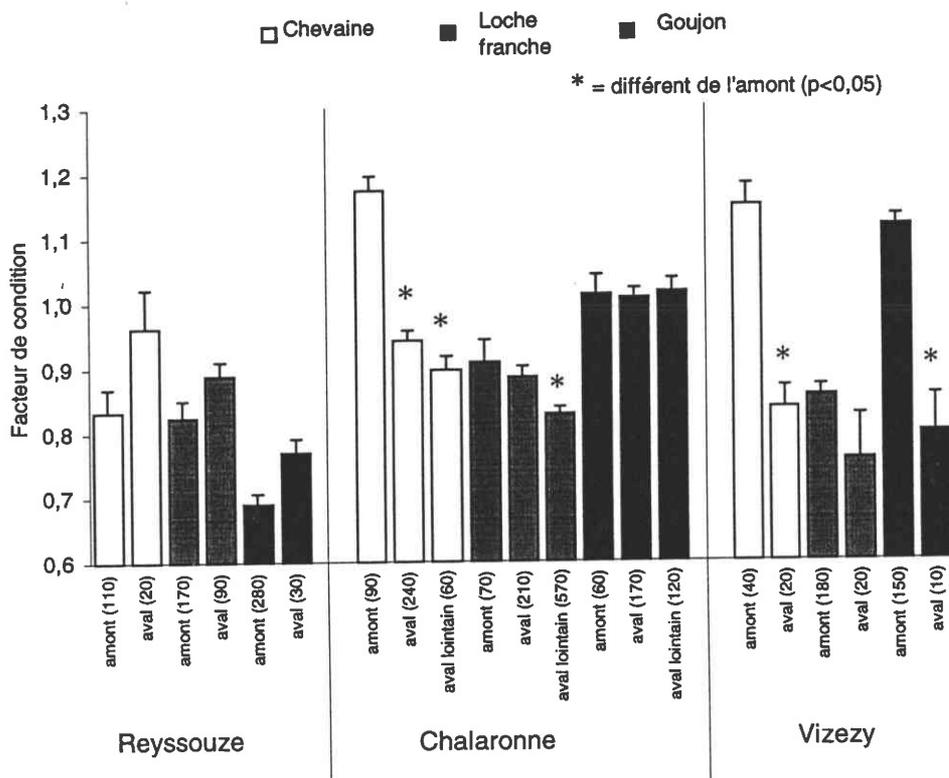


Figure 6 : Facteur de condition (= Poids / Longueur³) (moyenne et erreur type) des poissons pêchés dans la Reyssouze (R1, R3c) en novembre 93, dans la Chalaronne (C2c, C3b, C3c) en mars 94 et dans le Vizezy (V2, V3b) en juin 94 en amont et aval des STEP. () : nombre de poissons.

Pour deux espèces de poisson de la Chalaronne (chevaine et loche) et du Vizezy (chevaine et goujon), nous avons observé une diminution significative du facteur de condition à l'aval de la STEP par rapport à l'amont. Cette diminution est connue pour être la réponse à un stress (Skadsen *et al.*, 1980 ; Brown *et al.*, 1987).

Pour la Reyssouze, le facteur de condition des poissons semble peu affecté à l'aval de la STEP, qui est un aval lointain par rapport aux avals des deux autres sites.

Le facteur de condition mesuré chez les poissons s'est révélé simple à utiliser dans notre étude. Le nombre important de poissons pêchés nous a permis de discriminer de faibles différences du facteur de condition entre les stations.

2.2 Mesures biologiques sur des organismes exposés à l'effluent en conditions contrôlées

2.2.1 Tests de toxicité

Nous avons réalisé des bioessais de toxicité à court terme sur deux microcrustacés (*D. magna* et *C. dubia*) et à long terme sur *C. dubia* et sur un poisson : *D. rerio*. Les effluents testés en toxicité à court terme sont des échantillons instantanés¹⁹ différents pour chaque test. Pour la toxicité à long terme, c'est le même échantillon d'effluent, échantillon prélevé sur 24h et proportionnel au débit, qui a été testé sur invertébré et sur poisson. Les résultats sont résumés dans le Tableau 8. (Des résultats plus complets des tests de toxicité à long terme sont présentés en annexe 14).

Tableau 8 : Résumé des tests de toxicité effectués sur les effluents des trois STEP étudiées.

Toxicité et paramètre suivi	Test	Bourg-en-Bresse (octobre 93)	Châtillon-sur-Chalaronne (mars 94)	Montbrison (juin 94)
A court terme : - immobilité	<i>D.magna</i> 24h ($\leq 100\%$) <i>C.dubia</i> 24h ($\leq 100\%$) 48h ($\leq 100\%$)	NT ^a - ^b -	NT NT -	NT NT CI50 ^c : 91% [84-100]
A long terme : reproduction	<i>C. dubia</i> 7j.	(21-30-43-90%) LOEC ^a : 21%	($\leq 90\%$) NT ^b	($\leq 60\%$) NT
A long terme : survie	ELS sur <i>D. rerio</i> 10j. (21-30-43-62-90%)	LOEC ^d : 90%	NT	LOEC : 62%

() : concentrations des effluents testées. ^aNT : non toxique. ^btest non effectué. ^cCI50 : concentration inhibitrice de 50%. [] : intervalle de confiance à 95%. ^dLOEC : concentration minimale testée ayant un effet sur le paramètre choisi.

Aucune toxicité à court terme n'a été décelée par les trois tests utilisés pour les effluents des 3 STEP sauf pour l'effluent de Montbrison testé en 48h sur la cériodaphnie (Tableau 8). En plus des tests à court terme mentionnés dans le Tableau 8, une campagne de 5 tests Microtox effectués de février à avril 95 sur l'effluent de STEP de Châtillon testés à 45 et 80% n'a révélé aucune toxicité. Ces résultats confirment que les effluents de STEP sont faiblement toxiques à court terme comme l'avaient déjà observé différents auteurs (Metikosh, 1980 ; Craig *et al.* 1991 ; Arbuckle & Alleman, 1992).

Par contre, les effluents se sont révélés plus toxiques pour des tests effectués sur une plus longue période. Nous avons ainsi confirmé l'intérêt d'utiliser des tests de toxicité à long terme

¹⁹ Echantillon prélevé à un instant t.

pour déceler la toxicité des effluents de STEP bien qu'actuellement, seul le test daphnie à court terme (24h) soit utilisé pour le contrôle des rejets (Vasseur *et al.*, 1991).

De plus, nous avons observé une différence de toxicité en fonction de l'effluent : l'échantillon testé d'effluent de Bourg-en-Bresse s'est montré plus toxique à long terme que celui de Montbrison qui est lui-même plus toxique que celui de Châtillon.

Il est important de constater que la toxicité de l'effluent de Bourg-en-Bresse est importante puisque la plus faible concentration testée a déjà un effet sur la reproduction de la cériodaphnie, cette concentration étant proche de celle qu'on peut rencontrer dans la rivière.

L'effluent de Montbrison s'est révélé toxique à long terme pour le poisson uniquement. Celui-ci contenait une concentration forte en ammonium (Tableau 9).

Tableau 9 : Analyses physico-chimiques des effluents des 3 STEP.

Analyses	Bourg-en-Bresse oct 93	Châtillon-sur-Chalaronne mars 94	Montbrison juin 94
pH	6,6	7	7,4
Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	485	565	455
MES (mg/l)	192	147	78
DCO (mg/l)	205	275	150
COT (mg/l)	-	8,6	13,7
NK (mg/l)	18,2	-	14
NH_4^+ (mg/l)	4,7	1,2	10,2
NO_2^- (mg/l)	4,3	0,2	0,2
NO_3^- (mg/l)	2,7	2,8	3,6
Ptot (mg/l)	5,1	4,3	2,7
PO_4^{3-} (mg/l)	4,6	5,6	2,6

Il est à noter que la toxicité des effluents varie puisqu'un échantillon d'effluent de la STEP de Montbrison n'a pas montré de toxicité à long terme sur *C. dubia* alors qu'un autre échantillon prélevé une semaine auparavant avait révélé une toxicité à court terme sur cet organisme.

Les résultats des différents tests de toxicité à long terme sont complémentaires et montrent l'intérêt d'utiliser une batterie de tests comme l'a déjà conseillé Cairns (1983). Le test à long terme sur la cériodaphnie est un test plus sensible que le test sur poisson sauf quand la concentration en ammoniac est importante comme nous l'avons déjà remarqué dans des travaux antérieurs (Garric *et al.*, 1996).

2.2.2 Modification du protocole du test de toxicité sur la cériodaphnie pour la prise en compte de la complexité de l'exposition *in situ*

Pour mieux prendre en compte l'exposition réelle des organismes du milieu récepteur, nous avons décidé de modifier le protocole du test de toxicité chronique proposé par Weber *et al.* (1989) sur le microcrustacé d'eau douce *Ceriodaphnia dubia*. Nous avons ici essayé de montrer l'intérêt de l'utilisation de l'eau de la rivière comme eau de dilution dans le test.

Une eau de laboratoire et l'eau de la rivière prélevée en amont du rejet de la STEP ont été utilisées comme eau de dilution de l'effluent afin de vérifier leur influence sur la toxicité de l'effluent vis-à-vis de la reproduction de *C. dubia* après 7 jours d'exposition (Figure 7).

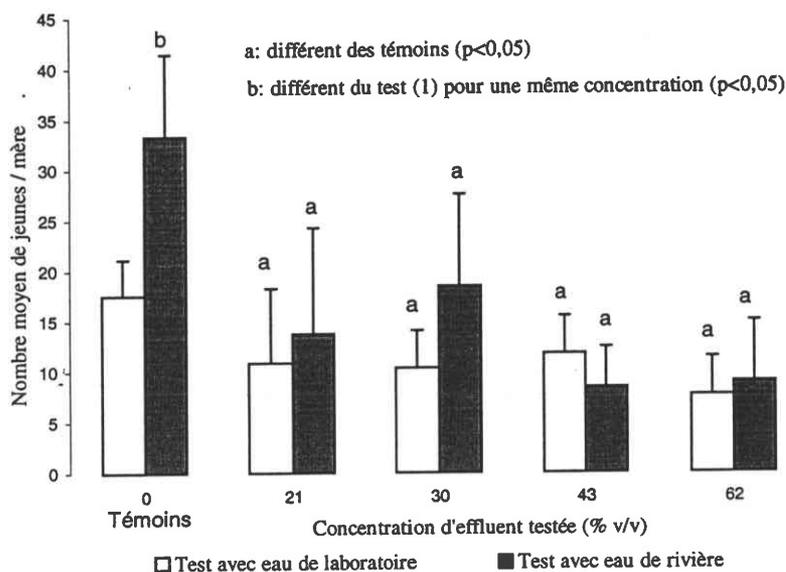


Figure 7 : Comparaison de la reproduction de *C. dubia* exposées à l'effluent de la STEP de Bourg-en-Bresse dilué avec de l'eau de laboratoire ou avec de l'eau de la rivière Reyssouze.

Tableau 10 : Concentrations d'effluent de la STEP de Bourg-en-Bresse dilué avec de l'eau de laboratoire ou avec de l'eau de la rivière Reyssouze ayant un effet sur la reproduction de *C. dubia*.

Concentration (en % v/v) entraînant une diminution de la reproduction de la cériodaphnie de :	Test avec eau de laboratoire	Test avec eau de rivière
10%	5 [3 ; 19]	3 [3 ; 6]
20%	11 [7 ; 24]	7 [5 ; 12]
50%	55 [17 ; 68]	17 [13 ; 36]

Concentrations calculées par interpolation linéaire. [] : intervalle de confiance à 95%.

Quelles que soient la concentration d'effluent et l'eau de dilution utilisée, l'effluent a un effet sur la reproduction de *C. dubia* (Figure 7). Les cériodaphnies témoins ont cependant une reproduction plus importante dans l'eau de la rivière que dans l'eau de laboratoire. Ainsi, nous avons mis en évidence un effet plus important de l'effluent sur la reproduction de la cériodaphnie en utilisant l'eau de la rivière plutôt qu'une eau de laboratoire comme eau de dilution du test. En effet, il faut moins d'effluent dans l'eau de la rivière que dans l'eau de laboratoire pour observer le même effet toxique de l'effluent sur la reproduction de la cériodaphnie (Tableau 10).

Par la suite, nous avons choisi d'utiliser l'eau de la rivière car elle facilite la détection de la toxicité de l'effluent et qu'elle permet de mieux représenter l'exposition *in situ*.

3. Mesures biochimiques sur des poissons prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

Dans ce paragraphe, nous étudions les modifications des activités enzymatiques EROD (Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase) et AChE (acétylcholinestérase), biomarqueurs d'exposition aux polluants mesurés respectivement dans le foie et dans le muscle de poissons du milieu ou exposés à l'effluent. Le couplage entre mesures *in situ* et mesures de laboratoire est intéressant pour mieux analyser l'effet des effluent de STEP sur le terrain à travers ces biomarqueurs.

3.1 Mesure de l'activité EROD sur des poissons prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

L'induction de l'activité EROD est un biomarqueur d'exposition à certains micropolluants organiques tels que des PCB et des HAP. Nous avons tenté de connaître les variations de ce biomarqueur sur nos trois sites en mesurant l'activité EROD de chevaines sur différentes stations. L'intensité de l'activité EROD des poissons est fonction du site étudié dans (ANOVA, $p < 0,01$) (Figure 8).

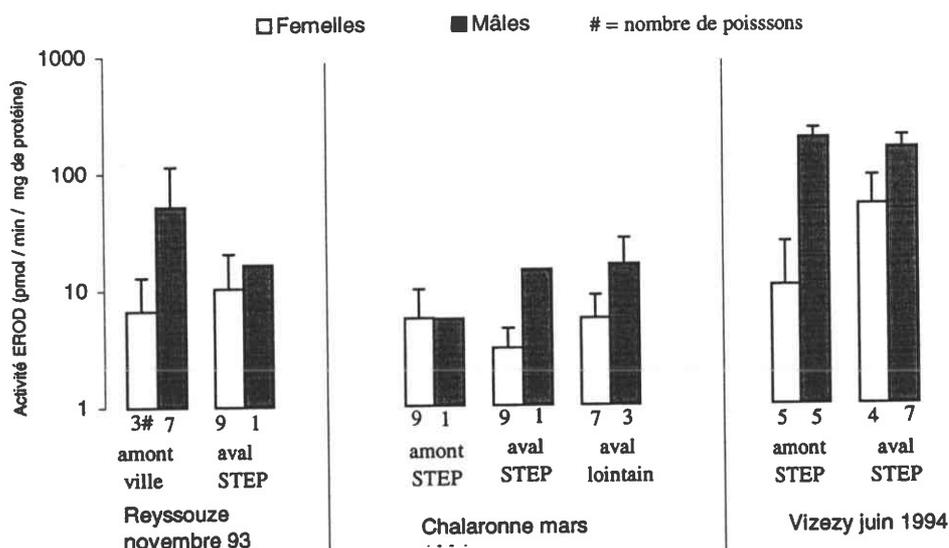


Figure 8 : Activité EROD de chevaines pêchés entre l'amont et l'aval de la STEP sur la Reysouze (R1, R3c), la Chalaronne (C2c, C3b et c) et le Vizezy (V1b, V2, V3b).

Tous sexes confondus, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence de l'activité EROD des poissons entre l'amont et l'aval des STEP des trois sites sauf sur la Chalaronne (ANOVA, $p = 0,03$). L'impossibilité de pêcher des mâles et des femelles en nombre égal à

chaque station a influencé la puissance de notre analyse statistique et peut expliquer en partie notre difficulté à différencier les stations entre elles. En effet, sur nos sites, nous avons confirmé que l'activité EROD était dépendante du sexe (ANOVA, $p < 0,05$) comme Goksøyr et Förlin (1992) l'avaient déjà remarqué.

L'effet inducteur des effluents des trois STEP a pu être mesuré lors d'exposition de 96h en laboratoire (Figure 9).

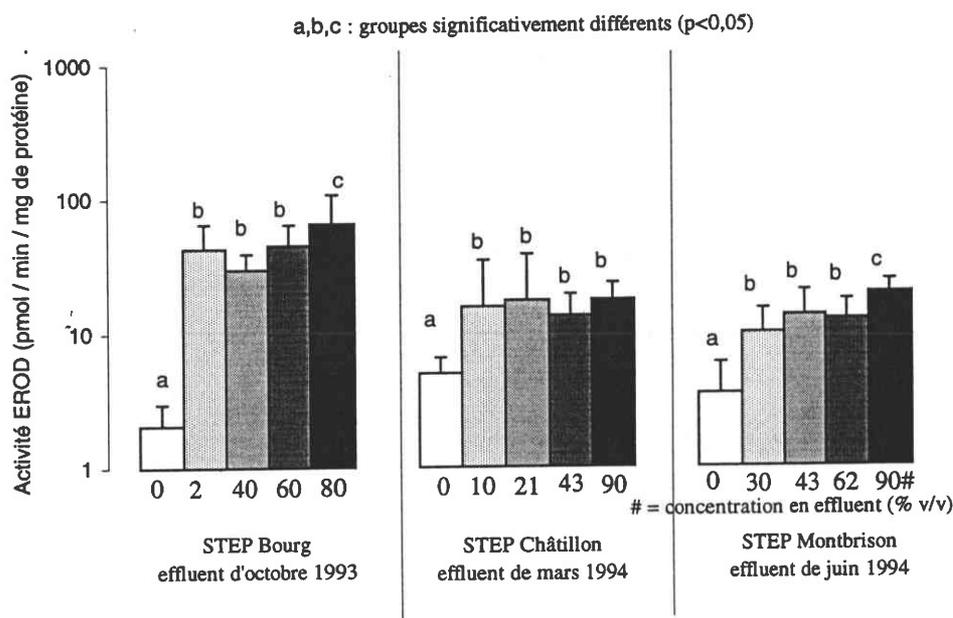


Figure 9 : Activité EROD (moyenne et écart-type) de lots de 10 truites exposées à différentes concentrations d'effluent provenant de trois STEP pendant 4 jours

Dès la plus faible concentration testée, les effluents se révèlent être inducteurs de l'activité EROD (ANOVA, $p < 0,05$).

L'effluent de Bourg-en-Bresse est le plus inducteur de l'activité EROD des trois effluents testés : le taux d'induction est de 3 pour l'effluent de Châtillon et de Montbrison et de 14 pour l'effluent de Bourg-en-Bresse. Il correspond à des niveaux déjà rencontrés pour des effluents de STEP et de papeterie (Richert, 1994).

A titre de remarque, nous avons noté une activité EROD différente entre les truites exposées à la β -naphtoflavone lors de l'expérience sur l'effluent de Bourg-en-Bresse et celles des expériences menées sur les effluents des deux autres STEP. Cette différence d'induction des témoins positifs est accompagnée de différences dans l'activité EROD des truites témoins et peut être expliquée par l'origine différente des truites d'expérimentation.

3.2 Mesure de l'activité AChE sur des poissons prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

Nous avons mesuré l'acétylcholinestérase (AChE) dans le muscle des poissons pêchés sur les trois rivières (Figure 10). L'inhibition de cette enzyme nous renseigne sur l'exposition des poissons à certains insecticides (carbamates et organophosphorés).

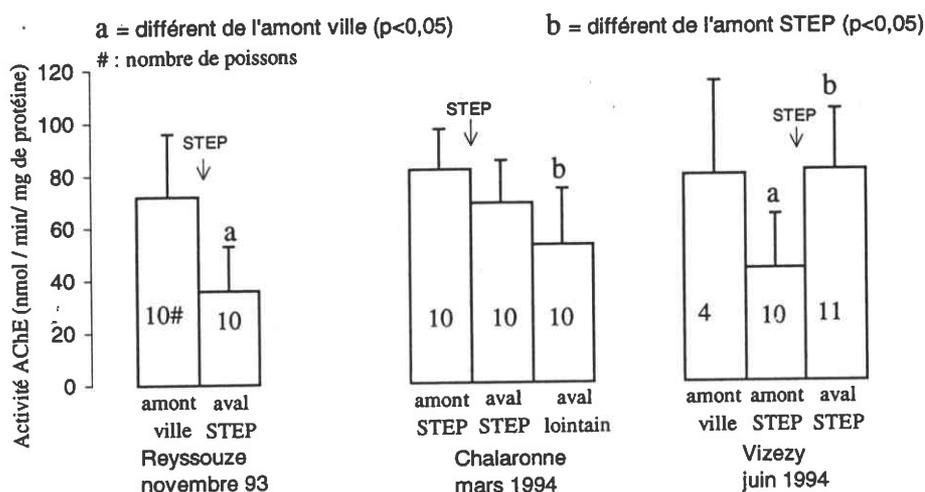


Figure 10 : Activité AChE de chevaines pêchés (moyenne et écart-type) en amont et aval des STEP sur la Reyssouze (R1 et R3c), sur la Chalaronne (C2c, C3b et C3c) et sur le Vizezy (V1b, V2 et V3b).

Nous avons observé une inhibition de l'activité AChE des poissons de la Reyssouze et de la Chalaronne de l'amont vers l'aval des cours d'eau.

L'inhibition de l'AChE observée ne peut s'expliquer que par des apports autres que le rejet de la STEP, les effluents de STEP n'ayant pas entraîné d'inhibition de l'activité AChE des truites exposées pendant 4 jours : cas des effluents de Châtillon et de Montbrison (Figure 11).

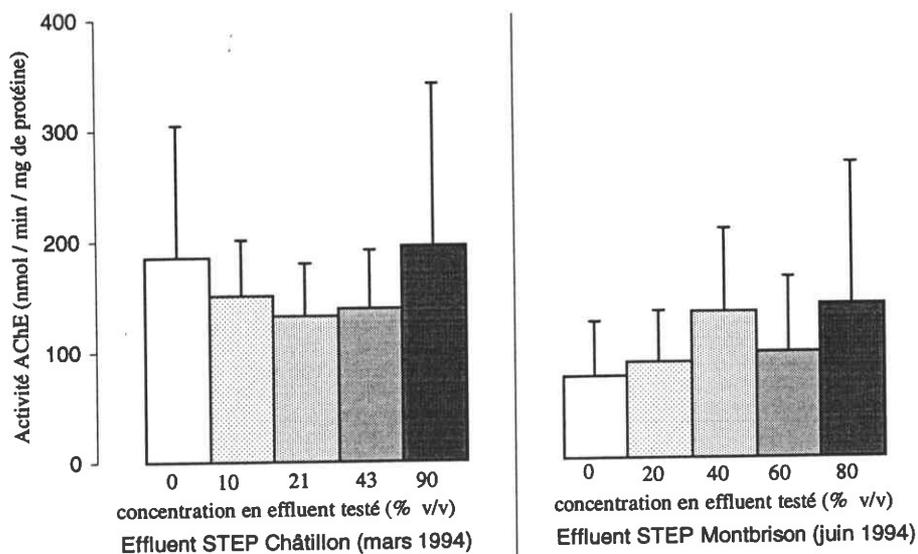


Figure 11 : Activité AChE (moyenne et écart-type) de lots de 10 truites exposées à différentes concentrations d'effluent des STEP de Châtillon et de Montbrison.

Nous pouvons donc soupçonner une pollution d'origine agricole à cause de la nature des polluants susceptibles d'inhiber l'activité de cette enzyme et de l'importance de l'agriculture dans les régions où coulent la Reysouze et la Chalaronne. Dans les analyses de micropolluants effectuées sur la Chalaronne (chapitre 4, §1.3.2), nous n'avons pas trouvé trace d'organophosphorés mais ceux-ci sont peu rémanents dans le milieu récepteur contrairement à l'inhibition de l'AChE (celle-ci est souvent irréversible, sa rémanence dépend alors du turnover de l'enzyme).

Dans le cas du Vizezy, nous avons observé une inhibition de l'activité AChE des poissons du Vizezy à l'aval de la ville mais à l'amont de la STEP. Le caractère inhibiteur de l'eau de la rivière en amont de la STEP sur l'AChE a été montré par l'inhibition de l'activité de cette enzyme pour des chevaines et des truites exposés à cette eau respectivement pendant 8 ou 12 jours dans des bassins de dérivation placés sur le site (Figure 12).

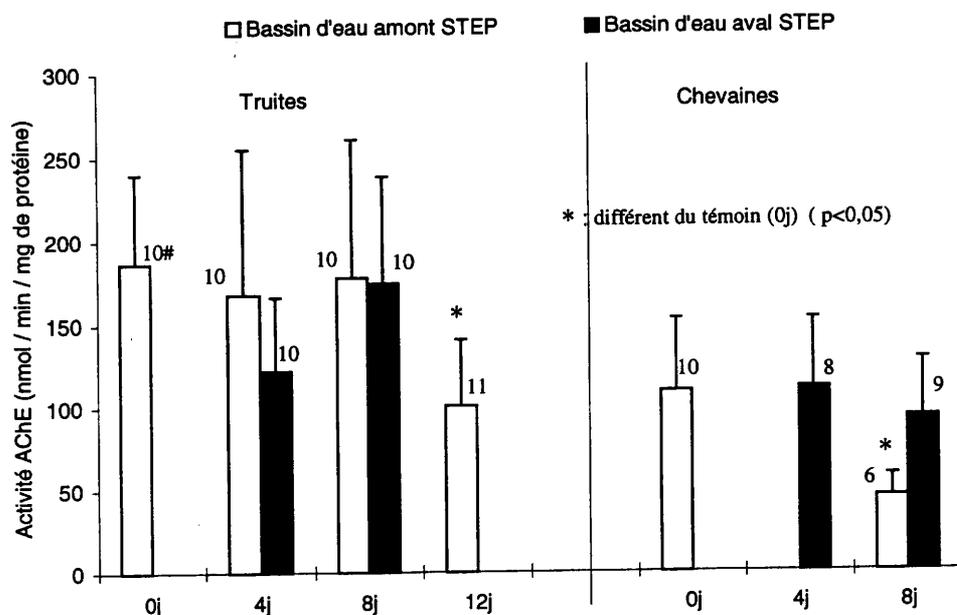


Figure 12 : Activité AChE (moyenne et écart-type) de truites et chevaines placés dans des bacs alimentés par de l'eau d'amont de la STEP de Montbrison et par un mélange (1/1) d'eau d'amont et d'effluent (juin 94). # : nombre de poissons.

L'AChE étant également inhibée par certains métaux à fortes concentrations (Olson & Christensen, 1980), nous pouvons suspecter l'impact des rejets de déversoirs d'orage placés en amont de la STEP, ces rejets contenant des métaux (§ 1.2.1).

4. Synthèse et discussion

Nous résumons ici les principales mesures obtenues sur l'impact des effluents de STEP de trois sites puis discutons de l'importance du site dans les variations de cet impact.

4.1 Evaluation de l'impact des effluents de STEP sur trois sites

Les résultats obtenus sur l'évaluation de l'impact de l'effluent des trois STEP par les différentes méthodes utilisées sont résumés dans le Tableau 11. Nous avons regroupé les résultats en fonction des approches chimique, biologique *in situ* et biologiques en conditions contrôlées. Nous avons écarté :

- les analyses de l'effluent qui ne permettent pas de révéler un impact,
- les mesures d'activité AChE, utilisées pour déceler des pollutions autres que l'effluent de STEP,
- les mesures d'activité EROD des poissons pêchés dans la rivière car nous estimons que le manque de réponse est lié à un problème d'expérimentation (nombre de poissons pêchés de chaque sexe).

Tableau 11 : Résumé de l'impact chimique et biologique des effluents des trois STEP. Comparaison pour les mesures in situ entre l'amont et l'aval de la STEP sauf pour la Reyssouze où les mesures sont entre l'amont de la ville et l'aval de la STEP.

Approche	Echantillon utilisé	Paramètre mesuré	Reyssouze STEP de Bourg-en-Bresse	Chalaronne STEP de Châtillon	Vizezy STEP de Montbrison
Chimique in situ	Eau	C, N, P [#]	+	-	+
	Sédiments	C, N, P	+	+	+*
		Métaux	+	-	-
			3/3 = 100% ^a	1/3 = 30%	2/3 = 70%
Biologique in situ	Invertébré	IBG	- / +	+	+
	Poisson	Structure	+	-	-
	Chevaine	FC	-	+	+
	Loche	FC	-	+	-
	Goujon	FC	-	-	+
			2/5 = 40%	3/5 = 60%	3/5 = 60%
Biologique en conditions contrôlées	Effluent	Toxicité à court terme	-	-	-
		Toxicité à long terme sur invertébré	+	-	-
		Toxicité à long terme sur poisson	+	-	+
		Activité EROD	+	+	+
			3/4 = 75%	1/4 = 25%	2/4 = 50%

* : différence entre l'amont ville et l'aval STEP. [#] : Concentrations en carbone (COT), azote (Ntot, NH₄⁺) et phosphore (Ptot, PO₄³⁻).

+ : effet significatif observé dû au rejet de la STEP ; - : pas d'effet significatif observé dû au rejet de la STEP ; + / - : effet significatif observé une fois sur 2. ^a : proportion et pourcentage de méthodes ayant donné un résultat significatif.

Nous avons détecté une concentration plus élevée en ammonium et en phosphates dans l'eau de la rivière ou dans l'eau interstitielle des sédiments à l'aval des STEP qu'à l'amont. Une éventuelle contamination en métaux est également observée. D'ailleurs, les effluents de STEP que nous avons analysés sont composés d'ammoniac en concentration proche des concentrations pouvant être toxiques à long terme pour les invertébrés et les poissons, de phosphates, de métaux notamment de cuivre et de zinc et de micropolluants organiques notamment des détergents et des HAP.

Au niveau biologique, nous avons observé la diminution de l'indice de qualité biologique (IBG) sur les sites à l'aval de la STEP. De plus, à l'aide de nos expériences en laboratoire, nous avons montré que les effluents de STEP étaient :

- relativement peu toxiques vis-à-vis des organismes exposés. Pour la plupart, ils sont toxiques à long terme sur les organismes mais n'entraînent pas la mort à court terme,
- inducteurs de l'activité enzymatique de détoxification EROD. L'effluent étant a priori un mélange complexe de molécules inductrices et inhibitrices de l'activité EROD, une relation n'est pas toujours mise en évidence entre la concentration d'exposition des poissons à l'effluent et l'importance de l'effet inducteur,

– non inhibiteurs de l'activité AChE.

Ces résultats analytiques et toxicologiques sont cohérents avec d'autres études menées sur les effluents de STEP au laboratoire (Garric *et al.*, 1994 ; Garric *et al.*, 1996).

• *Distinction de l'impact de l'effluent de STEP des autres perturbations*

L'impact de la STEP est fonction de la qualité de la rivière (Figure 13).

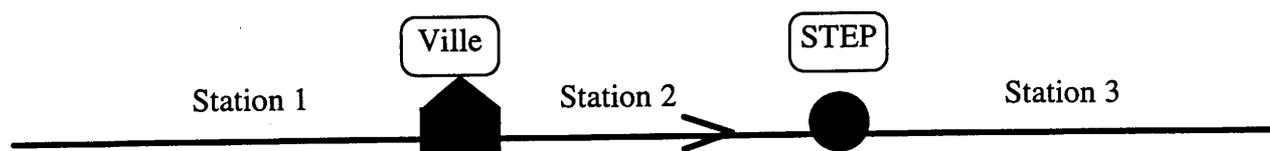


Figure 13 : Les différents secteurs du cours d'eau à proximité de la STEP (Station 1 : en amont de la ville ; Station 2 : en aval de la ville et en amont de la STEP ; Station 3 : en aval de la STEP).

Nous avons pu mettre en évidence des perturbations biologiques causées par d'autres pollutions qui peuvent perturber la détection de l'impact de la STEP.

A l'amont de la STEP, entre l'amont et l'aval de la ville, nous avons constaté des baisses d'IBG dans la Reyssouze et dans le Vizezy et d'activité AChE des poissons dans le Vizezy. Nous avons également noté des concentrations importantes de métaux en amont de STEP. Ces modifications nous ont permis de soupçonner l'influence des rejets de déversoirs d'orage.

Cette pollution semble relativement importante par rapport à l'effet du rejet de la STEP. Nous avons même pu montrer que l'apport de l'effluent dans la rivière permet de restaurer une situation moins perturbée qu'à l'amont. C'est le cas de l'activité enzymatique AChE des poissons du Vizezy et de l'IBG pour une campagne de mesure sur la Reyssouze.

Cependant, il faut noter que la pollution des déversoirs d'orage est localisée en amont de la pollution de la STEP : la faune en amont de la STEP est donc une faune déjà polluo-résistante. Ainsi, on peut imaginer que, pour une même pollution, les effets biologiques entre l'amont et l'aval de la STEP seront donc plus difficiles à déceler qu'entre l'amont et l'aval de la ville.

D'autre part, il est important de noter une diminution de la diversité des habitats de la rivière entre l'amont et l'aval de la ville qui peut influencer la note d'IBG. En effet, les rivières étudiées traversent les villes et sont partiellement canalisées dans la ville (cas de la Reyssouze). Par contre, elles recouvrent leur lit naturel au niveau du rejet de la STEP, celle-ci étant toujours placée en zone périphérique de la ville. L'influence de l'habitat et notamment de la pente de la rivière a également été observée sur le peuplement de poissons du Vizezy où il a été impossible de faire la part entre l'effet de la modification physique de la rivière et de la pollution chimique apportée par l'effluent de STEP.

Nous avons décelé une inhibition de l'activité AChE des poissons de la Reyssouze et de la Chalaronne à l'aval de la STEP que nous avons attribué à la pollution agricole, le rejet de la

STEP n'étant pas inhibiteur de cette activité enzymatique.

Malgré cette pollution agricole diffuse, nous avons remarqué une amélioration de la qualité biologique (IBG) des cours d'eau à l'aval lointain de la STEP. Cette amélioration de qualité prouve l'importance de la pollution due au rejet dans ce secteur de rivière comparativement à la pollution agricole.

En amont de la ville, les faibles notes d'IBG obtenues sur la Reyssouze nous montrent que les rivières sont soumises à de nombreuses pollutions qu'il est parfois difficile d'identifier. Ainsi, la station en amont de la ville ne peut être considérée comme une station de référence. Cependant, sa comparaison avec la station en amont de la STEP permet de faire la part entre la pollution urbaine apportée par les déversoirs d'orage et la pollution apportée par la STEP.

La distinction de l'impact de l'effluent de STEP des autres perturbations a été possible entre autres grâce aux comparaisons entre les mesures sur l'effluent et les mesures *in situ*. Il est à noter que les mesures d'activités enzymatiques permettent de telles comparaisons. Cependant, elles ne renseignent pas sur l'effet toxique de l'effluent.

- *Identification des agents polluants apportés par l'effluent de STEP*

Grâce aux mesures chimiques et biologiques, nous avons montré que l'impact de la STEP de Bourg-en-Bresse pouvait être dû à la fois à la matière organique, aux métaux et aux micropolluants organiques inducteurs de l'activité EROD.

Pour l'effluent de la STEP, des trois catégories de polluants, seuls les métaux ne sont pas incriminés. L'ammoniac, qui est un produit provenant de la dégradation de la matière organique, s'est révélé en concentration suffisamment importante dans cet effluent pour expliquer à lui seul sa toxicité vis-à-vis du poisson.

Enfin, pour le site de Châtillon, les micropolluants organiques ont été la seule catégorie de polluant décelée.

Bien que les concentrations en métaux à l'aval de la STEP de Bourg-en-Bresse soient très importantes par rapport à celles mesurées à l'aval des deux autres STEP, il ne faut pas oublier que sur ce site, nous n'avons pas analysé les métaux à l'amont immédiat de la STEP. Cette mesure supplémentaire nous aurait éventuellement permis de relativiser l'apport de la STEP par rapport à celui de la ville.

Il est à noter que l'identification des agents polluants d'un rejet de STEP est permis par des études biologiques de laboratoire couplée à des analyses chimiques.

4.2 Variations de l'impact de l'effluent de STEP en fonction du site

Dans le cas de la Reyssouze, il apparaît que l'analyse physico-chimique *in situ* suffit à déceler l'impact. Des effets biologiques de cet effluent ont également été montrés sur des organismes du laboratoire. Par contre, il est intéressant de montrer que l'étude biologique *in situ* n'a pas permis de dégager un impact net de l'effluent de la STEP à cause d'un environnement particulièrement perturbé en amont (IBG faible) comme en aval de la STEP (pas de poissons).

Il semblerait que la pollution de la Reyssouze à l'aval de la STEP soit plus importante et que les poissons la fuient contrairement aux deux autres rivières où ils s'adaptent. Ainsi, à l'aval immédiat de la STEP, il y a des poissons dans la Chalaronne et le Vizezy contrairement à la Reyssouze mais on a pu déceler un stress sur ces poissons grâce à l'étude du facteur de condition.

Nous observons une gradation de la toxicité de l'effluent en fonction de la taille de la STEP. Ainsi, d'après les tests de toxicité effectués sur les effluents des trois sites, il semblerait que l'effluent de la STEP de Bourg-en-Bresse soit plus toxique et plus inducteur de l'activité EROD que les effluents des STEP de Montbrison et de Châtillon. Cette tendance est confirmée par les analyses puisque l'effluent de la STEP de la Reyssouze est plus concentré en ammonium, en métaux et en micropolluants organiques que les effluents des autres STEP.

Comme Bubb & Lester (1995), nous pensons que l'effet d'un effluent sur le milieu dépend de sa CER, celle-ci ne devant pas être trop importante afin d'assurer la dispersion des contaminants et d'aider à l'auto-épuration des substances biodégradables. Cependant, dans notre travail, nous avons noté que l'impact de l'effluent de STEP n'était pas uniquement lié à la CER puisque ce seul facteur n'explique pas l'intensité de l'impact des différentes STEP. Ainsi, l'impact de la STEP de Bourg-en-Bresse sur le milieu récepteur semble plus important que celui de l'effluent de la STEP de Montbrison alors que la CER est plus importante à Montbrison qu'à Bourg-en-Bresse.

Dans les cas étudiés, il apparaît que plus le rejet de la STEP a un impact sur le milieu récepteur et plus la ville, toujours située en amont de la STEP a un impact sur ce milieu. Il est alors difficile de distinguer l'impact dû au rejet de la STEP dans ce contexte perturbé. C'est le cas pour le site de la Reyssouze où l'IBG en amont de la STEP est faible et où il n'y a pas de poissons.

Les variations de l'impact de l'effluent de STEP en fonction du site sont importantes et dues à de nombreux facteurs. Partant de ce constat, il nous a paru intéressant de nous focaliser sur un seul site d'étude sur lequel nous appliquerions de nombreuses méthodes d'évaluation biologique d'impact. Pour cela, nous proposons une étude mensuelle d'un site sur un an, certaines méthodes comme les analyses chimiques de l'eau et l'IBG nous permettant alors de caractériser les variations temporelles de l'impact.

Le site de la Chalaronne nous a semblé propice à une étude dans le temps, l'impact du rejet de la STEP étant suffisamment faible pour permettre de montrer l'intérêt de méthodes biologiques d'évaluation de l'effet plus complexes que l'IBG contrairement au site de la Reyssouze et même du Vizezy. D'autre part, la modification physique du Vizezy gêne la distinction de l'effet du rejet de la STEP.

Chapitre 4. Etude temporelle sur le site de Châtillon.

Résultats et discussions

Dans ce chapitre, nous exposons les résultats obtenus sur le site de Châtillon-sur-Chalaronne à l'aide des mesures physico-chimiques effectuées sur le milieu récepteur et sur l'effluent et des mesures biologiques réalisées sur des invertébrés et des poissons du milieu récepteur ou du laboratoire, ces derniers étant exposés à l'effluent en conditions contrôlées.

1. Etude physico-chimique du milieu récepteur entre l'amont et l'aval du rejet de la STEP et de l'effluent

Dans l'étude physico-chimique, nous avons regroupé les mesures des débits de la rivière et de l'effluent de STEP et les analyses de l'effluent ainsi que du milieu récepteur (eau, sédiments et chair de poissons) des stations de la rivière en amont et en aval du rejet.

1.1 Etude des débits de la rivière et de l'effluent de STEP

L'étude des débits horaires des effluents de sortie de STEP permet de noter les variations au cours de la journée avec un pic de débit à midi et le soir et un minimum dans la nuit. Ces variations sont caractéristiques d'une STEP à effluent en majorité domestique et ont confirmé l'intérêt d'un prélèvement d'effluent sur 24h, et proportionnel au débit pour les bioessais.

L'examen des débits journaliers des effluents de sortie de la STEP nous a permis de mettre en évidence les variations saisonnières du rejet. Lors de précipitations, le débit à l'entrée de la STEP a pu passer de 70 m³/h à 300 m³/h (soit de 0,02 à 0,08 m³/s). La STEP ne pouvant accepter que 70 m³/h, les eaux usées en surplus sont allées à la rivière sans être traitées.

Le débit moyen journalier de la rivière ainsi que la concentration d'effluent dans la rivière mesurés pendant un an sont représentés sur la Figure 21 sur laquelle nous avons mentionné les prélèvements de faune, d'eau et de sédiments effectués. Le débit de la Chalaronne a varié entre 0,1 et 12 m³/s avec un débit moyen d'environ 1 à 2 m³/s. Il a été important pendant les mois de février et mars et a atteint son minimum et une certaine stabilité pendant les mois de juillet et d'août. C'est à cette période que la concentration d'effluent dans la rivière (CER) a atteint 25% (avec un maximum de 40% pendant 1 ou 2 jours) alors qu'elle est entre 2 et 7% en période normale. Les mesures du débit de la rivière et de la CER doivent être effectuées en été car c'est à cette période que l'effluent est le plus concentré dans la rivière et que les conditions de débit de la rivière sont les plus stables.

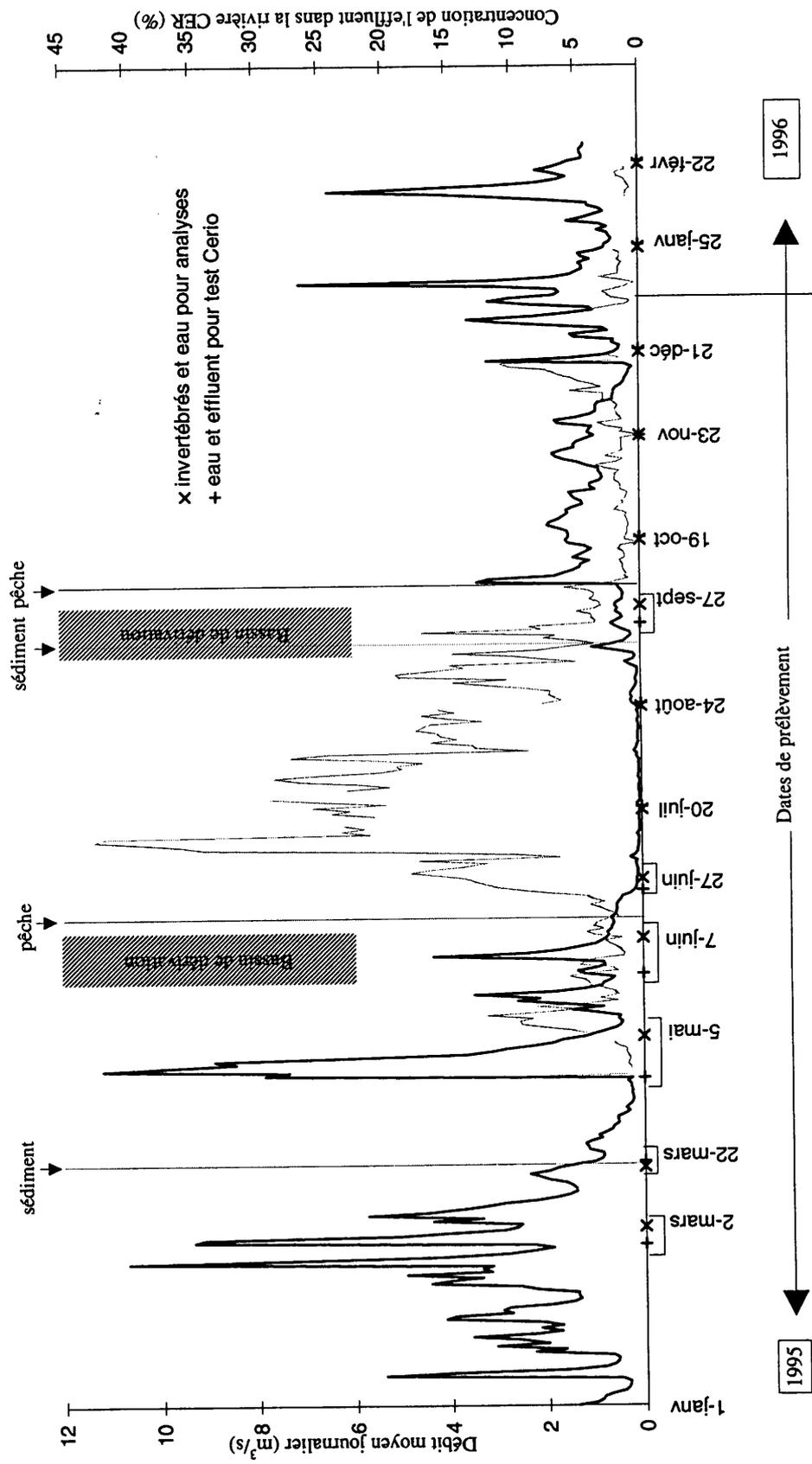


Figure 21 : Débit moyen journalier de la Chalaronne (en trait épais) et concentration d'effluent dans la rivière (CER en trait fin) pour la campagne de prélèvement de février 95 à février 96. Les dates mentionnées correspondent aux prélèvements d'invertébrés.

1.1 Analyses en carbone, azote et phosphore dans le milieu récepteur et dans l'effluent

Des analyses de carbone, d'azote et de phosphore ont été effectuées sur l'eau et les sédiments. Des analyses de micropolluants dans les sédiments et les poissons complètent cette caractérisation.

1.1.1 Analyses mensuelles en carbone, azote et phosphore des eaux de la Chalaronne et de l'effluent

Nous avons étudié la qualité chimique de l'eau et de l'effluent à l'aide de mesures mensuelles.

- *Analyses mensuelles en carbone, azote et phosphore des eaux de la Chalaronne prélevées sur deux stations*

Les mesures physico-chimiques effectuées sur l'eau de la Chalaronne ne permettent pas de distinguer nettement les stations en amont et en aval de la STEP puisque seulement 3,1% de la variabilité totale du nuage de points représentant les prélèvements mensuels sur l'analyse en composantes principales (ACP) (Figure 22c) permettent de séparer les deux stations.

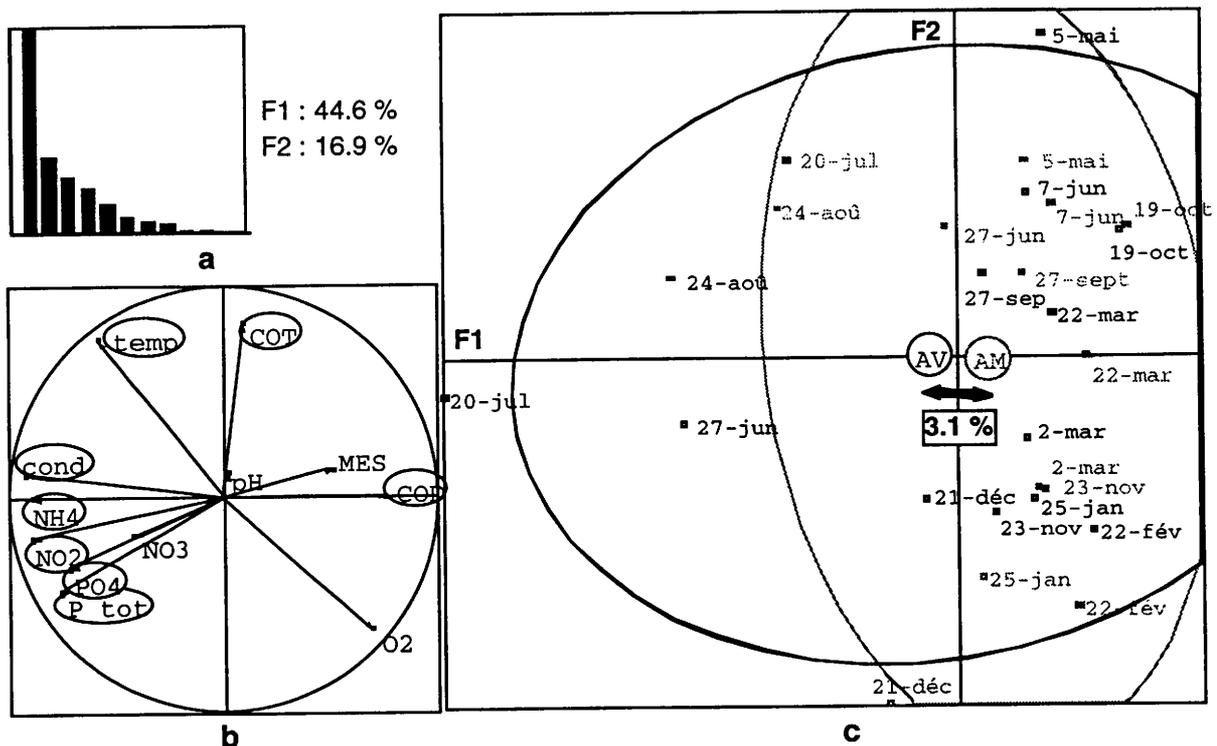


Figure 22 : Analyse en composantes principales des données physico-chimiques des stations de la Chalaronne en amont et aval de la STEP de Châtillon. 13 campagnes de février 95 à février 96.

a : Valeurs propres et % d'inertie

b : Carte factorielle des variables physico-chimiques (les variables significatives sont entourées).

c : Carte factorielle des échantillons (Am et Av sont les centres de gravité des deux étoiles des échantillons provenant respectivement des stations en amont et en aval de la STEP : C2c et C3b).

Sur la carte factorielle des échantillons (Figure 22c), trois échantillons de l'eau de la Chalaronne en aval de la STEP en été (juin, juillet et août) tirent l'ellipse des échantillons de l'aval sur le premier axe (F1). Cet axe représente l'axe de pollution puisqu'il traduit la différence entre les stations. Il est expliqué par la conductivité, P_{tot} , PO_4^{3-} , NH_4^+ ainsi que par NO_2^- et COD (Figure 22b).

Sur la carte factorielle des échantillons (Figure 22c), les prélèvements d'eau se répartissent également en fonction de la saison selon l'axe F2. L'axe F2 constitue un axe saisonnier, les variables expliquant cet axe étant la température et le COT.

Pour l'étude de l'évolution saisonnière, nous avons distingué la température et l'oxygène dissous des autres paramètres physico-chimiques, ceux-ci n'étant mesurés que sur l'eau de la rivière contrairement aux autres mesures qui ont été effectuées à la fois sur l'eau de la rivière et sur l'effluent. En effet, le prélèvement fractionné et réfrigéré de l'effluent empêche un contrôle de température et de concentration en oxygène dissous.

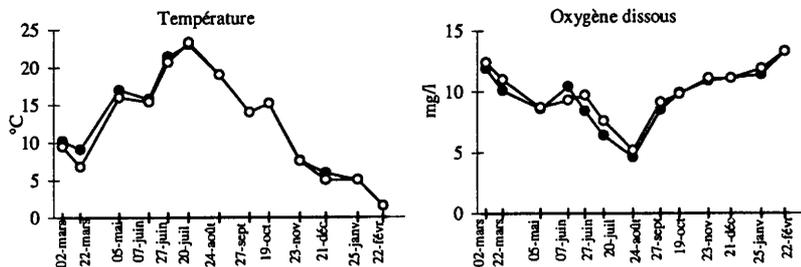


Figure 23 : Température et concentration en oxygène dissous de l'eau de la Chalaronne en amont (° : C2c) et aval (• : C3b) de la STEP.

On constate que l'effluent n'a pas d'effet sur la température et la teneur en oxygène dissous de l'eau de la rivière (Figure 23). Par contre, ces paramètres varient fortement en fonction de la saison, la teneur en oxygène dissous étant inversement proportionnelle à la température.

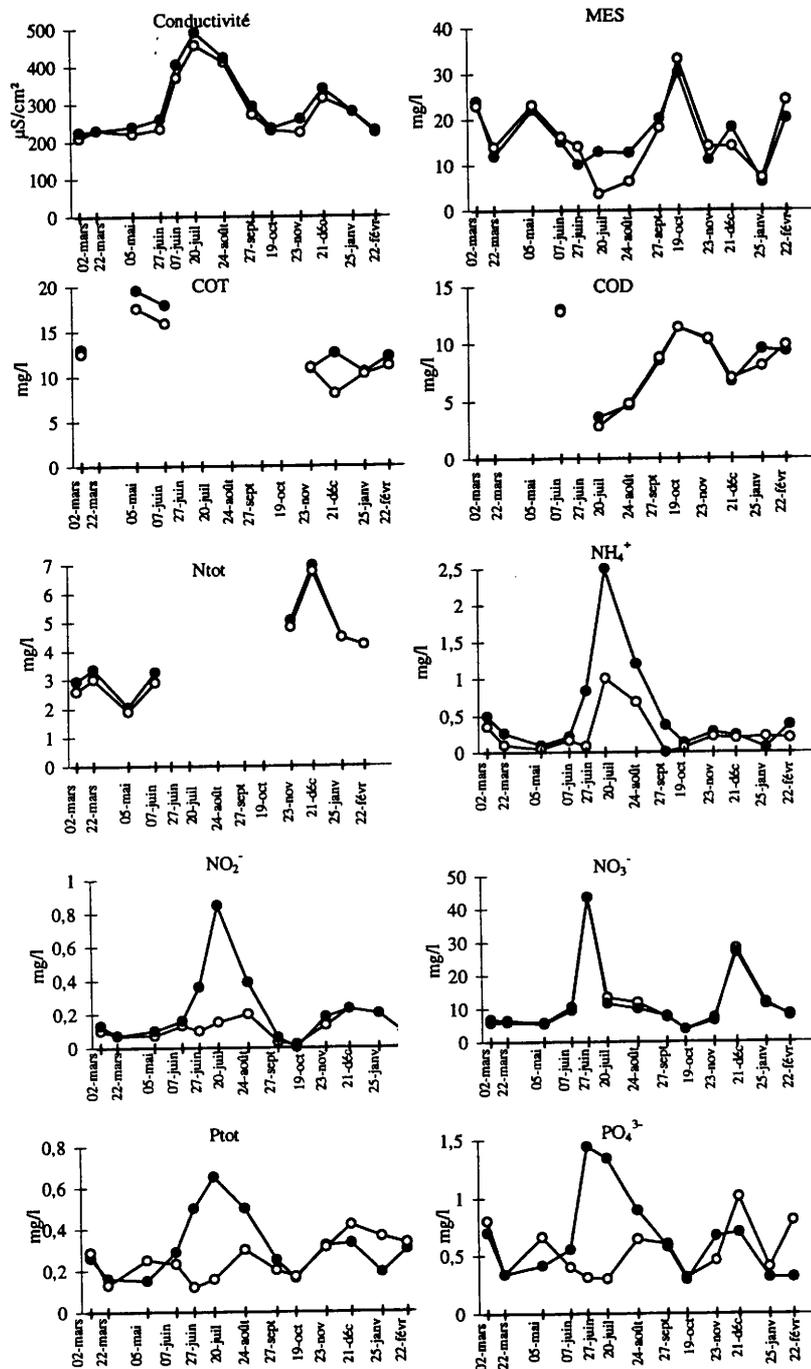


Figure 24 : Analyse physico-chimique de l'eau de la Chalaronne en amont (° : C2c) et aval (• : C3b) de la STEP.

Dans la Figure 24, nous n'avons pas présenté l'évolution du pH de l'eau de la rivière, celui-ci oscillant entre 7 et 9 mais ne présentant aucune variation caractéristique.

L'étude de l'évolution saisonnière des paramètres physico-chimiques (Figure 24) nous a permis de :

- confirmer l'importance de la conductivité, de Ptot, PO_4^{3-} , NH_4^+ et NO_2^- dans la mise en évidence de la différence physico-chimique de l'eau des stations amont et aval de la STEP,
- constater des évolutions saisonnières différentes des paramètres permettant de mettre en évidence l'impact du rejet,

Ce n'est qu'en été que l'impact de la STEP est observé avec les concentrations en Ptot, PO_4^{3-} , NH_4^+ et NO_2^- alors que, tout au long de l'année, une conductivité toujours légèrement plus importante distingue l'aval de la STEP de l'amont,

- noter de grandes variations des paramètres et notamment des MES sur l'eau de la Chalaronne pour les deux stations pendant l'année.

En été, nous avons observé une augmentation de la température, de la conductivité et de la concentration en NH_4^+ accompagnée de la diminution d'oxygène dissous et de MES dans l'eau prélevée sur les deux stations étudiées. La qualité physico-chimique de l'eau de la Chalaronne et notamment la concentration en MES à l'amont et à l'aval de la STEP semblent liées au débit de la rivière. De plus, la concentration en NO_3^- à la fin du mois de juin est particulièrement élevée dans l'eau des deux stations échantillonnées. Ce pic de nitrates de juin serait la conséquence d'un apport d'engrais qui a été effectué sur les cultures de maïs de cette région en juin (chambre d'agriculture de l'Ain, communication personnelle), mois où la pluviométrie a été abondante.

Les concentrations moyennes en azote et phosphore calculées grâce aux prélèvements mensuels ont été comparées avec la grille de qualité des agences de l'eau (Tableau 21). Des différences de qualité entre les stations amont et aval de la STEP peuvent être expliquées par NH_4^+ et Ptot. Quelle que soit la station d'étude, la pollution est modérée pour les autres formes de l'azote que NH_4^+ et nette pour les phosphates. Les qualités d'eau de la Chalaronne sur les deux stations sont comparables à celles observées en moyenne entre juillet et décembre 94 (voir chapitre 3, §1.1.1) sauf pour les nitrites.

Tableau 21 : Classes de pollution par l'azote et le phosphore des eaux de la Chalaronne entre l'amont et l'aval de la STEP entre février 1995 et février 1996 (moyennes sur les 13 prélèvements) (stations C2c et C3b) selon la grille de qualité des agences de l'eau.

	Amont	Aval
NH_4^+	1	2
NO_2^-	1	1
NO_3^-	1	1
Ptot	1	2
PO_4^{3-}	2	2

Situation normale : 0. Pollution modérée : 1, nette : 2, importante : 3 et excessive : 4.

Les concentrations en ammonium et en phosphate dans l'eau sont des paramètres sensibles pour la détection de l'impact d'un rejet de STEP dans le milieu à condition de les utiliser en été quand la CER est importante. Comparée à ces deux paramètres, la conductivité permet de détecter l'impact de la STEP tout au long de l'année. Cependant, sa mesure reste peu sensible comparée aux concentrations en ammonium et en phosphore mesurées en été. La concentration en ammonium est d'autant plus intéressante que nous pouvons extrapoler les effets de sa forme non ionisée sur les organismes. En effet, la connaissance des relations dose-

effet de l'ammoniac évaluées sur des organismes modèles au laboratoire peut nous renseigner sur les effets potentiels de ce polluant sur les organismes *in situ*.

En résumé, les analyses chimiques mensuelles en carbone, azote et phosphore sur l'eau de la rivière prélevée sur les stations en amont et en aval de la STEP n'ont pas permis de distinguer nettement les deux stations. En effet, les variations saisonnières des deux stations semblent plus importantes que l'influence du rejet de la STEP. Cependant, une conductivité plus forte à l'aval qu'à l'amont a été mesurée toute l'année. De plus, en été, des différences apparaissent dans les eaux de la rivière entre l'amont et l'aval de la STEP pour les concentrations en ammonium et en phosphore (P_{tot}, PO₄³⁻). Sur la Chalaronne, la concentration en nitrates nous a semblé caractériser un apport plutôt de type agricole.

• *Analyse mensuelle en carbone, azote et phosphore de l'effluent*

Lors du prélèvement de l'effluent sur 24h, une mesure de conductivité dans les échantillons horaires individualisés a montré déjà une importante variation de la qualité de l'effluent pendant la journée avec des pics de conductivité le matin et l'après-midi quand les industries sont en activité. Comme pour l'eau de rivière, nous n'avons pas représenté l'évolution du pH de l'effluent qui ne montre pas de variations caractéristiques.

Par contre, l'étude de l'évolution mensuelle des autres paramètres que le pH mesurés sur l'effluent (Figure 25) nous a permis de classer ceux-ci en deux groupes :

- conductivité, NH₄⁺, PO₄³⁻ et COD avec lesquels nous avons enregistré un pic de concentration en été, le maximum d'ammonium étant atteint en juillet avec 28 mg/l,
- MES, COT, N_{tot} et P_{tot} qui ont des concentrations maximales au printemps (mars et avril) notamment à cause d'un relargage de boues activées lors de débits importants dus à la pluie.

Seules la conductivité et les concentrations en NH₄⁺ et PO₄³⁻, caractérisant les substances dissoutes, mesurées dans le milieu récepteur en aval de la STEP seraient liées à l'apport de l'effluent.

Les MES, COT, N_{tot} et P_{tot}, caractéristiques des particules en suspension, sont plus influencés par l'apport de la rivière que par celui de la STEP qui est alors négligeable.

La concentration en NO₃⁻ est également plus liée aux apports de la rivière qu'à ceux d'effluent de la STEP, NO₃⁻ provenant des pratiques agricoles.

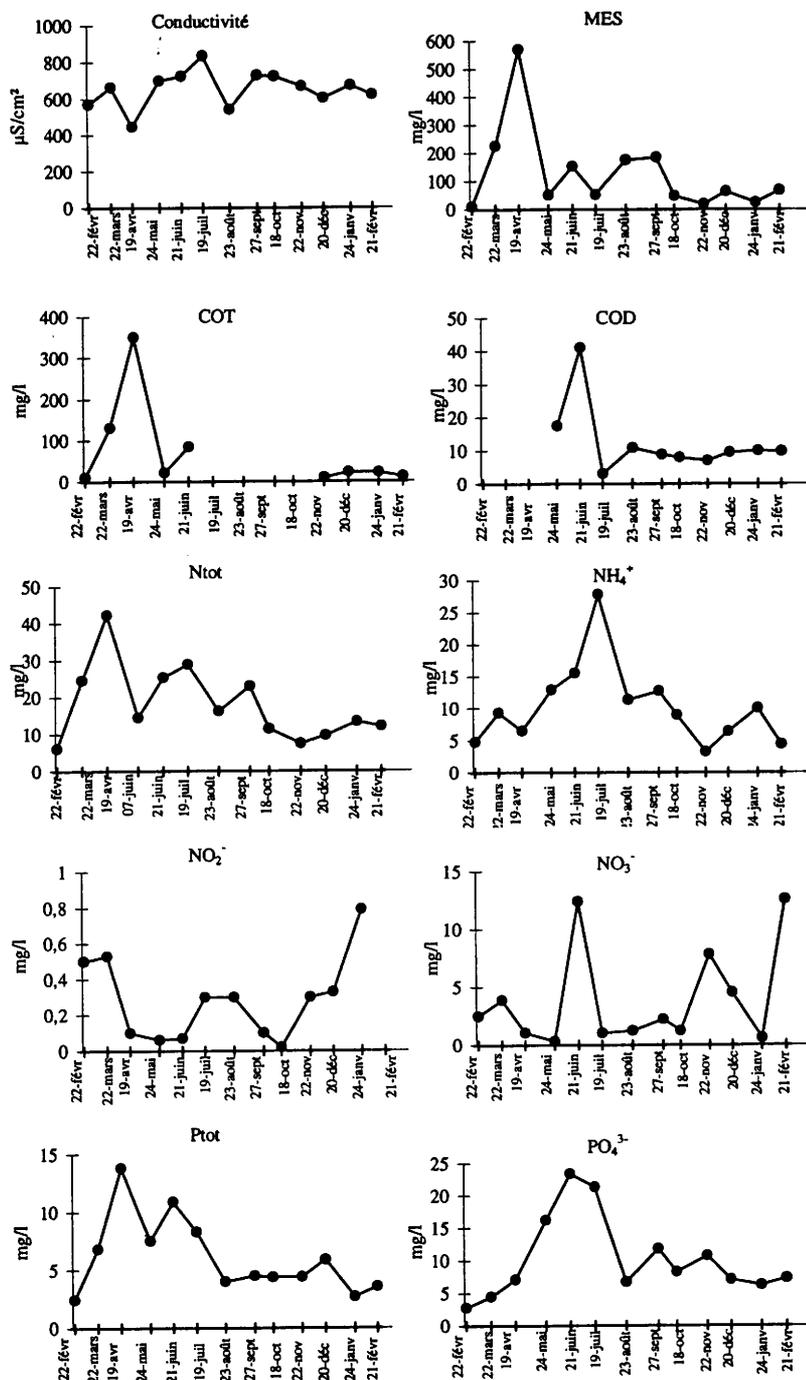


Figure 25 : Analyse chimique de l'effluent de la STEP de Châtillon-sur-Chalaronne

Pour les analyses en carbone, azote et phosphore effectuées sur l'effluent, il est important d'utiliser des paramètres normalisés afin de pouvoir comparer les résultats avec les normes de rejet existantes dans le but de détecter des anomalies de fonctionnement des STEP. Les normes de rejets sont basées sur les concentrations en MES, DCO et NK.

A la place de la DCO et de NK, nous avons choisi de mesurer le COT et Ntot, deux paramètres privilégiés dans les mesures sur les eaux de surface. Si la correspondance entre NK et Ntot est relativement facile à faire (Ntot = NK + nitrates + nitrites), il n'en est pas de même pour la DCO et le COT. En effet, le COT caractérise la teneur en carbone de

l'échantillon alors que la DCO quantifie la demande en oxygène. Des études d'oxydation de la matière organique ont cependant montré qu'1 mg/l de COT correspondrait environ à 2,7 mg d'O₂/l de DCO (Edeline, 1993 ; Servais *et al.*, 1993).

Les concentrations en MES, DCO et NK sur l'effluent alors calculées se sont révélées être souvent supérieures aux concentrations maximales autorisées pour les rejets de STEP (directive de mai 1991).

Dans un souci de gestion intégrée du milieu récepteur et de l'effluent demandée dans la loi sur l'eau de 1992, il est intéressant d'utiliser des paramètres communs pour caractériser la matière organique du milieu naturel et des effluents. Le COT, plutôt utilisé pour caractériser les eaux de surface, est contesté car il ne donne pas le degré de réduction du carbone qui est à l'origine de la demande en oxygène de la matière organique (mesurée par la DCO) et donc de l'impact de cette matière organique sur le milieu récepteur. La mesure de la DCO dans les eaux de rivière n'est cependant pas fiable à cause des faibles teneurs rencontrées. Pour des études d'impact portant à la fois sur l'effluent de STEP et sur le milieu, on préconise alors l'indice d'oxydabilité au permanganate au chaud ISO 8467 (Edeline, 1993).

1.1.2 Analyse bisannuelle en carbone, azote et phosphore des sédiments de la Chalaronne prélevés sur plusieurs stations

Alors que l'eau de la Chalaronne a été analysée mensuellement, nous avons préféré analyser les sédiments en carbone, azote et phosphore seulement deux fois dans l'année mais sur plusieurs stations à cause du caractère intégrateur et local d'une pollution du sédiment (Figure 26 et Figure 27).

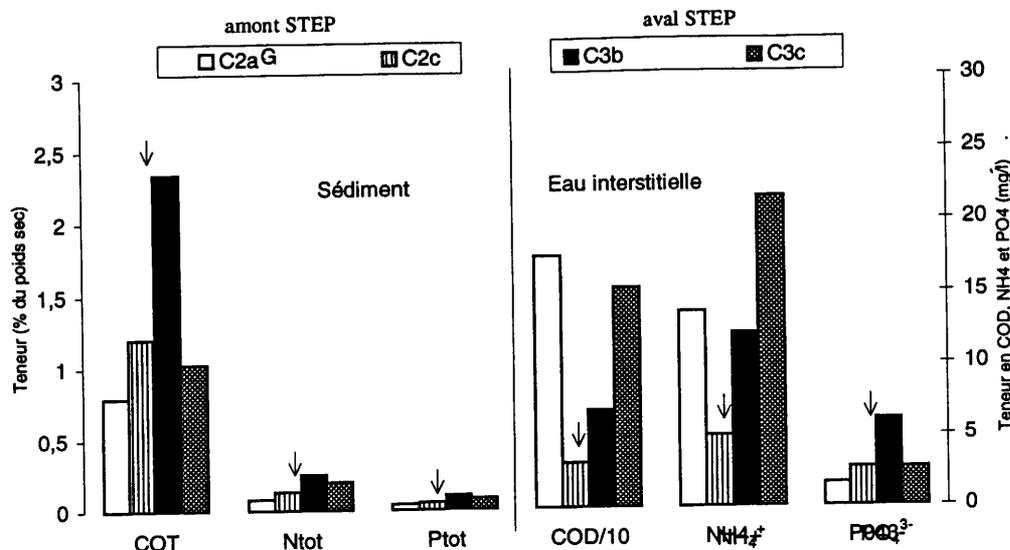


Figure 26 : Analyse chimique des sédiments prélevés le long de la Chalaronne en mars 1995. G : Sédiment grossier²⁰.. ↓ : Rejet de STEP

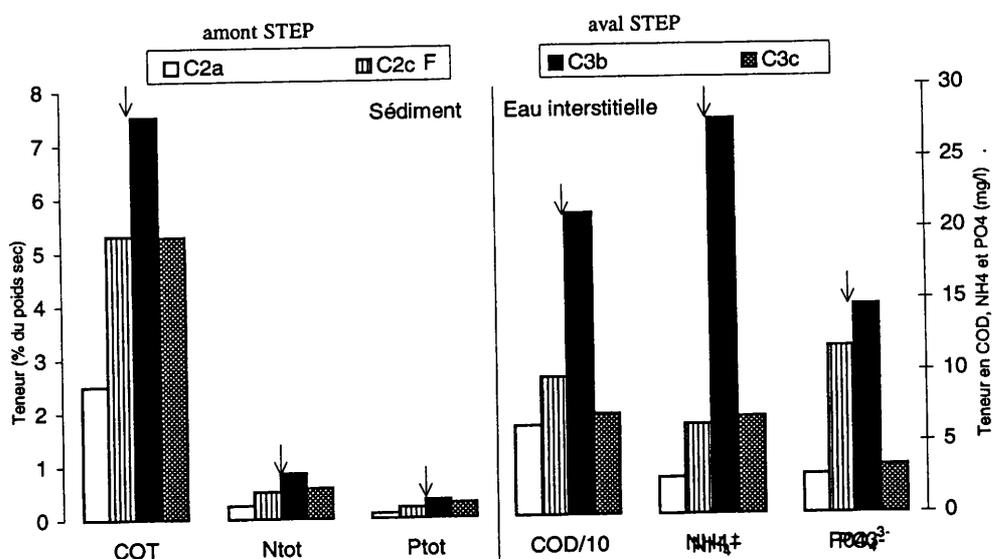


Figure 27 : Analyse chimique des sédiments prélevés le long de la Chalaronne en septembre 1995. F : Sédiment fin²⁰. ↓ : Rejet de STEP.

Les concentrations en COT, Ntot et Ptot dans le sédiment et en COD, NH₄⁺ et PO₄³⁻ dans l'eau interstitielle sont plus élevées dans les sédiments de l'aval de la STEP que dans ceux de l'amont. On peut noter d'autre part que les concentrations dans les sédiments sont deux fois plus élevées en septembre après l'étiage qu'en mars, période de crues. Les concentrations dans les sédiments et l'eau interstitielle à un aval plus lointain de la STEP (C3c) sont comparables à celles des sédiments de l'amont (C2c) sauf pour COD et NH₄⁺ en mars.

²⁰ Comparé à la texture moyenne (particules < 50 μm = 50% du poids sec) observée pour la majorité des prélèvements effectués sur la Chalaronne

Une station supplémentaire a été analysée à l'aval immédiat de la STEP (station C3a). Les sédiments de cette station présentent les mêmes caractéristiques que ceux de la station en aval de la STEP (station C3b) en mars mais pas en septembre. Leur texture grossière enregistrée à cette date a contribué à des concentrations en carbone, azote et phosphore exceptionnellement faibles pour une station en aval du rejet. En effet, l'analyse de la fraction fine des sédiments (particules < 50 µm) a montré une contamination des sédiments de cette station équivalente à celle un peu plus en aval.

En comparant la qualité des sédiments uniquement des deux stations encadrant le rejet, nous avons montré que la mesure des concentrations dans le sédiment et dans l'eau interstitielle sont complémentaires. En effet, l'impact de la STEP est détecté en mars par les concentrations en COT et en Ntot dans les sédiments et en septembre par les concentrations en NH_4^+ et PO_4^{3-} dans l'eau interstitielle. La faible différence enregistrée en septembre pour les paramètres du sédiment est due à une texture particulièrement fine du sédiment de l'amont entraînant une surestimation des concentrations.

Grâce à l'utilisation des classes de qualité, nous constatons une situation particulièrement dégradée à l'aval de la STEP en septembre mais aussi en amont (Tableau 22). La même pollution des sédiments en carbone, azote et phosphore avait été observée en septembre 94 en aval de la STEP mais pas en amont où la qualité était légèrement meilleure (voir chapitre 3, § 1.1.2). En mars, la pollution est moins forte pour les deux stations.

Tableau 22 : Classes de pollution par le carbone, l'azote et le phosphore des sédiments de la Chalaronne sur trois stations (C2c, C3a et b) selon Rofes (1994). ^a : Campagne de mars 95. ^b : Campagne de septembre 95.

	amont	aval
COT	1 ^a -4 ^b	2-4
Ntot	1-4	2-4
NH_4^+	2-2	2-4
Ptot	1-1	1-3
PO_4^{3-}	4-4	4-4

Situation normale : 0. Pollution modérée : 1, nette : 2, importante : 3 et excessive : 4.

La particularité de notre site expérimental réside dans la présence d'un affluent de la Chalaronne à l'amont proche du rejet de STEP, le Bief de Vernisson (voir carte de la Chalaronne, chapitre 2, § 1.2). Cet affluent a vraisemblablement un effet minimal sur la qualité des sédiments de la Chalaronne, les analyses du sédiment de cet affluent ayant révélé un sédiment peu chargé en carbone, azote et phosphore.

Les variations de qualité de sédiments de la Chalaronne observées entre plusieurs stations situées en amont (ou en aval) du rejet de STEP tendent à montrer que les variations

géographiques et notamment l'hétérogénéité des zones de prélèvement (différences de texture du sédiment) peuvent masquer un effet dû au rejet de la STEP.

Enfin, les variations saisonnières ne sont pas à négliger puisque, sur toutes les stations échantillonnées, les concentrations en carbone, azote et phosphore mesurées en mars dans les sédiments sont plus faibles que celles mesurées en septembre.

Le caractère intégrateur du sédiment rend son analyse plus intéressante que l'eau mais son échantillonnage est plus délicat puisque sa composition est directement liée à sa texture. En fait, il n'est pas certain que, sur ce type de cours d'eau et avec des paramètres globaux, le caractère intégrateur du sédiment soit une notion valide à cause des variations importantes de régime hydraulique et de la mobilité importante des sédiments. De plus, l'eau et les sédiments sont deux compartiments différents où ne se trouvent pas les mêmes composés. L'eau est un milieu oxydant qui transporte des substances dissoutes telles que les nitrates et les phosphates alors que le sédiment est un milieu réducteur conservant la matière organique et l'ammoniac et où se déposent les particules décantables telles que les boues de STEP.

1.2 Analyse des micropolluants dans le milieu récepteur

Une seule fois dans l'année d'étude sur le site de Châtillon nous avons dosé les métaux dans les sédiments et les micropolluants organiques dans les sédiments et les chevaines.

1.2.1 Analyse des métaux dans les sédiments

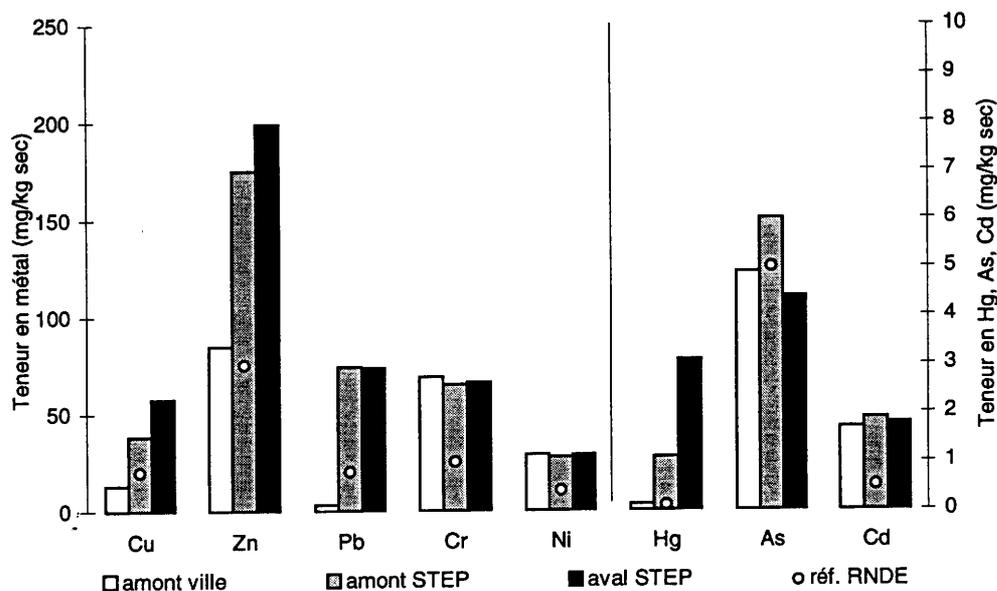


Figure 28 : Concentration en métaux des sédiments de la Chalaronne en amont de la ville (C1), en amont de la STEP (C2c) et en aval de la STEP (C3b) et références du RNDE²¹. Campagne de septembre 1995.

Nous n'avons pas remarqué de différences dans les concentrations métalliques entre l'amont et l'aval de la STEP sauf pour le mercure et dans une moindre mesure le Cu (cuivre) et le Zn (zinc) (Figure 28). Comme nous l'avons déjà remarqué en 94 (chapitre 3), la station en amont de la STEP mais en aval de la ville a la même contamination métallique que celle en aval de la STEP au vu des concentrations de références RNDE (1994) sauf pour le Cu.

Ainsi, les augmentations les plus importantes en concentration métallique sont relevées entre l'amont et l'aval de la ville : c'est le cas du Zn et du Pb (plomb) et à moindre échelle du Cu et du Hg (mercure). La nature des métaux présents et la localisation géographique de cette accumulation métallique nous permettent de suspecter une pollution due aux déversoirs d'orage déjà suspectée en 94.

Comparés aux références RNDE, les sédiments à l'aval de la STEP sont considérés contaminés pour 7 des 8 métaux dosés, le seul métal en dessous des normes étant l'As (arsenic) (Figure 28). Des concentrations du même ordre ont été décelées en 1994 dans les sédiments de la Chalaronne entre l'amont et l'aval de la STEP.

²¹Un sédiment est dit contaminé si les concentrations mesurées sont deux fois supérieures aux niveaux de référence RNDE (1994).

1.2.2 Analyses des micropolluants organiques dans les sédiments et dans les chevaines

Les micropolluants ont été dosés dans les sédiments (Tableau 23) et les muscles de chevaines (Tableau 24) car ils s'y accumulent préférentiellement à d'autres compartiments du milieu.

Tableau 23 : Concentrations en contaminants organiques dans les sédiments de trois stations situées sur la rivière Chalaronne en septembre 95 en amont de la ville, amont de la STEP et aval de la STEP (stations C1, C2c et C3b).

Concentrations en µg/kg poids sec	amont ville	amont STEP (aval ville)	aval STEP	Sites pollués ^b
∑ HAP		2430	1640	
Naphtalène	<50 ^a	100	<50	
Benzo(b+k)fluoranthène	<50	410	<50	3000
Benzo(a)pyrène	<50	280	260	90
Chrysène	<50	390	390	
Fluorène	50	130	70	
Phénanthrène	130	350	240	
Fluoranthène	150	380	330	1500
Pyrène	170	390	350	
PCB	<50	<50	<50	

^a : Seuil de détection. ^b : Concentration seuil estimée caractérisant un site pollué, Détermination des seuils de qualité pour les micropolluants, Etudes interagences, WRc, 1996.

Tableau 24 : Concentrations en polluants organiques dans les muscles de chevaines pêchés dans la Chalaronne en juin 95 en amont de la ville, amont de la STEP et aval de la STEP (stations C1, C2c et C3b).

Concentrations en µg/kg de poids frais	amont ville	amont STEP (aval ville)	aval STEP
∑ PCB	<10 ^a	51	16
PCB 101	<1	11	3
PCB 138	<1	17	4
PCB 153	<1	15	6
PCB 180	<1	8	3
HCB	<1	1	1
Lindane	7	12	6
pp'DDE	20	37	27
Chlordane	19	<5	<5
Phénol	<30	<30	500
Méthylphénols	<30	<30	50
Matière grasse % poids frais	3,0	2,6	4,2

^a : Seuil de détection en µg/kg de poids frais.

Des HAP, des PCB, quelques produits phytosanitaires, trouvés dans les effluents de STEP et dans le milieu récepteur à proximité de rejets de STEP (Marchand *et al.*, 1989 ; Lara-

Cazenave *et al.*, 1994 ; Miskiewicz & Gibbs, 1994 ; Makepeace *et al.*, 1995), ont été détectés dans les sédiments ou les poissons de la Chalaronne (Tableau 23 et Tableau 24). Les PCB et organochlorés sont des composés très persistants. Leur caractère hydrophobe explique leur distribution dans les graisses plutôt que dans les sédiments. Au contraire, les HAP, rapidement métabolisés dans les organismes (Melancon *et al.*, 1987 ; Payne *et al.*, 1988) ont été détectés uniquement dans les sédiments.

On retrouve les mêmes micropolluants dans la chair des poissons et dans les sédiments en aval de la STEP et en amont. Il est alors difficile de savoir si les micropolluants présents en aval proviennent de l'amont ou du rejet de la STEP. Seuls des phénols (phénol et méthylphénols) présents dans la chair des poissons uniquement en aval de la STEP nous permettent de soupçonner une contamination en micropolluants par le rejet, la présence de micropolluants organiques dans le rejet de la STEP ayant déjà été montrée (Garric *et al.*, 1996). Les phénols sont utilisés comme désinfectant et biocide en industrie pharmaceutique, type d'industrie raccordé à notre STEP.

De plus, la station en amont de la STEP et à l'aval de la ville est la station la plus contaminée en micropolluants organiques des trois stations échantillonnées. A l'origine de cette constatation, on peut avancer l'apport important de micropolluants dû aux rejets des déversoirs d'orage (Granier *et al.*, 1990). De plus, il y aurait une biodégradation plus rapide des micropolluants organiques à l'aval du rejet grâce à l'apport de bactéries du rejet ou de nutriments dopant les bactéries du milieu (Larson & Payne, 1981).

Dans les composés spécifiques aux rejets du réseau d'assainissement de la ville de Châtillon, nous regroupons les PCB et l'HCB, utilisé dans l'industrie du plastique et du chlore, type d'industrie raccordé à la STEP. Ces composés, détectés dans la chair des poissons, sont présents uniquement à proximité de la STEP soit en aval de la STEP mais aussi en amont (apport par les déversoirs d'orage faisant partie du système d'assainissement).

Dans les substances non spécifiques du rejet de la STEP, nous classons le lindane et le pp'DDE, métabolite principal du DDT, et le chlordane, insecticide pour les zones engazonnées des périphéries urbaines, qui n'a été détecté que sur le site en amont de la ville. Ces composés sont certes éventuellement présents à proximité de la STEP mais ils ont aussi été décelés sur la station en amont de la ville de Châtillon.

La contamination en PCB et en organochlorés (lindane et pp'DDE) semble faible sur le site de Châtillon comparée aux concentrations rencontrées par Brown *et al.* (1986) dans les poissons marins pêchés à proximité de la STEP de Los Angeles. Les concentrations mesurées par ces chercheurs sont de l'ordre du mg/kg de foie frais alors qu'elles sont de l'ordre du µg/kg de muscle frais dans notre étude. Il faut noter que la bioaccumulation dépend de l'espèce mais aussi du tissu analysé.

Parmi les HAP détectés dans les sédiments, certains composés semblent plus spécifiques des rejets liés au réseau d'assainissement de la STEP de Châtillon (cas du benzo(a)pyrène) que

d'autres (cas du fluoranthène). La plupart des HAP sont issus de la combustion incomplète de produits organiques dans les chaufferies au fuel et les moteurs à explosion (Ramade, 1992). Comparées aux concentrations de trois molécules d'HAP estimées par le WRc (Water Research center) sur des sites pollués, seule la contamination en benzo(a)pyrène sur le site de Châtillon semble élevée.

L'interprétation des concentrations en micropolluants organiques en terme de niveau de contamination est délicate car il n'existe pas encore de grille de qualité pour ces composés notamment à cause de l'extraordinaire foisonnement de polluants organiques.

Dans notre étude, c'est l'analyse des micropolluants organiques dans les poissons et non dans les sédiments qui nous a permis de déceler une contamination apportée par le rejet de la STEP. Cependant, il ne faut pas oublier que l'accumulation des contaminants organiques dans les organismes est plus lié à leur solubilité dans les lipides qu'à leur concentration dans les eaux usées (Brown *et al.*, 1986).

L'étude de bioaccumulation peut être effectuée sur d'autres organismes que les poissons tels que les invertébrés. On peut citer par exemple une étude de bioaccumulation sur les hydropsyches effectuée par Cain *et al.* (1992). La concentration en micropolluants à l'aval de la STEP semble être moins importante dans les invertébrés que dans les poissons (Brown *et al.*, 1986) car ces derniers contiennent plus de lipides mais il ne faut pas oublier que le poisson est un animal plus mobile et moins au contact du sédiment que l'invertébré. Le poisson a été choisi dans notre étude afin d'essayer de faire le lien entre la bioaccumulation et l'activité d'enzymes indicatrices de l'exposition aux polluants.

Devant la multiplicité des produits organiques, l'étude d'un traceur chimique de pollution peut fournir des renseignements sur le niveau de contamination par les micropolluants organiques. L'HCB étant spécifique des effluents de STEP (Courtney, 1979 ; Miskiewicz & Gibbs, 1994) et ayant des propriétés chimiques particulièrement intéressantes (faible biodégradabilité, forte bioconcentration) peut être proposé comme traceur de pollution provenant des STEP (Nebeker *et al.*, 1989). Il ne peut cependant pas être utilisé pour des études de relation de cause chimique à effet biologique étant donné qu'il est faiblement toxique et non inducteur de l'activité enzymatique de détoxification EROD (Goksøyr & Förlin, 1992).

En résumé, l'analyse chimique des micropolluants du milieu récepteur sur deux stations encadrant le rejet de STEP mais aussi sur une station en amont de la ville a montré le rôle des rejets dus aux déversoirs d'orage au niveau des sédiments et des organismes dans l'apport de micropolluants organiques et de métaux. Lors d'une évaluation de la contamination toxique apportée par un rejet de STEP, il semble donc indispensable d'élargir l'étude aux rejets du système d'assainissement dans sa globalité en incluant les rejets des déversoirs d'orage.

2. Mesures biologiques sur des invertébrés prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

Après avoir caractérisé par des études analytiques les apports chimiques de l'effluent de STEP dans le milieu, nous avons cherché à évaluer les perturbations causées par cet effluent sur la biocénose. Cette évaluation, comme toutes les mesures que nous avons effectuées sur le milieu récepteur, est basée sur des comparaisons entre les mesures obtenues sur la station amont et la station aval de la STEP.

2.1 Mesures biologiques sur des invertébrés prélevés *in situ* entre l'amont et l'aval du rejet de la STEP

Pour une évaluation la plus complète possible, nous avons effectué des mesures sur les invertébrés à l'échelle de la communauté, de la population et de l'individu.

2.1.1 Indice de qualité biologique mesuré à l'aide des invertébrés

L'indice biologique global (IBG) mesuré mensuellement pour les stations en amont et en aval de la STEP est présenté dans la Figure 29. Le nombre de taxons ainsi que le groupe indicateur pris en compte dans le calcul de l'IBG sont présentés respectivement dans la Figure 29 et le Tableau 25.

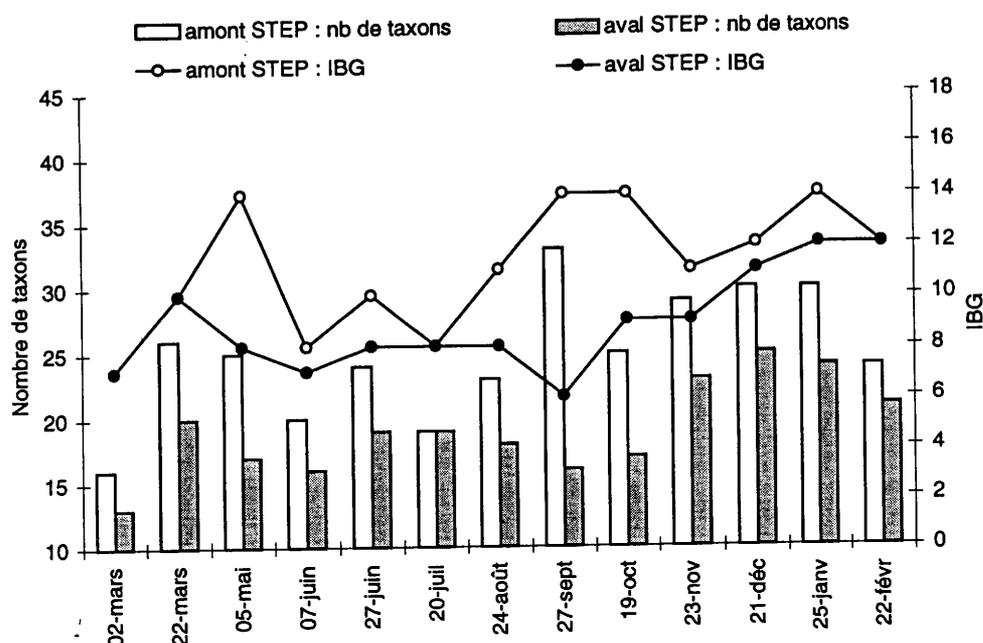


Figure 29 : Evolution mensuelle de l'IBG entre les stations en amont (C2c) et en aval (C3b) de la STEP de février 95 à février 96.

Tableau 25 : Taxons indicateurs déterminés pour les stations en amont et en aval de la STEP (C2c et C3b). Campagnes mensuelles de février 95 à février 96.

	amont STEP (C2c)		aval STEP (C3b)		écart entre G.I.
	Taxon indicateur	G.I. ¹	Taxon Indicateur	G.I.	
02-mars	Hydropsychidae	3	Hydropsychidae	3	0
22-mars	Hydropsychidae	3	Hydroptylidae	5	-2
5-mai	Leptophlebiidae	7	Ephemerellidae	3	(4)
7-juin	Hydropsychidae	3	Ephemerellidae	3	0
27-juin	Psychomyidae	4	Hydropsychidae	3	1
20-juil	Hydropsychidae	3	Hydropsychidae	3	0
24-août	Hydroptilidae	5	Hydropsychidae	3	2
27-sept	Hydroptilidae	5	Baetidae	2	3
19-oct	Leptophlebiidae	7	Psychomyidae	4	(3)
23-nov	Hydropsychidae	3	Hydropsychidae	3	0
21-déc	Psychomyidae	4	Psychomyidae	4	0
25-janv	Ephemeridae	6	Ephemeridae	6	0
22-févr	Ephemeridae	6	Ephemeridae	6	0

¹G.I. : Groupe Indicateur.

Les IBG obtenus sont pratiquement toujours plus faibles en aval de la STEP qu'en amont (Figure 29). Le plus fort écart d'indice entre la station amont et la station aval a été observé au mois de septembre. C'est également à cette période que le nombre de taxons est le plus élevé en amont de la STEP et un des plus faibles du secteur aval.

Il faut noter que les notes d'IBG obtenues en mai et en octobre en amont de la STEP sont surestimées, le groupe indicateur étant majoré à cause de la présence de quelques rares individus appartenant à la famille des Leptophlebiidae (Tableau 25).

L'IBG a été déterminé sur d'autres stations de cette rivière, en mars et en septembre 95, conjointement aux analyses sur sédiments (Figure 30).

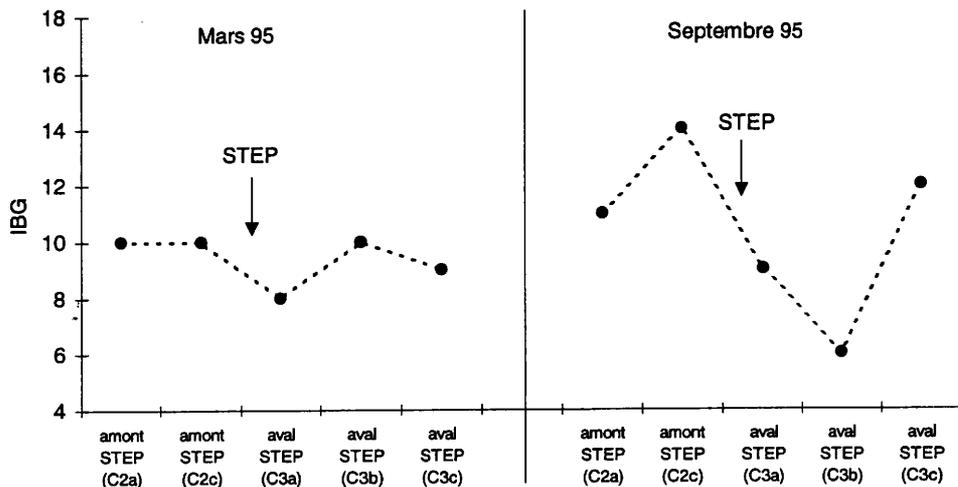


Figure 30 : Valeurs d'IBG sur 5 stations de la Chalaronne pour les campagnes de mars et septembre 1995.

Globalement tout le secteur situé en amont de la STEP présente un même niveau de faible qualité biologique (Figure 30). En mars, nous avons observé le plus faible indice à l'aval immédiat de la STEP alors qu'au mois de septembre, l'effet du rejet de la STEP se fait ressentir jusqu'à un aval plus lointain. L'IBG calculé sur une station supplémentaire située sur le Bief de Vernisson (voir chapitre 2 § 1.2.), ruisseau qui se jette dans la Chalaronne en amont de la STEP ne permet pas d'expliquer les variations de qualité, notées en septembre, entre les deux stations de l'amont.

Ainsi, l'IBG évalué sur plusieurs stations de la Chalaronne a révélé une qualité médiocre de cette partie du cours d'eau. Les valeurs mensuelles d'IBG obtenues sur les stations en amont et en aval de la STEP mettent en évidence l'impact du rejet de la STEP sur la faune benthique malgré une situation déjà perturbée à l'amont. Selon Wright *et al.* (1995), même les perturbations faibles peuvent être appréhendées avec des mesures quantitatives sur les invertébrés déterminés à la famille telles que l'IBG. De plus, sa simplicité d'utilisation permet une application en routine.

Les indices ont varié fortement au cours de l'année sur les deux stations mettant en évidence un impact plus important de la STEP en septembre en fin de période d'étiage. La période estivale a constitué une période critique durant laquelle l'impact de la STEP est devenu maximum et s'est fait ressentir loin en aval.

L'IBG mesuré le long de la rivière indiquent des variations importantes de qualité biologique en liaison avec des apports polluants diffus. L'effet de la STEP sur les mesures biologiques utilisées est alors d'autant plus difficile à distinguer.

2.1.2 Etude biocénotique approfondie

Nous avons étudié l'évolution mensuelle de la richesse taxonomique (Figure 31) et de l'abondance (Figure 32) de la communauté d'invertébrés benthiques ainsi que son évolution globale grâce à une analyse factorielle des correspondances. Cette analyse prend en compte les 13 prélèvements mensuels et les 64 taxons ou espèces récoltés (tableau de contingence de 26 stations-dates * 64 taxons) (Figure 33 et Figure 34). La composition détaillée de la communauté d'invertébrés se trouve en annexe 10.

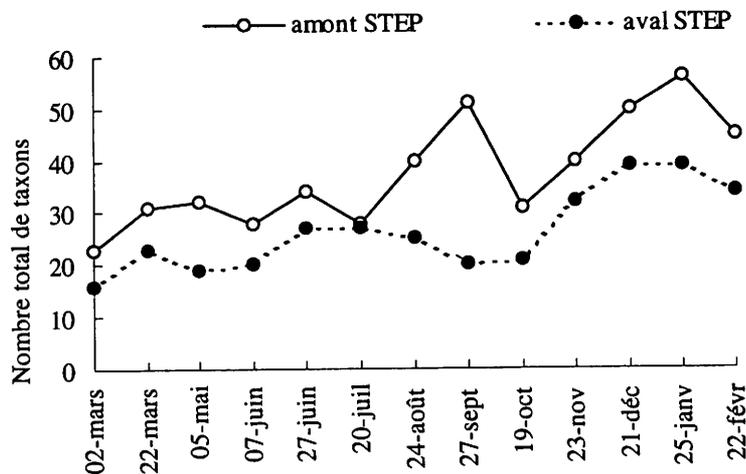


Figure 31 : Evolution de la richesse taxonomique totale de la communauté d'invertébrés prélevés sur la Chalaronne sur les stations amont STEP (aval ville) (C2c) et aval STEP (C3b) durant les 13 campagnes de 95/96.

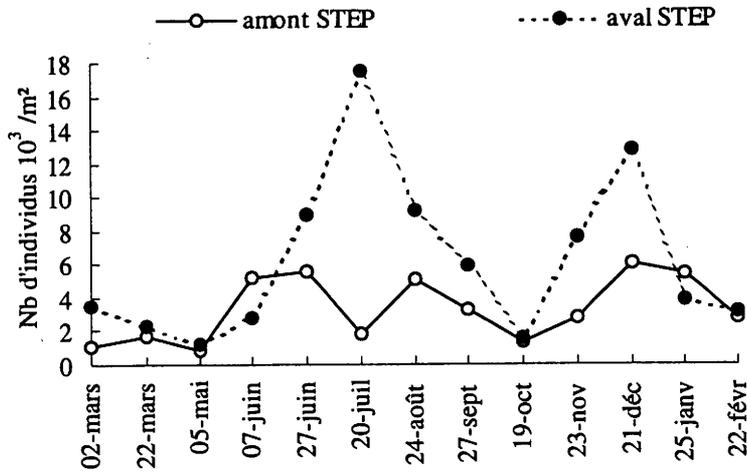


Figure 32 : Evolution de l'abondance totale de la communauté d'invertébrés prélevés sur la Chalaronne sur les stations amont STEP (aval ville) et aval STEP durant les 13 campagnes de 95/96.

Nous avons tout d'abord noté une abondance plus importante et une richesse taxonomique plus faible en aval de la STEP qu'en amont (Figure 31 et Figure 32), ce qui corrobore les résultats de Birge *et al* (1989) obtenus sur d'autres sites. Ce sont plutôt les taxons les moins abondants de l'amont de la STEP qui ont disparu en aval. Nous avons détecté une abondance maximale à l'aval de la STEP en juillet et en décembre due à la prolifération des Oligochètes mais aussi de *Baetis fuscatus* en été et de la sangsue *Erpobdella*, prédateur d'Oligochètes, en hiver. En juillet et en octobre, la diminution du nombre de taxons et de l'abondance en amont de la STEP est due à l'absence de mollusques et à la faible présence des Chironomidae (Diptères).

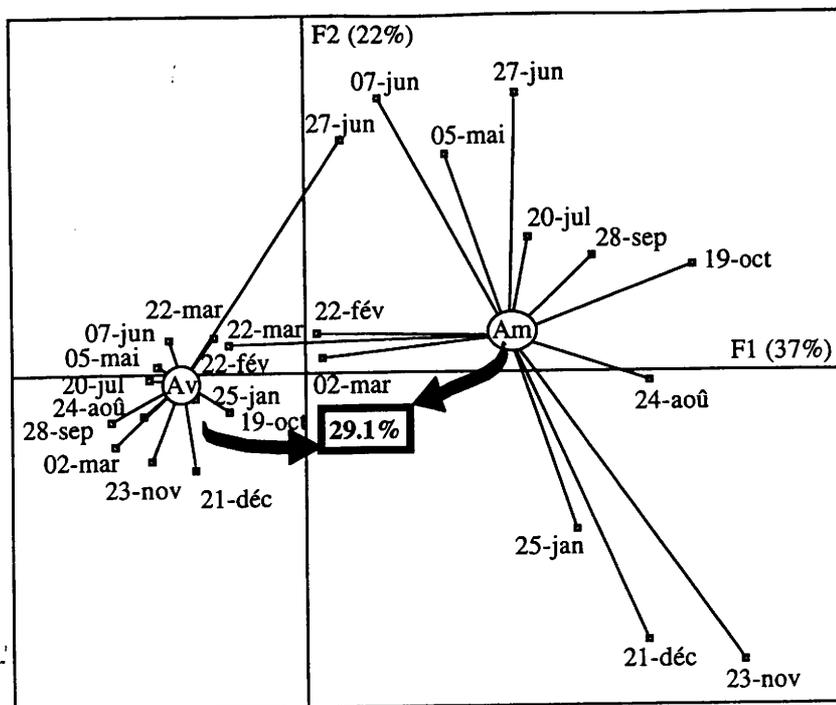


Figure 33 : Carte factorielle des 13 campagnes de prélèvements provenant de l'AFC effectuée sur les abondances des taxons d'invertébrés benthiques déterminés sur les stations de la Chalaronne C2c et C3b en amont et aval de la STEP (de février 95 à février 96). Am et Av sont les centres de gravité des deux étoiles des échantillons provenant respectivement C2c et C3b. 29,1% = pourcentage de la variabilité totale du nuage permettant de séparer C2c de C3b. F1 = station et F2 = saison.

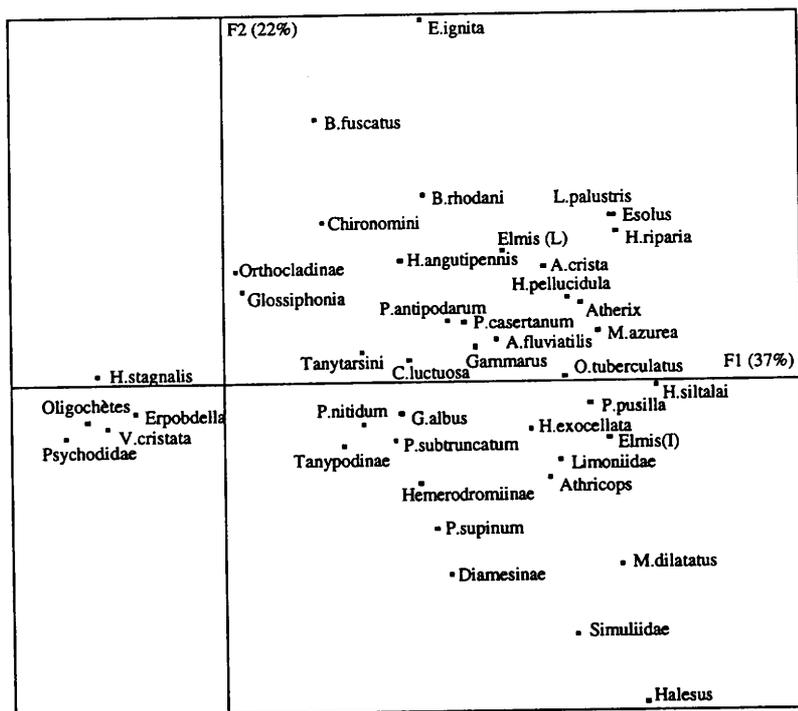


Figure 34 : Carte factorielle des taxons provenant de l'AFC effectuée sur les abondances de taxons d'invertébrés benthiques déterminés pour les stations C2c et C3b de la Chalaronne en amont et aval de la STEP. 13 campagnes de février 95 à février 96.

Toutes saisons confondues, la structure de la communauté d'invertébrés benthiques de la station en amont de la STEP se distingue nettement de celle de la station en aval de la STEP sur la carte factorielle (Figure 33).

Les échantillons du secteur situé en amont de la STEP présentent une forte dispersion comparés à ceux de la station aval (Figure 33). Les variations temporelles de la communauté d'invertébrés benthiques plus importantes en amont de la STEP qu'en aval témoignent de l'existence d'un peuplement moins perturbé à l'amont qu'à l'aval : le peuplement d'invertébrés est en équilibre dynamique constant avec une colonisation de nouvelles espèces lors de la saison de reproduction. La biocénose étudiée en amont ne correspond cependant pas à une biocénose de milieu de référence indemne de toute pollution (Odum, 1975).

Sur la carte factorielle provenant de l'AFC, les campagnes d'hiver s'opposent aux campagnes d'été selon l'axe F2 qui constitue un axe saisonnier (Figure 33).

Les échantillons les plus éloignés sont ceux des mois de juillet, d'août et de septembre. L'effet de la STEP est le plus marqué à cette période puisque les différences de structure des peuplements d'invertébrés benthiques entre l'amont et l'aval de la STEP sont alors maximales. Elles sont dues à la fois à un appauvrissement du peuplement d'invertébrés benthiques à l'aval de la STEP et à un enrichissement du peuplement d'invertébrés à l'amont de la STEP, l'été étant la période de reproduction et de colonisation du milieu pour de nombreux invertébrés. En été seulement, nous avons observé une augmentation du nombre de taxons en amont alors qu'il a sensiblement diminué en aval (Figure 31).

En juillet, la différence de structure de communauté d'invertébrés entre les deux stations est due à la prolifération d'individus en aval de la STEP, les espèces présentes sur les deux stations étant les mêmes. Par contre, en août et en septembre, la différence entre les deux stations est due à une diversité spécifique plus faible à l'aval de la STEP (Figure 31 et Figure 32).

Les échantillons les plus proches sont :

- les échantillons de février et mars. Le peuplement d'invertébrés benthiques est notablement plus pauvre en amont à cette période que pour le reste de l'année. Sa constitution ressemble à celle du peuplement d'invertébrés situé à l'aval de la STEP. Ces modifications sont dues aux forts débits de la rivière (entraînés par les pluies abondantes en cette saison) qui provoquent la dérive des invertébrés et estompe les différences de qualité biologique entre l'amont et l'aval de la STEP.
- celui du 7 juin de la station en amont de la STEP et celui de la station aval du 27 juin constitués d'une structure biocénotique semblable notamment à cause de la prolifération de *Baetis fuscatu*s (dont le cycle de développement pourrait être retardé à l'aval de la STEP).

Cinq taxons différencient la station recevant les effluents de la STEP de celle située en amont ; ils sont toujours plus abondants et plus souvent présents en aval. Ce sont les

Oligochètes, une famille de Diptère (Psychodidae), deux espèces d'Achètes (*Hellobdella stagnalis* et *Erpobdella* sp); une espèce de Mollusques (*Valvata cristata*) (Figure 34).

Tous ces organismes sont tolérants à un enrichissement du milieu en matière organique et particulièrement les Oligochètes (Friedrich, 1990). Une prolifération d'Oligochètes à l'aval de STEP a déjà été observée par différents auteurs (Kondratief & Simmons, 1982 ; Wright *et al.*, 1995).

Ces 5 taxons s'opposent sur l'axe F1 à une quantité importante de taxons plutôt caractéristiques de la station amont (Figure 34). Un certain nombre d'espèces d'invertébrés présente un degré de saprobiontie assez élevé et sont susceptibles de proliférer à l'aval des STEP. C'est le cas en particulier des Hydropsychidae (Trichoptères), de certaines espèces de Baetidae (Ephéméroptères) ou des Elmidae (Coléoptères) et de certaines familles de Diptères (Simuliidae, Limoniidae). Or, dans notre étude, les Trichoptères, les Ephéméroptères et les Coléoptères ont été moins abondants à l'aval de la STEP, comme l'ont déjà observé d'autres chercheurs (Pontash *et al.*, 1989 ; Monda *et al.*, 1995a). La disparition ou la diminution des effectifs de certaines de ces espèces en aval de la STEP peut être liée à la présence de toxiques dans le milieu (Roger *et al.*, soumis).

A travers l'étude biocénotique approfondie, l'impact du rejet de la STEP sur la faune d'invertébrés benthiques apparaît plus important et sur une plus longue période (l'été) que l'indice de qualité.

De plus, nous avons noté une raréfaction de nombreux taxons à l'aval de la STEP avec une prolifération de quelques taxons résistants à la matière organique.

Par contre, la diminution d'effectifs de certains taxons connus pour leur résistance à la matière organique nous a permis de soupçonner l'influence des micropolluants que sont les métaux ou les produits organiques de synthèse malgré des analyses chimiques prouvant une contamination en micropolluants plus forte à l'amont de la STEP qu'à l'aval. Des études complémentaires sont nécessaires pour définir les sensibilités des différentes espèces vis-à-vis des produits toxiques.

La description de la faune d'invertébrés par l'abondance et la richesse taxonomique peut être complétée par une approche fonctionnelle. Celle-ci est une approche plus compréhensive car plus cognitive qu'une description discursive reposant sur la systématique, qui pourrait nous permettre de prédire l'évolution d'une biocénose face à une perturbation . Cette approche de la bioindication à l'aide des traits biologiques des invertébrés a été appliquée à la Chalaronne (Charvet *et al.*, sous presse).

2.1.3 Evolution du peuplement d'*Hydropsyche*

Le genre *Hydropsyche* est bien représenté à l'amont et à l'aval de la STEP. C'est le groupe indicateur le plus souvent utilisé pour calculer l'IBG (voir §2.1.1). Quatre espèces d'*Hydropsyche* sont présentes sur le site (Figure 35). Cette étude fait partie de l'article 2 présenté en annexe.

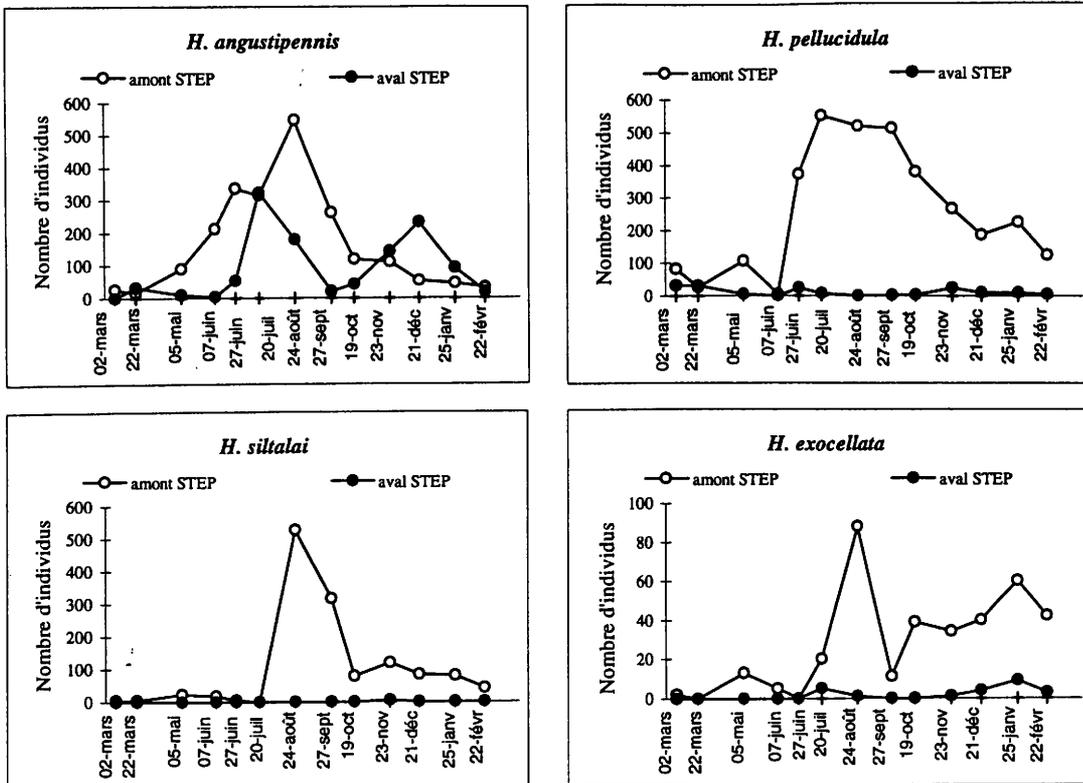


Figure 35 : Abondance des 4 espèces d'Hydropsyche au cours du temps en amont (C2c) et aval (C3b) de la STEP.

Ces quatre espèces d'Hydropsyche ont présenté des réactions différentes face au rejet de la STEP. Seule *Hydropsyche angustipennis* est bien représentée à l'aval : le nombre d'individus pour cette espèce entre l'amont et l'aval de la STEP n'est pas statistiquement différent (test apparié de Wilcoxon, $p=0,13$). Certains auteurs ont montré qu'*H. angustipennis* est l'espèce la plus résistante aux différents types de pollutions, tant organiques que toxiques (Petersen, 1986 ; Faessel *et al.*, 1993).

Ainsi, le genre *Hydropsyche* est composé d'espèces de sensibilité différente à la pollution : alors qu'une étude des effectifs de *H. pellucidula* et *H. siltalai* a suffi à détecter l'effet de la pollution du rejet de la STEP de Châtillon, l'espèce *H. angustipennis* peut être proposée pour des études d'effets sublétaux (dysfonctionnement du cycle de développement, difformités, bioaccumulation,...).

2.1.4 Structure de la population d'*Hydropsyche angustipennis*

La structure de la population d'*Hydropsyche angustipennis* a été étudiée d'abord en fonction du mois de prélèvement puis globalement en rassemblant tous les individus obtenus au cours des 13 prélèvements mensuels.

- *Etude de l'évolution des stades larvaires au cours du temps*
H. angustipennis semble avoir un cycle de développement complet sur un an (Figure 36).

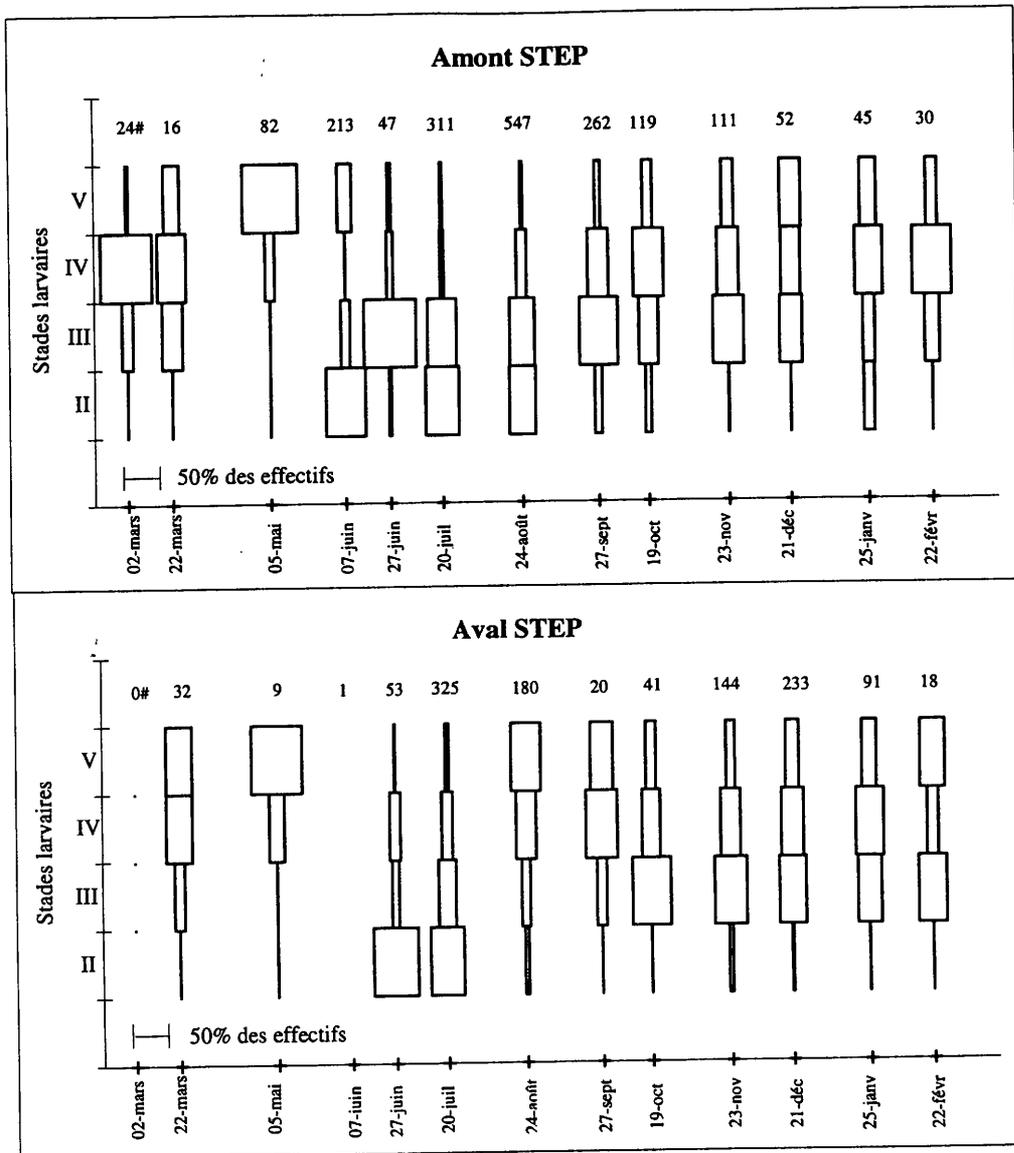


Figure 36 : Distribution des stades larvaires de *H. angustipennis* au cours du temps en amont (C2c) et aval (C3b) de la STEP entre février 95 et février 96. # : effectif d'hydrosyche prélevé pour une campagne.

L'émergence a eu lieu entre mai et juin. *H. angustipennis* éclôt en été et croît en été et automne. Elle passe l'hiver au stade 4 et croît à nouveau au printemps pour atteindre le stade 5, dernier stade larvaire avant l'émergence, au printemps. A l'aval, le cycle de développement semble légèrement perturbé : la distribution des stades est la même qu'à l'amont sauf en août, septembre et octobre pendant la période de croissance. C'est en août qu'on a la plus grande différence quantitative et qualitative de la population d'*H. angustipennis* entre l'amont et l'aval de la STEP. Comparée à l'amont de la STEP, la population d'hydrosyche est à la fois moins nombreuse à l'aval de la STEP mais a une structure totalement inversée avec une majorité de stade 5.

En amont de la STEP, le déroulement du cycle de développement de *H. angustipennis* est le même que celui décrit par Xiang *et al.* (1984) pour *H. angustipennis* prélevée dans des zones peu polluées.

Les légères modifications dans le déroulement du cycle de développement de *H. angustipennis* à l'aval de la STEP peuvent être dues à un retard de croissance des larves pendant l'automne comme l'ont observé certains auteurs sur des sites pollués (Andersen & Klubnes, 1983 ; Vuori & Parkko, 1996) ou à une prolongation ou un retard de l'émergence notés par Petersen & Petersen (1984) pour des hydropsyches exposées en laboratoire à des effluents pollués. La prolongation de la période d'émergence sur une période de deux mois pourrait bouleverser le synchronisme du cycle de développement ayant alors un effet sur le succès de reproduction et sur la compétition entre espèce.

La température est déterminante dans le développement des larves d'insecte (Boon, 1987). Nous ne l'avons pas retenu pour expliquer les perturbations observées dans le cycle d'*H. angustipennis* entre l'amont et l'aval de la STEP compte tenu de la faible différence de température de l'eau de la rivière entre ces deux stations.

• *Distribution globale des stades larvaires*

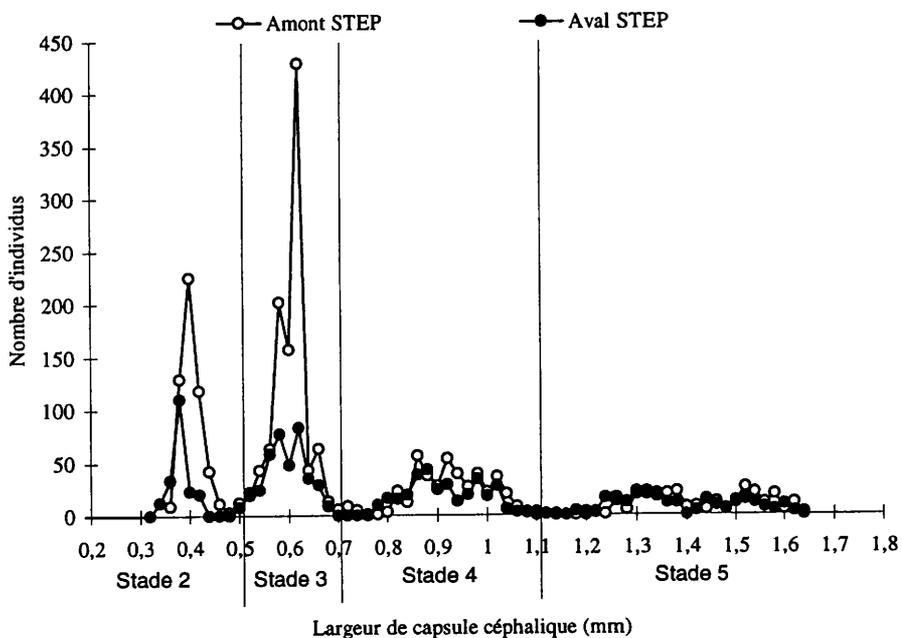


Figure 37 : Distribution des stades larvaires de *H. angustipennis* en fonction de la largeur de la capsule céphalique (tous les prélèvements mensuels de février 95 à février 96 confondus).

La distribution des stades larvaires est différente entre la population d'*H. angustipennis* échantillonnée à l'amont de la STEP et celle de l'aval de la STEP (Figure 37). En effet, alors que les deux derniers stades larvaires (stades 4 et 5) sont présents en nombre égal à l'amont et à l'aval de la STEP, les stades larvaires les plus jeunes détectés dans notre étude (stades 2 et 3) sont faiblement représentés à l'aval de la STEP en comparaison de l'amont (37% de l'amont).

Pour expliquer la disparition des jeunes stades larvaires à l'aval de la STEP, nous pouvons avancer deux hypothèses : les jeunes larves sont plus sensibles aux toxiques ou (et) la période

de présence de ces stades larvaires est l'été, époque où l'effluent est le plus concentré dans la rivière. Les perturbations que nous avons observées sur les populations d'hydropsyches à l'aval de la STEP sont différentes de celles observées par Vuori & Parkko (1996). Ces auteurs ont observé plutôt une diminution des derniers stades larvaires pour des populations d'hydropsyches soumises à des rejets industriels et domestiques. Ils expliquent ces modifications par une augmentation de la mortalité des stades les plus vieux due à un effet cumulatif des polluants que se traduit par une augmentation des dommages des trachéobranches pour les 3^{ème} et 4^{ème} stades.

Dans notre étude mensuelle sur les hydropsyches, la faiblesse des effectifs prélevés et un échantillonnage trop espacé notamment pendant la période d'été ne nous a pas permis de conclure à un retard de l'émergence ou de la croissance à l'aval de la STEP. Une étude plus précise du cycle de développement aurait nécessité des prélèvements plus rapprochés notamment en période d'émergence et un suivi sur plusieurs années.

2.1.5 Etude morphologique d'*Hydropsyche angustipennis*

Des études sur la morphologie de *H. angustipennis* ont été effectuées sur le prélèvement d'août où, pour chaque individu, nous avons mesuré la largeur de la capsule céphalique, la surface et le poids des individus. Nous avons étendu ces descriptions morphologiques à tous les prélèvements par l'étude de la surface des organismes uniquement.

- *Relations entre la taille de la capsule, la surface et le poids des organismes*

Tout d'abord, nous avons remarqué que la mesure de la surface (ou du poids) donne une indication différente de la mesure de la largeur de la capsule céphalique. En effet, l'ajustement entre le poids et la surface des individus est meilleur que celui entre le poids et la taille de la capsule céphalique (Figure 38 et Tableau 26). Les hydropsyches ont une croissance continue de leur surface qui est corrélée à leur poids alors qu'elles ont une croissance discontinue de la largeur de leur capsule céphalique. Ainsi, la mesure de la surface (ou du poids) des hydropsyches peut être une approche intéressante pour suivre leur état de santé alors que la largeur de la capsule céphalique est un bon indicateur du stade larvaire.

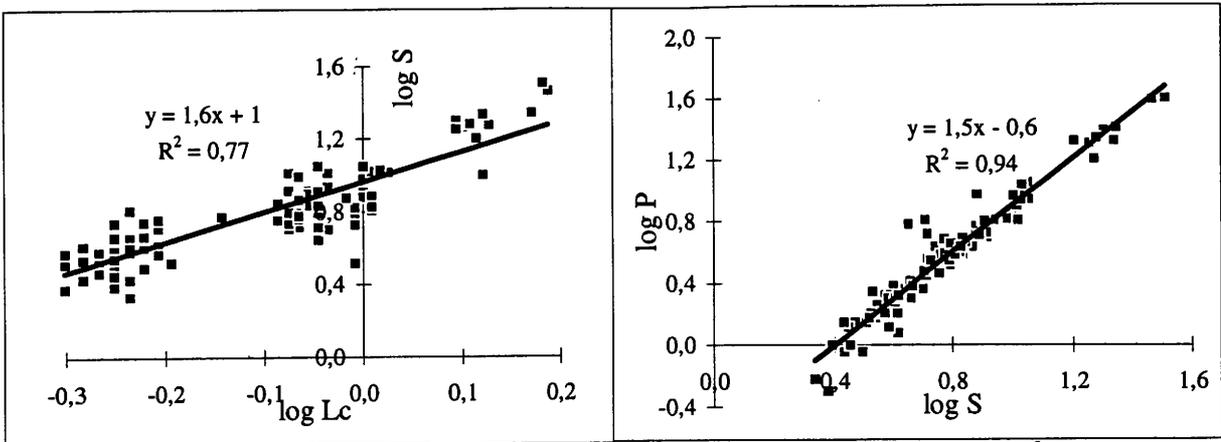


Figure 38 : Régressions linéaires entre le poids (P en mg), la surface (S en mm^2) et la largeur de la capsule céphalique (Lc en mm) de *H. angustipennis* prélevés amont de la STEP (C2c) en août 1995.

Tableau 26 : Régressions linéaires entre le poids (P en mg), la surface (S en mm^2) et la largeur de la capsule céphalique (Lc en mm) de *H. angustipennis* prélevées à l'amont et à l'aval de la STEP en août 1995

Amont STEP (C2c)	Aval STEP (C3b)
$\log P = 1,5 \log S - 0,6$ $R^2 = 0,94$	NS ¹
$\log P = 2,6 \log Lc + 0,9$ $R^2 = 0,78$	NS
$\log S = 1,6 \log Lc + 1$ $R^2 = 0,77$	$\log S = 2,1 \log Lc + 1$ $R^2 = 0,72$
$\log S = 1 + 1,2 \log Lc + 0,02 \text{ station} + 0,5 \text{ station} * \log Lc$ $R^2 = 0,79$	

¹ NS : régression statistiquement non significative.

Ainsi, un modèle de régression linéaire a été ajusté entre le poids et la surface (ou la taille de la capsule céphalique) de *H. angustipennis* pour la station en amont de la STEP (Tableau 26). Pour la station en aval de la STEP, le modèle linéaire n'était pas suffisant en raison de la grande dispersion des surfaces pour un poids donné. Il nous a donc été impossible de remplacer le paramètre « surface » par le paramètre « poids » dans la suite de notre analyse.

De plus, nous avons comparé les relations « largeur de capsule céphalique - surface » entre les organismes de l'amont et de l'aval de la STEP (Tableau 26). L'influence de la taille de la capsule céphalique s'est révélée différente à l'aval comparativement à l'amont. Ce résultat a été obtenu par l'ajustement d'une régression multiple sur les données de l'amont et de l'aval où tous les coefficients sont significatifs (Fisher, $p < 0,05$) sauf le coefficient station (Tableau 26). Ainsi, *H. angustipennis* au dernier stade larvaire, avait une surface plus importante en août à l'aval de la STEP qu'à l'amont. Par contre, aux jeunes stades (stade 2), c'est l'inverse.

• Etude de la surface des organismes

Pour les prélèvements mensuels autres que celui d'août, les hydropsyches n'ayant pas été individualisées, nous n'avons pas la correspondance de la surface des organismes avec leur stade larvaire. Tous stades larvaires confondus, la surface des hydropsyches dépend de la

station de prélèvement (surface plus importante à l'aval de la STEP qu'à l'amont) et de la saison (surface plus importante en hiver qu'en été) (ANOVA, $p < 0,05$). On observe moins de dispersion de la surface des individus à l'amont de la STEP qu'à l'aval. A l'aide de la distribution de la surface, nous n'avons réussi à distinguer que le dernier (5^{ème}) stade larvaire. Pour toute la campagne de prélèvement, aucune différence de surface des organismes de ce stade n'a été observée entre les deux sites (ANOVA, $p = 0,46$) sauf pour le prélèvement de juillet où les individus sont plus gros à l'aval qu'à l'amont (test t, $p < 0,05$).

En résumé, nous avons remarqué, une modification de la forme de *H. angustipennis* en été, qui, pour le dernier stade larvaire, a une surface plus importante à l'aval de la STEP qu'à l'amont. Ce résultat nous permet de soupçonner l'influence de la matière organique du rejet qui sert de nourriture aux hydropsyches en aval.

H. angustipennis est un organisme intéressant par sa taille, son cycle de développement et sa résistance à la matière organique pour des études sur sa population ou sa morphologie. Il est à noter que d'autres indicateurs ont été utilisés sur les hydropsyches tels que des perturbations comportementales (Petersen & Petersen, 1984) ou l'apparition de malformations (Vuori, 1995 ; Vuori & Parkko, 1996 ; Champely *et al.*, 1997).

2.2 Toxicité chronique de l'effluent mesurée au laboratoire sur *Ceriodaphnia dubia*

Les études *in situ* nous ont permis de déceler l'impact de la STEP mais aussi des effets de pollutions en amont de la STEP notamment celui dû aux apports des déversoirs d'orage. Dans un contexte de multi-contamination, il s'est avéré difficile d'isoler les effets imputables au rejet de la STEP. Il semble donc intéressant d'adopter une approche spécifique du rejet de la STEP par des tests en conditions contrôlées.

Chaque mois pendant un an, simultanément aux études sur les invertébrés de la rivière, nous avons effectué des tests de toxicité à long terme sur *C. dubia*. Nous avons exposé les organismes à l'eau de la rivière prélevée en amont de la STEP, à l'effluent à 90% et à sa concentration dans la rivière (CER) reconstituée à partir d'un mélange d'effluent et d'eau de rivière. Un lot d'organismes témoins est exposé à de l'eau de laboratoire. Nous avons mesuré la survie (Tableau 27), la reproduction (Figure 39) et la croissance (Figure 40) des organismes exposés (résultats détaillés en annexe 15 et dans l'article 2).

Sur 13 tests, 2 ne satisfont pas aux conditions de validité appliquées sur le lot témoin : ceux de juin et d'août. De plus, il faut noter que la reproduction et la croissance du lot de cériodaphnies témoins, non présentées dans les figures, sont légèrement inférieures à celles des cériodaphnies exposées à l'eau de laboratoire, cette dernière étant plus pauvre en substances chimiques.

Dans les figures, nous avons mentionné les CER_j, CER estimées le jour du prélèvement. Elles correspondent aux concentrations testées sur les cériodaphnies sauf en février et novembre 95.

Tableau 27 : Survie (en %) de *Ceriodaphnia dubia* exposée à 90% d'effluent de STEP de Châtillon après 7 jours de test en 95 et 96.

Dates de test	Effluent 90%
24-févr 95	100
24-mar	70
21-avr	100
26-mai	0*
21-juil	30*
21-sept	80
20-oct	80
23-nov	100
22-déc	100
26-janv 96	90
23-févr	100

* = significativement différent des témoins.

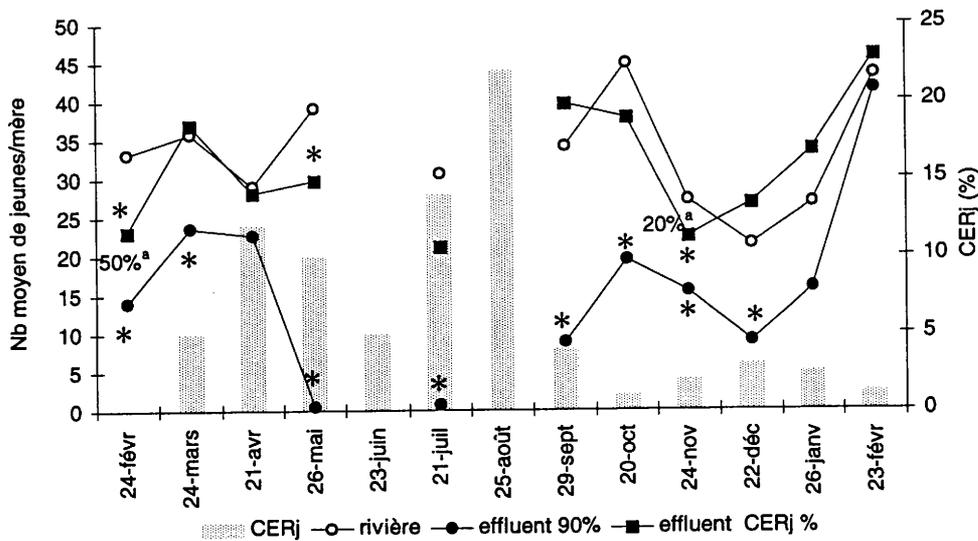


Figure 39 : Etude mensuelle de la reproduction (nombre moyen de jeunes/mère) de *C. dubia* exposées pendant 7 jours à des mélanges d'eau de la Chalaronne et d'effluent de STEP.

* = significativement différent des témoins exposés à l'eau de la Chalaronne. CERj = concentration de l'effluent dans la rivière estimée le jour du prélèvement d'effluent. ^a : concentration d'effluent testée à la place de la CERj.



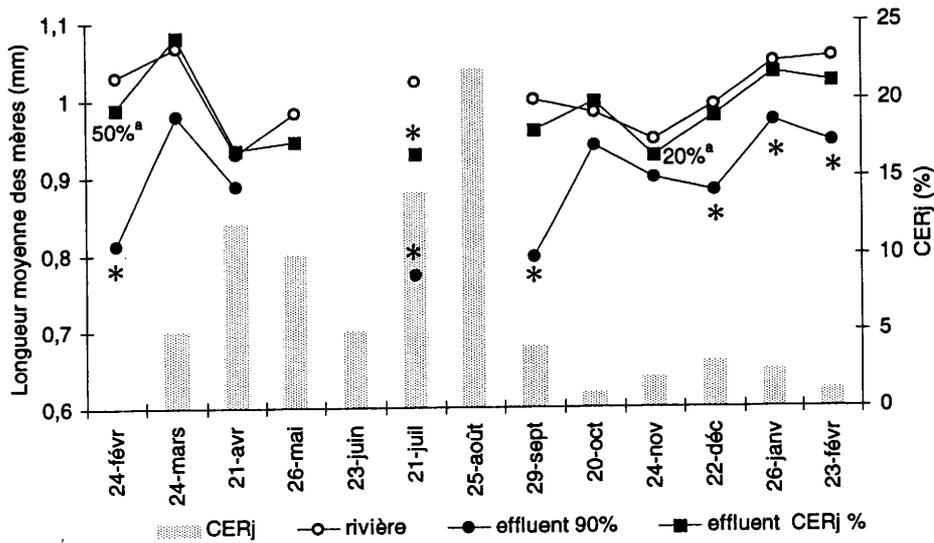


Figure 40 : Croissance (longueur moyenne des mères) de *Ceriodaphnia dubia* soumise pendant 7 jours à des mélanges d'eau de la Chalaronne et d'effluent de STEP.

* = significativement différent des témoins exposées à l'eau de la Chalaronne. CERj = concentration de l'effluent dans la rivière estimée le jour du prélèvement d'effluent. ^a : concentration d'effluent testée à la place de la CERj.

La toxicité de l'effluent a été révélée tout au long de l'année grâce à la reproduction et la croissance de la cériodaphnie après 7 jours d'exposition à 90% d'effluent.

En été, nous avons observé une mortalité importante des cériodaphnies exposées pendant 7 jours à 90% d'effluent²² (Tableau 27). De plus, les cériodaphnies survivantes ont une reproduction et une croissance particulièrement faibles. A cette même période, nous avons décelé un effet significatif de l'effluent testé à la CERj sur la reproduction ou la croissance des cériodaphnies.

Le pic de toxicité observé en été est à la fois dû à :

- une différence dans la qualité de l'effluent, celui-ci étant plus concentré en été qu'en hiver si on se base sur la conductivité et les concentrations en PO_4^{3-} et en NH_4^+ mesurées dans l'effluent (§ 1.3.)
- une CER plus importante en été qu'en hiver, celle-ci étant supérieure à 10% en été.

Contrairement au pic de toxicité observé en été dans notre étude, Metikosh (1980) a décelé des effluents de STEP plus toxiques en hiver qu'en été, l'auteur l'expliquant par une performance plus faible de la STEP en hiver qu'en été à cause des températures basses.

²² Aucune mortalité significative des cériodaphnies n'a été décelée en 48h d'exposition à l'effluent testé à 90%. Ces résultats confirment que les effluents de STEP sont des effluents faiblement toxiques à court terme comme nous l'avons déjà remarqué dans le chapitre 3 pour les effluents de trois STEP.

Dans notre étude, 10% semble être la concentration d'effluent au-dessus de laquelle on mesure un effet de l'effluent sur la reproduction de la cériodaphnie quelle que soit la date de prélèvement. En effet, on observe la diminution de la reproduction de la cériodaphnie pour les tests de février et novembre 95 où les concentrations d'effluent testées sont supérieures à 10%. Ce seuil de 10% d'effluent pour la détection des effets de toxicité à long terme d'effluent de STEP a déjà été observé par Craig *et al.* (1991).

Il faut noter que, dans notre étude, il peut exister un biais dans l'estimation de la toxicité de l'effluent à la CER. En effet, les CER_j étant calculées grâce à des mesures de débit de la Chalaronne acquises le jour même, celles-ci sont légèrement différentes des CER réelles calculées grâce à des débits validés par le SEMA disponibles environ 6 mois après.

Nous avons testé mensuellement une concentration fixée d'effluent sur la cériodaphnie afin d'apprécier les variations de qualité de l'effluent. Cependant, la variation dans le temps des paramètres mesurés sur la cériodaphnie peut être également due à une variation de l'état de santé des organismes. Ainsi, même si le suivi mensuel est possible car la méthode est suffisamment simple à utiliser, il faut remarquer que ce suivi nous a posé problème du fait de variations dans la qualité de l'élevage des cériodaphnies comme l'avaient déjà souligné DeGraeve & Cooney (1987). Afin de vérifier l'état de santé des organismes, un test avec un toxique de référence doit être réalisé en parallèle avec le test sur effluent.

En résumé, l'effluent testé mensuellement à 90% pendant 7 jours s'est révélé avoir un effet sur la reproduction ou la croissance de *C. dubia* pendant toute l'année. En été, ces effets sont accompagnés de mortalité mais aussi d'une diminution de la reproduction ou de la croissance pour des concentrations d'effluent équivalentes aux concentrations rencontrées à l'aval de la STEP (CER).

2.3 Relations entre les mesures biologiques sur invertébrés *in situ* et en conditions contrôlées et les études physico-chimiques

A partir des données mensuelles, nous avons comparé par une analyse en composantes principales (ACP) (Figure 41) :

- la physico-chimie courante à l'aval de la STEP ainsi que le débit de la rivière et la CER. Nous avons choisi d'utiliser les moyennes des débits de la rivière et de la concentration de l'effluent dans la rivière enregistrés pendant les 10 jours précédents l'expérimentation (notées respectivement Q_{moy10j} et $\%eff_{moy10j}$). Ce choix nous permet d'intégrer les possibles modifications survenues sur la faune benthique et de simuler l'exposition des cériodaphnies qui est de 7 jours
- l'IBG à l'aval de la STEP
- la reproduction et la croissance des cériodaphnies exposées en laboratoire à l'effluent à la CER, simulant les conditions chimiques de l'eau de la rivière à l'aval de la STEP.

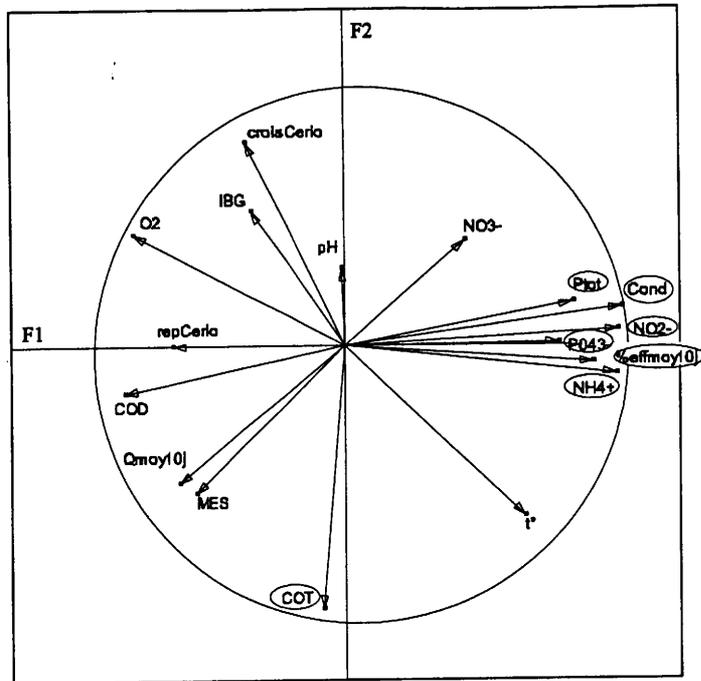


Figure 41 : Carte factorielle de l'analyse en composantes principales des méthodes utilisées mensuellement sur le site de Châtillon. Physico-chimie courante. Débit et CER moyens pendant les 10 jours précédents les mesures mensuelles : Q_{moy10j} et $\%eff_{moy10j}$. IBG. Reproduction et croissance étudiés au laboratoire sur des cériodaphnies exposées à l'effluent à la CER : *repCerio* et *croisCerio*.

Les variables expliquant les axes de la Figure 41 sont des paramètres physico-chimiques (paramètres entourés dans la figure). Il semblerait que la diminution de la reproduction de la cériodaphnie exposée pendant 7 jours à l'effluent à la CER soit un bon indicateur d'une CER, d'une conductivité et de concentrations en azote et phosphore élevées. La diminution de la croissance de la cériodaphnie exposée pendant 7 jours à l'effluent à la CER et la baisse de l'IBG semblent plus liées à des concentrations importantes en COT. Par contre, la concentration en COD semble bénéfique à la reproduction de la cériodaphnie.

Ainsi, la reproduction de la cériodaphnie semblerait être un indicateur de la pollution azotée et phosphorée alors que l'IBG est plus un indicateur de pollution organique. Par l'utilisation de ces deux méthodes, on obtient l'identification de certains types de polluants apportés par la STEP. Il est utile de rappeler ici que, comme l'IBG, les études de la morphologie d'une hydrosyche ont permis de déceler l'impact de la matière organique.

D'autre part, il existerait des mesures qui permettraient d'identifier une pollution apportée par des micropolluants telles que l'étude de l'apparition de malformation des pièces buccales des larves de chironomes (Bird *et al.*, 1995).

Les études morphologiques des organismes se sont révélées intéressantes pour l'évaluation de l'impact de l'effluent de STEP puisque l'effluent semble avoir un effet à la fois sur la taille de la cériodaphnie et sur la surface des hydrosyches : il ralentirait la croissance des stades jeunes.

Le test de toxicité sur *C. dubia* exposée à l'effluent pendant 7 jours et l'IBG donnent des résultats comparables (Figure 41) comme l'ont déjà montré différents chercheurs (Eagleson *et*

al., 1990 ; Dickson *et al.*, 1992).

Cependant, il existe une différence dans le pouvoir de discrimination des mesures *in situ* et des tests de toxicité. Ainsi, aucune toxicité de l'eau de la rivière en amont de la STEP n'a été suspectée alors que l'IBG a révélé une station déjà dégradée en amont de la STEP. De plus, tout au long de l'année, nous n'avons pas détecté de toxicité à long terme sur la cériodaphnie exposée à l'effluent à la CER alors qu'entre l'amont et l'aval de la STEP une baisse de qualité biologique a été décelée grâce à l'IBG et à la diminution sensible de la population de certaines espèces d'invertébrés (Kosmala *et al.*, 1996b). C'est seulement à 90% d'effluent testé sur *C. dubia* que nous avons détecté une toxicité à long terme tout au long de l'année.

Suivant les cas, il peut arriver que les tests de laboratoire sous-estiment (Niederlehner *et al.*, 1990 ; Clements & Kiffney, 1994b) ou surestiment (Pontash *et al.*, 1989) les effets *in situ*. Selon Clements & Kiffney (1995) et Lapoint *et al.* (1995), les facteurs qui limitent la concordance entre les tests et les réponses de terrain sont, entre autres :

- la variation de la sensibilité en fonction des sites,
- les phénomènes d'acclimatation et d'adaptation de la faune du milieu,
- les effets indirects,
- la difficulté dans les études de terrain de distinguer la variation naturelle de la variation due à la pollution étudiée,
- les paramètres mesurés,
- la variation temporelle.

La relation entre les tests de laboratoire et les mesures de terrain est une problématique fondamentale en écotoxicologie. Pour clarifier les extrapolations des essais de laboratoire, il est nécessaire de développer des études comprenant l'utilisation conjointe de bioessais et de mesures *in situ* (Sasson-Brickson & Burton, 1991).

3. Mesures biologiques sur des poissons prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées

3.1 Mesures biologiques sur des poissons prélevés *in situ* entre l'amont et l'aval du rejet de la STEP

Deux pêches successives ont été réalisées au printemps et en automne sur des portions de rivière encadrant le rejet de la STEP afin de pouvoir comparer des structures de peuplement et de population piscicole ainsi que des mesures morphologiques et physiologiques effectuées sur des poissons entre les différentes stations pêchées.

3.1.1 Etude du peuplement piscicole

La structure du peuplement piscicole de la Chalaronne étudiée sur trois stations en juin et octobre 95 est présentée sur les Figure 42 et Figure 43 ; les cinq espèces rares²³ (anguille, brochet, carpes, silure et truite fario) n'y sont pas représentées. Elle est détaillée en annexe 12. En juin, nous avons compté 17 espèces de poissons à l'amont de la ville, 22 à l'aval de la ville et 20 à l'aval de la STEP. En octobre, nous avons dénombré 12 espèces de poissons à l'amont de la ville, 24 à l'aval de la ville et 20 à l'aval de la STEP. Pour les deux saisons de pêche, le nombre d'espèces de poissons augmente entre l'amont et l'aval de la ville et diminue entre l'amont et l'aval de la STEP. La diminution du nombre d'espèces à l'aval de la STEP peut s'expliquer par la disparition des espèces rares à l'aval de la STEP qui sont presque toutes présentes à l'amont. Une diminution d'indices basés sur la diversité piscicole a déjà été observé par Karr *et al.* (1985) et Neiheisel *et al.* (1988) l'amont et l'aval d'un rejet de STEP. Cependant, il faut relativiser notre résultat par le fait que la différence de diversité spécifique est plus importante entre l'amont et l'aval de la ville qu'entre l'amont et l'aval de la STEP.

²³ <0,1% de l'effectif total.

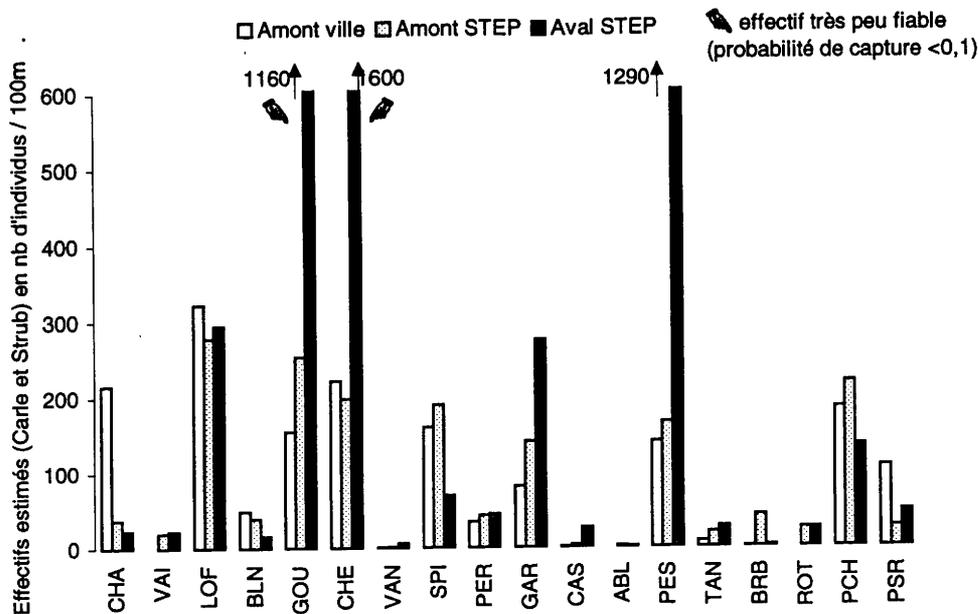


Figure 42 : Composition spécifique des peuplements de poissons pêchés à l'électricité sur trois stations sur la Chalaronne en juin 95 (stations C1, C2c et C3b). Liste des abréviations des espèces en annexe 11. Les effectifs ont été estimés par la méthode de Carle & Strub et ramenés à 100 m de linéaire pour chaque station.

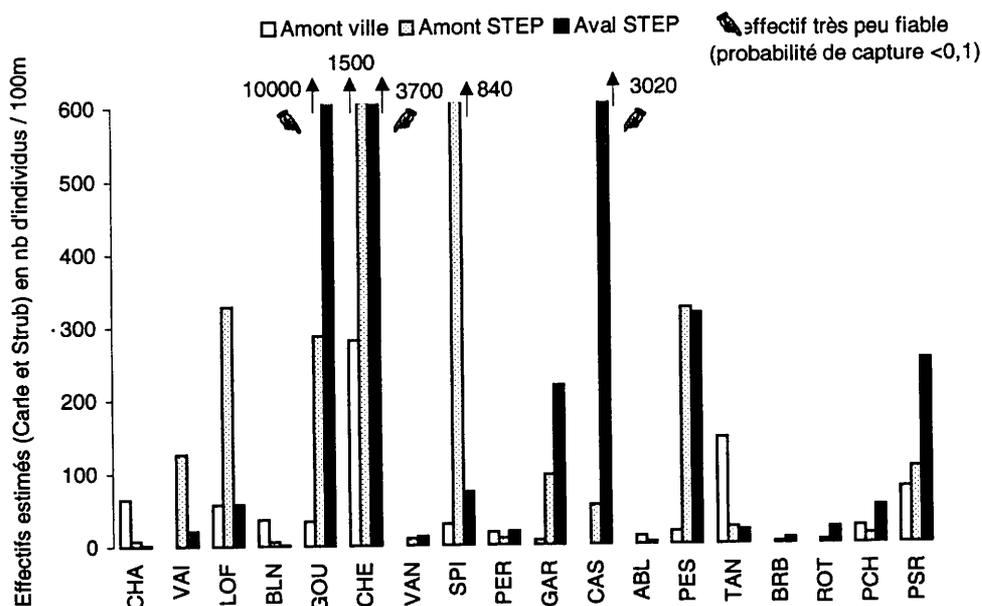


Figure 43 : Composition spécifique des peuplements de poissons pêchés à l'électricité sur trois stations sur la Chalaronne en octobre 95 (stations C1, C2c et C3b). Liste des abréviations des espèces en annexe 11. Les effectifs ont été estimés par la méthode de Carle & Strub et ramenés à 100 m de linéaire pour chaque station.

Entre les trois stations échantillonnées de l'amont vers l'aval, nous avons observé la diminution du nombre de chabots et de blageons conjointement à une augmentation du nombre de gardons, de chevaines et de perches soleil. Nous avons également remarqué une

diminution de l'effectif de spirilins mais uniquement entre les stations amont et aval de la STEP.

Il y a donc un remplacement d'espèces dont l'indice de résistance à la dégradation défini par Verneaux (1981) est faible par des espèces dont l'indice de résistance est plus élevé. Cette modification n'est pas détectée uniquement entre l'amont et l'aval de la STEP mais aussi entre l'amont de la ville et l'aval de la STEP.

Il est à noter que des problèmes d'estimation d'effectif de 3 espèces rencontrées sur la station à l'aval de la STEP (carassin, chevaine, goujon) sont dus à la présence importante de caches naturelles pour le poisson contribuant à une pêche peu efficace. Ainsi, force est de constater que, malgré le soin apporté aux choix de nos stations de pêche, celles-ci n'ont pas des conditions d'habitat pour les poissons totalement identiques. Or, les biocénoses présentes dans le milieu dépendent de l'habitat (Bergman *et al.*, 1986). Une étude approfondie de l'habitat des poissons a été envisagée pour permettre la mesure de la capacité d'accueil du cours d'eau : la comparaison de cette capacité d'accueil avec la surface réellement utilisée par les poissons dans le cours d'eau de l'aval de la STEP nous aurait permis de nous affranchir de l'habitat et d'isoler ainsi l'impact physico-chimique du rejet de la STEP (Valentin, 1995).

3.1.2 Structure de la population de chevaines

Pour les pêches de juin et d'octobre 95, la structure de la population des chevaines a été représentée par la distribution des individus pêchés en fonction de leur taille sur les graphiques des Figure 44 et Figure 45.

Effectifs

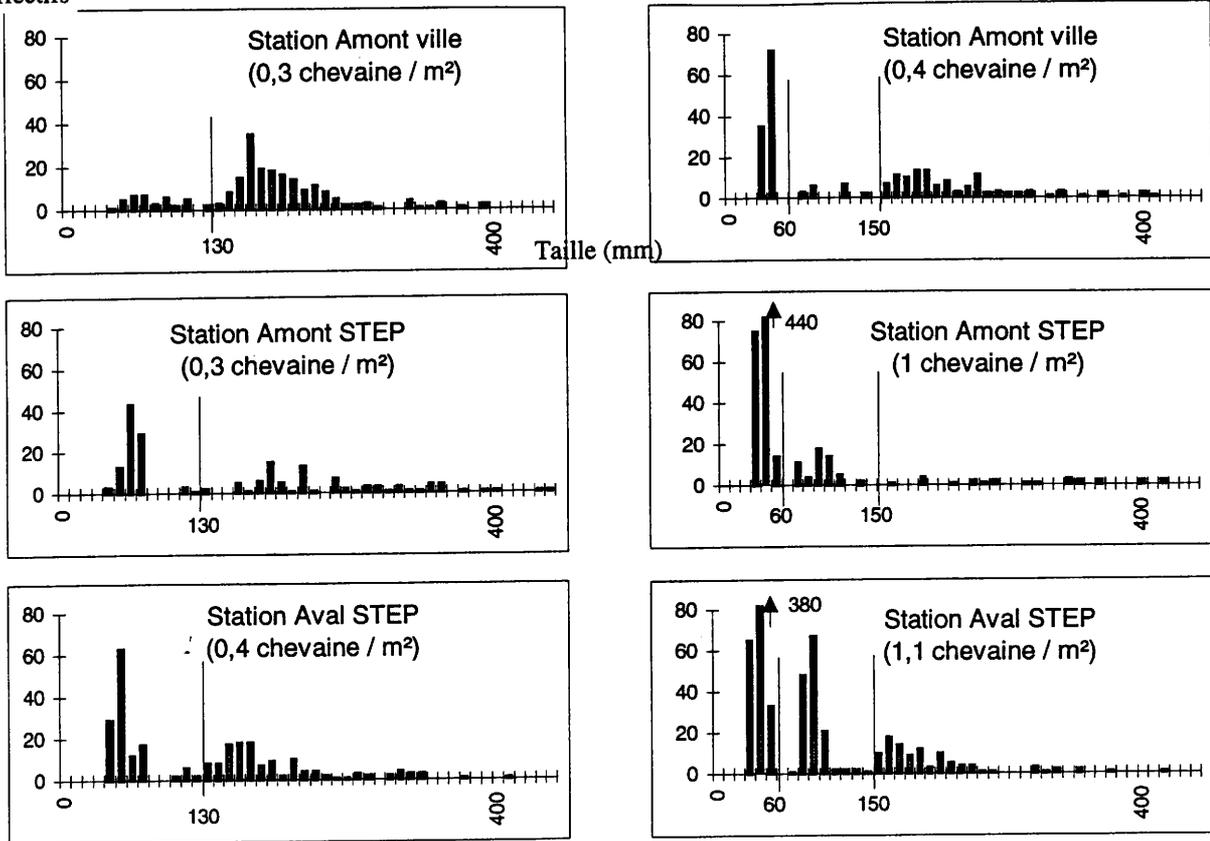


Figure 44 : Structures de population de chevaines dans les stations de la Chalaronne (C1, C2c, C3b) en juin 95. Histogrammes en classes de taille (en mm).

Figure 45 : Structures de population de chevaines dans les stations de la Chalaronne (C1, C2c, C3b) en octobre 95. Histogrammes en classes de taille (en mm).

Tableau 28 : Proportion de chevaines par classe de taille dans les stations de la Chalaronne de campagnes de juin et d'octobre 95.

	Juin		Octobre		
	Age 0 ⁺	Age 1 ⁺	Age 0 ⁺	Age 1 ⁺	Age n ⁺
	<130	>130	<60	60-150	>150
Amont	17	83	32	7	61
Amont STEP	53	47	84	8	8
Aval STEP	54	46	59	19	22

Les structures de population de chevaines sont équivalentes entre l'amont et l'aval de la STEP pour les deux campagnes (Tableau 28, Figure 44 et Figure 45). En octobre, on note cependant une proportion de chevaines d'âge 1⁺ plus importante en aval de la STEP qu'en amont.

La population de chevaines de l'amont de la ville est mieux structurée et a une proportion de chevaines adultes plus importante que pour les deux autres stations.

La différence de structure de la population de chevaines est plutôt marquée entre l'amont et l'aval de la ville qu'entre l'amont et l'aval de la STEP. Elle peut indiquer l'impact de la pollution apportée par la ville mais aussi une différence possible des populations de poissons.

En effet, les populations de poisson des deux stations à l'aval de la ville sont géographiquement plus proches que les populations de poisson situées de part et d'autre de la ville.

Entre juin et octobre, la densité de chevaines sur les stations à l'amont et à l'aval de la STEP a nettement augmenté alors que celle de la station à l'amont de la ville est restée stable pour les deux campagnes. Cette augmentation de densité de chevaines s'accompagne de l'abondance de poissons de petite taille en octobre due à la reproduction des chevaines qui a lieu en juin (Philippart, 1972). Ainsi, même si les populations à l'aval de la ville semblent moins équilibrées qu'à l'amont, nous avons tout de même noté un recrutement important des jeunes, signe d'un renouvellement de population. On peut supposer une différence de sensibilité des chevaines à la pollution en fonction de leur âge. Contrairement à leurs aînés, les jeunes chevaines semblent particulièrement résistants à la pollution apportée par les rejets des réseaux d'assainissement (déversoir d'orage et rejet de STEP).

L'étude de la structure de population de poissons nécessite un prélèvement annuel sur plusieurs années. L'automne s'est révélé être la saison propice puisqu'en cette saison nous pouvons étudier les jeunes chevaines nés pendant l'été, moins mobiles que leurs aînés et dont nous connaissons ainsi plus les conditions d'exposition. Comme pour l'étude du peuplement piscicole, il semble important de réfléchir sur les dimensions spatiales des stations prélevées et sur la distance qui doit séparer les stations.

La bonne richesse spécifique piscicole observée sur la Chalaronne couplée avec une structure de population de chevaines assez déséquilibrée nous laisse à penser qu'il existerait un fonctionnement de la communauté piscicole qui s'effectuerait à une échelle supérieure à la station de pêche. Le poisson étant un organisme mobile et de grande taille, les secteurs de rivière pour son étude doivent être de longueur suffisamment grande pour appréhender la communauté piscicole dans son entier (au moins 200 m dans un cours d'eau de 10 m de large pour une étude des cyprinidés, communication personnelle H. Capra). De plus, la distance entre les secteurs de rivière comparés doit être supérieure à l'aire de mobilité des poissons des stations respectives. Enfin, les études sur les poissons sont à effectuer préférentiellement en dehors de leur période de reproduction (entre avril et juillet), période propice à leur déplacement à l'occasion de la recherche du site de fraie.

Ces contraintes et notamment les contraintes géographiques rendent difficiles le choix des stations. A titre d'exemple, selon ces critères, la station choisie sur la Chalaronne en amont de la STEP est à abandonner.

Lors de l'étude du peuplement piscicole, nous n'avons pas détecté de différence entre les populations de chevaines de la station en amont et en aval de la STEP. Il est important de constater que, malgré la proximité des deux stations d'étude, nous avons pu mettre en évidence une légère différence de contamination chez les chevaines pêchés en amont et en aval de la STEP. Ceci peut démontrer une mobilité spatiale réduite de ces populations.

3.1.3 Facteur de condition mesuré sur les chevaines, les loches et les goujons.

Le facteur de condition (FC = 100 * poids / longueur³) a été calculé pour les chevaines, loches et goujons pêchés dans la Chalaronne.

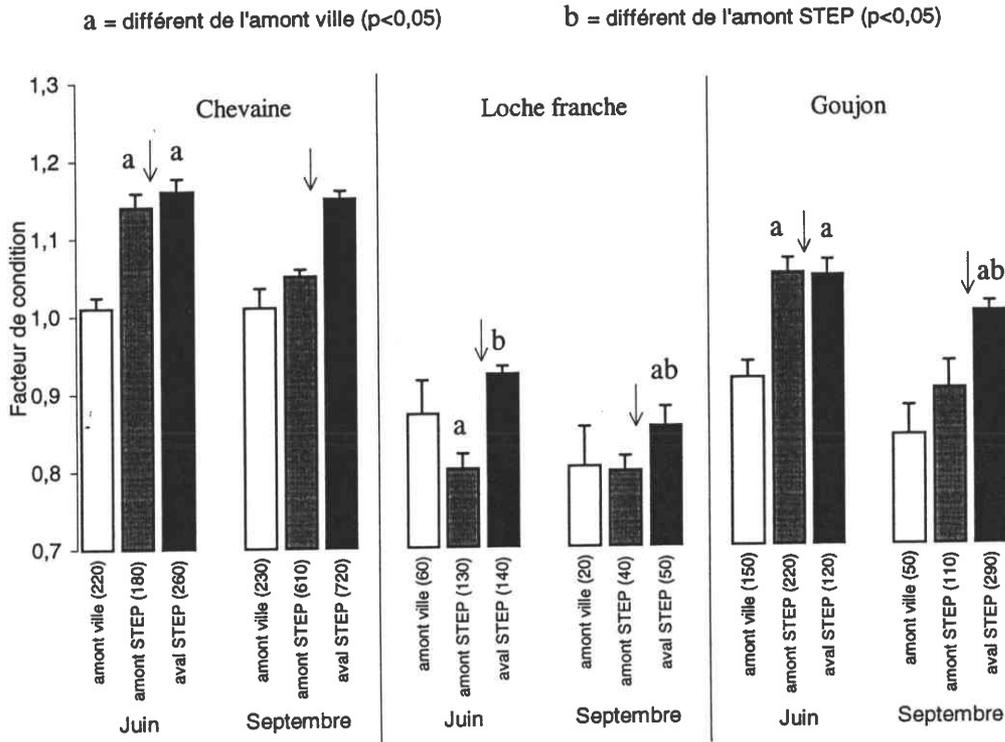


Figure 46 : Facteur de condition (= Poids / Longueur³) (moyenne et erreur type) de poissons pêchés dans la Chalaronne (C1, C2c et C3b) en juin et septembre 95. () : nombre de poissons.

Pour les trois espèces de poisson, le facteur de condition augmente entre l'amont de la ville et l'aval de la STEP (Figure 46). Pour les goujons et les chevaines, nous avons noté une augmentation significative du FC entre l'amont et l'aval de la STEP en septembre alors qu'en juin, l'augmentation est significative entre l'amont et l'aval de la ville. On peut supposer un effet des rejets des déversoirs d'orage particulièrement importants en juin qui a été une période pluvieuse. Cet effet aurait tendance à masquer l'impact de la STEP.

Il est probable qu'une différence de maturation sexuelle des poissons soit à l'origine des écarts de FC observés entre les poissons pêchés en juin et ceux pêchés en septembre.

Le FC nous dispense d'une étude des relations entre le poids et la taille des poissons identique à celle effectuée sur les hydropsyches. Il faut noter toutefois que le facteur de condition ne se justifie que si dans la relation poids = a * longueur^b, b est voisin de 3, ce qui est en général le cas (Le Cren, 1951).

Certains auteurs (Lindström-Seppa & Oikari, 1989 ; Flammarion *et al.*, sous presse) ont également observé une augmentation du FC de poissons pêchés à l'aval d'une grande agglomération comprenant une zone d'industrie chimique ou de poissons exposés à des effluents de papeterie comparé au FC de poissons témoins vivants dans des eaux peu polluées. Les mécanismes physiologiques à l'origine de l'augmentation du FC ne sont pas connus.

Cependant, nous avons remarqué que les poissons à l'aval de la STEP avaient un facteur de condition tantôt inférieur tantôt supérieur à celui des poissons de l'amont (voir chapitre 3, §2.1.3), ce qui entraîne des difficultés d'interprétation de cet outil. En effet, le FC est influencé par de nombreux facteurs (Le Cren, 1951). Il semble être moins un indicateur d'un effet dû à une perturbation chimique que d'un effet biotique ou physique (nourriture, température,...). C'est un outil qui semble peu adapté à la détection de l'impact d'un effluent de STEP étant donné que nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de relation dose-effet.

3.2 Mesures de l'activité EROD de poissons prélevés *in situ* et de poissons exposés à l'effluent en conditions contrôlées

Des mesures d'activité EROD ont été effectuées à la fois sur des poissons pêchés dans la rivière et sur des poissons exposés à l'effluent dans des bassins de dérivation placés sur le site de la STEP. Ces mesures ont fait l'objet de l'article 1 présenté en annexe.

3.2.1 Mesures de l'activité EROD chez des chevaines prélevés *in situ*

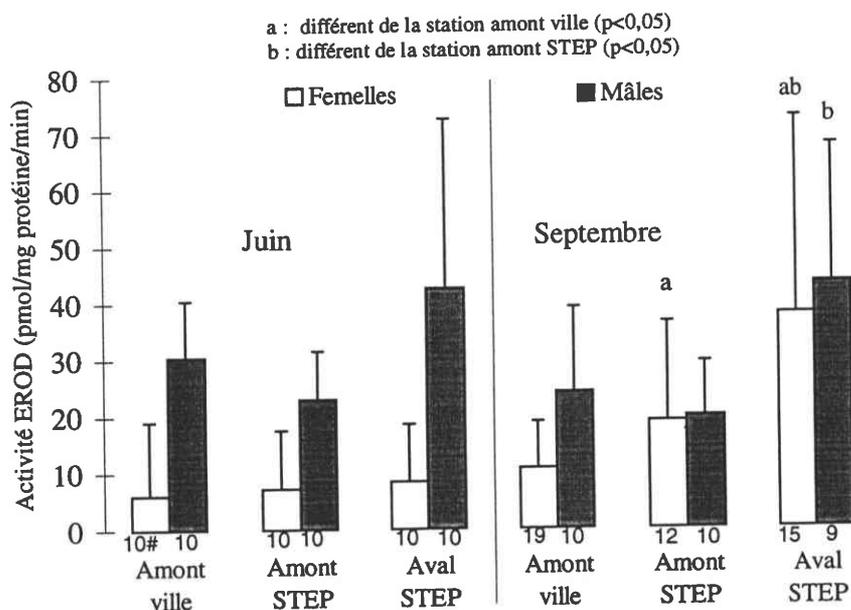


Figure 47 : Activité EROD (moyenne et écart-type) de chevaines pêchés en 95 en amont (C1 et C2c) et aval (C3b) de la STEP. # : Nombre de poissons.

L'activité EROD des chevaines pêchés à l'aval de la STEP est supérieure à celle des chevaines pêchés en amont de la STEP. C'est le cas en septembre où la différence d'activité enzymatique est très nette mais également dans une moindre mesure en juin pour les chevaines mâles (Test Mann-Whitney, $p=0,08$) (Figure 47).

L'activité EROD étant induite par certains micropolluants organiques, nous pouvons suspecter

une exposition aux composés inducteurs plus importante des poissons de l'aval de la STEP que ceux de l'amont. Parmi les micropolluants détectés sur le site, seuls quelques HAP (le benzo(a)pyrène, le fluoranthène et le chrysène) sont reconnus comme des inducteurs de l'activité EROD (Van der Weiden, 1993 ; Richert, 1994 ; Van der Weiden *et al.*, 1994). Cependant, ces composés sont en concentrations plus faibles à l'aval de la STEP qu'à l'amont.

Il se peut que les substances à l'origine de l'induction de l'activité EROD à l'aval de la STEP n'aient pas été analysées.

On peut également supposer des effets inhibiteurs et inducteurs sur l'activité EROD dans un contexte de contamination chimique relativement complexe. En effet, sur le site de Châtillon, sont présents non seulement des HAP mais aussi des métaux connus pour être des inhibiteurs de l'activité EROD (Bucheli & Fent, 1995). L'induction de l'activité EROD à l'aval de la STEP pourrait s'expliquer par une inactivation des métaux inhibiteurs due à leur complexation à la matrice organique contenue dans le rejet.

D'autre part, il est à noter que les différences d'activité EROD entre l'amont et l'aval de la STEP sont relativement faibles. En effet, l'activité EROD mesurée à l'aval de la STEP est deux fois moins importante que celle mesurée sur des chevaines provenant de sites fortement contaminés du Rhône (Flammarion *et al.*, sous presse). De plus, l'activité EROD des chevaines pêchées à l'amont de la STEP est supérieure à celle de chevaines du bassin du Rhône vivants dans des zones dites de référence (Flammarion & Garric, 1997).

De plus, les activités EROD des chevaines femelles sont particulièrement faibles en juin, pendant la période de reproduction. Ce résultat déjà observé par différents auteurs (Förlin & Haux, 1990 ; Flammarion, 1997) confirme le rôle des hormones sexuelles dans l'inhibition de l'activité EROD montré entre autre par Förlin & Hansson (1982a).

Le rapport hépatosomatique ($RHS = 100 * \text{poids du foie/poids total}$) a été mesuré sur les chevaines sacrifiées pour les mesures de l'activité EROD (Figure 48).

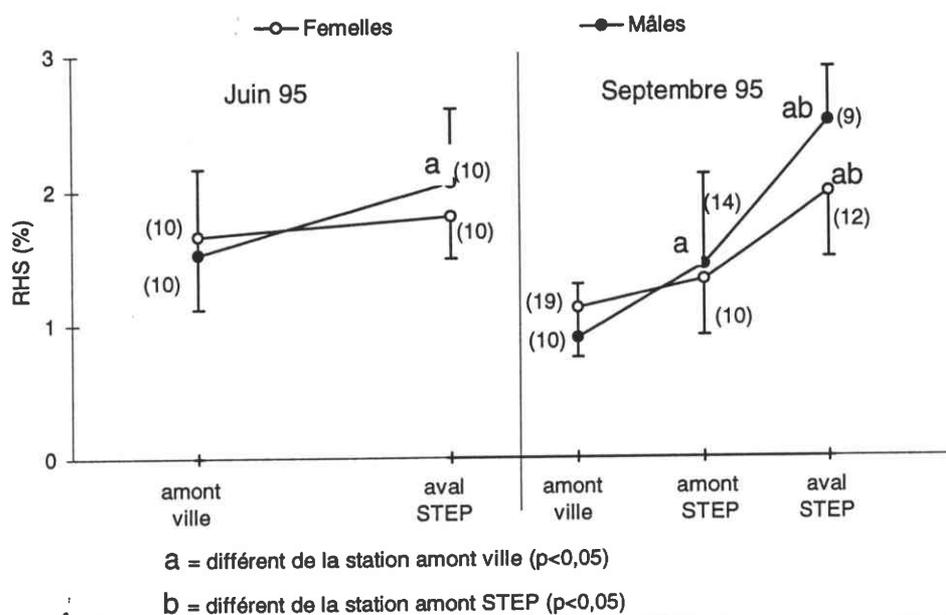


Figure 48 : Rapport hépatosomatique (RHS) (moyenne et écart-type) des chevaines pêchées en amont (C1, C2c) et aval (C3b) de la STEP () : Nombre de poissons.

Pour les deux campagnes, le RHS des chevaines pêchées à l'aval de la STEP est significativement supérieur à celui des chevaines pêchées à l'amont de la ville sauf pour les femelles en juin. En septembre, le RHS des poissons de l'aval de la STEP s'est également montré supérieur à celui des poissons pêchés en amont de la STEP, station supplémentaire étudiée. Certains auteurs (Förlin & Hansson, 1982a ; Grizzle *et al.*, 1988 ; Goede & Barton, 1990) ont déjà noté une augmentation de la taille du foie de poissons exposés à un effluent de STEP.

L'activité EROD et le RHS mesurés sur les chevaines dans notre étude semblent suivre les mêmes variations bien qu'aucune relation n'ait pu être mise en évidence entre ces deux paramètres sur les données individuelles. Selon Sloof *et al.* (1983), l'augmentation du foie des poissons pourrait être associée à la stimulation d'activités enzymatiques hépatiques.

Le rapport hépatosomatique peut rendre compte d'un stress apporté par des micropolluants, le foie étant l'organe majoritairement impliqué dans la détoxification des xénobiotiques. Son utilisation est ainsi intéressante en accompagnement de la mesure de l'activité EROD.

3.2.2 Mesures de l'activité EROD chez des loches prélevés *in situ*

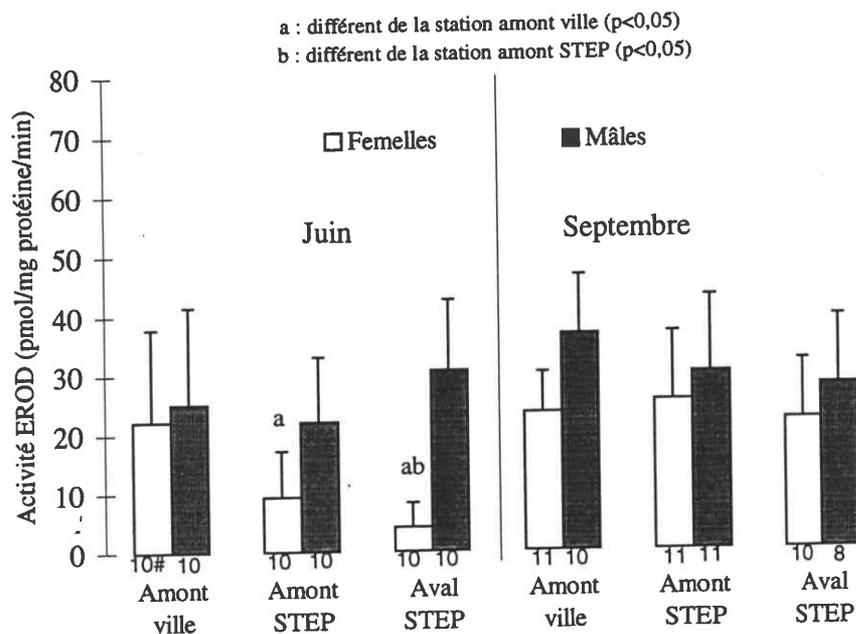


Figure 49 : Activité EROD (moyenne et écart-type) de loches pêchées en 95 en amont (C1 et C2c) et aval (C3b) de la STEP. # : Nombre de poissons.

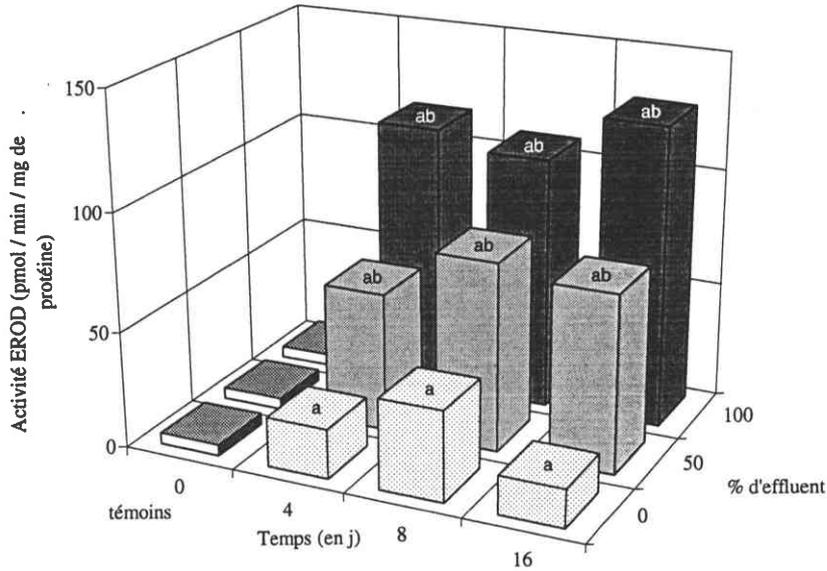
Les résultats de l'activité EROD mesurée sur la loche sont complémentaires de ceux obtenus avec le chevaine. En effet, nous avons noté une décroissance de l'activité EROD des loches femelles pêchées en juin des stations amont vers les stations aval (Figure 49). Comme nous l'avons vu pour les chevaines, les femelles ont une activité EROD inhibée en période de reproduction. De plus, les loches, poissons au contact du sédiment, sont particulièrement exposées aux micropolluants pouvant provenir des rejets de déversoirs d'orage en juin qui a été une période pluvieuse. Dans le contexte de contamination complexe des sédiments observée par l'analyse, nous pouvons soupçonner le rôle de certains métaux qui sont des inhibiteurs de l'activité EROD (Gagné & Blaise, 1993 ; Richert, 1994 ; Bucheli & Fent, 1995).

3.2.3 Mesures de l'activité EROD chez des poissons exposés à l'effluent sur site, dans des bassins de dérivation

Nous avons placé en même temps des truites et des carpes pendant deux semaines dans des bassins installés à proximité de la STEP de Châtillon alimentés par de l'eau de la Chalaronne pompée en amont de la STEP mais à l'aval de la ville, à un mélange fait à 50% d'effluent de la STEP et 50% d'eau de rivière et à l'effluent pur. Nous avons étudié dans le temps l'activité EROD de ces poissons que nous avons complété par des études de bioaccumulation et de

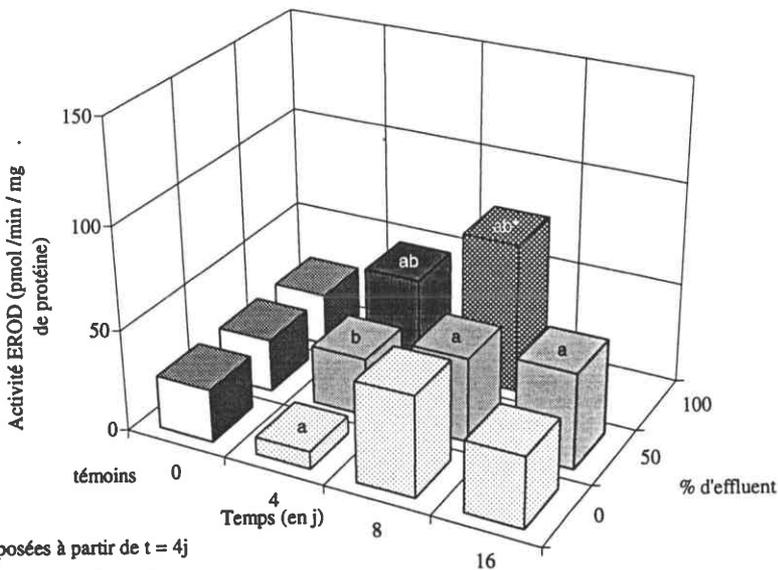
mortalité. Nous avons mené ces expérimentations en juin et en septembre 95, en même temps que les mesures sur les poissons de la rivière.

Les activités EROD des lots de carpes et de truites exposées dans les bassins en juin 95 sont présentées respectivement sur la Figure 50 et la Figure 51. Les activités EROD des poissons exposés dans les bassins en septembre sont présentées en annexe 13.



a = différent des témoins ($p < 0,05$)
 b = différent des poissons exposés à 0% d'effluent ($p < 0,05$)

Figure 50 : Activité EROD (moyenne sur 10 à 22 individus) des carpes exposées dans des bassins placés sur le site de la STEP de Châtillon à l'eau de la Chalaronne et à l'effluent de STEP en juin 1995.



* = truites exposées à partir de t = 4j
 a = différent des témoins ($p < 0,05$)
 b = différent des poissons exposés à 0% d'effluent ($p < 0,05$)

Figure 51 : Activité EROD (moyenne sur 10 à 12 individus) des truites exposées en bassin à l'eau de la Chalaronne et à l'effluent de STEP en juin 1995

Tout d'abord, en comparaison de l'activité EROD des témoins (poissons sacrifiés au début de l'expérience : $t = 0$), nous avons observé une induction de l'activité EROD des poissons (carpes et truites) exposés à l'effluent mais aussi de ceux exposés à l'eau de la rivière, pour certaines durées d'exposition. Une induction de l'activité EROD pour des carpes exposées à de l'eau de rivière a déjà été notée par Melancon *et al.* (1987).

Des composés inducteurs seraient donc présents dans l'effluent et, dans une moindre mesure, dans l'eau de la rivière à l'amont de la STEP. Il est à noter que l'encagement pourrait également entraîner une induction de l'activité EROD. Selon Bucheli & Fent (1995), le poisson encagé souffrirait d'un stress qui peut entraîner la libération de cortisol connu pour agir en synergie avec les agents inducteurs de l'activité EROD (Devaux *et al.*, 1992).

De plus, on note une induction de l'activité EROD chez les carpes exposées à l'effluent par rapport à l'activité EROD des carpes exposées à l'eau de la Chalaronne. L'effet des effluents de STEP sur les activités monooxygénases de poissons avaient déjà été montrés (Förlin & Hansson, 1982b ; Garric *et al.*, 1996). Nous avons obtenu une relation dose-effet entre l'activité EROD des carpes et la concentration de l'effluent.

Pour tenter d'expliquer les inductions d'activité EROD, nous avons recherché les micropolluants dans le muscle des carpes (Tableau 29).

Tableau 29 : Concentrations en micropolluants dans les muscles des carpes exposées à de l'eau de rivière et de l'effluent pendant 16 jours. ND : non détecté.

Campagne	Concentrations en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais	Bac à 0% d'effluent	Bac à 50% d'effluent	Bac à 100% d'effluent
Juin	PCB	<1 ^a	<1	<1
	Lindane	4	<1	4
	Lipides % poids frais	0,8	2,4	0,9
Septembre	PCB	<1	<1	<1
	Lindane	<1	2	2
	Lipides % poids frais	0,8	ND ^b	ND

^a : < seuil de détection en mg/kg de poids frais. ^b : non déterminé.

Seul du lindane a été détecté à la fois dans les poissons exposés à l'effluent et ceux exposés à la rivière. Le lindane est un des composés organiques les plus bioaccumulables. Ses effets sur les activités enzymatiques du poisson sont encore inconnus (Galgani *et al.*, 1991) alors qu'il s'est révélé être un inducteur puissant des enzymes hépatiques chez le rat (Krechniak *et al.*, 1994). L'origine de la contamination en lindane est probablement double : l'agriculture et la STEP, le lindane étant un des rares composés non éliminé par les boues activées (Petrasek *et al.*, 1983).

Ainsi, nous avons observé l'induction de l'activité EROD des carpes exposées à l'effluent sans toutefois détecter les molécules inductrices par l'analyse. Le défaut de substances bioaccumulées détectées par l'analyse chimique dans la chair des poissons peut être expliquée par un temps d'exposition trop court des organismes à l'effluent.

Comparée à celle des poissons exposés à l'eau de la rivière, l'activité EROD des poissons exposés à l'effluent est induite dès 4 jours d'exposition. Cette induction dure tout au long de l'expérimentation.

Nous pouvons avancer deux hypothèses pour expliquer cette constance dans l'induction de l'activité EROD. D'une part, il est reconnu que l'induction de l'activité EROD persiste après un rejet ponctuel de composés inducteurs (Haasch *et al.*, 1993 ; Kloepper-Sams & Benton, 1994) mais cette induction est tout de même réversible (Melancon *et al.*, 1987). D'autre part, on peut suspecter la présence constante de composés inducteurs dans l'effluent. En effet, nous avons observé l'effet inducteur de l'effluent pour des truites exposées successivement au rejet en juin et pour les carpes exposées en juin et en septembre.

Pour les truites, nous n'avons pas décelé de différence entre l'activité EROD des poissons exposés à l'effluent et ceux exposés à l'eau de la Chalaronne (sauf en juin pour une concentration de 100% d'effluent). Il faut noter que nous avons observé une importante mortalité pour la truite exposée à 100% d'effluent notamment à cause de l'effet conjoint de l'ammoniac, de la température et de l'oxygène dissous. La mortalité des truites exposées à l'effluent pur a été importante et rapide mais variable dans le temps et fonction des variations de la qualité de l'effluent.

Dans le bassin alimenté par de l'eau de rivière, la température et l'oxygène dissous ont respectivement varié entre 14-16°C et 7,3-8,6 mg d'O₂/l en juin et entre 12-18°C et 5,6-9 mg d'O₂/l en septembre. Dans le bassin alimenté par de l'effluent pur, la température et l'oxygène dissous ont respectivement varié entre 14-17,5°C et 2,9-7,3 mg d'O₂/l en juin et entre 16,5-20°C et 2,4-7 mg d'O₂/l en septembre.

En juin, la concentration en ammoniac dans le bac à 100% d'effluent explique à elle seule la mortalité des truites puisqu'elle a atteint des concentrations létales pour cet animal (Emerson *et al.*, 1975 ; Arthur *et al.*, 1987 ; Kosmala *et al.*, 1996a). Pour un effluent de STEP dilué ayant des concentrations en ammoniac de 0,05 mg/l, les effets des effluents sur la truite ne sont plus d'ordre léthal mais plutôt d'ordre subléthal avec l'apparition de dommages sur les branchies (Carline *et al.*, 1987).

Ainsi, dans notre travail, on peut penser que les truites ont une activité EROD faible parce qu'elles sont en état de stress trop important. La truite est donc un organisme moins adapté que la carpe à la mesure d'activité EROD dans ces conditions d'expérimentation. Cependant, nous avons observé des variations plus importantes d'inductibilité de l'activité EROD entre les lots de carpes qu'entre les lots de truites, l'élevage de la carpe étant moins standardisé que celui de la truite. En effet, grâce aux témoins positifs injectés à la β -naphthoflavone, nous avons décelé entre juin et septembre une différence d'inductibilité de l'activité EROD des carpes, ces dernières étant plus âgées en septembre qu'en juin puisque les carpes de juin et de septembre proviennent de la même ponte. Cette différence d'inductibilité n'a pas été observée pour les truites qui sont de même taille en juin et en septembre et proviennent de pontes différentes. Ainsi, l'âge et de nombreux autres facteurs (dont le sexe, l'espèce...) influencent les activités enzymatiques (Goksøyr & Förlin, 1992).

Grâce aux mesures de l'activité EROD sur des poissons du milieu et des poissons exposés artificiellement à l'effluent, nous avons pu relier l'observation de l'induction de l'activité enzymatique de certains poissons pêchés entre l'amont et l'aval de la STEP et la mise en évidence du potentiel inducteur de l'effluent à l'aide de poissons exposés à l'effluent.

Il est à noter que l'induction de l'activité EROD par l'effluent a été plus facile à montrer sur les poissons juvéniles exposés dans les bassins que sur les poissons de la rivière pêchés en amont et en aval de la STEP.

4. Synthèse et discussion

Nous résumons ici les principales mesures de l'impact de l'effluent de la STEP de Châtillon et discutons des variations de cet impact en fonction du temps.

4.1 Evaluation de l'impact de l'effluent de la STEP de Châtillon

Les résultats obtenus sur l'évaluation de l'impact de l'effluent de la STEP de Châtillon par les différentes méthodes utilisées sont résumés dans le Tableau 30. Nous avons regroupé les résultats en fonction des approches chimique, biologique *in situ* et biologiques en conditions contrôlées. Comme pour les résultats sur les trois sites (chapitre 3), ce regroupement nous permettra de proposer une interprétation de l'impact selon la Triade de Chapman (1986).

Grâce à l'approche physico-chimique, nous avons observé des variations de concentration d'effluent dans la rivière. Nous avons détecté un effet de la STEP sur le milieu récepteur (eau et sédiments de la rivière) par une légère augmentation des matières azotée et phosphorée. Nous avons remarqué la présence de métaux, de PCB, d'HAP, de produits phytosanitaires dans les sédiments et les poissons aux environs de la STEP mais les différences entre l'amont et l'aval de la STEP sont faibles. Seul le phénol, le cuivre et le mercure semblent être amenés par le rejet de la STEP.

Grâce à l'approche biologique *in situ*, nous avons détecté des effets de la STEP sur les invertébrés et les poissons.

Nous avons noté une baisse de l'indice biologique global (IBG) à l'aval de la STEP accompagnée de modifications structurelles observées au niveau de l'espèce. Nous avons également constaté une modification au niveau de la communauté d'hydropsyques, certaines espèces étant plus sensibles que d'autres aux perturbations entraînées par la STEP. Nous avons observé des différences morphologiques d'*Hydropsyche angustipennis* entre l'amont et l'aval de la STEP, une raréfaction de ses stades jeunes ainsi qu'une modification de son développement.

Sur le peuplement piscicole, nous avons mis en évidence une raréfaction des espèces sensibles à la dégradation entre l'amont et l'aval de la STEP. Nous avons détecté une augmentation du

facteur de condition sur le goujon et le chevaine. De plus, en comparant l'activité EROD et le rapport hépatosomatique de poissons pêchés entre l'amont et l'aval de la STEP, nous avons observé une induction de l'activité EROD de chevaines pêchés à l'aval de la STEP accompagnée d'une augmentation de leur rapport hépatosomatique.

Grâce à l'approche biologique en conditions contrôlées, nous avons montré l'induction de l'activité EROD de poissons par l'effluent. La toxicité de l'effluent a été prouvée par la mortalité de truites et par la diminution de la croissance et de la reproduction de *C. dubia*, deux organismes exposés à l'effluent.

Tableau 30 : Résumé des effets mesurés de l'effluent de la STEP de Châtillon-sur-Chalaronne

Approche	Echantillon utilisé	Paramètre mesuré	Effet	Fréquence	Saison d'effet le plus marqué
Chimique <i>in situ</i>	Eau	C, N, P [#]	±	mensuelle	été
	Sédiments	C, N, P	+ / -	2	
		Métaux	-	1	
		Micropolluants	-	1	
Poissons	Micropolluants	+	1		
3/5 = 60%^a					
Biologique <i>in situ</i>	Invertébré	Hydropsyche	+	mensuelle	été
		IBG	+	mensuelle	été
		Taxon, densité, AFC	+	mensuelle	été
	Hydropsyche	Distribution	+	1	
	Hydropsyche	Morphométrie	±	mensuelle	été
	Poisson	Structure	-	2	
	Chevaine	Effectif	-	2	
		Distribution	+	2	
		EROD	+ / -	2	
	Chevaine	RHS	+	2	
		FC	+ / -	2	
		EROD	+ / -	2	
	Loche	FC	+ / -	2	
FC		+ / -	2		
Goujon	FC	+ / -	2		
12/16 = 75%					
Biologique en conditions contrôlées	Effluent (+ eau de rivière)	Reproduction de cériodaphnie	+	mensuelle	été
		Mortalité de truite	+	2	
		EROD sur truite	-	2	
		EROD sur carpe	+	2	
		Micropolluant sur carpe	-	2	
3/5 = 60%					

[#] concentrations en carbone (COT, COD), azote (Ntot, NH₄⁺) et phosphore (Ptot, PO₄³⁻)

+ : effet significatif observé ; - : pas d'effet significatif observé ; + / - : effet significatif observé une fois sur 2 ; ± : effet observé certains mois ou pour certains paramètres. ^a : proportion et pourcentage de méthodes ayant donné un résultat significatif.

Grâce aux études mensuelles sur la Chalaronne, nous avons pu déceler des variations telles que :

- la concentration élevée en nitrates en juin dans l'eau de la rivière
- la diminution de la qualité biologique de la rivière en amont de la STEP en été, suivie d'une amélioration globale dans le temps.

• *Distinction de l'impact de l'effluent de STEP des autres perturbations*

A l'amont de la STEP, entre l'amont et l'aval de la ville, nous avons constaté des différences importantes dans :

- la concentration de micropolluants, celle-ci étant maximale à l'aval de la ville,
- l'activité EROD.

Ce sont à la fois les natures spécifiques des polluants incriminés (nitrates) et la période de l'année (augmentation de nitrates en juin suivie d'une diminution de la qualité biologique) qui nous ont permis de soupçonner l'influence de l'agriculture.

Nous pouvons caractériser cet impact le long du cours d'eau à l'aval de la STEP. Ainsi, entre deux stations à l'aval de la STEP, nous avons noté des variations de la qualité chimique et biologique (IBG) au niveau du sédiment. Il semblerait que l'impact soit plus important à une distance de 1 à 2 km du rejet qu'à l'aval immédiat (quelques mètres). Par contre, à un aval plus lointain (>3 km), nous avons remarqué une amélioration de la qualité du cours d'eau due à l'auto-épuration. Cette récupération au fil de l'eau dépend de la capacité du milieu à assimiler la pollution apportée par la STEP.

• *Identification des agents polluants apportés par l'effluent de STEP*

L'IBG calculé à partir des invertébrés et la morphologie étudiée sur une espèce d'invertébrés nous ont permis de soupçonner le rôle de la matière organique dans l'impact d'un rejet de STEP.

L'ammoniac, qui est un produit provenant de la dégradation de la matière organique, s'est révélé parfois en concentration suffisamment importante pour expliquer à lui seul la mortalité des truites exposées à l'effluent dans des bassins de dérivation (Davis, 1975 ; Arthur *et al.*, 1987). La toxicité de l'ammoniac peut être renforcée par un taux d'oxygène faible ou par la toxicité d'autres constituants de l'effluent (Nimmo *et al.*, 1989 ; Magaud *et al.*, 1997).

Aucune relation ne peut être clairement établie entre les polluants conventionnels analysés et les effets toxiques mesurés sur la cériodaphnie sauf pour l'ammoniac (Schroder *et al.*, 1991). Ainsi, dans notre étude mensuelle sur la Chalaronne, la toxicité observée en juillet sur la cériodaphnie peut être liée à une concentration en ammoniac dans l'effluent, connue comme étant toxique pour la daphnie (Emerson, 1975 ; Garric, 1987).

Parce que nous avons détecté des micropolluants à proximité de la STEP (en aval mais aussi en amont), il a été difficile de connaître l'apport dû au rejet de la STEP, sauf pour des produits spécifiques d'une usine raccordée à la STEP ainsi que pour le cuivre et le zinc. Nous avons cependant suspecté la présence de micropolluants dans l'effluent ou dans le milieu récepteur à l'aval de la STEP grâce à, dans l'ordre décroissant de l'évidence de la relation de cause à effet :

- l'induction (et l'inhibition) de l'activité d'une enzyme de détoxification (activité EROD) des poissons exposés à l'effluent,
- la toxicité mesurée sur la cériodaphnie, organisme le moins sensible à l'ammoniac de tous les organismes testés. Quelques auteurs (Birge *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 1992; Craig *et al.*, 1991; Garric *et al.*, 1996) ont confirmé que les composés organiques ou les métaux présents en faible concentration dans les eaux usées pouvaient être identifiés comme d'autres causes de toxicité sur des organismes d'essai exposés à de l'effluent que l'ammoniac,
- la diminution des effectifs d'espèces vivant dans des milieux riches en matières organiques à l'aval de la STEP.

4.2 Variations de l'impact de l'effluent de la STEP de Châtillon dans le temps

Les mesures effectuées dans le temps nous ont permis d'observer des variations saisonnières de l'impact du rejet de la STEP. Ainsi, grâce aux mesures mensuelles, nous avons enregistré une variation des paramètres analytiques plus importantes à l'aval de la STEP qu'à l'amont alors que c'est l'inverse pour la faune d'invertébrés.

L'impact de l'effluent de STEP s'est révélé plus important en été quelle que soit l'approche employée (physico-chimique, biologique *in situ* ou en conditions contrôlées). En effet, c'est en été que nous avons observé, entre les deux stations encadrant le rejet, une différence maximale dans la composition des communautés d'invertébrés, des différences morphologiques entre les individus d'une même espèce d'invertébrés et des concentrations en ammoniac et en phosphates plus importantes.

A cette même période, l'effluent testé à la CER s'est révélé toxique pour la cériodaphnie, la CER étant maximum. C'est également en été que l'effluent testé pur s'est montré le plus toxique vis-à-vis de la cériodaphnie et le plus chargé en ammoniac et phosphates.

Hors période d'été, la pluie, entraînant de forts débits de la rivière et de l'effluent qui est alors moins concentré, peut diminuer les effets du rejet de la STEP sur le plan biocénétique et physico-chimique, la concentration de l'effluent étant très faible et le sédiment étant parfois emporté (Moon *et al.*, 1994; Monda *et al.*, 1995a).

Des éléments d'explication de la variabilité de l'impact de la STEP dans le temps peuvent être apportés par l'analyse de la variabilité temporelle à la fois de la qualité physico-chimique du milieu récepteur, des cycles biologiques des espèces étudiées et de la toxicité de l'effluent pur testé au laboratoire.

Les mesures physico-chimiques mensuelles sur l'eau de la rivière ont permis de noter des variations saisonnières notamment de la température, de la conductivité et des concentrations

en oxygène dissous et en matières en suspension. Ces variations ont été quantitativement plus importantes que les différences enregistrées entre l'amont et l'aval de la STEP.

L'abondance des invertébrés de la rivière connaissent des variations en fonction des rythmes saisonniers. Ainsi, les éclosions des hydropsyches en été ont entraîné une augmentation de la population. De plus, les notes d'IBG reflétant la structure de la biocénose sont meilleures en hiver qu'en été. En été, la disparition des mollusques, due aux très faibles débits qui entraînent un assèchement des zones calmes de bordure constituant leur habitat a entraîné la diminution de la richesse taxonomique. En automne, l'« homogénéisation » et l'appauvrissement de la faune d'invertébrés prélevées sur les deux stations peuvent être la conséquence d'une augmentation des débits de la rivière.

De plus, la qualité des rejets de STEP ainsi que leur concentration dans la rivière (CER) peuvent être des éléments d'explication des variations d'impact dans le temps.

Il faut cependant noter que, malgré les variations saisonnières, nous avons détecté pendant toute l'année une toxicité de l'effluent pur testé sur *C. dubia* et une différence de qualité biologique à travers l'IBG entre les stations en amont et en aval de la STEP.

Chapitre 5. Discussion générale et conclusion

Afin de décrire les effets des rejets de STEP sur les cours d'eau, nous avons utilisé un grand nombre de méthodes appartenant aux approches physico-chimiques, biologiques *in situ* et en conditions contrôlées. La multiplication des méthodes était pour nous un gage d'objectivité et de sensibilité dans la description de l'impact.

Dans ce chapitre, nous comparons les méthodes utilisées et nous proposons une interprétation de notre démarche intégrée selon la Triade de Chapman (1986). Nous en dégagerons une approche opérationnelle de détection de l'impact d'un effluent de STEP sur le milieu et présenterons des améliorations possibles pour une évaluation plus pertinente de cet impact.

1. Apport respectif des différentes méthodes mises en œuvre dans le cadre de notre approche intégrée

1.1 Comparaison des différentes méthodes

Nous avons comparé les différentes méthodes utilisées dans le cadre de l'évaluation de l'impact d'un effluent de STEP selon leur capacité de discrimination de l'impact et selon des critères scientifiques et économiques.

1.1.1 Comparaison des méthodes selon des critères d'ordre scientifique

Les méthodes utilisées dans le cadre de notre travail de thèse ont d'abord été classées selon leur aptitude à détecter l'impact de l'effluent. Il s'est avéré que les mesures sur les invertébrés ont permis de mieux discriminer l'impact de la STEP que les mesures biologiques sur poissons ou les analyses chimiques.

De plus, nous avons classé les méthodes selon leur pertinence écologique et leur aptitude à identifier l'agent responsable de la perturbation (Figure 52). Cette classification s'inspire du modèle conceptuel d'Adams (1990). Une méthode est écologiquement d'autant plus pertinente qu'elle rend compte d'une perturbation à un niveau élevé de l'organisation de l'écosystème. Il est apparu que les méthodes à forte pertinence écologique avaient une faible capacité à identifier l'agent polluant responsable et réciproquement.

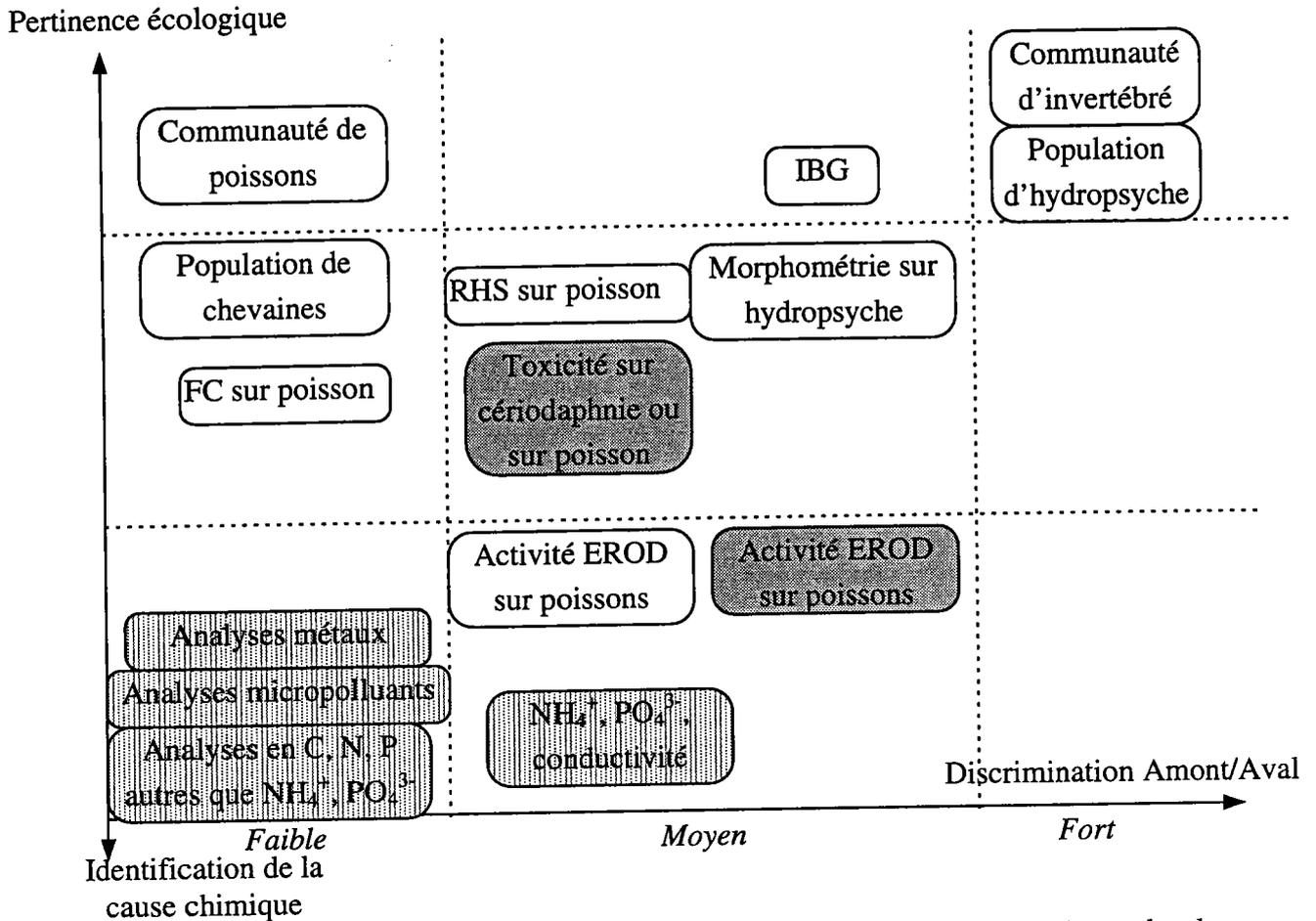


Figure 52 : Comparaison des différentes méthodes utilisées sur les différents sites selon leur capacité à distinguer l'amont de l'aval de la STEP, leur pertinence écologique et leur capacité à identifier des types de polluants responsables.

C, N, P : Carbone, azote et phosphore. Cadre rayé : analyses chimiques in situ, Cadre grisé : mesures biologiques en conditions contrôlées, Cadre normal : mesures biologiques in situ.

Il est à noter que les analyses de métaux et de micropolluants organiques présentées dans les figures sont des analyses sur un compartiment intégrateur du milieu (soit les sédiments ou les organismes) contrairement aux analyses en carbone, azote et phosphore qui sont effectuées sur l'eau.

1.1.2 Comparaison des différentes méthodes selon des critères d'ordre économique

D'après la Figure 53, les méthodes de détection de l'impact de l'effluent les plus discriminantes et les plus aisées à mettre en œuvre sont :

- la mesure de l'IBG,
- le test de toxicité sur la cériodaphnie,
- les mesures de concentration en ammonium et phosphate et les mesures de conductivité.

Simplicité d'utilisation

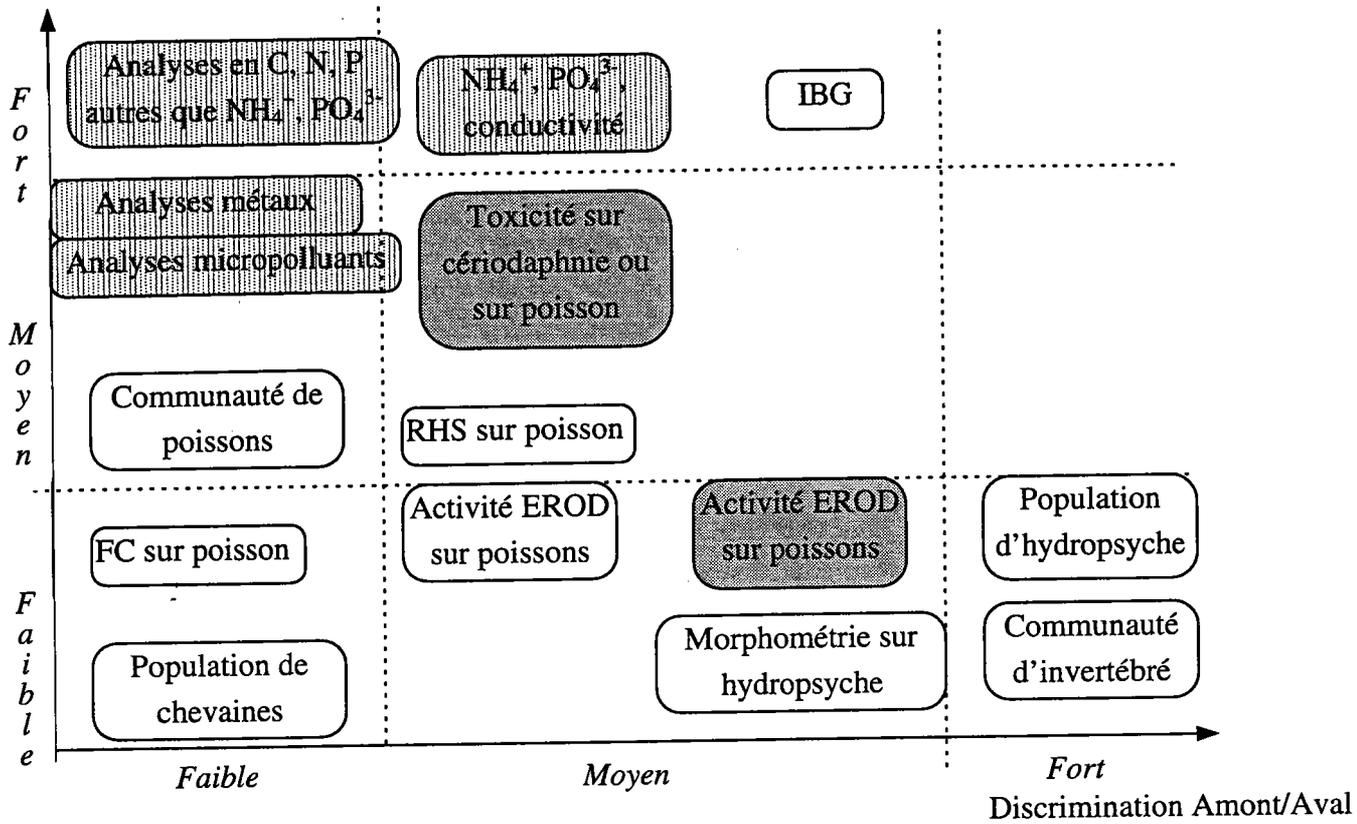


Figure 53 : Comparaison des différentes méthodes utilisées sur les différents sites selon leur capacité à distinguer l'amont de l'aval de la STEP et leur simplicité d'utilisation.
 C, N, P : Carbone, azote et phosphore. Cadre rayé : analyses chimiques *in situ*, Cadre grisé : mesures biologiques en conditions contrôlées, Cadre normal : mesures biologiques *in situ*.

1.2 Interprétation de notre approche intégrée selon la Triade

Nous avons utilisé une approche intégrée prenant en compte à la fois des mesures physico-chimiques, des mesures biologiques *in situ* et en conditions contrôlées comme Chapman (1986) dans son analyse triadique.

Cependant, contrairement à Chapman (1986) qui n'étudie qu'un point de la rivière, nous avons utilisé une double approche milieu-effluent (Tableau 32). De plus, nous avons étudié le milieu par comparaison entre l'amont et l'aval du rejet de la STEP, ce qui nous affranchit de la nécessité d'une référence pour conclure si le milieu est perturbé contrairement à des mesures effectuées en un seul point. Dans ce dernier cas, il est important d'utiliser des méthodes qui ont un référentiel et permettent d'interpréter le résultat comme l'IBG, par exemple.

Tableau 31 : Comparaison de l'approche intégrée utilisée dans notre étude avec l'approche triadique de Chapman.

Approche	Approche intégrée de notre étude		Triade Chapman
	Effluent	Milieu	Milieu
Physico-chimique	×	×	×
Biologique <i>in situ</i>		×	×
Biologique en conditions contrôlées	×	×	×

Notre approche intégrée et celle de Chapman s'inscrivant dans un même cadre conceptuel, nous avons pu tenter une traduction de nos résultats selon la grille d'interprétation de Chapman (1990) pour les trois sites (Tableau 32).

Tableau 32 : Triade de Chapman (1986) appliquée aux trois rivières (Reyssouze, Chalaronne et Vizezy) entre l'amont et l'aval des STEP.

Approche	Approche intégrée simplifiée 1994			Approche intégrée 1995
	Reyssouze	Vizezy	Chalaronne	Chalaronne
Physico-chimie	+ (100% ^a)	+ (70%)	- (30%)	+ (60%)
Biologique <i>in situ</i>	- (40%)	+ (60%)	+ (60%)	+ (75%)
Biologique en conditions contrôlées	+ (75%)	- (50%)	- (25%)	+ (60%)

+ : effet significatif. - : effet non significatif. ^a: % de réponses significatives sur l'ensemble des méthodes utilisées (voir tableaux §4.1 des chapitres 3 et 4).

Selon cette grille d'interprétation détaillée dans le chapitre 1 (§ 1.2.4), la situation à l'aval de la STEP de Bourg-en-Bresse est comparable à la situation 6 où il y aurait des éléments toxiques stressant le système. La situation à l'aval de la STEP de Montbrison est comparable à la situation 8 où il y aurait des éléments toxiques non biodisponibles ou une altération qui ne serait pas due aux éléments toxiques.

La situation de pollution de la Chalaronne à l'aval de la STEP décrite en 1994 est comparable à la situation 5 où l'altération ne serait pas due à des contaminants toxiques. En 1995, la situation à l'aval de la STEP de Châtillon est comparable à la situation 1 décrite comme le cas d'une pollution évidente induite par les contaminants. La différence de situation notée pour la même rivière à un an de différence est due au nombre de méthodes utilisées : alors qu'une seule méthode par approche a été considérée pour les résultats du chapitre 4, de nombreuses méthodes pour chaque approche ont été utilisées dans le chapitre 3. Il faut cependant remarquer que les pourcentages de réponses significatives sur l'ensemble des méthodes utilisées, notés dans le Tableau 32, dégagent la même tendance entre les résultats obtenus sur la Chalaronne pour les chapitres 3 et 4.

La grille d'interprétation de Chapman permet de synthétiser les différentes situations rencontrées dans notre travail. Ainsi, il apparaît que la pollution à l'aval de la STEP de Châtillon est une pollution de type mixte (à la fois organique et toxique) alors que la pollution à l'aval de la STEP de Bourg-en-Bresse est une pollution plutôt à caractère toxique. La perturbation notée à l'aval de la STEP de Montbrison rend compte de la modification physique (changement de la pente) du cours d'eau.

2. Perspectives

Pour répondre à la demande des gestionnaires, nous proposons des méthodologies simplifiées d'évaluation de l'impact d'un effluent de STEP. De plus, nous présentons des évolutions possibles de l'approche intégrée ainsi que des axes de recherche.

2.1 Proposition de méthodologies de mesure de l'effet des effluents de STEP

Nous avons montré que le couplage de mesures chimiques et biologiques permettait de rechercher la cause chimique de la perturbation biologique alors que l'utilisation conjointe des mesures *in situ* et en conditions contrôlées augmentait les chances de détection d'effets de l'effluent de STEP.

Or, avec la loi sur l'eau du 3 juin 1992 qui impose le respect des milieux aquatiques et de leur fonctionnement, des méthodologies d'étude d'impact incluant des mesures sur la faune aquatique sont à proposer. D'autre part, l'effluent étant un mélange complexe, identifier l'agent responsable de la toxicité est nécessaire pour proposer des solutions de traitement adaptées.

Aussi, nous proposons ici une démarche simple pour mesurer l'impact d'un rejet de STEP sur le milieu récepteur ainsi qu'une méthodologie pour déceler les catégories de polluants amené par l'effluent de STEP.

- **Mesure de l'impact d'un effluent de STEP**

Selon différents auteurs (Heber *et al.*, 1996 ; Jonhson, 1996), une approche intégrée utilisant des mesures physico-chimiques, biologiques *in situ* et en conditions contrôlées est à préconiser sachant qu'aucune des mesures utilisées seules n'apporte d'informations suffisantes pour permettre de prendre en compte des mesures de gestion du milieu.

Dans le but de présenter une approche intégrée opérationnelle de mesure de l'effet d'un effluent de STEP sur le milieu récepteur, nous avons volontairement proposé des mesures simples dégagées dans le §1.1 (Tableau 33).

Tableau 33 : Méthodologie de mesure de l'impact d'un effluent de STEP sur le milieu récepteur.

Mesure physico-chimique	Mesure biocénotique	Mesure toxicologique
Concentration en NH_4^+ dans le milieu Comparaison avec les données de toxicité	Indice Biologique Global Comparaison entre l'amont et l'aval de la STEP	Bioessai 7j. sur Cériodaphnie Effluent testé à 90%

Conscients qu'une étude d'impact ne doit pas se réduire à une simple étude de l'effluent, nous proposons d'utiliser l'indice biologique global comme mesure biologique *in situ*. L'IBG étant une méthode relativement simple, son utilisation peut être répétée dans le temps ou dans l'espace. Les mesures d'IBG sont à effectuer l'été. L'étude de l'IBG doit toujours se faire par comparaison entre deux stations encadrant le rejet. Il est important de mesurer l'impact global lié au réseau d'assainissement et de ne pas écarter l'impact des rejets des déversoirs d'orage placés en amont de la STEP. Pour cela, les stations d'étude à privilégier pour la mesure de l'impact sont une station à l'amont de la ville et une station à l'aval de la STEP. Pour faire la part entre l'impact lié aux rejets des déversoirs d'orage et celui dû à l'effluent de STEP, il suffit d'intercaler une station en amont de la STEP.

D'autre part, pour mieux étudier le danger que représente l'effluent de STEP, un test de toxicité à long terme est également recommandé. L'effluent est considéré comme toxique si une diminution de la reproduction de la cériodaphnie est observée après 7 jours d'exposition des organismes à 90% d'effluent. Contrairement à l'IBG, le test à long terme sur cériodaphnie n'est pas normalisé. Une utilisation en routine de notre approche nécessiterait la normalisation de ce bioessai. Conscients du caractère peu toxique des effluents de STEP, Sweet *et al.* (1997) proposent un test de toxicité de 22h sur la bactérie du Microtox (*Vibrio fisheri*).

De plus, il nous a semblé important de proposer l'ammonium comme paramètre de suivi des rejets de STEP. L'ammonium est un produit de dégradation de la matière organique, principal composant des effluents et il est reconnu depuis longtemps que sa forme non ionisée explique pour une bonne part la toxicité des effluent de STEP (EIFAC, 1973). Sa mesure est normalisée et il existe actuellement une grille de qualité des agences de l'eau reposant sur ce paramètre. Les mesures de concentration en ammonium sont à faire pendant l'été, période critique d'impact.

Notre méthodologie regroupant les trois mesures décrites ci-dessus est une approche intégrée permettant une interprétation de l'impact d'un effluent de STEP selon la Triade de Chapman. Dans les années à venir, il semble certain que ce type d'approche alliant des mesures physico-chimiques, biologiques *in situ* et en conditions contrôlées sera davantage utilisé par les gestionnaires afin de contrôler les rejets dans le milieu aquatique. Des expériences aux Etats-

Unis ont montré que, si elle est appliquée sur un bassin versant, une telle approche permet de contrôler les rejets existants et de détecter les améliorations de l'environnement (Chapman, 1995). Ainsi, selon Jonhson (1996), la nécessité de considérer la meilleure option environnementale pour le rejet des déchets entraîne l'intérêt de généraliser l'approche intégrée à tous les compartiments environnementaux que sont l'eau mais aussi l'air et le sol.

- *Identification des agents responsables des perturbations biologiques dues aux effluents de STEP*

La différenciation entre les familles de contaminants contenues dans l'effluent peut se faire à l'aide d'un profil de réponses toxicologiques de différents organismes ayant une réponse spécifique à une catégorie de polluants. Dans ce but, nous proposons une méthodologie reposant sur des mesures biologiques en conditions contrôlées combinant des réponses physiologiques et biochimiques d'organismes exposés à l'effluent (Figure 54).

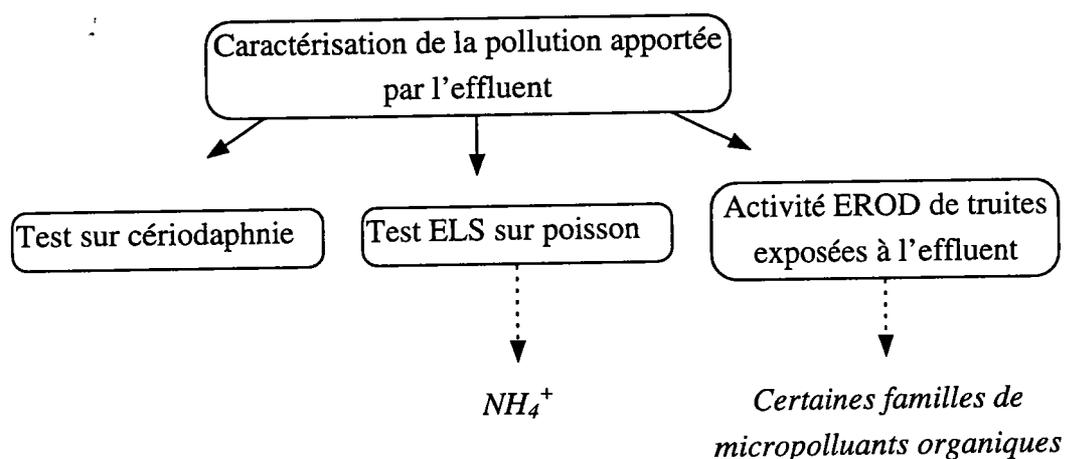


Figure 54 : Proposition de méthodologie de recherche des catégories de polluants apportés par l'effluent de STEP à l'aide d'effets biologiques.

L'utilisation conjointe de ces trois bioessais nous renseigne sur la nature des contaminants contenus dans l'effluent. Le test à long terme sur la céridaphnie est un test sensible utilisé pour caractériser la toxicité globale de l'effluent. La présence d'ammoniac en concentration toxique dans l'effluent est alors détectée par le test à long terme sur embryon de poisson tandis que l'existence de micropolluants organiques inducteurs de l'activité EROD est décelé par la mesure de cette activité sur des poissons exposés à l'effluent.

La même recherche d'identification de familles de contaminants est à étudier sur les organismes du milieu récepteur.

Au niveau de l'individu, on a vu que l'étude de la morphologie des hydropsyches révélait la présence de matière organique. D'autre part, la mesure de difformités apparues chez les chironomes témoignerait de la présence de micropolluants (Bird *et al.*, 1995).

Au niveau de la communauté, cette recherche s'apparente plus à des études d'épidémiologie.

L'IBG est reconnu comme étant un indicateur de la présence de matière organique. De plus, l'étude bibliographique nous indique que la disparition de certaines espèces d'invertébrés permettait de soupçonner l'influence d'une pollution plutôt organique, ou plutôt toxique. La traduction de liste faunistique en profil de traits biologiques s'appuyant sur la connaissance biologique des taxons étudiés est en cours d'étude (Statzner *et al.*, 1994). Il serait alors question de traduire l'abondance et la diversité des taxons en profil physico-chimique permettant alors à partir de la liste faunistique de remonter à la cause de la perturbation. Une telle méthodologie s'appuyant sur des mesures de la biocénose en place est encore du domaine de la recherche.

2.2 Solutions pour limiter l'impact des effluents de STEP

Proposer des méthodologies pour diagnostiquer l'impact est nécessaire mais pas suffisant pour les gestionnaires qui sont demandeurs de solutions permettant de réduire l'impact des rejets de STEP.

D'après notre travail, les rejets de déversoirs d'orage ont un effet sur la rivière non négligeable comparativement à l'impact des rejets de STEP. Ils sont la source d'une contamination en métaux et en micropolluants organiques en amont de la STEP, ce qui a pour effet de masquer la contribution des rejets de STEP. Mieux connaître et maîtriser l'impact des rejets de déversoirs d'orage est donc indispensable.

Des variations saisonnières de l'impact de l'effluent sur le milieu ainsi que des variations de la qualité de l'effluent ont été observées. La prise en compte des variations de qualité de traitement dans le cas des STEP doit être effectuée grâce à un contrôle régulier des STEP, prescrit dans l'arrêté de mars 93 du Ministère de l'Environnement. Le contrôle du traitement dans les STEP passe par une meilleure gestion des by-pass de STEP.

La législation sur les rejets de STEP ne prend pas en compte les problèmes liés aux toxiques qui sont pourtant présents dans ces rejets. La solution pour maîtriser les rejets de toxiques dans le milieu via les effluents de sortie est de limiter au maximum les quantités de ces composés dans les effluents d'entrée de STEP en traitant spécifiquement les effluents à la sortie des industries (arrêté de mars 93) et en réduisant le ruissellement des eaux de pluie sur les surfaces imperméabilisées contaminées.

Il est important de rappeler que la majeure partie des micropolluants (environ 90%) est piégée dans les boues de STEP. Ainsi, le passage des effluents en STEP est à préconiser pour éliminer le maximum de ces micropolluants.

2.3 Amélioration des différentes approches utilisées

Dans ce paragraphe, d'autres mesures biologiques de détection d'impact d'un effluent de STEP sont proposées. De plus, nous discutons des améliorations à apporter à notre approche intégrée. Ces améliorations entraînent des remises en question des mesures biologiques *in situ* et en conditions contrôlées utilisées.

2.3.1 Autres mesures à envisager pour l'évaluation de l'impact des effluents de STEP

Dans notre travail, nous avons utilisé différentes mesures biologiques (biocénotique, physiologique, biochimique, ...) sur les invertébrés et les poissons. C'est parce que ces organismes sont sensibles à l'ammoniac que nous avons proposé le contrôle de ce contaminant dans l'eau.

L'impact des phosphates également présents dans les effluents de STEP est à étudier (Billen *et al.*, 1993). Cet impact peut être évalué sur les algues, organismes sensibles à ce contaminant (Garnier *et al.*, 1993).

D'autre part, les effluents de STEP rejettent des bactéries, de la matière organique et des nutriments. L'effet de ces divers constituants sur les microorganismes de la rivière est à évaluer (Delsart *et al.*, 1996).

De plus, il serait important d'élargir les méthodes utilisées à des mesures de génotoxicité (Devaux *et al.*, sous presse ; White *et al.*, 1998a et b) et d'effet oestrogénisant sachant que les effluents contiennent des micropolluants connus pour provoquer des altérations de l'ADN (cas de certains HAP) et des perturbations du fonctionnement hormonal (cas des NPEO). Ces perturbations ont des conséquences importantes puisqu'elles peuvent porter atteinte à la survie ou à la reproduction des organismes. Leur mesure peut s'effectuer sur des poissons prélevés *in situ* ou exposés à l'effluent en conditions contrôlées.

2.3.2 Evolution de l'approche biologique *in situ*

La détection de l'effet de la STEP se fait par comparaison entre un site en amont et un site en aval de la STEP. Selon Hicks *et al.* (1991), comparer le secteur influencé par la modification avec un secteur de référence comparable nous amène à supposer que la référence et le secteur influencé étaient comparables avant la modification.

Dans notre travail, la prise en compte d'un tronçon de rivière permet de nous garantir une certaine constance dans les conditions physiques de la rivière. Par contre, comparer différents secteurs de cours d'eau doit obligatoirement être fait en prenant en compte le gradient de ressources alimentaires (Amoros & Petts, 1993) qui conditionne la distribution des organismes. Ainsi, la structure des communautés d'invertébrés et de poissons sont conditionnées par les conditions physiques de la rivière. Il est important de remarquer qu'il existe des techniques permettant une étude approfondie de l'habitat des poissons pour évaluer la mesure de la capacité d'accueil du cours d'eau. Le peuplement piscicole réel comparé à

cette capacité d'accueil devrait nous permettre de nous affranchir de l'habitat dans l'évaluation de l'impact d'un effluent de STEP (Valentin, 1995).

Alors que les mesures sur l'individu nous permettent éventuellement la recherche de la nature chimique d'une pollution, les mesures sur la communauté nous indiquent les conséquences écologiques de la perturbation (Mc Carthy & Shugart, 1990). Le facteur temps différencie également ces mesures puisque l'individu répond plus rapidement à des changements d'exposition que la communauté (Jimenez & Stegeman, 1990). Ainsi, des mesures des traits biologiques sur l'individu ou sur la population pourraient prédire la modification de la structure de la communauté d'invertébrés.

Au niveau de la communauté, traduire l'abondance et la diversité des taxons en caractéristiques fonctionnelles (ou traits biologiques) permet d'essayer de comprendre les mécanismes de transformation de l'écosystème exposé à une pollution (Charvet *et al.*, sous presse). Une traduction en terme fonctionnel de l'écosystème en place permettrait de s'affranchir des caractéristiques faunistiques régionales et d'aboutir à une connaissance de la fréquence et de l'intensité de la perturbation (Southwood, 1988) voire éventuellement de son type (organique, toxique ou physique).

Il s'avère important de comprendre comment les réponses toxicologiques individuelles peuvent s'exprimer à l'échelle de la communauté et inversement quels sont les mécanismes qui produisent les structures de communauté observées dans un système stressé (Depledge, 1996). Dans notre étude, même si nous n'avons pas spécifiquement mis en œuvre d'expérimentations permettant de comprendre les mécanismes liant les différents niveaux biologiques d'organisation (Thellen *et al.*, 1996), nous avons pu dégager quelques questions et éléments de réponse à ce sujet.

Enfin, il est à noter que les études sur la population, niveau d'organisation intermédiaire entre l'individu et la communauté, peuvent à la fois nous aider dans l'identification des agents chimiques à l'origine de la toxicité et nous permettre une compréhension des modifications de structure de communauté (Attrill & Depledge, 1997).

2.3.3 Evolution de l'approche biologique en conditions contrôlées

Pour essayer de combler le fossé entre les mesures *in situ* et en conditions contrôlées, l'adaptation des méthodes de laboratoire par la prise en compte de certaines caractéristiques du milieu récepteur et notamment le scénario d'exposition est à développer. Auparavant réservé à la mesure de la toxicité de substances pures, les bioessais ont évolué et permis l'évaluation de la toxicité de mélanges complexes que sont les effluents. Il s'agit aujourd'hui

d'adapter les bioessais pour permettre une évaluation de la toxicité du milieu récepteur contaminé par un effluent (Crane *et al.*, 1996).

Dans notre travail, nous avons simulé les conditions de terrain en reproduisant certaines conditions d'exposition *in situ*.

Par rapport à un test normalisé sur effluent de STEP, le test sur la cériodaphnie utilisé pour le site de Châtillon prend en compte les conditions chimiques du milieu récepteur à l'amont et à l'aval de la STEP.

Le scénario d'exposition pour les poissons des bassins de dérivation intègre également la variation temporelle des qualités du milieu et de l'effluent. L'utilisation des bassins de dérivation en tant que méthode d'exposition est à développer. De nombreuses mesures biologiques pourraient être envisagées à partir d'un tel outil expérimental. Des aménagements sont nécessaires pour utiliser des invertébrés plus petits que les poissons et donc moins sensibles par leur dimension et leur mobilité au stress dû à l'encagement.

Sur la Figure 55, nous avons présenté les différentes évolutions possibles des tests de toxicité permettant de prendre en compte les conditions du milieu et de tendre ainsi vers les réponses du milieu récepteur.

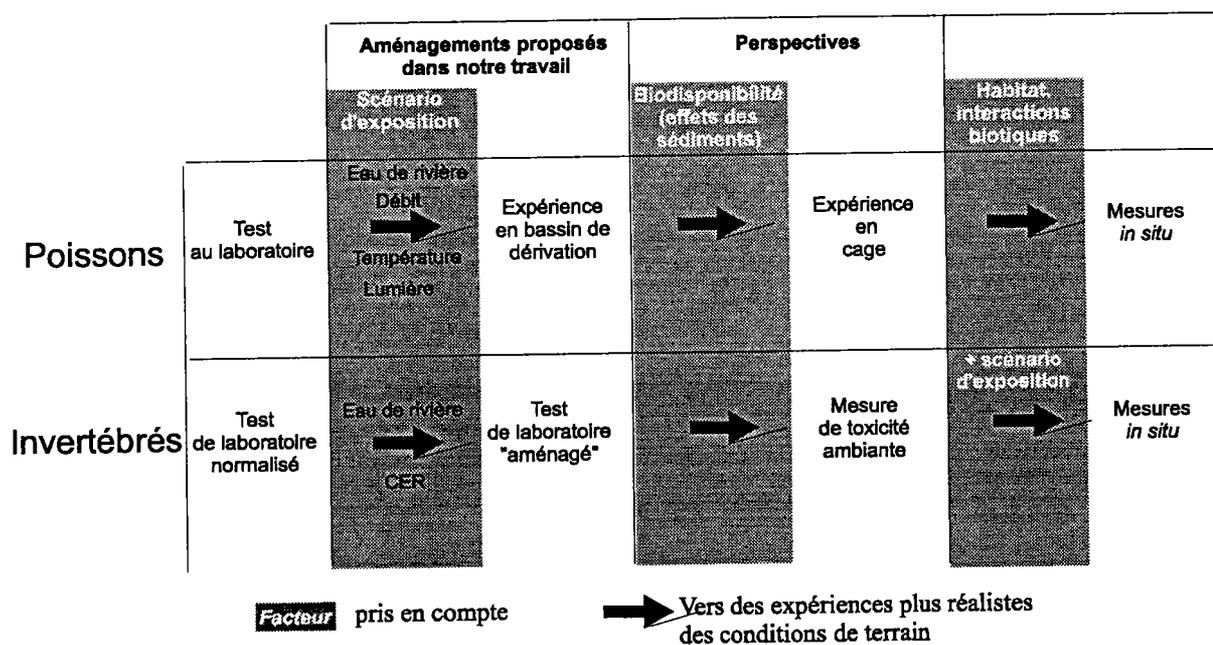


Figure 55 : Entre le test normalisé et les mesures *in situ* : vers des expériences plus réalistes des conditions de terrain. Adapté de Dickson *et al.* (1995)

La biodisponibilité étant un facteur important dans l'expression des effets d'une contamination toxique, sa prise en compte nécessite d'étudier les poissons mis en cage dans le milieu ou de tester la toxicité ambiante sur les cériodaphnies (Dickson *et al.*, 1995). Proche de notre dispositif de bassins de dérivation, la technique d'encagement de poissons dans le milieu récepteur a déjà fait ses preuves en tant qu'outil de contrôle de la qualité de l'eau (Lindström-Seppä & Oikari, 1989 ; Haasch *et al.*, 1993 ; Jedamski-Grymlas *et al.*, 1994). Des expérimentations se développent sur les invertébrés pour simuler la technique d'encagement des poissons à petite échelle (Maltby *et al.*, 1990 ; Sasson-Brickson & Burton, 1991 ; Crane *et*

al., 1996) ou pour étudier la toxicité des sédiments qui représentent un milieu intégrateur de la pollution.

Enfin, vers des expérimentations encore plus proches des conditions naturelles, on peut citer le mésocosme. Le mésocosme est un dispositif expérimental qui permet d'étudier les effets écologiques de contaminants sur les communautés dans des conditions d'exposition réelles propres aux biotopes naturels (Ramade, 1992 ; Waller *et al.*, 1995 ; Caquet *et al.*, 1996).

2.3.4 Evolution de l'approche intégrée

Dans le cas de l'étude d'une source de pollution connue, la comparaison de méthodes *in situ* et en conditions contrôlées est le meilleur moyen pour faire la part entre les effets engendrés par cette pollution et des perturbations annexes. En cas de source de pollution non identifiée, l'utilisation conjointe de mesures *in situ* et en conditions contrôlées reste indispensable pour étudier les mécanismes de perturbation (Douben & Siepel, 1993).

Dans le cadre de l'évaluation de l'impact de l'effluent de STEP, il s'est avéré important de pouvoir utiliser les mêmes mesures sur l'effluent et sur le milieu récepteur.

A titre d'exemple, on peut évoquer la recherche d'un paramètre descripteur de la matière organique valable à la fois pour des analyses d'eau de rivière et d'effluent.

Des méthodes biologiques telles que les biomarqueurs (induction de l'activité EROD par exemple) utilisée dans ce travail se prêtent bien aux mesures à la fois *in situ* et au laboratoire puisque c'est la même mesure qui est effectuée sur des poissons pêchés dans la rivière ou exposés artificiellement à des contaminants au laboratoire. L'utilisation du même matériel biologique sur le terrain et en laboratoire est également à préconiser même si elle est parfois plus difficile à mettre en œuvre (cas de notre travail).

Dans le §2.1, nous avons proposé une approche intégrée simplifiée basée sur l'étude des invertébrés. Les mesures sur invertébrés sont intéressantes puisqu'elles permettent des études à différents niveaux d'organisation. Il apparaît intéressant de réfléchir sur la possibilité de coupler des études de population d'invertébrés *in situ* avec des études de traits biologiques sur ces organismes en conditions contrôlées. Dans ce but, il est important d'identifier des mesures biologiques ainsi que des espèces ou taxons « cibles ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS S. M. (1990).** Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Symposium* 8 : 1-8.
- AHEL M., GIGER W. & KOCH M. (1994a).** Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, 28 (5) : 1131-1142
- AHEL M., GIGER W. & KOCH M. (1994b).** Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research*, 28 (5) : 1143-1152
- AITKEN M.D., HECK P.E., ALVAREZ-COHEN L., GRIMBERG S.J. & STRINGFELLOW W.T. (1993).** Activated sludge. *Water Environment Research*, 65 (4) : 324-336
- ALLARDI J. (1994).** Les poissons comme « indicateur biologique » de l'état des écosystèmes aquatiques. Etat de santé des écosystèmes aquatiques. Les variables biologiques comme indicateurs. Actes sur séminaire national 2-3/11/94. Cemagref Eds.
- ALLARDI J., BOËT P., BELLIARD J. & BOUGHIDA L. (1993).** Influences des actions anthropiques sur le peuplement ichtyologique de la Seine. In Fustec E. & De Marsily G. (Eds). *La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion. Actes de Colloque. 29-30 avril 1993* : 221-238
- AMOROS C. & PETTS G.E. (1993).** (Eds). Hydrosystèmes fluviaux. Masson. 300p.
- ANDERSEN T. & KLUBNES R. (1983).** The life histories of *Hydropsyche siltalai* Dölher, 1963 and *H. pellucidula* (Curtis, 1834) (Trichoptera, Hydropsychidae) in a West Norwegian River. *Aquatic Insects*, 5 : 51-62.
- ANDERSSON T., FÖRLIN L., HARDIG J. & LARSSON A. (1988).** Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45 : 1525-1536.
- ARBUCKLE W.B. & ALLEMAN J.E. (1992).** Effluent toxicity testing using nitrifiers and Microtox TM. *Water Environment Research*, 34 (3) : 263-267
- ARTHUR J.W., WEST C.W., ALLEN K.N. & HEDTKE S.F. (1987).** Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38 : 324-331
- ARUKWE A. & GOKSÖYR A. (1997).** Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *The Journal of Experimental Zoology*, 277 : 313-325.
- ATTRILL M.J. & DEPLEDGE M.H. (1997)** Community and population indicators of ecosystem health : targeting links between levels of biological organisation. *Aquatic Toxicology*, 39 : 183-197.

- BAGOT D., FABRE B., GRADL T. & GOERGLER B. (1993).** Incidence de la nature des effluents sur la flore de la station d'épuration de Ribeauvillé (Haut-Rhin). *T.S.M.-L'Eau*, 6 : 333-337
- BARROIN G. (1995).** Les phosphates ou comment manipuler la science. *La Recherche*. Novembre 1995.
- BARTHELEMY R. (1994).** Impact des rejets de station d'épuration sur le peuplement des macroinvertébrés benthiques. *Maîtrise de Biologie Gestion Restauration des Eaux Douces, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand*. 23 p.
- BERGMAN H.L., KIMERLE R.A. & MAKI A.W. (Eds) (1986)** Environmental hazard assessment of effluents. SETAC. Pergamon Press. 366p
- BERTRAND-KRAJEWSKI J.L., LEFEBVRE M. & AUDIC J.M. (1994).** Impact des événements pluvieux en réseau unitaire sur le fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées : 26-1 - 26-15
- BERVOETS L., BAILLIEUL M., BLUST R. & VERHEYEN R. (1996).** Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. *Environmental Pollution*, 91 (3) : 333-341
- BERVOETS L., BAILLIEUL M., BLUST R., DE BOECK G. & VERHEYEN R. (1993).** Impact assessment of industrial effluents on freshwater ecosystems. *The Science of the Total Environment, suppl.* : 1123-1128
- BIESINGER K.E., ANDEW R.W. & ARTHUR J.W. (1974).** Chronic toxicity of NTA (nitritotriacetate) and metal-NTA complexes to *Daphnia magna*. *Journal of Fishery Research Board of Canada*, 31 : 486-490.
- BILLEN G., GARNIER J, POULIN M. & SERVAIS P. (1993)** Un exemple d'application des modèles de fonctionnement de l'écosystème élaborés par le Piren-Seine : Evaluation de l'impact sur la qualité de l'eau du traitement de l'azote et du phosphore dans les effluents urbains. In Fustec E. & De Marsily G. (Eds). *La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion. Actes de Colloque. 29-30 avril 1993* : 319-350
- BIRD G.A., ROSENRETER M.J. & SCHWARTZ W.J. (1995).** Deformities in the menta of chironomid larvae from the experimental lakes area, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52 : 2290-2295.
- BIRGE W.J., BLACK J.A. & SHORT T.M. (1989).** A comparative ecological and toxicological investigation of a secondary wastewater treatment plant effluent and its receiving stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 : 437-450
- BOON P.J. (1987).** The influence of kielder water on trichopteran (caddisfly) populations in the river North Tyne (Northern England). *Regulated Rivers : Research and Management*, 1 :95-109.
- BOTTERWEG J. & RISSELADA J. (1993).** Toxicity assessment of effluents in the Netherlands : implementation, problems and prospects. *The Science of the Total Environment, suppl.* : 1105-1113
- BROWN D.A., GOSSETT R.W., HERSHELMAN G.P., WARD C.F., WESTCOTT A.M. & CROSS J.N. (1986).** Municipal wastewater contamination in the Southern

- California bight : part I - Metal and organic contaminants in sediments and organisms. *Marine Environmental Research*, 18 : 291-310
- BROWN J.A., JOHANSEN P.H., COLGAN P.W. & MATHERS R.A. (1987).** Impairment of early feeding behavior of largemouth bass by pentachlorophenol exposure : a preliminary assessment. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116 : 71-78.
- BRUSLÉ J. (1990).** Effects of heavy metals on eels, *Anguilla* sp. *Aquatic Living Resources*. 3 : 131-141.
- BUBB J.M. & LESTER J.N. (1994).** Anthropogenic heavy metal inputs to lowland river systems, a case study, the River Stour, U.K. *Water, Air and Soil Pollution*, 78 : 279-296
- BUBB J.M. & LESTER J.N. (1995).** The effect of final sewage effluent discharges upon the behaviour and fate of metals in a lowland river system. A question of dilution. *Environmental Technology*, 16 : 401-417
- BUCHELI T.D. & FENT K. (1995).** Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25 (3) : 201-268
- BUCHER F. & HOFER R. (1990).** Effects of domestic wastewater on serum enzyme activities of brown trout (*Salmo trutta*). *Comparative of Biochemistry and Physiology*, 97C (2) : 381-385
- BURKHARD L.P. & JENSON J.J. (1993).** Identification of ammonia, chlorine, and diazinon as toxicants in a municipal effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25 : 506-515
- CAIN D.J., LUOMA S.N., CARTER J.L. & FEND S.V. (1992).** Aquatic insects as bioindicators of trace element contamination in cobble-bottom rivers and streams. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic and Sciences*, 49 : 2141-2154
- CAIRNS J. (1983).** Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard. *Hydrobiologia*, 100 : 47-57
- CALAMARI D., CHIAUDANI G. & VIGHI M. (1985).** Methods for measuring the effects of chemicals on aquatic plants. *Methods for estimating risk of chemical injury : human and non-human biota and ecosystems. Scope report 26*, B. Vouk, G.C. Butler, D.G. Hoel & D.B. Peacol, Eds., 1985. New York : J. Wiley & Sons : 549-571.
- CAQUET T., LAGADIC L., JONOT O., BATURO W., KILANDA M., SIMON P., LE BRAS S., ECHAUBARD M. & RAMADE F. (1996).** Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34 : 125-133
- CARLE F.L. & STRUB M.R. (1978).** A new method for estimating population size from removal data. *Biometrics*, 34 : 621-630
- CARLINE R.F., BENSON A.J. & ROTHENBACHER H. (1987).** Long-term effects of treated domestic wastewater on rainbow trout, *Water Research*, 21 (11), 1409-1415.
- CARPENTER K.E. (1924).** A study of the fauna of rivers polluted by lead mining in the Aberystwyth district of Cardiganshire. *Annals of Biology*, 11 : 1-23.

- CAVALLI L., GELLERA A. & LANDONE A. (1993). LAS removal and biodegradation in a wastewater treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12 : 1777-1788
- CHAMPELY S., GUINAND B., THIOULOUSE J. & CLERMIDY A. (1997). Functional data analysis of curve asymmetry with application to the colour pattern of *Hydropsyche contubernalis* head capsule. *Biometrics*, 53 : 294-305
- CHAPMAN J.C. (1995). The role of ecotoxicity testing in assessing water quality. *Australian Journal of Ecology*, 20 : 20-27
- CHAPMAN P.M. (1986). Sediment quality criteria from the sediment quality triad: an example. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5 : 957-964
- CHAPMAN P.M. (1989). Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and chemistry*, 8 : 589-599
- CHAPMAN P.M. (1990). The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *The Science of the Total Environment*, 97-98 : 815-825
- CHARVET S., KOSMALA A. & STATZNER B. Bioindication through species traits of benthic macroinvertebrates : perspectives for a general tool in stream management. *Archiv für Hydrobiologie* : sous presse.
- CHESEL D. & DOLÉDEC S. (1992). Logiciel ADE (Version 3.6). Analyses multivariées et graphiques pour données environnementales. Manuel de l'utilisateur, URA CNRS 1451 « Ecologie des Eaux Douces et des Grands Fleuves », Université de Lyon I, Villeurbanne, 127p.
- CLEMENTS W.H. & KIFFNEY P.M. (1994a). Assessing contaminant effects at higher levels of biological organisation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 : 357-359
- CLEMENTS W.H. & KIFFNEY P.M. (1994b). Integrated laboratory and field approach for assessing impacts of heavy metals at the Arkansas river, Colorado. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 : 397-404
- CLEMENTS W.H. & KIFFNEY P.M. (1995). Validation of whole effluent toxicity tests : integrated studies using field assessment, microcosms, and mesocosms. In Grothe D.R., Dickson K.L. & Reed-Judkins D.K. (Eds). *Whole effluent toxicity testing. An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts*. SETAC : 229-244.
- COURTNEY K.D. (1979). Hexachlorobenzene (HCB) : a review. *Environmental Research* 20 225-266.
- COWAN R.M., ELLIS T.G., HIGGINS M.J., ALAGAPPAN G. & PARK K. (1996). Activated sludge and other aerobic suspended culture processes. *Water Environment Research*, 68 : 451-469
- CRAIG G.R., MONTEITH H.M. & ORR P.L. (1991). Acute and chronic evaluation of Ontario Canada STP effluents. *Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences*, 1774 (1-2) : 207
- CRANE M., JOHNSON I. & MALTBY L. (1996). *In situ* assays for monitoring the toxic impacts of waste in rivers. In Tapp J.F., Wharfe J.R.. & Hunt S.M. (Eds). *Toxic impacts of wastes on the aquatic environment*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge :

116-124.

- DAVIS (1975). Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species : a review. *Journal of Fishery Research Board of Canada*, 32 :2295-2332.
- DE ALENCASTRO L.F. & TARRADELLAS J. (1983). Etude de la concentration en PCB des eaux usées dans les stations d'épuration. *Gaz - Eaux - Eaux usées*, 63 (3) : 113-122
- DEGRAEVE G.M. & COONEY J.D. (1987). Ceriodaphnia : an update on effluent toxicity testing and research needs. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 331-333.
- DELSART C., SIMON P. & TORRE M. (1996). Bactéries rejetées par les stations d'épuration et capacité d'assimilation des milieux récepteurs. *Revue des Sciences de l'Eau* : soumis.
- DEPLEDGE M.H. (1996). Interpretation, relevance and extrapolations : can we devise better ecotoxicological tools to assess toxic impacts ? In Tapp J.F., Wharfe J.R.. & Hunt S.M. (Eds). *Toxic impacts of wastes on the aquatic environment*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge : 104-115.
- DEVAUX A., PESONEN M., MONOD G. & ANDERSSON T. (1992). Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 43 (4) : 898-901
- DEVAUX A., FLAMMARION P., BERNARDON V., GARRIC J. & MONOD G. (sous presse). Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuscicus cephalus*). *Marine Environmental Research*.
- DICKSON K.L., WALLER W.T., KENNEDY J.H. & AMMANN L.P. (1992). Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 1307-1322
- DICKSON K.L., WALLER W.T., KENNEDY J.H., AMMANN L.P., GUINN R. & NORBERG-KING T.J. (1995). Relationships between effluent toxicity, ambient toxicity, and receiving system impacts : Trinity river dechlorination case study. In Grothe D.R., Dickson K.L. & Reed-Judkins D.K. (Eds) *Whole effluent toxicity testing. An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts*. SETAC : 287-308
- DIRECTION DE LA PREVENTION DES POLLUTIONS ET DES RISQUES SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL (1993). Arrêté du 1er mars 1993, relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux rejets de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation. *Ministère de l'Environnement* : 100 p.
- DOUBEN P.E.T. & SIEPEL H. (1993). Extrapolation from laboratory to field and from individual to populations : pitfalls to avoid. *The Science of the Total Environment*, suppl. : 1025-1036
- EAGLESON K.W., LENAT D.L., AUSLEY L.W. & WINBORNE F.B. (1990). Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using

- the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9 : 1019-1028
- EDELIN F. (1993). Epuration biologique des eaux. Cebedoc Eds. Tec & Doc. Lavoisier. 303p
- EDINGTON J.M. & HILDREW A.G. (1995) Caseless caddis larvae of the British Isles. A revised key. Freshwater Biological Association. Scientific Publication n°53. Series Eds J.M. Elliott. 133p.
- EIFAC (1973). Water quality criteria for European freshwater fish. Report on ammonia and inland fisheries. *Water Research*, 7 : 1011-1022.
- EMERSON K., RUSSO R.C., LUND R.E. & THURSTON R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effects of pH and temperature. *Journal of Fisheries Research Board Canadian*, 32 : 2379-2383
- FAESSEL B., ROGER M.C. & CAZIN B. (1993). Incidence de rejets ponctuels et diffus sur les communautés d'invertébrés benthiques d'un cours d'eau du Beaujolais : l'Ardières. *Annals of Limnology*, 29 (3-4) : 307-323
- FAUCON T. (1995). Les séparateurs de liquides légers et le prétraitement des eaux pluviales. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*, 179 : 48-50
- FENET H. (1997). Les biomarqueurs chez l'anguille européenne en cage : application à la surveillance des eaux superficielles. Thèse de l'Université de Montpellier I. 151p.
- FLAMMARION P., MIGEON B. & GARRIC J. Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety* : sous presse.
- FLAMMARION P., MIGEON B. & GARRIC J (1996). Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 3 : 440-445
- FLAMMARION P. & GARRIC J. (1997). Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker ? *Chemosphere*, 35 (10) 2375-2388.
- FLAMMARION P. (1997). Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. Thèse de l'Université de Metz. 106p.
- FORBES V.E. & FORBES T.L. (1994). Ecotoxicology in theory and practise Ecotoxicology Series 2 Chapman & Hall : 247p.
- FÖRLIN L. & HANSSON T. (1982a). Effects of oestradiol-17 β and hypophysectomy on hepatic mixed function oxydases in rainbow trout. *Journal of Endocrinology*, 95, 245-252.
- FÖRLIN L. & HANSSON T. (1982b). Effects of treated municipal wastewater on the hepatic, xenobiotic, and steroid metabolism in trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6, 41-48.
- FÖRLIN L. & HAUX C. (1990). Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *Journal of Endocrinology*, 124 : 207-213.

- FOSTER S.C., BURKS S.L., FORT D.J., STOVER E.L. & MATLOCK M.D. (1994).** Development and evaluation of a non destructive measure of fish growth for sublethal toxicity assessment. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53 : 85-90
- FRIEDRICH G. (1990).** Eine Revision der Saprobien-Systems. *Z. Wasser Abwasser Forsch*, 23 : 141-152
- GAGNE F. & BLAISE C. (1993).** Hepathic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Research*, 27 : 1669-1682.
- GALGANI F., BOCQUENE G., LUCON M., GRZEBYK D., LETROUIT F. & CLAISSE D. (1991).** EROD measurements in fish from the Northwest part of France. *Marine Pollution Bulletin*, 22 : 494-500.
- GALGANI F., BOCQUENE G. & CADIOU Y. (1992).** Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 91 : 77-82.
- GARBAN B., OLLIVON D., POULIN M., GAULTIER V. & CHESTERIKOFF A. (1995).** Exchanges at the sediment - water interface in the river Seine downstream from Paris, *Water Research*, 29 : 473-481.
- GARNIER J., BILLEN G., HANSET P., TESTARD P. & COSTE M. (1993).** Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. In Fustec E. & De Marsily G. (Eds). *La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion. Actes de Colloque. 29-30 avril 1993* : 289-310
- GARRIC J. (1987).** Toxicité de l'azote ammoniacal pour la faune aquatique dans les eaux continentales. Rapport Cemagref-Lyon : 7 p.
- GARRIC J., BRAY M., MIGEON B., VOLLAT B. & RICHERT C. (1994).** Evaluation de l'écotoxicité de rejets industriels et urbains et de la contamination du milieu récepteur. Application à la Moselle en amont de Nancy. Laboratoire d'écotoxicologie, Rapport Cemagref, 31p.
- GARRIC J., VINDIMIAN E. & FERARD J.F. (1993).** Ecotoxicology and wastewater : some practical applications. *The Science of the Total Environment, suppl.* : 1085-1103
- GARRIC J., VOLLAT B., NGUYEN D.K., BRAY M., MIGEON B. & KOSMALA A. (1996).** Ecotoxicological and chemical characterisation of municipal wastewater treatment plant effluents. *Water Science and Technology*, 33 (6) : 83-91
- GASITH A., JOP K.M., DICKSON K.L., PARKERSON T.F. & KACZMAREK S.A. (1988).** Protocol for the identification of toxic fractions in industrial wastewater effluents in *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: 10th volume, ASTM STP 971, p. 204-215, ADAMS W.J., CHAPMAN G.A., LANDIS W.G. (Eds) American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- GAULTIER V., ROFES G., HAMELIN G. & MOTTE B. (1992).** Qualité des sédiments en aval de Paris en relation avec la station d'épuration d'Achères. Dosage et mobilité du phosphore. Rapport PIREN-Seine, 46p.

- GILBERTSON M. (1984).** Need for development of epidemiology for chemical induced diseases in fish in Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.*, 41 : 1534-1540.
- GOEDE R.W. & BARTON B.A. (1990).** Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Symposium* 8 : 93-108
- GOKSØYR A. & FÖRLIN L. (1992).** The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22 : 287-312
- GPQEE Grand Programme Qualité - Epuration des Eaux (1993).** Caractérisation et impact sur les milieux aquatiques des effluents liquides urbains. CEMAGREF, IFREMER, ANJOU RECHERCHE, CIRSEE, Ministère de l'Environnement, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. 112p. décembre 1993
- GPQEE Grand Programme Qualité - Epuration des Eaux (1995a).** Caractérisation et impact sur les milieux aquatiques des effluents liquides urbains. CEMAGREF, IFREMER, ANJOU RECHERCHE, CIRSEE, Ministère de l'Environnement, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. 38p. mars 1995
- GPQEE Grand Programme Qualité - Epuration des Eaux (1995b).** Caractérisation, impact et devenir des rejets de station d'épuration dans les eaux douces superficielles, CEMAGREF, Contrat Ministère de l'Environnement DGAD/SRAE/ 94094. 203p. décembre 1995
- GPQEE Grand Programme Qualité - Epuration des Eaux (1997).** Caractérisation, impact et devenir des rejets de station d'épuration dans les eaux douces superficielles, CEMAGREF, Contrat Ministère de l'Environnement DGAD/SRAE/ 95153.163p. juin 1997
- GRANIER L., CHEVREUIL M., CARRU A.M. & LETOLLE R. (1990).** Ruban runoff pollution by organochlorines (Polychlorinated biphenyls and lindane) and heavy metals (lead, zinc and chromium). *Chemosphere*, 21 (9) : 1101-1107
- GRIZZLE J.M., HOROWITZ S.A. & STRENGTH D.R. (1988).** Caged fish as monitors of pollution : effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Water Resources Bulletin*, 24 (3) : 951-959
- GROTHER D.R., DICKSON K.L. & REED-JUDKINS D.K. (1995).** (Eds) Whole effluent toxicity testing. An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts. SETAC 346 p
- GUENTER F. & GIGER W. (1996).** Speciation and fate of ethylenediaminetetraacetate (EDTA) in municipal wastewater treatment. *Water Research*, 30 (1) : 122-134
- GUETTIER P., IWEMA A., MAGNAN J.P., MATHIAN R., RABY D., VACHON A. & VIDOU P. (1994).** *L'assainissement des agglomérations : techniques d'épuration actuelles et évolutions.* Etudes inter-agences, 27. 176 p.
- GULLEY D.D., BOELTER A.M. & BERGMAN H.L. (1989).** Toxstat Release 3.0, Fish physiology and toxicology laboratory, Department of zoology and physiology, Univ. Wyoming (U.S.A.).

- HAASCH M.L., PRINCE R., WEJKSNORA P.J., COOPER K.R. & LECH J.J. (1993).** Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12 : 885-895
- HARRIES J.E., SHEAHAN D.A., JOBLING S., MATTHIESSEN P., NEALL P., ROUTLEDGE E.J., RYCROFT R., SUMPTER J.P. & TYLOR T. (1996).** A survey of oestrogenic activity in United Kingdom Inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (11) : 1993-2002.
- HATWELL S.I., DAWSON C.E., DURELL E.Q., ALDEN R.W., ADOLPHSON P.C., WRIGHT D.A., COELHO G.M., MAGEE J.A., AILSTOCK S. & NORMAN M. (1997).** Correlation of measures of ambient toxicity and fish community in Chesapeake bay, USA, tributaries-urbanizing watersheds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 : 2556-2567.
- HEBER M.A. & NORBERG-KING T.J. (1996).** United States Environmental Protection Agency's water-quality based approach to toxics control. In Tapp J.F., Wharfe J.R. & Hunt S.M. (Eds). *Toxic impacts of wastes on the aquatic environment*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge : 175-187.
- HICKS B.J., HALL J.D., BISSON P.A. & SEDELL J.R. (1991).** Responses of salmonids to habitat changes. In Meehan W.R. (Eds). *Influence of forest and rangeland management on salmonid fishes and their habitats*, 483-518.
- HOUSE M.A., ELLIS J.B., HERRICKS E.E., HVITVED-JACOBSEN T., SEAGER J., LIJKLEMA L., AALDERINK H. & CLIFFORDE I.T. (1992).** Urban drainage, impacts on receiving water quality, *Water Science and Technology*, 12 : 117-158.
- HRUBEC J., VAN KREIJL C.F., MORRA C.F.H. & SLOOFF W. (1983).** Treatment of municipal waste water by reverse osmosis and activated-carbon-removal of organic micropollutants and reduction of toxicity. *The Science of the Total Environment*, 27 : 71-88
- JEAN G. (1991).** Evaluation de la toxicité aiguë de solutions synthétiques et d'effluents à partir d'un multi-test macroinvertébrés : le M.T.M. Comparaison des réponses des macroinvertébrés avec celles de *p. phosphoreum* et de *Daphnia magna* et de *Brachydanio rerio*. Thèse de Doctorat de l'INSA-Lyon, 213p
- JEDAMSKI-GRYMLAS J., LANGE U., SIEBERS D. & KARBE L. (1994).** Induction of the hepatic biotransformation system of the Golden Ide (*Leusiscus idus*) after exposure in the river Elbe. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28 : 35-42
- JIMENEZ B.D. & STEGEMAN J.J. (1990).** Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. American Fisheries Society, Symposium. 8 : 67-79.
- JOBLING S. & SUMPTER J.P. (1993).** Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27 : 361-372
- JOHNSON I. (1996).** What next? - Future developments in the field of aquatic environmental toxicology. In Tapp J.F., Wharfe J.R. & Hunt S.M. (Eds). *Toxic impacts*

- of wastes on the aquatic environment. The Royal Society of Chemistry. Cambridge : 251-259.
- KANG J.Y. & GOULDER R. (1996).** Epiphytic bacteria downstream of sewage-works outfalls. *Water Research*, 30 (3) : 501-510
- KARR J.R. (1993).** Defining and assessing ecological integrity : beyond water quality. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12 (9) : 1521-1531.
- KARR J.R., FAUSCH K.D., ANGERMEIER P.L., YANT P.R. & SCHLOSSER I.J. (1986).** *Assessing biological integrity in running waters. A method and its rationale.* Illinois Natural History Survey, Special Publication 5. 28 p.
- KARR J.R., HEIDINGER R.C. & HELMER E.H. (1985).** Effects of chlorine and ammonia from wastewater treatment facilities on biotic integrity. *Journal of Water Pollution & Control Federation*, 9, 912-915.
- KARI F. G. & GIGER W. (1996).** Speciation and fate of ethylenediaminetetraacetate (EDTA) in municipal wastewater treatment. *Water Research*, 30 (1) : 122-134
- KIMBALL K.D. & LEVIN S.A. (1985).** Limitations of laboratory bioassays : the need for ecosystem-level testing. *BioScience*, 35 (3) : 165-171
- KLOEPPER-SAMS, P. J. & BENTON, E. (1994).** Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 2. Induction of hepatic cytochrome P4501A in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and other species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 : 1483-1496.
- KONDRATIEFF P.F. & SIMMONS G.M., Jr. (1982).** Nutrient retention and macroinvertebrate community structure in a small stream receiving sewage effluent. *Archiv für Hydrobiologie*, 94 : 83-98.
- KOSALA J. & PICKETT S. T. A. (1992).** Ecosystem stress and health : an expansion of the conceptual basis. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1 : 7-13.
- KOSMALA A., CHARVET S., ROGER M.C. & FAESSEL B.** Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Research* : sous presse.
- KOSMALA A., MIGEON B., FLAMMARION P. & GARRIC J.** Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using fish biomarker EROD : field and on-site experiments *Ecotoxicology and Environmental Safety* : sous presse.
- KOSMALA A., MIGEON B., & GARRIC J. (1996a).** Fish EROD activity to assess the impact of a wastewater treatment plant. Field and on-site experimental approaches. In Tapp J.F., Wharfe J.R., & Hunt S.M. (Eds). *Toxic impacts of wastes on the aquatic environment.* The Royal Society of Chemistry. Cambridge : 271.
- KOSMALA A., FAESSEL B., ROGER M.C. & GARRIC J. (1996b)** Instream macroinvertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test to assess the impact of a wastewater treatment plant effluent. In 4th European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety. SECOTOX 25-28 August 1996.
- KOSMALA A. (1992).** Développement d'un essai d'écotoxicité basé sur la nutrition de *Daphnia magna* (Crustacé d'eau douce). DEA. Université de Strasbourg. 144p.

- KRANTZBERG G. & BOYD D. (1992).** The biological significance of contaminants in sediment from Hamilton harbour, lake Ontario, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 1527-1540.
- KRECHNIAK J., ENGLLOT B., WRZESNIEWSKA K. & HAC E. (1994).** Interaction of lindane and carbaryl on hepatic microsomal enzymes in rats. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52 : 927-934.
- LAFONT M. & MOUTHON J. (1990).** Comparaison de méthodes pour évaluer la toxicité des sédiments. Cemagref. 24p.
- LAFONT M. (1989).** *Evaluation de l'impact de la pollution dans les cours d'eau : présentation des travaux* : 95-105
- LAPOINT T.W., BARBOUR M.T., BORTON D.L., CHERRY D.S., CLEMENTS W.H., DIAMOND J.M., GROTHE D.R., LEWIS M.A., REED-JUDKINS D.K. & SAALFELD G.W. (1995).** Field assessment. In Grothe D.R., Dickson K.L. & Reed-Judkins D.K. (Eds). *Whole effluent toxicity testing. An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts*. SETAC : 191-228.
- LARA-CAZENAVE M.B., LEVY V., CASTETBON A., POTIN-GAUTIER M., ASTRUC M. & ALBERT E. (1994).** Pollution d'eaux de ruissellement par les métaux lourds en zone urbaine. Première partie : métal total. *Environmental Technology*, 15 : 1135-1147
- LARSON R.J. & PAYNE A.G. (1981).** Fate of the benzene ring of linear alkylbenzene sulfonate in natural waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 41 (3) : 621-627
- LATIF M., PERSOONE G., JANSSEN C., DE COEN W. & SVARDAL KARL (1995).** Toxicity evaluations of wastewaters in Austria with conventional and cost-effective bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32 : 139-146
- LDA Laboratoire départemental d'analyses de la drôme 26 (1995).** Mise en œuvre de la technique « multi-résidus » organiques sur les parties non solubles des eaux superficielles (sédiments - matières en suspension). *Laboratoire départemental d'Analyses de la Drôme*. 17p.
- LDA Laboratoire départemental d'analyses de la drôme 26 (1997).** Extraction et analyses des micropolluants organiques sur les dreissènes. *Laboratoire départemental d'Analyses de la Drôme*. 58p.
- LE CREN E.D. (1951).** The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20 : 201-215.
- LINDSTROM-SEPPA P. & OIKARI A. (1989).** Biotransformation and other physiological in Whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18 : 191-203
- LLOYD R. (1989).** Ecological monitoring. Aquatic toxicity of complex effluents. *Chemistry & Industry*. 17 July 1989, 449-452.
- MAGAUD H., MIGEON B., MORFIN P., GARRIC J. & VINDIMIAN E. (1997).** Modelling fish mortality due to urban storm run-off ; interacting effects of hypoxia and un-ionized ammonia. *Water Research*, 31 : 211-218.

- MAKEPEACE D.K., SMITH D.W. & STANLEY S.J. (1995).** Urban stormwater quality: summary of contaminant data. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25 (2) : 93-139
- MALTBY L. & CALOW P. (1989).** The application of bioassays in the resolution of environmental problems : past, present and future. *Hydrobiologia*, 188/189 : 65-76.
- MALTBY L., NAYLOR C. & CALOW P. (1990).** Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19 : 292-300
- MARCHAND M., CAPRAIS J.C., PIGNET P. & POROT V. (1989).** Les polluants organiques dans les effluents urbains et apports polluants dans le milieu marin. Cas du littoral français. *Water Research*, 23 (4) : 461-470
- MARSHALL A.S., CRUMBY W.D., GREELEY M.S., RYON M.G. & SCHILLING E.M. (1992a).** Relationship between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 1549-1557
- MARSHALL A.S., CRUMBY W.D., GREELEY M.S., SHUGART L.R. & SAYLOR C.F. (1992b).** Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents : a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 24 : 347-360
- MARTIN G. (1979).** Le problème de l'azote dans les eaux. Technique et documentation. 279p.
- MARTIN A.M. (1992).** Use biomonitoring data to reduce effluent toxicity. *Chemical Engineering Progress*, 88 : 43-49
- MASFARAUD J.F., MONOD G. & DEVAUX A. (1990).** Use of the fish cytochrome P-450 dependent 7-Ethylresorufin-O-Deethylase activity as a biochemical indicator of water pollution. Study of the liver and the kidney of male and female nase (*Chondrostoma nasus*) from the river Rhône. *The Science of the Total Environment*, 97-98 : 729-738
- MASON C.F. & BARAK N.A.E. (1990).** A catchment survey for heavy metals using the eel (*Anguilla anguilla*). *Chemosphere*. 21 : 695-699.
- MASON C.F. (1987).** A survey of mercury, lead and cadmium in muscle of British freshwater fish. *Chemosphere*. 16 : 901-906.
- MC CARTHY J.F. & SHUGART L.R. (1990).** (Eds) Biological markers of environmental contamination. Lewis. 457p
- MC INTYRE A.E., PERRY R & LESTER J.N. (1981).** The behaviour of polychlorinated biphenyls and organochlorine insecticides in primary mechanical wastewater treatment. *Environmental Pollution (séries B)*, 2 : 223-233
- MEIER J.R. & BISHOP D.F. (1985).** Evaluation of conventional treatment processes for removal of mutagenic activity from municipal wastewaters. *Journal WPCF*, 57 : 999-1005
- MEIER J.R., BLAZAK W.F., RICCIO E.S., RUSHBROOK C.J., STEWART B.E. & CONDIE L.W. (1986).** Genotoxicity and subchronic toxicity of municipal wastewater effluents. *Environmental Mutagen*, 8 (suppl. 6) : 55

- MELANCON M.J., YEO S.E. & LECH J.J. (1987).** Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in fish by exposure to river water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6 : 127-135
- MELCER H., STEEL P. & BEDFORD W.K. (1995).** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic nitrogen compounds in a municipal treatment plant. *Water Environment Research*, 67 : 926-934
- METIKOSH S., CAIRNS V.W. & JANK B.E. (1980).** Toxicity assessment of treated municipal effluents. Environment Canada, Ottawa, Ont., Report EPS 4-WP-80-1. 36p.
- MISKIEWICZ A.G. & GIBBS P.J. (1994).** Organochlorine pesticides and hexachlorobenzene in tissues of fish and invertebrates caught near a sewage outfall. *Environmental Pollution*, 84 : 269-277
- MITZ S.V. & GIESY P. (1985).** Sewage effluent biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 10 (1) : 40-52.
- MONDA D.P., GALAT D.L. & FINGER S.E. (1995a).** Evaluating ammonia toxicity in sewage effluent to stream macroinvertebrates: I. a multi-level approach. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8 : 378-384
- MONDA D.P., GALAT D.L., FINGER S.E. & KAISER M.S. (1995b).** Acute toxicity of ammonia (NH₃-N) in sewage effluent to *Chironomus riparius*: II. Using a generalized linear model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28 : 385-390
- MONTUELLE B. & VOLAT B.** Impact of a wastewater treatment plant discharge on enzyme activity in freshwater sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* : sous presse.
- MOON C.H., LEE Y.S. & YOON T.H. (1994).** Variation of trace Cu, Pb and Zn in sediment and water of an urban stream resulting from domestic effluents. *Water Research*, 28 : 985-991
- MORRIS T., FARE G. & SPADONE J. (1992).** Toxicity reduction evaluation at the Linden Roselle Sewerage authority wastewater treatment plant. *Water Environment & Technology*, 5 : 8-16.
- MOUCHEL J.M. (1995).** Quantification et modélisation des impacts dus aux rejets urbains de temps de pluie dans l'agglomération parisienne. *R.E.S.E.A.U. d'Ile de France*, 15 : 5-9
- MUNAWAR M. (1992).** Préface. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1 : xiii-xvi
- NADEAU I. (1995).** Assainissement. Les petites communes doivent faire leur choix. *Entreprises & techniques*, 1537 : 31-41.
- NAUDIN S., GARRIC J., VINIMIAN E., BRAY M., MIGEON B., VOLLAT B. & LENON G. (1995).** Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30 : 54-62.
- NAUDIN S. (1996).** Le développement embryo-larvaire du danio zébré (*Brachydanio rerio*) : évaluation de ce modèle pour la mesure de la toxicité des effluents et des sédiments. Apports de l'analyse d'images pour les mesures biométriques de l'essai embryo-larvaire. Thèse de l'Université de Metz. 213p.

- NEBEKER A.V. , GRIFFIS W.L., WISE C.M., HOPKINS E. & BARBITTA J.A. (1989).** Survival, reproduction and bioconcentration in invertebrates and fish exposed to hexachlorobenzene, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 : 601-611.
- NEIDERLEHNER B., PONTASH K. PRATT J. & CAIRNS J. (1990).** Field evaluation of predictions of environmental effects from a multispecies-microcosm toxicity test. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19 : 62-71.
- NEIHEISEL T.W., HORNING W.B., AUSTERN B.M., BISHOP D.F., REED T.L. & ESTENIK J.F. (1988).** Toxicity reduction at municipal wastewater treatment plants. *Journal WPCF*, 60, 1 : 57-67
- NEIHEISEL T.W., HORNING W.B., PETRASEK A.C., ASBERRY V.R., JONES D.A., MARCUM R.L. & HALL C.T. (1983).** Effects on toxicity of volatile priority pollutants added to a conventional wastewater treatment system. *EPA-600, S3-83-083* : 18 p.
- NGUYEN D.K. (1995).** Caractérisation des polluants organiques de faibles poids moléculaires (< 600 daltons) dans les eaux usées urbaines. Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon. 159 p. + annexes
- NGUYEN D.K., BRUCHET A. & ARPINO P.(1993).** High resolution capillary GC-MS analysis of low molecular weight organics in municipal wastewaters. The 15th International Symposium on Capillary chromatography, Riva del Garda, Italy, May 24-28 1993. 26 p.
- NIMMO D.W.R., LINK D., PARRISH L.P., RODRIGUEZ G.J. & WUERTHELE W. (1989).** Comparison of on-site and laboratory toxicity tests: derivation of site-specific criteria for un-ionized ammonia in a Colorado transitional stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 : 1177-1189
- OCDE Organisation de Coopération et de Développement Economique (1987).** Monographie sur l'environnement. Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau.
- OCDE Organisation de Coopération et de Développement Economique (1992).** Draft for test guidelines program : fish early life stage-toxicity test.
- ODUM E.P. (1975).** Ecology. 2nd Ed. Molt, Rinehart and Winston Ed., London. 244p.
- ODUM (1984).** The mesocosm. *BioScience*, 34 : 558-562.
- OFFICE INTERNATIONAL DE L'EAU RNDE Réseau National des Données sur l'Eau. LIMOGES (1995).** Bilan de l'assainissement des villes de plus de 10 000 habitants. 20 p.
- OLLIVON D., GARBAN B. & CHESTERIKOFF A. (1995).** Analysis of the distribution of some polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended matter in the river Seine (France). *Water, Air and Soil Pollution*, 81 : 135-152
- OLSON D.L. & CHRISTENSEN G.M. (1980).** Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environmental Research*, 21 : 327-335.
- PAXEUS N. (1996).** Organic pollutants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden. *Water Research*, 30 (5) : 1115-1122

- PAYNE J.F., FANCEY L.L., RAHIMTULA A.D. & PORTER E.L. (1987).** Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86C (2) : 233-245
- PAYNE J.F., KICENIUK J., FANCEY L.L., WILLIAMS U., FLETCHER G.L., RAHIMTULA A. & FOWLER B. (1988).** What is a safe level of polycyclic aromatic hydrocarbons for fish: subchronic toxicity study on Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, 1983-1993.
- PERSAT H. (1988).** De la biologie des populations de l'ombre commun *Thymallus thymallus* (L. 1758) à la dynamique des communautés dans un hydrosystème fluvial aménagé, le Haut-Rhône français. Eléments pour un changement d'échelles. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 223p.
- PETERSEN R.C. (1986).** Population and guild analysis for interpretation of heavy metal pollution in streams. Community Toxicity Testing, ASTM STP 920, J. Cairns, Jr., Ed., *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, 180-198.
- PETERSEN L. B.-M. & PETERSEN R.C. JR (1983).** Anomalies in hydropsychid capture nets from polluted streams. *Freshwater Biology*, 13 :185-191.
- PETERSEN L. B.-M. & PETERSEN R.C. JR (1984).** Effect of kraft pulp mill effluent and 4,5,6 trichloroguaiacol on the net spinning behavior of *Hydropsyche angustipennis* (Trichoptera). *Bulletin d'écologie* : 36, 68-74.
- PETRASEK A.C., KUGELMAN I.J., AUSTERN B.M., PRESSLEY T.A., WINSLOW L.A. & WISE R.H. (1983).** Fate of toxic organic compounds in wastewater treatment plants. *Journal WPCF*, 55 (10) : 1286-1296
- PHILIPPART J.C. (1972).** Age et croissance du chevaine *Leuciscus cephalus* (L.) dans l'Ourthe et la Berwine. *Annales de la société Royale Zoologique de Belgique*, tome 102, fasc. 1-2 : 47-81.
- POHL R. J. & FOUTS J. R. (1980).** A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* 107 : 150-155.
- PONTASCH K.W., NIEDERLEHNER B.R. & CAIRNS J. (1989).** Comparisons of single-species, microcosm and field responses to a complex effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 : 521-532
- POUILLY M. (1994).** Relation entre l'habitat physique et les poissons des zones à cyprinidés rhéophyles dans trois cours d'eau du bassin rhodanien : vers une simulation de la capacité d'accueil des peuplements. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 256p.
- PURDOM C.E., HARDIMAN P.A., BYE V.J., ENO N.C., TYLER C.R. & SUMPTER J.P. (1994).** Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, 8 : 275-285.
- RAMADE F. (1992).** Précis d'écotoxicologie. Masson - Paris, Milan, Barcelone, Bonn - 300p.

- RAPPAPORT S.M., RICHARD M.G., HOLLSTEIN M.C. & TALCOTT R.E. (1979).** Mutagenic activity in organic wastewater concentrates. *Environmental Science & Technology*, 13 (8) : 957-961
- RICKERT D.A. & HUNTER J.V. (1971).** General nature of soluble and particulate organics in sewage and secondary effluent. *Water Research*, 5 : 421-436.
- RICHERT C. (1994).** Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons et d'indicateurs écologiques pour le diagnostic in situ de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 190p.
- RIZZONI M., GUSTAVINO B., FERRARI C., GATTI L.G. & FANO E.A. (1995).** An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome; a mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure. *The Science of the Total Environment*, 162 : 124-137
- ROBERT M., CAMBIER P. & JUSTE C. (1994).** Conditions de l'utilisation des boues de stations d'épuration en agriculture. *Cahiers Agriculture*, 3 : 285-294
- ROFES G. (1994).** Un intégrateur physico-chimique : le sédiment. Gestion intégrée des milieux aquatiques. Presses de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 89-101.
- ROGERS H.R. (1996).** Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *The Science of the Total Environment* 185, 3-26.
- ROGER M.C., FAESSEL B., KOSMALA A. & CHARVET S.** Effect of a wastewater treatment plant effluent on a community of benthic invertebrates. *Hydrobiologia* : soumis.
- ROSSO A. (1995).** Description de l'impact des micropolluants sur les peuplements d'oligochètes des sédiments de cours d'eau du bassin-versant de l'Ill (Alsace). Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 196p.
- SASSON-BRICKSON G. & BURTON G.A. (1991).** In situ and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 : 201-207
- SAXENA J. & SCHWARTZ D.J. (1979).** Mutagens in wastewaters renovated by advanced wastewater treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22 : 319-326
- SCHRODER G.D., ROSS-LEWANDOWSKI S. & DAVIS E.M. (1991).** Evaluation of the toxic effects of selected municipal wastewater effluents on aquatic invertebrates. *Environmental Technology*, 12 : 757-768
- SERVAIS P., GARNIER J., BARILLIER A. & BILLEN G. (1993).** Dégradation de la matière organique à l'aval d'Achères. In Fustec E. & De Marsily G. (Eds). *La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion. Actes de Colloque. 29-30 avril 1993* : 269-287
- SIEGRIST H. & BOLLER M. (1997).** Interdiction des phosphates : conséquences pour l'épuration des eaux. *EAWAG news*, 42 : 9-12.

- SIM T.S., NG W.J., BULICH A.A. & NG K.Y. (1994).** Technical methods section. Toxicity assessment of wastewater treatment processes using the microtox 45% screening test procedure. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9 : 161-164
- SKADSEN J.M., WEBB P.W. & KOSTECKI P.T. (1980).** Measurement of sublethal metabolic stress in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using automated respirometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 15 : 193-206.
- SLOOFF W. (1983).** Benthic macroinvertebrates and water quality assessment: some toxicological considerations. *Aquatic Toxicology*, 4 : 73-82
- SLOOFF W., VAN KREIJL C.F. & BAARS A.J. (1983).** Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4 : 1-14
- SOUTHWOOD, T.R.E. (1988)** Tactics, strategies and templets. *Oikos*, 52 : 3-18.
- STATZNER B., RESH V.H. & DOLEDEC S. (1994).** (Eds) Ecology of the Upper Rhône river : a test of habitat templet theories. *Freshwater Biology*, 31 : 253-556.
- STUBIN A.I., BROSNAN T.M., PORTER K.D., JIMENEZ L. & LOCHAN H. (1996).** Organic priority pollutants in New York city municipal wastewaters: 1989-1993. *Water Environment Research*, 68 (6) : 1037-1044
- SWEET L.I., TRAVERS D.F. & MEIER P.G. (1997).** Chronic toxicity evaluation of wastewater treatment plant effluents with bioluminescent bacteria : a comparison with invertebrates and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 : 2187-2189.
- THELLEN C., CHASSE R. & MARTEL L. (1996)** Ecotoxicologie de la mesure à l'évaluation. Collection Environnement, vol. 20. Messier D., Langlois C. & Deslisle C.E. Eds. Québec
- THURSTON R.V., RUSSO R.C., MEYN E.L., ZAJDEL R.K. & SMITH C.E. (1986).** Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115 : 196-207
- US EPA (1991).** Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluent and receiving waters to freshwater organisms, *United States Environmental Protection Agency* 4th ed. EPA 600/4-90/027
- VALENTIN S. (1995).** Variabilité artificielle des conditions d'habitat et conséquences sur les peuplements aquatiques : effets écologiques des éclusées hydroélectriques en rivière. Etude de cas (Ance du Nord et Fontaulière) et approches expérimentales. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 284p.
- VAN DER WEIDEN M.E.J. (1993)** Cytochrome P450 1A induction in carp as biological indicator for the aquatic contamination of chlorinated polyaromatics. Thesis, University of Utrecht, Research Institute Toxicology, ISBN 90-393-0376-2.
- VAN DER WEIDEN M.E.J., HANEGRAAF F.H.M. & EGGENS M.L. (1994).** Temporal induction of cytochrome P450 1A in the mirror carp (*Cyprinus carpio*) after administration of several polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (5) : 797-802

- VAN DIJK, G.M., VAN LIERE L., ADMIRAAL W., BANNINK B.A. & CAPPON J.J.** (1994). Present state of the water quality of European rivers and implications for management, *The Science of the Total Environment*, 145, 187-195.
- VASSEUR P., FERARD J.F. & BABUT M.**, (1991). The biological aspects of the regulatory control of industrial effluents in France, *Chemosphere*, 22 : 625-633
- VASSEUR P., FÉRARD J.F., VIAL J. & LARBAIGT G.** (1984). Comparaison des tests Microtox et daphnie pour l'évaluation de la toxicité aiguë d'effluents industriels, *Environmental Pollution*, Ser. A (3), 225-235.
- VERNEAUX J.** (1981). Les poissons et la qualité des cours d'eau. *Annales Scientifiques de l'Université de Franche-Comté Besançon*, 4 (2) : 33-41
- VINDIMIAN E., NAMOUR P., MIGEON B. & GARRIC J.** (1991). In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish : barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquatic Toxicology*, 21 : 255-266
- VUORI K.M.** (1995). Species and population responses of translocated hydropsychid larvae (Trichoptera, Hydropsychidae) to runoff from acide sulphate soils in the river Kynönjoki, Western Finland. *Freshwater Biology*, 33 : 305-318
- VUORI K.M. & PARKKO M.** (1996). Assessing pollution of the river Kymijoki via hydropsychid caddis flies: population age structure, microdistribution and gill abnormalities in the *Cheumatopsyche lepida* and *Hydropsyche pellucidula* larvae. *Archiv für Hydrobiologie*, 136 (2) : 171-190
- WALLER W.T., AMMANN L.P., BIRGE W.J., DICKSON K.L., DORN P.B., LEBLANC N.E., MOUNT I., PARKHURST B.R., PRESTON H.R., SCHIMMEL S.C., SPACIE A. & THURSBY G.B.** (1995). In Grothe D.R., Dickson K.L. & Reed-Judkins D.K. (Eds). *Predicting instream effects from whole effluent toxicity tests. Whole effluent toxicity testing. An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts*. SETAC : 271-286.
- WEBER C.I., PELTIER W.H., NORBERG-KING T.J., HORNING W.B., KESSLER F.A., MENKEDICK J.R., NEIHEISEL T.W., LEWIS P.A., KLEMM D.J., PICKERING Q.H., ROBINSON E.L., LAZORCHAK J.M., WYMER L.J. & FREYBERG R.W.** (1989). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. U.S. EPA/ 600/4-89/001, U.S. EPA, Washington, D.C.
- WHITE P.A., RASMUSSEN J.B. & BLAISE C.** (1998a). Genotoxic substances in the St Lawrence system I: Industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St Lawrence, St Maurice, and Saguenay rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 : 286-303.
- WHITE P.A., RASMUSSEN J.B. & BLAISE C.** (1998b). Genotoxic substances in the St Lawrence system II : extracts of fish and macroinvertebrates from the St Lawrence and Saguenay rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 : 286-303.

- WOODIWISS F.S. & FRETWELL C.O. (1974).** The toxicity of sewage effluents, industrial discharges and some chemical substances to brown trout (*Salmo trutta*) in the Trent River Authority Area. *Journal of Water Pollution & Control Federation* : 396-405
- WRIGHT I.A., CHESSMAN B.C., FAIRWEATHER P.G. & BENSON L.J. (1995).** Measuring the impact of sewage effluent on the macroinvertebrate community of an upland stream: the effect of different levels of taxonomic resolution and quantification. *Australian Journal of Ecology*, 20 : 142-149
- XIANG V.J., SCHRÖDER P. & SCHWOERBEL J. (1984).** Phänologie und Nahrung der Larven von *Hydropsyche angustipennis* und *siltalai* (Trichoptera, Hydropsychidae) in einem Seeabfluss. *Archiv für Hydrobiologie, Suppl.* 66, 255-292.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Fonctionnement d'une STEP

• *Composition des eaux usées*

L'eau usée est composée :

- de gros débris
- de particules décantables
- de matières organiques et minérales contenues dans la phase dissoute.

Ces particules et ces matières proviennent de rejets domestiques et en moindre quantité de rejets industriels. Les matières organique, azotée et phosphorée sont présentes en grande quantité dans les eaux usées. D'ailleurs, la qualité des eaux usées s'exprime en équivalent-habitant (eqhab) qui correspond à une quantité journalière de matière organique, de matière en suspension, d'azote et de phosphore. En forte concentration, la matière organique est reconnue pour entraîner des altérations du milieu.

Dans les eaux usées, il peut aussi y avoir :

- des bactéries
- des organismes pathogènes
- des micropolluants apportés principalement par les industries.

Ce sont des composés généralement peu dégradables, difficiles à éliminer et susceptibles d'accumulation comme les métaux et les molécules organiques de synthèse. Leur concentration tend à augmenter avec la taille du réseau d'assainissement.

• *Principe de fonctionnement d'une STEP*

Une STEP est une usine de transformation qui permet d'extraire, de l'eau usée, les particules décantables ainsi que les matières contenues dans la phase dissoute. L'élimination des particules se fait par décantation qui intervient avant et après le traitement biologique.

Le traitement biologique sert à éliminer les matières organiques. Ce sont des bactéries de la rivière, placées dans des conditions favorables (aération), que l'on nomme « boues activées » qui se nourrissent de la matière organique et l'assimilent ou la minéralisent. La matière organique assimilée par les bactéries est piégée car les bactéries sont ensuite décantées au même titre que les matières en suspension. Les éléments minéralisés sont eux rejetés dans la rivière ou l'atmosphère (Guettier *et al.*, 1994).

Les STEP, conçues essentiellement pour l'élimination de la pollution carbonée, éliminent peu les formes azotées et phosphorées. Des aménagements spécifiques du traitement biologique permettent :

- l'élimination de l'ammoniac par sa transformation en azote gazeux avec, comme composé intermédiaire, les nitrates,
- le traitement du phosphore, composé connu pour son rôle dans l'eutrophisation, ce traitement est basé sur son accumulation dans les bactéries.

Les micropolluants contenus dans les effluents de STEP s'adsorbent sur les particules et sont en grande partie éliminés lors de la décantation (rendement de 60 à 90%). C'est le cas des métaux, des hydrocarbures, des organochlorés. Seuls quelques composés tels que le lindane, le pentachlorophénol, l'EDTA ne sont pas éliminés par le traitement de la STEP à cause de leur propriété hydrophile (Marchand *et al.*, 1989 ; Kari & Giger, 1996). Les solvants sont dégagés dans l'atmosphère ou dégradés par les bactéries comme les détergents (l'EDTA étant moins biodégradable que le LAS et le NTA). Les APEO sont bien dégradés mais leur dégradation peut conduire à la formation de produits intermédiaires (NPEO) plus toxiques que les produits initiaux (Ahel *et al.*, 1994a). Il faut noter que le devenir et l'élimination des micropolluants

sont difficiles à estimer car les concentrations dans l'effluent d'entrée sont faibles (Petrasek *et al.*, 1983).

Le terme d'élimination employé dans la description du traitement ne doit pas masquer le fait que les composés soutirés de l'eau se retrouvent dans l'atmosphère ou dans les boues. Les boues sont les bactéries en excès décantées et soutirées du traitement. Ainsi, les deux produits issus de la STEP sont l'eau épurée et les boues, leur composition étant qualitativement identique.

- *Limites de fonctionnement d'une STEP*

La qualité du traitement dans une STEP est fonction de la quantité de matière organique à détruire, de la masse de bactéries épuratrices et du temps de séjour de l'effluent dans le bassin d'aération.

Les STEP sont des usines de transformation à l'air libre. Elles sont basées sur des phénomènes physiques et biologiques qui subissent des variations en fonction des conditions climatiques telles que la température ou la pluie (Aitken *et al.*, 1993 ; Cowan *et al.*, 1996). La pluie entraîne un dysfonctionnement de la nitrification et de la dénitrification dû à un débit trop important dans la STEP. En cas de pluie, la pollution arrivant à la STEP est plus minérale et particulaire d'où une diminution de la biodégradation (Bertrand-Krajewski *et al.*, 1994). La qualité de l'eau à épurer influence également le fonctionnement de la STEP.

ANNEXE 2 : Description des STEP

Les trois STEP sont composées

- d'un prétraitement comprenant un dégrilleur et un déshuileur
- d'un traitement par boues activées composé de bassins d'aération suivi d'un décanteur
- d'un traitement des boues.

Un déversoir existe en tête de STEP.

Châtillon-sur-Chalaronne

Cette STEP a été mise en service en 1982.

Les principaux problèmes de la STEP sont la gestion des boues et les eaux parasites.

Trop de boues étaient remises en circulation, ce qui déstabilisait la STEP. Un épaisseur de boues a été placé sur la STEP pendant l'été 95.

En temps de pluie, l'eau en surplus n'est pas traitée et est rejetée directement à la rivière. Le débit accepté dans la STEP en temps de pluie est souvent un peu élevé : les boues de la STEP sont entraînées par le débit et les eaux de sortie sont alors plus chargées que les eaux d'entrée.

Les eaux de sortie de la STEP passent dans un tuyau et sont rejointes par les eaux du by-pass quand il fonctionne.

Bourg-en-Bresse

Il existe une décantation primaire située entre le prétraitement et le traitement par boues activées dont le temps de séjour est de 2 à 3h. Dans les bassins d'aération, l'eau séjourne environ 4h. Dans les décanteurs secondaires, le temps de séjour est de 3 à 4h.

Pour le traitement des boues provenant de la décantation primaire, la STEP est équipée de digesteurs qui transforment la matière organique en matière minérale grâce à l'action de bactéries anaérobies.

Les boues sont utilisées directement par les agriculteurs ou sont séchées. Comme pour la STEP de Châtillon, le principal problème de la STEP de Bourg-en-Bresse était la gestion des boues. Les lits de séchage étant insuffisants, une centrifugeuse à boue, installée en automne 93, a permis une plus efficace et plus rapide déshydratation des boues. Les boues sont alors stockées puis valorisées en agriculture.

Les eaux de sortie de la STEP passent dans un canal ouvert et sont rejointes par les eaux du by-pass quand il fonctionne.

STEP d'environ 100 000 eqhab, celle-ci est en auto-surveillance. Des analyses en MES, MO (DCO, DBO), NK, Ptot sont effectuées sur place, une fois par semaine. Des analyses de métaux lourds sur boues sont faites annuellement pour vérifier les normes d'épandage.

Montbrison

La STEP a été mise en service en 1985 et est exploitée par la commune. Le réseau est ancien. Il y a beaucoup d'eaux parasites (21 à 25% d'eaux parasites). Les métaux lourds sont présents en faible quantité ce qui autorise l'utilisation des boues en épandage agricole. Par contre, la STEP reçoit beaucoup d'huiles. C'est une STEP où s'opère la 1ère phase de la nitrification ainsi que la déphosphatation.

ANNEXE 3 : Description des trois rivières

- *La Chalaronne*

La Chalaronne est une rivière de plaine appartenant au bassin versant de la Saône. Le site est sur le plateau de la Dombes à 30 km au Nord Est de Lyon. Elle prend sa source dans l'étang de Glareins et se jette dans la Saône vers Thoissey. Elle traverse Villars-les-Dombes avant d'arriver à Châtillon-sur-Chalaronne.

La Chalaronne coule sur des sédiments lessivés déposés durant la glaciation Riss. Le fond du cours d'eau est composé de cailloux ronds, d'argile et de loess.

La station hydrométrique se trouve dans la ville de Châtillon. Une deuxième station hydrométrique se trouve en amont, à Villars-les-Dombes.

- *La Reyssouze*

Comme la Chalaronne, la Reyssouze est une rivière de plaine appartenant au bassin versant de la Saône. Elle prend sa source au pied de la montagne de Journans et se jette dans la Saône à Pont de Vaux. Elle ne traverse aucune ville avant Bourg-en-Bresse.

La géologie de la Reyssouze est identique à celle de la Chalaronne.

La station hydrométrique se trouve à Majornas à côté de la STEP.

- *Le Vizezy*

Le Vizezy traversant Montbrison descend des monts du Forez, région peu agricole. Rivière de montagne contenant peu de cyprinidés en amont de la STEP, elle devient rivière de plaine à l'aval. Il prend sa source dans les Monts du Forez à côté de la roche Gourgon et se jette dans le Lignon qui lui-même se jette dans la Loire. En amont de Montbrison, il ne traverse aucune ville.

Le Vizezy coule sur un sol granitique.

La station hydrométrique se trouve sur le site de La Guillanche.

ANNEXE 4 : Prélèvement et conservation des échantillons

Approche	Méthodes	Effluent	Eau de rivière	Sédiment	Invertébrés de la rivière	Poissons de la rivière
Physico-chimique	Prélèvement	Echantillon moyen sur 24h	Echantillon instantané	Carotte		Muscle
	Conservation	4°C (< 24h)	4°C (< 24h)	4°C (< 24h)		Congelé
Biologique en laboratoire	Prélèvement	Echantillon moyen sur 24h	Echantillon instantané			
	Conservation	Congelé	Congelé			
en bassin de dérivation	Prélèvement	Dérivation de l'effluent et de l'eau de rivière				
	Conservation	Foie et muscle congelés				
Biologique <i>in situ</i>	Prélèvement				Echantillon récupéré au filet Surber et troubleau NF T 90-350	Echantillon de foie et de muscle de poissons (pêche électrique)
	Conservation				Formolé	Foie congelé à l'azote liquide

ANNEXE 5 : Méthodes utilisées pour les analyses physico-chimiques

Les eaux de surface et l'effluent ont été analysés au Cemagref et à l'Institut Pasteur de Lyon alors que les sédiments ont été analysés exclusivement au Cemagref.

Nature de l'analyse	Méthode appliquée
Paramètres physiques	(sur le terrain)
Température	thermomètre WTW LF 196
Conductivité	conductimètre WTW LF 196
pH	pHmètre WTW pH 196
Oxygène dissous	oxymètre WTW oxy 196
Indices globaux	
DCO	NF T 90 101
Azote total (Ntot)	méthodes Cemagref (Namour <i>et al.</i> , 1991)
Azote Kjeldahl (NK)	NF T 90.110
Phosphore total (Ptot)	
Eau	NF T 90.023
Sédiment	NF T 90.023 après fusion alcaline
Carbone organique total (COT)	
Eau	NF T 90.102
Sédiment	Combustion à 1300°C et mesure IR
Carbone organique dissous (COD)	T 90 102 après filtration 0,22 µm
Matières en suspension (MES)	NF T 90.105
Substances eutrophisantes	
Nitrate (NO ₃ ⁻)	NF T 90.012
Nitrite (NO ₂ ⁻)	NF T 90.013
Ammonium (NH ₄ ⁺)	NF T 90.015
Orthophosphate (PO ₄ ³⁻)	NF T 90.023

ANNEXE 6 : Traitements statistiques utilisés

Mesures	Analyses statistiques	Logiciel
Chimie sur Châtillon	Analyse en composantes principales (ACP)	ADE-4 (Chessel et Dolédec, 1992)
Test de toxicité chronique sur <i>Ceriodaphnia dubia</i> et sur <i>Danio rerio</i>	Algorithme USEPA (1991) (NOEC, LOEC) CI10, 20, 50% par interpolation linéaire	Toxstat (Gulley <i>et al.</i> , 1989)
Test de toxicité aiguë	CI50 par la méthode des probits	Toxstat (Gulley <i>et al.</i> , 1989)
Activité EROD	Tests non paramétriques ou transformation en log puis tests paramétriques (ANOVA : analyse de variance) puis test LSD (Lowest statistical difference)	NCSS (Number Cruncher Statistical System 5.01). Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA)
Activité AChE	Transformation en log puis tests paramétriques (ANOVA) puis test LSD	Statistica
Structure de population de chevaines	Analyse de variance (ANOVA)	Statistica
Structure de population d'invertébrés	Analyse de variance (ANOVA)	Statistica
Structure de la communauté d'invertébrés benthiques	Analyse factorielle des correspondances (AFC)	ADE-4

ANNEXE 7 : Calendrier des expérimentations sur les trois sites en 93/94

• Mesures in situ

Bourg-en-Bresse	STATION 1	STATION 2	STATION 3
	<i>eau</i>	septembre 1994	septembre 1994
	<i>sédiments</i>	septembre 1994	septembre 1994
	<i>invertébrés</i>	octobre 1993, septembre 1994	octobre 1993, septembre 1994
	<i>pêche, EROD</i>	novembre 1993	novembre 1993

Châtillon-sur-Chalaronne

	<i>eau</i>	février, juillet - décembre 1994	février, juillet - décembre 1994
	<i>sédiments</i>	septembre 1994	septembre 1994
	<i>invertébrés</i>	décembre 1993 février, avril, juin, août 1994	décembre 1993 février, avril, juin, août 1994
	<i>pêche, EROD</i>	mars 94	mars 94

Montbrison

	<i>eau</i>	août et septembre 1994	août et septembre 1994	août et septembre 1994
	<i>sédiments</i>	septembre 1994	septembre 1994	septembre 1994
	<i>invertébrés</i>	octobre 93, août 1994	octobre 93, août 1994	octobre 93, août 1994
	<i>pêche, EROD</i>	juin 1994	juin 1994	juin 1994

Mesures au laboratoire

	Bourg-en-Bresse	Châtillon-sur-Chalaronne	Montbrison	
	<i>chimie effluent</i>	octobre 1993 septembre 1994	octobre 1993 septembre 1994	juin, septembre 1994
	<i>micropolluants</i>			juin 1994
	<i>tests aigus</i>	octobre 1993	octobre 1993	mai, juin 1994
	<i>tests chroniques</i>	octobre 1993	octobre 1993	juin 1994

• Expérimentations en conditions contrôlées

	<i>tests sur ceriodaphnie</i>	octobre 1993	
	<i>bassin de dérivation</i>		juin 1994

Calendrier des expérimentations sur le site de la Chalaronne en 95.

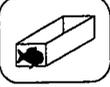
- *Mesures in situ*

	Châtillon-sur-Chalaronne	STATION 1	STATION 2	STATION 3
 <i>eau</i>			février 1995 - février 1996 (tous les mois)	février 1995 - février 1996 (tous les mois)
 <i>sédiments</i>			mars, septembre 1995	mars, septembre 1995
 <i>micropolluants</i>	septembre 1995		septembre 1995	septembre 1995
 <i>sédiments</i>				
 <i>poissons</i>	juin, octobre 1995		juin, octobre 1995	juin, octobre 1995
 <i>en permanence</i>				à partir de mars
 <i>invertébrés</i>			février 1995 - février 1996 (tous les mois)	février 1995 - février 1996 (tous les mois)
 <i>pêche</i>	juin, octobre juin, septembre		juin, octobre juin, septembre	juin, octobre juin, septembre
 <i>EROD</i>				

- *Mesures au laboratoire*

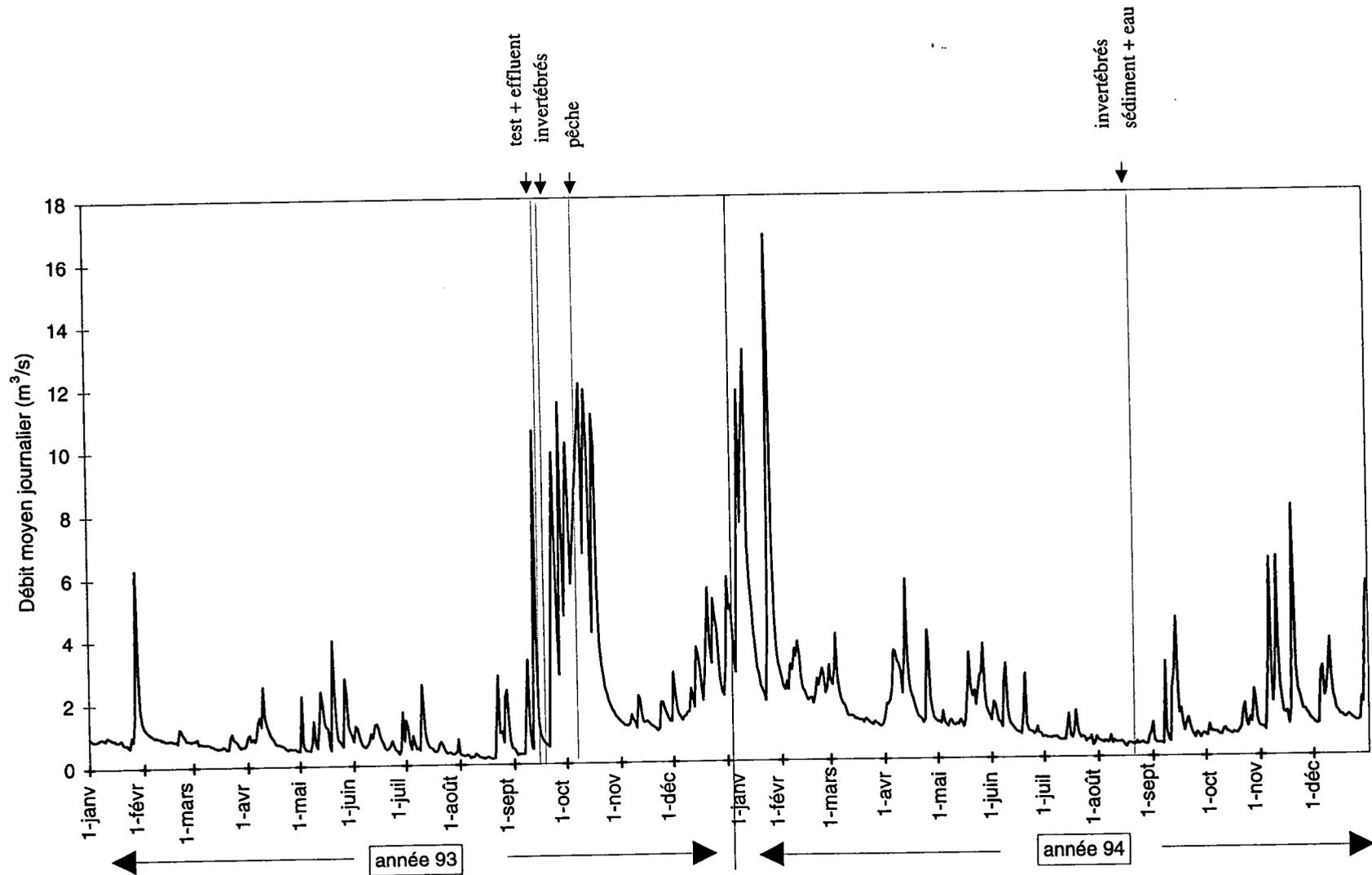
 <i>effluent</i>	février 1995 - février 1996 (tous les mois)
 <i>tests chroniques</i>	février 1995 - février 1996 (tous les mois)

- *Expérimentations en conditions contrôlées*

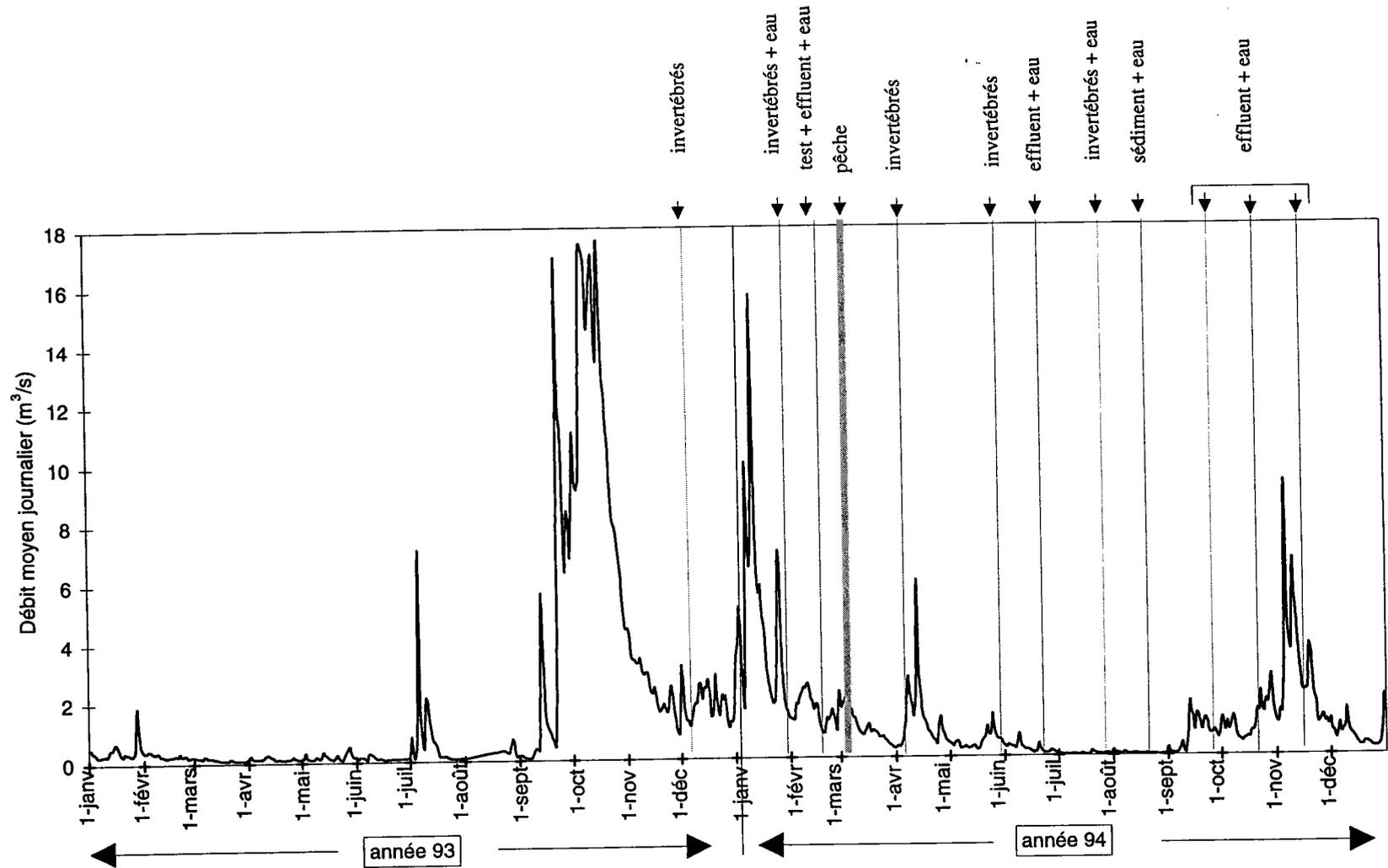
 <i>bassin de dérivation</i>	juin et septembre 1995
--	------------------------

ANNEXE 8 : Débit des trois rivières : la Reyssouze, la Chalaronne et le Vizezy en 1993/94 et prélèvements effectués

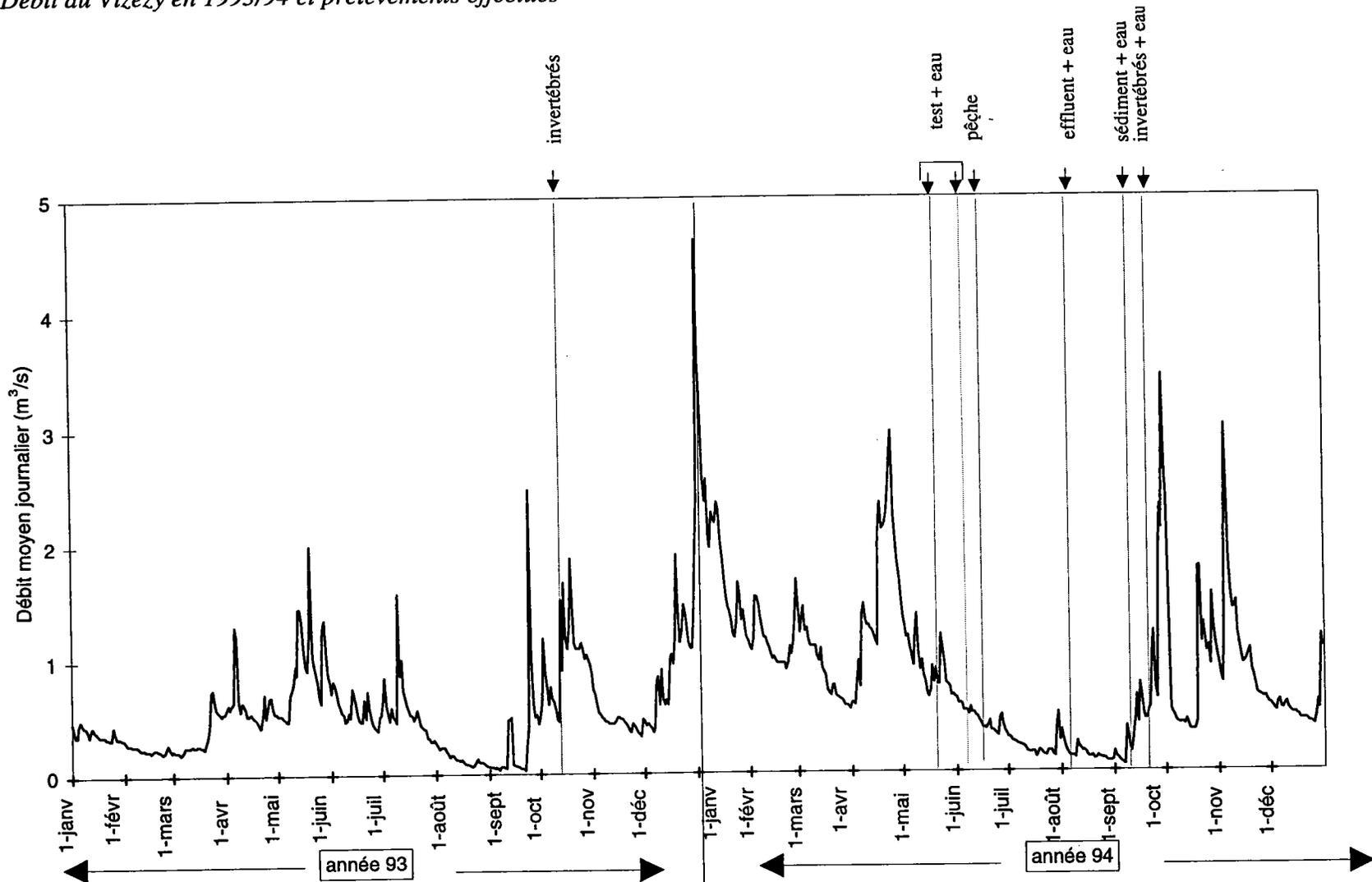
- Débit de la Reyssouze en 1993/94 et prélèvements effectués



- Débit de la Chalaronne en 1993/94 et prélèvements effectués



– Débit du Vizezy en 1993/94 et prélèvements effectués



ANNEXE 9 : Analyses chimiques de l'eau des trois rivières étudiées en amont et aval des STEP

			pH	cond μS/cm	temp C°	O ₂ mg/l	MES mg/l	COT mg/l	Ntot mg/l	NH ₄ ⁺ mg/l	NO ₂ ⁻ mg/l	NO ₃ ⁻ mg/l	Ptot mg/l	PO ₄ ³⁻ mg/l
Reyssouze (STEP de Bourg-en- Bresse)	sept-94	amont STEP (R2)	7,7	315	11,7	9,2	7	12	6,75	0,15	0,46	23,5		0,52
		aval STEP (R3a)	7,9	360	16	6,6	6	13,2	13,3	12	2,3	11,5		3,8
Chalaronne (STEP de Châtillon)	févr-94	amont STEP (C2c)	7,7	194	4,3	12,6	9,5	11		0,12	0,07	8,8		0,15
		aval STEP (C3b)	7,7	223	4,5	12,2	11	10		0,18	0,07	8,1		0,18
	juil-94	amont STEP (C2c)	7,7	360	20	5,2	15	6,9		0,83	0,53	14,8		0,43
		aval STEP (C3b)	7,6	368	20	4,8	9	7,1		1,26	0,79	12,9		0,83
	août-94	amont STEP (C2c)	6,7	369	20	4,9	12	5,15		0,36	0,36	12,6		1,31
		aval STEP (C3b)	6,8	345	20	3,8	15	4,75		0,59	0,82	7		1,6
	sept-94	amont STEP (C2c)	7,9	200	12,5	10,2	36	18,3	5,15	0,28	0,3	10,2	0,26	0,67
		aval STEP (C3b)	8	210	12,9	9,8	43	17,9	4,95	0,43	0,53	9,2	0,32	0,7
	oct-94	amont STEP (C2c)	7,7	175	11,1	9,8	48	11,9	4,05	0,19	0,3	5,8	0,36	0,7
		aval STEP (C3b)	7,7	200	11,2	9,7	44	11,5	4,85	0,25	0,3	6,2	0,33	0,49
	nov-94	amont STEP (C2c)	7,5	185	9,6	11	29	16,2	6,55	0,1	0,2	8,6	0,32	0,75
		aval STEP (C3b)	7,9	220	9,9	10,8	26	14,1	7,35	0,32	0,23	9,4	0,34	0,65
	déc-94	amont STEP (C2c)	8	350	6,5	13	11	6,85	5,75	0,25	0,1	19,6	0,23	0,6
		aval STEP (C3b)	8,1	400	7	13,2	13	8,85	6,45	0,16	0,26	21,4	0,58	0,6
Vizezy (STEP de Montbrison)	août-94	amont ville (V1a)	7,10	50	17,9	8,7	4	4,95	1,2	0,08	0,03	3,4	0,16	0,34
		amont (V1b)	6,8	85	20,5	7	<3	4,65	1,35	0,05	0,03	3,85	0,08	0,15
		amont STEP (V2)	6,8	155	23,7	8,3	7	5,3	1,45	0,05	0,2	2,9	0,14	0,27
		aval STEP (V3b)	6,7	215	24,2	7,1	14	7,8	3,9	0,35	0,79	9,05	0,53	1,13
	sept-94	amont ville (V1a)	7,5	35	10,1	8,9	7	12,5	1,75	0,02	0,07	3	0,14	
		amont STEP (V2)	7	45	11,1	9,6	14	13,3		0,06	0,1	3,4	0,1	
		aval STEP (V3b)	7,3	150	14,1	7	51	21,6		2,5	1,3	7,6	1	

ANNEXE 10 : Faune d'invertébrés benthiques prélevée mensuellement en amont et en aval de la STEP de Châtillon

Station C2c	24-févr	24-mars	21-avr	26-mai	23-juin	21-juil	25-août	21-sept	20-oct	23-nov	22-déc	26-janv	23-févr
Amont STEP													
Trichoptères													
<i>Hydropsyche pellucidula</i>	58	16	47	5	372	182	294	236	185	89	146	99	46
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	22	15	41	207	338	108	321	155	42	30	45	13	8
<i>Hydropsyche exocellata</i>	2	-	4	5	-	17	74	4	-	2	27	19	22
<i>Hydropsyche siltalai</i>	5	4	12	18	5	-	419	203	47	45	70	30	4
<i>Psychomyia pusilla</i>	-	-	-	-	13	1	-	14	60	1	23	54	21
<i>Tinodes waeneri</i>	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	7
<i>Hydroptila sparsa</i>	-	-	-	-	-	2	18	-	-	-	-	-	-
<i>Hydroptila vectis</i>	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
<i>Halesus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	6	1
<i>Halesus digitatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-
<i>Mystacides azurea</i>	-	-	-	-	-	2	-	23	1	2	4	1	-
Ephéméroptères													
<i>Ephemera danica</i>	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	2	6	15
<i>Baetis fuscatus</i>	-	-	44	308	723	37	145	22	12	-	-	-	-
<i>Baetis rhodani</i>	2	31	6	236	151	27	87	10	6	31	33	4	13
<i>Caenis luctuosa</i>	12	5	4	3	10	-	-	1	12	3	6	33	7
<i>Habrophlebia sp.</i>	-	-	3	-	-	-	-	-	6	-	1	1	-
<i>Ephemerella ignita</i>	-	-	62	88	138	8	1	-	-	-	-	-	-
Coléoptères													
<i>Platambus maculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	6	1
<i>Elmis sp.</i>	-	5	26	14	27	2	19	78	12	12	14	25	8
<i>Limnius volckmari</i>	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	1	7
<i>Oulimnius tuberculatus</i>	1	-	-	-	25	17	42	45	24	15	22	32	20
<i>Esolus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
<i>Hydraena riparia</i>	-	-	-	-	-	-	6	61	-	-	-	-	-
Odonates													
<i>Platycnemis sp.</i>	-	-	1	1	6	-	3	25	8	3	17	4	-
<i>Calopteryx splendens</i>	-	1	2	6	1	-	-	-	-	-	-	8	-
<i>Calopteryx virgo</i>	-	-	-	-	-	-	-	6	1	3	4	8	-
Hétéroptères													
<i>Corixa sp.</i>	-	1	4	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Mégaloptères													
<i>Sialis fuliginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-
<i>Sialis lutaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2	3	1
Diptères													
TABANIDAE	-	2	-	-	-	36	16	-	-	2	3	2	-
TIPULIDAE	-	-	-	-	1	-	-	13	-	1	-	-	-
SIMULIIDAE	-	2	18	32	3	137	951	55	24	1413	2502	1589	-
PSYCHODIDAE	-	3	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	2
CERATOPOGONIDAE	24	4	1	3	22	2	-	1	-	17	-	-	-
LIMONIIDAE	4	5	3	-	12	9	2	33	55	47	34	78	48
Atalantinae	12	6	3	-	-	-	3	-	-	-	-	-	47
Hemerodromiinae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36
<i>Athericops crassipes</i>	-	3	-	-	-	-	34	32	-	9	26	44	26
<i>Atherix ibis</i>	-	-	-	-	9	10	20	16	-	5	-	4	1
<i>Ibisia marginata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	4	2
MUSCIDAE	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
DIAMESINAE	-	1	-	-	7	1	2	-	-	28	71	8	26
TANYPODINAE	1	22	1	24	7	87	167	18	7	31	161	139	47
ORTHOCLADINAE	66	321	193	2438	5	172	105	417	88	237	224	805	686
CHIRONOMINI	1	23	50	658	1208	414	674	212	60	82	93	134	72
TANYTARSINI	36	47	18	58	176	145	244	405	18	25	120	252	151

Station C2c (suite)	24-févr	24-mars	21-avr	26-mai	23-juin	21-juil	25-août	21-sept	20-oct	23-nov	22-déc	26-janv	23-févr
Amont STEP													
Crustacés													
<i>Gammarus sp.</i>	75	73	61	152	277	133	516	461	197	217	248	143	44
<i>Asellus aquaticus</i>	-	3	1	2	-	-	-	16	22	18	11	11	9
<i>Orconectes limosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Mollusques													
<i>Valvata cristata</i>	1	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	1	-
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	97	25	46	107	785	-	50	86	178	136	585	456	85
<i>Bithynia tentaculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-
<i>Physella acuta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	2	-	-
<i>Lymnaea palustris</i>	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-
<i>Lymnaea peregra</i>	-	1	4	-	6	-	-	13	1	1	3	3	2
<i>Bathyomphalus contortus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	6	-
<i>Gyrolus albus</i>	-	-	-	2	-	-	-	28	6	2	10	12	3
<i>Armiger crista</i>	-	-	1	-	-	-	-	13	-	-	-	2	1
<i>Hippeutis complanata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7	1
<i>Meneletus dilatatus</i>	1	-	-	-	5	-	40	11	18	21	83	12	2
<i>Ancylus fluviatilis</i>	35	6	5	52	248	-	60	1	143	87	117	42	28
<i>Ancylus lacustris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pisidium casertanum</i>	-	1	-	-	13	-	10	13	-	-	3	10	19
<i>Pisidium henslowanum</i>	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-
<i>Pisidium nitidum</i>	-	-	-	-	12	-	20	52	-	-	21	45	21
<i>Pisidium personatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	16	2
<i>Pisidium subtruncatum</i>	-	-	-	-	12	-	40	14	-	5	8	55	19
<i>Pisidium supinum</i>	-	-	1	-	-	-	-	18	1	15	28	62	28
<i>Sphaerium corneum</i>	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	1	2
Oligochètes													
OLIGOCHETA	559	993	205	780	881	248	550	310	67	147	1170	989	1183
Achètes													
<i>Glossiphonia sp.</i>	-	1	-	24	-	1	3	16	-	-	3	1	1
<i>Erpobdella sp.</i>	12	8	7	13	18	13	50	81	25	19	19	23	28
<i>Hellobdella stagnalis</i>	-	-	2	4	1	6	4	-	-	-	4	-	7
<i>Hellobdella marginata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Piscicola geometra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Station C3b Aval STEP	24-févr	24-mars	21-avr	26-mai	23-juin	21-juil	25-août	21-sept	20-oct	23-nov	22-déc	26-janv	23-févr
Trichoptères													
<i>Hydropsyche pellucidula</i>	16	9	-	-	19	2	-	-	-	20	3	8	4
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	-	4	2	2	52	136	122	1	22	31	128	59	10
<i>Hydropsyche exocellata</i>	-	-	-	-	-	4	1	-	-	1	4	7	2
<i>Hydropsyche siltalai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychomyia pusilla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1	-	-	-
<i>Tinodes waeneri</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	18	-
<i>Hydroptila sparsa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydroptila vectis</i>	-	7	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Halesus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Halesus digitatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mystacides azurea</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Ephéméroptères													
<i>Ephemera danica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	10
<i>Baetis fuscatus</i>	-	-	21	75	1013	314	120	23	18	22	3	-	-
<i>Baetis rhodani</i>	2	-	6	-	9	12	-	-	-	10	37	2	2
<i>Caenis luctuosa</i>	-	7	1	3	14	1	-	-	-	-	-	10	-
<i>Habrophlebia sp.</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ephemerella ignita</i>	-	-	4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coléoptères													
<i>Platambus maculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Elmis sp.</i>	-	-	5	-	1	6	5	1	-	-	-	-	-
<i>Limnius volckmari</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ouliminius tuberculatus</i>	-	-	-	-	-	6	10	-	-	6	-	-	-
<i>Esolus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydraena riparia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Odonates													
<i>Platycnemis sp.</i>	-	2	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
<i>Calopteryx splendens</i>	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Calopteryx virgo</i>	-	-	-	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-
Hétéroptères													
<i>Corixa</i>	25	119	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Mégaloptères													
<i>Sialis fuliginosa</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Sialis lutaria</i>	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Diptères													
TABANIDAE	-	-	-	-	-	1	3	-	2	-	3	1	1
TIPULIDAE	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	3	2	-
SIMULIIDAE	-	-	1	-	3	12	40	-	100	321	923	4	24
PSYCHODIDAE	2	21	5	24	-	-	-	-	-	49	21	-	9
CERATOPOGONIDAE	1	28	2	14	25	-	-	-	-	7	-	-	-
LIMONIIDAE	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	2	2	1
<i>Atalantinae</i>	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hemerodromiinae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-
<i>Athricops crassipes</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	3
<i>Atherix ibis</i>	-	-	-	-	2	-	2	-	1	-	-	-	-
<i>Ibis marginata</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MUSCIDAE	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	2	-	-
DIAMESINAE	13	-	-	1	6	-	-	-	-	-	20	15	6
TANYPODINAE	98	36	-	1	41	202	138	7	-	13	15	13	6
ORTHOCLADIINAE	113	357	55	698	2649	2105	129	375	192	162	561	409	557
CHIRONOMINI	69	220	136	6	1547	674	510	166	52	147	205	55	70
TANYTARSINI	29	89	11	-	152	168	110	24	30	128	211	57	77

Station C3b (suite)	24-févr	24-mars	21-avr	26-mai	23-juin	21-juil	25-août	21-sept	20-oct	23-nov	22-déc	26-janv	23-févr
Aval STEP													
Crustacés													
<i>Gammarus sp.</i>	3	45	1	28	120	172	139	15	70	65	23	46	19
<i>Asellus aquaticus</i>	-	-	1	-	1	-	-	-	19	3	359	6	11
<i>Orconectes limosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
Mollusques													
<i>Valvata cristata</i>	-	-	-	-	-	-	10	6	-	6	8	14	11
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	-	-	7	31	747	-	-	4	7	53	229	141	31
<i>Bithynia tentaculata</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2	2	-
<i>Physella acuta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnaea palustris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnaea peregra</i>	-	6	-	3	5	6	10	1	15	6	6	13	2
<i>Bathyomphalus contortus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gyrolus albus</i>	-	1	-	-	1	2	10	2	1	1	10	7	3
<i>Armiger crista</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hippeutis complanata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Meneletus dilatatus</i>	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	18	1	-
<i>Ancylus fluviatilis</i>	1	10	-	1	3	7	20	14	-	16	52	43	6
<i>Ancylus lacustris</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	4	-	1	-
<i>Pisidium casertanum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	11
<i>Pisidium henslowanum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pisidium nitidum</i>	-	-	-	1	-	-	10	-	-	6	35	48	18
<i>Pisidium personatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	1
<i>Pisidium subtruncatum</i>	-	-	-	13	-	-	-	-	-	7	15	31	18
<i>Pisidium supinum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	19	13
<i>Sphaerium corneum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	8	13	14	9
Oligochètes													
OLIGOCHETA	3073	1274	927	1835	2339	13518	7460	5038	1061	6375	9276	2514	2175
Achètes													
<i>Glossiphonia sp.</i>	-	2	-	-	6	16	5	3	1	8	8	4	7
<i>Erpobdella sp.</i>	77	73	23	23	127	122	260	141	14	124	469	281	84
<i>Hellobdella stagnalis</i>	-	-	-	2	37	37	39	62	4	13	26	17	7
<i>Hellobdella marginata</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Piscicola geometra</i>	-	-	-	-	-	7	10	-	-	-	-	-	-

ANNEXE 11 : Tableau des noms et des codes d'espèces rencontrées dans les différents sites

Nom français	Nom latin	Code
Truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	TAC
Chabot	<i>Cottus gobio</i>	CHA
Truite fario	<i>Salmo trutta fario</i>	TRF
Vairon	<i>Phoxinus phoxinus</i>	VAI
Loche franche	<i>Bartbatula barbatula (Noemacheilus barbatulus)</i>	LOF
Blageon	<i>Leuciscus souffia</i>	BLN
Goujon	<i>Gobio gobio</i>	GOU
Chevaine	<i>Leuciscus cephalus</i>	CHE
Vandoise	<i>Leuciscus leuciscus</i>	VAN
Spirlin	<i>Alburnoïdes bipunctatus</i>	SPI
Barbeau fluviatile	<i>Barbus barbuis</i>	BAF
Perche commune	<i>Perca fluviatilis</i>	PER
Brochet	<i>Esox lucius</i>	BRO
Gardon	<i>Rutilus rutilus</i>	GAR
Carassin	<i>Carassius carassius</i>	CAS
Carpe commune	<i>Cyprinus carpio</i>	CCO
Carpe cuir	<i>Cyprinus carpio</i>	CCU
Carpe miroir	<i>Cyprinus carpio</i>	CMI
Ablette	<i>Alburnus alburnus</i>	ABL
Perche soleil	<i>Lepomis gibbosus</i>	PES
Tanche	<i>Tinca tinca</i>	TAN
Brème bordelière	<i>Blicca bjoerkna</i>	BRB
Rotengle	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	ROT
Poisson-chat	<i>Ictalurus melas</i>	PCH
Pseudorasbora	<i>Pseudorasbora parva</i>	PSR
Silure glane	<i>Silurus glanis</i>	SIL
Anguille	<i>Anguilla Anguilla</i>	ANG

ANNEXE 12 : Pêche électrique sur la Reyssouze, la Chalaronne et le Vizezy en 93/94/95. Les effectifs (N) et biomasses (B, en grammes) ont été estimés par la méthode de Carle et Strub décrite dans le chapitre 2 (§ 3.2.1) et ont été ramenés à 100 m de linéaire pour chaque station. IC représente l'intervalle de confiance de l'effectif à 95% et p est la probabilité de capture. En grisé figurent les résultats considérés comme très peu fiables ($p < 0,1$).

• *Reyssouze (novembre 93)*

	CHA	VAI	LOF	GOU	CHE	VAN	SPI	PER	BRO	GAR	ABL	PES	TAN	ROT	PCH	PSR	
R1	N	37	283	327	498	99	161	-	7663	1	8931	2	32	23	1	18	-
	B	304	468	1180	2856	7335	13158	-	35183	272	151973	14	538	3667	1	604	-
	p	0,27	0,52	0,24	0,27	0,75	0,81	-	0,03	1,00	0,03	1,00	0,80	0,59	1,00	0,48	-
	IC	34	45	222	246	8	7	-	10260	-	7113	-	3	7	-	8	-
R3c	N	-	2	1912	461	54	-	1	-	9	-	206	-	-	21	5	
	B	-	3	6364	2760	3252	-	1	-	142	-	909	-	-	338	7	
	p	-	0,50	0,06	0,09	0,40	-	1,00	-	0,90	-	0,62	-	-	0,84	0,71	
	IC	-	-	2459	576	31	-	-	-	-	-	26	-	-	-	-	

• *Chalaronne (mars 94)*

	TAC	CHA	VAI	LOF	BLN	GOU	CHE	SPI	PER	GAR	CAS	ABL	PES	TAN	BRB	ROT	PCH	PSR	SIL	
C2c	N	1	10	3	268	1	118	147	14	73	116	2	4	162	26	8	877	37	1584	1
	B	291	100	9	736	13	2139	24056	53	478	5549	198	8	1209	3603	511	1202	801	2036	147
	p	1,00	0,90	0,75	0,24	1,00	0,44	0,63	0,87	0,86	0,81	1,00	0,80	0,46	0,76	0,88	0,31	0,49	0,32	0,50
	IC	-	-	-	203	-	47	21	-	2	6	0	-	51	3	-	300	16	404	-
C3b	N	1	-	16	1953	51	440	469	83	133	397	2	54	263	27	45	36	72	554	2
	B	177	-	45	7284	533	8626	22411	585	1723	17705	62	106	1831	1195	3996	57	617	1555	121
	p	1,00	-	0,70	0,12	0,66	0,42	0,54	0,91	0,35	0,60	0,67	0,33	0,53	0,75	0,50	0,79	0,93	0,68	0,67
	IC	-	-	3	1807	9	109	62	-	73	39	-	39	48	3	18	3	-	31	-
C3c	N	1	63	37	1491	277	234	95	178	34	104	-	-	19	11	-	1	6	113	-
	B	299	962	123	5144	4933	4943	8854	1208	470	984	-	-	197	522	-	1	177	403	-
	p	1,00	0,36	0,61	0,49	0,92	0,67	0,78	0,83	0,87	0,90	-	-	0,70	1,00	-	0,50	1,00	0,94	-
	IC	-	43	10	157	3	23	6	8	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
% effectif	0,03	0,89	0,61	35,38	3,85	7,26	6,00	2,97	2,10	5,30	0,04	0,44	3,71	0,58	0,40	8,74	0,96	20,72	0,03	

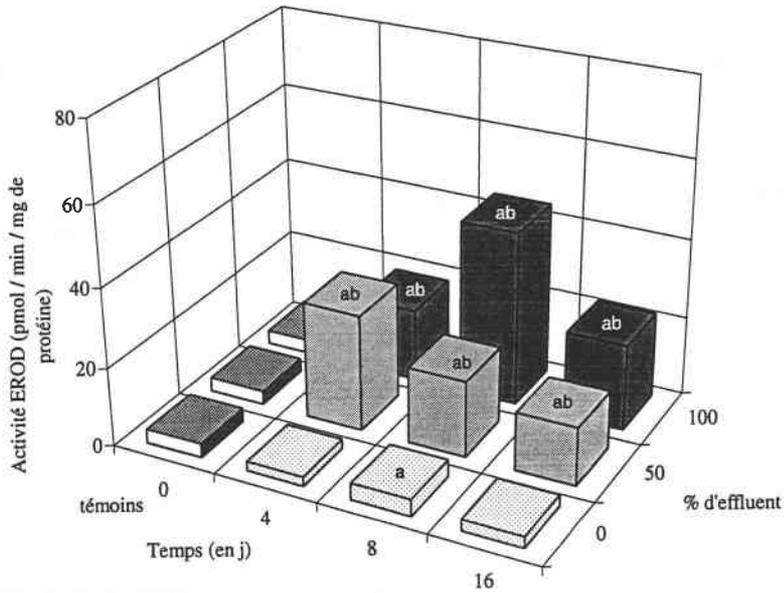
• Chalaronne en 95

		CHA	TRF	VAI	LOF	BLN	GOU	CHE	VAN	SPI	PER	BRO	GAR	CAS	CCO	CCU	CMI	ABL	PES	TAN	BRB	ROT	PCH	PSR	SIL	ANG	
juin-95	C1	N	216	1	-	323	49	155	222	1	161	34	-	82	1	-	-	1	-	141	7	1	-	185	107	-	-
		B	1871	385	-	2212	1188	1254	19843	86	2892	277	-	2683	48	-	-	607	-	1029	875	4	-	3523	582	-	-
		p	0,32	1,00	-	0,11	0,84	0,71	0,69	1,00	0,80	0,42	-	0,75	1,00	-	-	1,00	-	0,36	0,73	1,00	-	0,41	0,57	-	-
		IC	113	-	-	387	2	13	17	-	7	19	-	6	-	-	-	-	-	70	-	-	-	65	21	-	-
	C2c	N	38	-	20	278	39	253	198	1	190	42	2	141	3	4	-	3	2	167	20	42	24	220	27	1	-
		B	854	-	21	928	86	1687	19727	76	490	1217	1389	4596	176	4091	-	7102	80	1399	3438	3347	112	4550	64	756	-
		p	0,94	-	0,86	0,29	0,97	0,79	0,88	1,00	0,86	0,50	1,00	0,71	1,00	1,00	-	1,00	1,00	0,63	0,90	0,82	0,85	0,15	0,92	1,00	-
		IC	-	-	-	162	-	11	3	-	4	18	-	12	-	-	-	-	-	22	-	3	-	242	-	-	-
	C3b	N	23	-	22	295	16	1157	1601	6	69	45	-	276	27	1	-	2	1	1285	28	2	26	136	48	-	-
		B	556	-	23	1390	272	18751	91582	551	366	1696	-	10904	916	1862	-	4803	21	7745	1548	60	281	2882	109	-	-
		p	0,18	-	0,84	0,31	1,00	0,06	0,09	0,86	0,20	0,35	-	0,42	0,49	0,50	-	0,50	1,00	0,12	0,64	1,00	0,40	0,18	0,68	-	-
		IC	28	-	-	155	-	1505	1818	-	74	32	-	85	13	-	-	-	-	1314	6	-	16	146	7	-	-
oct-95	C1	N	65	-	-	57	37	34	282	-	29	17	-	6	-	-	-	-	-	17	146	-	-	24	77	-	-
		B	451	-	-	589	800	1264	17680	-	153	624	-	3309	-	-	-	-	-	197	946	-	-	144	769	-	-
		p	0,38	-	-	0,73	0,57	0,88	0,77	-	0,73	0,57	-	0,55	-	-	-	-	-	0,90	0,53	-	-	0,78	0,62	-	-
		IC	38	-	-	6	11	-	12	-	4	6	-	3	-	-	-	-	-	-	32	-	-	3	14	-	-
	C2c	N	8	-	126	328	6	288	1345	10	837	9	3	96	54	4	1	5	11	324	23	3	5	13	104	1	1
		B	82	-	194	1070	40	2922	16537	527	936	205	2210	3228	5449	6063	1818	5059	165	4024	6275	244	18	1040	474	430	-
		p	0,33	-	0,45	0,14	0,75	0,38	0,45	1	0,41	0,82	1	0,33	0,37	0,8	0,5	0,83	0,63	0,61	0,56	0,75	0,71	0,48	0,22	1	0,50
		IC	7	-	43	355	-	104	162	-	163	-	-	62	34	-	-	-	-	3	33	8	-	7	101	-	-
	C3b	N	2	-	21	57	1	10006	3694	13	73	18	1	218	3016	-	-	-	3	316	19	7	22	52	252	-	1
		B	17	-	24	265	1	144526	80820	1417	194	846	1170	9118	49380	-	-	-	3	3429	1339	30	105	2837	1620	-	574
		p	1,00	-	0,34	0,83	1,00	0,02	0,11	0,65	0,65	0,70	1,00	0,30	0,02	-	-	-	1,00	0,44	0,56	0,29	0,74	0,45	0,14	-	1,00
		IC	-	-	17	2	-	13903	3115	3	12	3	-	133	4199	-	-	-	-	84	7	7	3	24	287	-	-
% effectif		1,16	0,00	0,52	4,51	0,49	39,15	24,59	0,11	2,85	0,55	0,02	2,72	10,20	0,03	0,00	0,04	0,06	7,51	0,92	0,18	0,26	2,07	2,06	0,01	0,01	

• Vizezy (juin 1994)

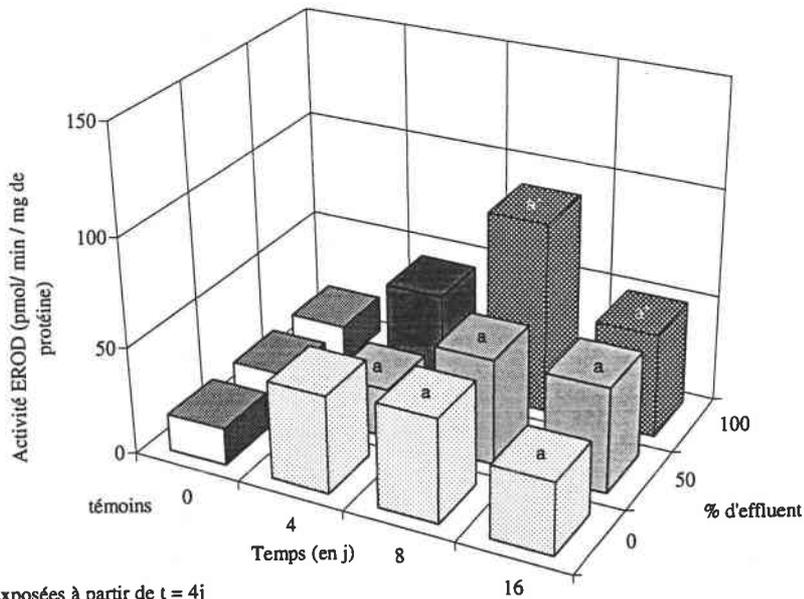
		TRF	VAI	LOF	GOU	CHE	SPI	PER	GAR	PES	TAN	ROT
	N	113	24	41	28	1	-	-	-	-	-	-
V1b	B	3331	89	402	633	60	-	-	-	-	-	-
	p	0,82	0,40	0,49	0,18	0,50	-	-	-	-	-	-
	IC	5	15	17	33	-	-	-	-	-	-	-
	N	21	73	198	252	39	4	2	14	-	-	-
V2	B	615	206	719	2915	2509	138	634	219	-	-	-
	p	0,88	0,59	0,67	0,37	0,76	0,80	0,67	0,50	-	-	-
	IC	-	16	18	101	4	-	-	7	-	-	-
	N	-	1	29	33	32	-	-	2	97	28	356
V3b	B	-	2	111	336	990	-	-	20	210	171	1530
	p	-	0,50	0,61	0,38	0,67	-	-	0,67	0,37	0,77	0,27
	IC	-	-	8	22	6	-	-	-	53	3	214

ANNEXE 13 : Activité EROD des poissons placés dans les bassins de dérivation en septembre 1995



a = différent des témoins ($p < 0,05$)
 b = différent des poissons exposés à 0% d'effluent ($p < 0,05$)

Activité EROD (moyenne sur 12 à 13 individus) des carpes exposées en bassin à l'eau de la Chalaronne et à l'effluent de STEP en septembre 1995.



* = truites exposées à partir de $t = 4j$
 a = différent des témoins ($p < 0,05$)

Activité EROD (moyenne sur 10 à 12 individus) des truites exposées en bassin à l'eau de la Chalaronne et à l'effluent de STEP en septembre 1995

ANNEXE 14 : Paramètres mesurés sur les tests de toxicité sur *C. dubia* et *D. rerio*

Reproduction de *C. dubia* exposée pendant 7j aux effluents des trois sites. En grisé : significativement différent des témoins

Effluent de Bourg-en-Bresse (octobre 1993)	Concentration testée	0	20,8	30	43,3	62,4	90
	Nombre moyen de jeunes / mère	17,6 ±3,6	10,9 ±7,4	10,4 ±3,7	11,8 ±3,7	7,7 ±3,8	2,5 ±1,5
	Nombre de mères	9	10	8	10	9	8
Effluent de Châtillon-sur-Chalaronne (mars 1994)	Concentration testée	0	5,6	11,3	22,5	45	90
	Nombre moyen de jeunes / mère	30,4 ±5,9	34,7 ±6,3	35,2 ±6,1	42,2 ±2,9	39,5 ±7,5	36,2 ±10,8
	Nombre de mères	10	10	10	10	10	9
Effluent de Montbrison (juin 1994)	Concentration testée	0	3,7	7,5	15	30	60
	Nombre moyen de jeunes / mère	29,3 ±10,4	22,5 ±4,1	22,1 ±5,8	24,0 ±7,9	25,9 ±7,0	29,1 ±6,6
	Nombre de mères	10	10	8	10	8	9

Paramètres de toxicité mesurés pendant les tests ELS de *D. rerio* après 10j d'exposition aux effluents des trois sites. En grisé : significativement différent des témoins

	Critère de toxicité	Concentrations d'effluent testé (en %)						
		0 (Témoins)	14,4	20,8	30	43,3	62,4	90
Effluent de Bourg-en-Bresse (oct. 1993)	œufs blancs / 50 à 24h	2,9 ±0,9		3,5 ±1,9	4,5 ±1,7	5,4 ±1,6	5,4 ±1,9	8,7 ±5,3
	nb total d'éclos / 30	29,7 ±0,2		29,3 ±0,2	27,7 ±2,5	27 ±3	24,3 ±0,8	21,7 ±2,5
	nb de larves survivantes	29 ±1		26,9 ±0,1	30 ±0	28,6 ±1,2	27,9 ±1,7	7 ±4,9
	taille (mm)	4,8 ±0		4,6 ±0,3	4,6 ±0,3	4,3 ±0,3	4,2 ±0,3	4 ±0,3
Effluent de Châtillon-sur-Chalaronne (mars 1994)	œufs blancs / 50 à 24h	2,3 ±1,5		1 ±0	3 ±3,2	2,2 ±2,2	2,3 ±1,2	1,6 ±1,2
	nb total d'éclos / 30	29,7 ±0,5		30 ±0	29,7 ±0,2	30 ±0	29,7 ±0,2	30 ±0
	nb de larves survivantes	30 ±0		28,7 ±1,5	29 ±1	28,3 ±1,5	28,0 ±1,0	28,3 ±1,5
Effluent de Montbrison (juin 1994)	œufs blancs / 50 à 24h	1,5 ±1,9	2,5 ±1,3	3,2 ±3,2	3,4 ±1,0	4,5 ±1,5	3,7 ±2,6	1,2 ±1
	nb total d'éclos / 30	29,7 ±0,5	29,7 ±0,2	30 ±0	29,7 ±0,5	30 ±0	29 ±0,6	30 ±0
	nb de larves survivantes	28,6 ±0,6	26 ±1	27 ±0	24,3 ±5,2	26,7 ±1,2	8,5 ±9,4	18,3 ±6,1

ANNEXE 15 : Survie, reproduction (en nombre de jeunes : moyenne±écart-type) et longueur (in μm : moyenne± écart-type) de *Ceriodaphnia dubia* à la fin du test de toxicité chronique de 7 jours de mars 95 à février 96. (*Ceriodaphnia dubia* a été exposé à l'eau de la Chalaronne A et à deux concentrations d'effluent de STEP dilué avec de l'eau de rivière B et C (10 réplicats par échantillon testé)

	A eau de rivière			B 90% effluent			C effluent à la CER estimée ^a			
	Survie	Reproduction	Longueur	Survie	Reproduction	Longueur	Survie	Reproduction	Longueur	CER (%)
24-Feb	10	33± 7	1029±50	10	14±6 *	813±204 *	9	23±11 *	988±66	NM ^b (50) ^c
24-Mar	10	36±10	1068±80	7	24±11*	979± 75	10	37± 5	1082±74	5
21-Apr	10	29± 4	931±46	10	23± 9	888± 44	9	28± 8	936±63	12
26-May	9	39± 7	983±50	0 *	-	-	9	30± 9 *	947±75	16
21-Jul	10	31± 8	1023±60	3 *	1± 1 *	683± 35 *	10	21± 9	929±58	14
								*		
29-Sep	10	34±11	999±64	8	9± 3 *	795± 71 *	9	40± 6	960±59	4
20-Oct	9	45±10	983±4	8	19± 7 *	941± 25	10	38± 9	997±38	1
23-Nov	9	27± 7	948±36	10	15± 5 *	901± 58	10	22± 3 *	925±47	2 (20)
22-Dec	10	21± 6	991±32	10	9± 3 *	883± 35 *	10	27± 6	978±35	3
26-Jan	10	27±11	1047±6	9	16±10*	984± 37 *	10	34±10	1034±55	2
23-Feb	10	43±13	1053±65	10	41±13	945± 78 *	10	46± 9	1024±42	1

* : significativement différent ($p < 0.05$) selon les tests statistiques préconisés dans US EPA (1992). ^a CER estimé : Concentration de l'effluent dans la rivière obtenue par les données de débit en temps réel. ^b NM : non mesuré. ^c entre parenthèses : concentration d'effluent testé en C quand la concentration d'effluent testée est différente de la CER.

Article 1

Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using fish biomarker EROD : field and on-site experiments.
Ecotoxicology and Environmental Safety, sous presse.

**Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using fish biomarker
EROD: field and on-site experiments.**

KOSMALA A., MIGEON B., FLAMMARION P., and J. GARRIC

*Cemagref, Laboratory for Ecotoxicology, 3 bis quai Chauveau, 69336 LYON cedex 09,
FRANCE*

The impact of a wastewater treatment plant (WWTP) effluent was assessed by the fish biomarker ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) using field and on-site laboratory experiments. EROD activity was measured on chub (*Leuciscus cephalus*) and stone loach (*Noemacheilus barbatulus*) caught at 3 sites of the Chalaronne river (South East, France). Liver somatic index (LSI) and organochloride bioaccumulation in muscle were estimated on chub only. In September, EROD activity and LSI of chub increased significantly between the sites above and below the WWTP effluent discharge. EROD induction detected in chub was confirmed by on-site tank experiments. EROD levels were determined on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to different concentrations of the WWTP effluent and the river water for 16 days. After a 4-day exposure, EROD activities of the carp exposed to the effluent increased significantly compared to the control. The response was linked to the effluent concentration and was stable with exposure time. WWTP effluent induced EROD activity whereas organic and metal analyses, performed on fish muscle and sediment, did not show any difference between upstream and downstream the discharge.

Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using fish biomarker

EROD: field and on-site experiments.

KOSMALA A., MIGEON B., FLAMMARION P., and J. GARRIC

Cemagref, Laboratory for Ecotoxicology, 3 bis quai Chauveau, 69336 LYON cedex 09,

FRANCE

INTRODUCTION

Most of the major pollutants, such as PCBs, PAHs, surfactants, solvents, metals, are usually present in municipal wastewaters at relatively low concentrations (less than 10 µg/l). However, some compounds have been detected at specific WWTP in much higher concentrations (De Alencastro and Tarradellas, 1983; Nguyen et al., 1994; Petrasek et al., 1983). The activated sludge process commonly used in wastewater treatment is not aimed to remove the toxic compounds but it can actually remove up to 90% of them. Nevertheless, the concentrations of several compounds in the treated effluent were sufficiently high to be of environmental concern (Petrasek et al., 1983).

The toxicity of WWTP effluents was studied through various bioassays using fish or aquatic invertebrates and showed the time variability of the effluents. (Garric et al. 1996; Schroeder et al. 1991). Because of the variability and the complexity of the effluent, the impact assessment of the WWTP discharges in the receiving water is difficult. Moreover, multi-point source pollution, added to agricultural pollution, makes often impossible to establish a clear relationships between in situ effects and discharges. Some authors used caged fish (Grizzle et

al. 1988) or macroinvertebrates community structure (Monda et al., 1995; Wright et al., 1995) to measure the impact of WWTP effluent in the receiving freshwater.

Moreover, the analysis of micropollutants in sediment or in organisms can give an information on the contamination of sites above and below an effluent discharge. Fish liver weight measurement, usually associated with the hepatic enzymes activities is an indicator of exposure to chemical pollutants and of fish health (Grizzle et al., 1988; Sloof et al., 1983).

Representing toxicant-induced changes in biological systems, the biomarkers such as the induction of hepatic cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in fish, are useful to detect a source of contamination and its associated biological effects in the receiving waters (Payne et al., 1987). The P450 system reacts to the presence of aromatic and chlorinated organic compounds like PAHs or PCBs leading to the induction of metabolizing enzyme activities such as the ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity (Goksoyr and Förlin, 1992; Monod et al., 1988; Spies et al., 1982).

The objectives of this study were to assess the impact of a WWTP through biological (fish EROD activity, fish liver somatic index) and chemical data. Fish EROD activity was measured through on-site experiments and in situ studies. Both approaches were helpful to detect the specific impact of a WWTP discharge in a river receiving pollution from several origins.

MATERIALS AND METHODS

The study area was the Chalaronne river and the WWTP of Châtillon-sur-Chalaronne near Lyon. The WWTP receives domestic and industrial discharges and is designed for 6,000 population equivalent. Field studies and on-site experiments were carried out in June and September 1995.

Field studies

Studies were carried out in Chalaronne river, a medium-size river receiving effluents from the WWTP. Three sites were sampled (Fig. 1). The first site located upstream from the town of Châtillon is a low contaminated area. The second site upstream from the WWTP discharge receives stormwater overflow from the combined sewerage system. The third site is downstream from the WWTP discharge. At each site, two cyprinids species, chub (*Leuciscus cephalus*) and stone loach (*Noemacheilus barbatulus*), were caught by electrofishing.

Chub was selected because it is a very common pelagic species in European rivers. Loach is a benthic and sedentary species and should provide information on sediment contamination. Fish were collected for EROD, LSI and micropollutant concentration measurements.

On-site experimental tank

An on-site experimental device was set up in the WWTP area. Three tanks were supplied with the WWTP effluent and the Chalaronne river water. Tanks were 1.8 m long, 0.75 m wide and 0.55 m high. The volume of water available for the fish was 500 l per tank and the water flow was 800 l per hr. Two tanks received respectively the WWTP effluent (100% V/V) and diluted with the Chalaronne water (50% V/V). The 50% dilution rate is the maximum instream waste concentration of effluent observed during the last decade. During exposure, the

effluent concentration of the tank containing a mixture of Chalaronne water and effluent was $47\% \pm 6\%$. The variations of the effluent rate were due to the deposit plugging the pipes and reducing the flow.

Oxygen and temperature were measured every 15 minutes. Conductivity, pH and flow were measured daily. Ammoniac concentration was measured at least 3 times a week. Air was injected in the tank water to increase the dissolved oxygen concentration and, by this way, to prevent fish from hypoxia. Ammonia and oxygen were controlled in the tank because it is well known that fish species (especially rainbow trout) are sensitive to these two parameters. Moreover, un-ionized ammonia is a major toxic component of treated domestic wastewater (EIFAC, 1973). In the river supplied tank, temperature and dissolved oxygen varied respectively between 14-16°C and 7.3-8.6 mg O₂/l in June and between 12-18°C and 5.6-9 mg O₂/l in September. Conductivity was about 300 μS/cm for both periods. In the 100% effluent supplied tank, temperature and dissolved oxygen varied respectively between 14-17.5°C and 2.9-7.3 mg/l in June and between 16.5-20°C and 2.4-7.0 mg/l in September. Conductivity was about 600 μS/cm.

40 juvenile rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) and 40 juvenile mirror carps (*Cyprinus carpio*), obtained respectively from local hatcheries were placed in the 3 experimental tanks. Trout species was selected for the study because it is a well-known laboratory model. Unfortunately, trout is sensitive to ammonia, temperature and dissolved oxygen. The cyprinid species was selected because of its resistance to these effluent parameters and its better representativity regarding the river fish population, mostly composed of cyprinid species. Carp were easy to get from fish farm. Moreover, carp were already used as a P450 inducible organism (Rivière et al., 1990; van der Weiden, 1993).

In June and September, the average total length (weight) was respectively 12 and 10 cm (22 g and 12 g) for the trout, and 14 and 21 cm (70 g and 250 g) for the carp.

Because of the physico-chemical conditions in the 100% effluent tank, important trout mortality occurred, up to 4-day exposure (68% in June and 56% in September). Thus, only 4-day exposure was considered in the induction experiments with trouts. Groups of 10 trouts were successively exposed during 16 days to assess the inducing activity of the undiluted effluent with time. In June, three groups of trouts were exposed for 4 days to the effluent.

In September, two groups were exposed : the first one for 4 days and the second one for 11 days. No mortality occurred for this last group during this time.

Positive control for EROD induction was obtained by intraperitoneal injection of fish with β -naphthoflavone (BNF) (SIGMA, France) solved in arachid oil at a concentration of 25 mg/kg in carp and 0.5 mg/kg in trout. These BNF concentrations were previously shown to induce significantly EROD activity respectively in trout and carp (Flammarion et al., 1996; Rivière et al., 1990).

EROD activity of 10 carps and 10 trouts was measured at the beginning of the experiments and considered as control values.

Fish were fed twice a day with a trout food (Trouw, France) at the rate of 1% fish weight. Ten fishes of each species were sacrificed at 4, 8 and 16 days.

Fish placed in the tank supplied by river water showed no signs of stress or physical damage due to confinement.

Sampling of fish

Fish were killed by cervical dislocation. They were weighed and total body length was measured. Liver was rapidly excised and weighed in chub but not in loach because of the liver size. Liver somatic index (LSI) was calculated for chub.

The liver was rinsed in 150 mM KCl, homogenized in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8 with 20% glycerol and poured into cryotubes. Liver homogenates were frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C before enzymatic assay.

EROD assay

EROD activity was measured on S9 supernatants of liver homogenates using a modified Pohl and Fouts (1980) procedure. Protein content was measured by the method of Lowry et al. (1951). EROD activity was expressed in pmol of resorufin per mg of S9 protein and per min. Sometimes, we used the EROD induction rate which is defined as the ratio of the EROD activity of a fish to the average EROD activity of fish of the same species and sex (for on-site experiment, as we used juveniles, no sex difference was considered) caught in the reference area. For on-site experiments, EROD activity of the fish sacrificed at the beginning of the experiment was considered as the reference.

Chemical analysis

The chemical analyses of organic compounds in river sediment and in fish (chub and carp) muscle from both field studies and on-site experiments were carried out following a multiresidue procedure suitable for the determination of 132 molecules (EEC 76/464). 10 g of muscles from 10 fishes were pooled (without sexual distinction for chub). Organic extracts obtained using dichloromethane and Soxhlet extraction were analysed with GC-MS, GC-FID-

ECD and HPLC. For fish muscle, the extraction was microwave-assisted. Metal contents in sediment were determined by atomic absorption spectrophotometry.

Data analysis

Statistical procedures to detect significant effect on mean EROD activity were performed using the two-tailed Mann-Whitney U-test because of the heterodasticity of the EROD frequency distributions.

RESULTS

Field studies

- Chemical data

4 PCBs congeners and HCB were detected at low concentrations in fish sampled upstream and downstream the WWTP effluent discharge (Table 1). Significant lindane and pp'DDE concentrations in chub muscle were measured at the sampling sites. Phenol and methylphenol were accumulated in fish only below the WWTP.

In sediment, we did not notice any metal concentration differences between the two sites respectively above and below the WWTP except for Cu and Hg (Table 2). However, we noticed an increase of metal (Cu, Hg, Pb and Zn) concentrations between the two sites respectively above and below the town. All sites were contaminated by chromium and nickel.

PAHs were detected upstream and downstream from the WWTP.

- EROD and LSI data

Significant EROD differences between sites were only detected for chub in September and for loach in June. A 2-fold induction was observed for chub between sites upstream and downstream from the WWTP, while an EROD activity decrease was observed for female loach between the same two sites (Fig. 2). An induction trend was also observed for male chub in June (Mann-Whitney test, $p=0.08$). Besides, sexual EROD dimorphism was higher in June for both species. Female EROD levels were low in June while male EROD levels were stable between June and September.

LSI of chubs increased significantly at upstream vs downstream sites except for female in June (Table 3). In September, an increase of chub LSI was measured between the sites surrounding the WWTP.

On-site experimental tanks

- Chemical data

Chemical analysis on carp muscle only detected an accumulation of lindane (around 0.3 $\mu\text{g/g}$ lipid weight) after 16-day exposure. In June, we found lindane in carp exposed to river water and 100% effluent. In September, lindane was detected only in carp from the two tanks supplied by the effluent.

- EROD data

Globally for both species, an EROD induction was found in comparison to the control values, even for fish in the tank supplied by Chalaronne water (Fig. 3 and 4). Furthermore, fish EROD activity was significantly induced from 4-day exposure to the effluent.

For carp in June and September, EROD activity increased with the effluent concentrations whatever the exposure time was.

On the contrary, we did not observed an increasing time-EROD activity relationship throughout 16-day of exposure, whatever the effluent concentrations or the species tested. After 4-day exposure, we only observed a low increase of the mean EROD activity, which reached a maximum at 8-day exposure, then decreased or remained stable until 16-day.

With trout no significant EROD activity difference was noticed between Chalaronne water and 50% diluted effluent, whatever the season or the duration of exposure.

Nevertheless, fish exposed to the 50% diluted effluent showed a significant EROD increase compared to the control values. But in June, where EROD activity of the control was higher than customly measured (Flammarion et al., 1996), trout EROD activity after 4-day exposure only, was not significantly different from the control.

In june in the 100% effluent tank, the concentration of un-ionized ammonia calculated following Emerson et al. (1975) reached lethal concentration for rainbow trout (Arthur et al., 1987) with a maximum detected of 0.53 mg/l, and explained the mortality of fish.

However all the three groups of survival trouts, exposed successively to the 100% effluent during 4 days, showed a significant induction compared to control and to river water exposed trouts in the same conditions. In September induction occured only after 11 days of exposure.

In the tank supplied by river water, carp EROD activity increased significantly between 4 and 8-day for both season, and then decreased at 16-day exposure (Mann-Whitney $p < 0.05$ in June and $p = 0.1$ in September). For the trout in June, the same increase of EROD activity occured at the beginning of the exposure but fish remained induced until the end of experiment. No more trout EROD activity increase occured between 4 and 16 days of exposure in September.

Between the experiments of June and September, the induction rate of carps exposed to the undiluted effluent was reduced by 3, while EROD levels of trouts were similar during the two experiments.

For fish exposed to 50% of effluent, EROD induction rate of carp (equal to 10) was generally higher than trout (equal to 3.4). It reached a level of 24 for carp exposed to undiluted effluent.

In September, we could also notice a less important increase of the EROD activity than in June, for fish exposed to the river water versus the control.

DISCUSSION

Field studies

- Chemical data

PCBs and chlorinated insecticides (DDT, lindane) were found in WWTP effluents (Marchand et al., 1989). In our study, a contamination by several ortho-substituted PCBs which are not specific EROD inducers (Van der Weiden, 1993) was found for chub sampled in both sites downstream and upstream from the WWTP. This last site was contaminated too, because of a stormwater discharge in this area. Miskiewicz and Gibbs (1994) also detected organochlorines (HCB, lindane, chlordane, pp'DDE,...) in fish caught near a sewage outfall. As the same compounds are present in the two sites surrounding the WWTP, we can conclude to the same origin of the pollution, i.e. the WWTP effluent going to the river before treatment because of stormwater overflow, or going continuously to the river after treatment.

PAHs were present in river sediment from the site below the city. Marchand (1989) and Makepeace (1995) detected HAPs in respectively both WWTP effluent and stormwater samples. Their main source is incomplete combustion of gasolines or coal. The concentrations

of PAHs were 3 times higher than in sampled sediment below a big industrial french town. Considering PCBs and HAP_s concentrations in fish or sediment, the station receiving untreated stormwater effluent seemed more contaminated than the station downstream from the WWTP.

At last, the presence of phenol in the muscle of chub caught downstream from the WWTP might be due to a pharmaceutical industry connected to the WWTP.

Globally, we did not notice a specific impact of the WWTP discharge on metal increase. For both metal and organic compounds, effect of the city of Châtillon and stormwater effluent seemed more important to explain the contamination increase, compared to the reference station. Stormwater overflow discharges are known to contain metals (Lara-Cazenave et al., 1994; Makepeace et al., 1995) and can explain the observed increase of Cu, Hg, Pb and Zn between upstream and downstream from the town. The WWTP discharge brought Cu and Hg too. In previous studies, copper in the Châtillon WWTP effluent could reach a concentration up to 2 mg/l (Garric et al., 1996).

- EROD and LSI data

The within groups EROD variability was high, but same results were observed in the literature (Flammarion et al., 1996; Kloepper-Sams and Benton, 1994; Lindström-Seppä and Oikari, 1989; Soimasuo et al., 1995). Through fish EROD measurement, we could detect a significant impact of the WWTP effluent for chub in September. The lack of EROD response of female chub in June may be related to the spawning period. Fish females are less responsive to inducers immediately before and during spawning, due to elevated levels of estrogens (Kloepper-Sams and Benton, 1994).

Comparing the induction rate (maximum of 3.5) with other induction rates obtained in different contaminated area (1.5 to 15) by Vindimian et al. (1991, 1993), we concluded to a non high-marked impact of WWTP effluent. But the impact also was detected by the significant increase of LSI measured on chub, except for female in June. Grizzle et al. (1988) already noticed liver enlargement in fish exposed to WWTP effluent. From laboratory experiments, it is known that exposure to xenobiotic compounds often results in liver enlargement, usually associated with the induction or the stimulation of hepatic enzyme activities (Sloof et al., 1983). Hypertrophy and hyperplasia seem to be the main causes of the liver enlargement (Goede and Barton, 1990). In this study, LSI was found to be an indicator of WWTP impact as sensitive as EROD activity. However, even if both EROD activity and LSI were increasing in September for chub, the two parameters were found not to be related considering individual data.

The decrease of EROD activity in loach, which occurred between the three sites, could be explained by this species' behavior. Loach is a sedentary benthic species in contact with the Chalaronne river sediments which were contaminated with metals, in particular with Cr, Cu, Pb. Metals are known to reduce monooxygenases induction, such as cadmium (Förlin et al., 1986) and copper (Flammarion et al., 1996). A laboratory study using a Châtillon WWTP effluent sample with high metal contents, showed no EROD induction for trout (Garric et al., 1996).

In our study, no link was found between EROD activity increase of chub from both sites, above and below the effluent, and analysed chemicals. On the contrary, Van der Oost et al. (1991) found correlations between EROD levels and PCBs and PAHs concentrations.

Some hypothesis may be examined to explain the different EROD levels observed upstream and downstream from WWTP. Below the treatment plant, EROD induction of chub could be enhanced by the continuous discharge of inducers in the treated effluent. In the opposite, a

periodic discharge of inducers from stormwater overflow could not have constant and significant effect on the induction of EROD activity. It is known that the EROD induction decreases when fish are no more exposed to inducers (van der Weiden, 1993). So, the sampling of fish twice a year was certainly not sufficient to detect any periodically biological response. Moreover, chemical analysis of sediment and fish sampled above and below the effluent did not detect other inducers than PAHs and PCBs. But, only one sampling or inappropriate analytical methods could fail to identify all the chemicals.

From our results, EROD activity measurements appeared to be a more useful signal of a WWTP impact on the receiving freshwater than chemical analysis on water or sediment.

On-site experimental tanks

Caging techniques offer several advantages in aquatic toxicology compared to field studies on fish (Soimasuo et al., 1995):

- selection of a desired species and of its particular developmental stage is possible. This selection allows a better control of the variability compared to field studies
- fishing effort allocation to catch the same species on the different sampled sites is suppressed
- fish mobility is avoided which removes a source of variability
- the use of fish from hatchery avoids the problem of fish which might be pollution-adapted
- endogenous fish population is not disturbed.

More, compared with caging techniques, on-site experimental tanks allowed to control effluent concentrations. Finally, vandalism is avoided because the tanks were placed in the WWTP area.

Caged fish were already used as a monitoring tool and this method was proved to be reliable (Haasch et al., 1993; Jedamski-Grymlas et al., 1994; Lindström-Seppä and Oikari, 1989).

However, caged fish may suffer from density stress, which could increase cortisol levels (Bucheli and Fent, 1995). As cortisol was shown to potentiate induction of EROD activity in trout hepatocytes cultures (Devaux et al., 1992), we can suspect that caging may influence EROD activity.

- Chemical data

Time exposure of 16 days may have been too short to expect a significant bioconcentration of xenobiotic in fish muscle. Lindane measured in both fish exposed to the effluent and fish exposed to the river water is one of the most bioavailable compounds which can accumulate easily in fish flesh. The origin of this contamination is probably double: agricultural origin (contaminated area upstream from the WWTP) or WWTP effluent origin (contaminated area downstream from the WWTP). Lindane is one of the rare pollutants not to be eliminated by the activated sludge process because of its chemical properties (Petrasek et al., 1986).

- EROD data

Both in June and September, the WWTP effluent induced EROD activity, even if the induction rates of carp were different between the two experiments. The concentration-EROD activity relationship observed with carp confirmed this inducing effect.

Except for carps exposed to 100% effluent in September, we noticed stable levels of EROD activity throughout the experiments for fish exposed to the effluent. This stability could be due to the persistence of the EROD induction after an episodic discharge of inducers. Kloeppers-Sams and Benton (1994) reported that EROD activity did not show any significant loss for at least 8 days. However, Haasch et al. (1993) and Melancon et al. (1987) showed the reversibility of EROD activity of carp after 20 days. The successive experiments of 4-day exposure with trout in 100% effluent underlined the constant inducing effect of the WWTP

effluent with time. They allow to conclude that the induction obtained with fishes exposed during 16 days was not due to a peak of inducers but rather to a continuous discharge of such compounds from a treated WWTP effluent.

For carps exposed to 100% effluent, we could observe a significant decrease of EROD activity with time from 4-day exposure. Municipal effluents contains multiple compounds more or less toxic and with possible antagonistic or synergistic effects on the EROD induction. Thus, the EROD activity decrease observed could be due either to a change with time of the inducers contained in the effluent or to a toxic effect with time which affected the inducibility of fish EROD activity.

Indeed, hepatotoxic damage can inhibit the ability of the liver cells to produce enzymes (Adams et al., 1992) and reduce fish EROD activity. Melancon et al. (1987) also observed an increase and then a decrease of EROD activity with time. They explained this specific EROD response either by a decrease of inducing agent present in the water, or by a fish response which became refractive to induction.

At last, we observed a slight inducing effect of Chalaronne water on fish EROD activity. Melancon et al. (1987) already detected an EROD induction of carp exposed to a river water compared to carp exposed to dechlorinated city water.

One explanation of EROD induction variations for fish exposed to Chalaronne water is the possible discharge of inducing contaminants brought by stormwater in the river. In our study, the increase of fish EROD activity was more important in June, especially between 4 and 8 days of exposure. At this time, the mean daily flow in the river was 4-fold higher than the monthly mean flow because of a storm.

CONCLUSIONS

On-site exposure of fish to WWTP effluents allowed to measure EROD activity induction, and to detect the presence of inducer compounds. Carp are more adapted than trout for such on-site experiments with WWTP effluent. A 4-day exposure was enough to measure a significant effect of effluent on the EROD induction. At last, in the river, chub, more than loach, was found to detect an EROD induction also noticed in experimental tanks.

In our study, the river receiving the WWTP effluent is already polluted above the treatment plant and under the influence of a stormwater overflow. Usually, WWTP effluents do not contain high concentrations of organic or mineral compounds. Thus, in such a type of urban pollution, chemical analysis alone does not allow to point out the specific impact of WWTP discharge. Moreover, it does not give any information about biological effects. On the contrary, the use of indicators such as EROD or LSI can detect a biological response on the natural fish populations. The joint use of such data, from receiving water and from on-site experiments, helps to clearly underline the field impact of the WWTP discharge. More, the experimental tanks were useful to point out the constant inducing effect on EROD activity of WWTP effluent. From our results, we can conclude that WWTP effluent can be sources of chronic pollution for the receiving water. Such a contamination by bioavailable compounds is likely to cause long term toxic effects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Bray, P. Morfin, P. Roger (Cemagref, Lyon, France) and the fishguards of the French Conseil Supérieur de la Pêche (especially Mr. Perrin) for excellent technical assistance. Chemical analyses were performed by P. Castillo and F. Massat at the laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme (France). This research was partly supported by the french Ministry of the Environment through grant n° DRAEI 92133.

REFERENCES

- Adams, S. M., Crumby, W. D., Greeley, M. S. Jr, Ryon, M. G., and Schilling, E. M. (1992). Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 1549-1557.
- Arthur, J. W., West, C. W., Allen, K. N., and Hedke, S. F. (1987). Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 324-331.
- Bucheli, T. D., and Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **25**, 201-268.
- De Alencastro, L. P., and Tarradellas, J. (1983). Etude de la concentration en PCB des eaux usées dans les stations d'épuration. *Gas Wasser Abwasser* **3**, 113-122.
- Devaux, A., Pesonen, M., Monod, G., and Andersson, T. (1992). Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 898-901.
- EIFAC (1973). Water quality criteria for European freshwater fish. Report on ammonia and inland fisheries. *Wat. Res.* **7**, 1011-1022.
- Emerson, K., Russo, R. C., Lund, R. E., and Thurston, R. V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effects of pH and temperature. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**, 2379-2383.
- Flammarion, P., Migeon, B., and Garric, J. (1996). Joint effect of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 440-445.
- Förlin, L., Haux, C., Karlsson-Norrgrén, L., Runn, P., and Larsson, A. (1986). Biotransformation enzymes activities and histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. *Aquat. Toxicol.* **8**, 51-64
- Garric, J., Vollat, B., Nguyen, D. K., Bray, M., Migeon, B., and Kosmala, A. (1996). Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents. *Water Sci. Technol.* **33**, 83-91.
- Goede, R.W., and Barton, B.A. (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish, *American Fisheries society Symposium* **8**, 93-108
- Goksøyr, A., and Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22**, 287-312.
- Grizzle, J. M., Horowitz, S. A., and Strength, D. R. (1988). Caged fish as monitors of pollution: effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Wat. Resour. Bull.* **24**, 951-959.
- Haasch, M. L., Prince, R., Wejksnora, P. J., Cooper, K. R., and Lech, J. J. (1993). Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 885-895.
- Jedamski-Grymlas, J., Lange, U., Siebers, D., and Krabe, L. (1994) Induction of the hepatic biotransformation system of golden ide [*Leuciscus idus* (L.)] after exposure in the river Elbe. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **28**, 35-42
- Klopper-Sams, P. J. and Benton, E. (1994). Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 2. Induction of hepatic cytochrome P4501A in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and other species. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1483-1496.
- Lara-Cazenave, M. B., Levy, V., Castetbon, A., Potin-Gauthier, M., Astruc, M., and Albert, E. (1994). Pollution of urban runoff waters by heavy metals. Part I: total metal. *Environ. Technol.* **15**, 1135-1147.

- Lindström-Seppä, P., and Oikari A. (1989). Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **18**, 191-203.
- Lowry O. H. , Rosebrough, N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Makepeace, D. K., Smith, D. W. and Stanley, S. J. (1995). Urban stormwater quality: summary of contaminant data. *Critical Reviews in Environ. Sci. Technol.* **25** (2), 93-139.
- Marchand, M., Caprais, J. C., Pignet, P. and Porot, V. (1989). Organic pollutants in urban sewage and pollutant inputs to the marine environment. Application to the French shoreline. *Wat. Res.* **23** (4), 461-470.
- Melancon, M. J., Yeo, S. E., and Lech, J. J. (1987). Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in fish by exposure to river water. *Environ. Toxicol. Chem.* **6**, 127-135
- Miskiewicz, A. G., and Gibbs, P. J. (1994). Organochlorine pesticides and hexachlorobenzene in tissues of fish and invertebrates caught near a sewage outfall. *Environ. Pol.* **84**, 269-277.
- Monda, D. P., Galat, D. L., Finger, S. E. (1995). Evaluating ammonia toxicity in sewage effluent to stream macroinvertebrates: I. A multi-level approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 378-384.
- Monod, G., Devaux, A., and Riviere, J. L. (1988). Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *Sci. Total Environ.* **73**, 189-201.
- Nguyen, D. K., Bruchet, A., and Arpino, P. (1994). High resolution capillary GC-MS analysis of low molecular weight organic compounds in municipal wastewater. *J. High Resol. Chromatogr.* **17**, 153-159.
- Payne, J. F., Fancey, L. L., Rahimtula, A. D. and Porter, E. L. (1987). Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* **86C**, 233-245.
- Petrasek, A. C., Kugelman, I. J., Austern, B. M., Pressley, T. A., Winslow, L. A., and Wise, R. H. (1983). Fate of toxic organic compounds in wastewater treatment plants. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **55**, 1286-1296.
- Pohl, R. J., and Fouts, J. R. (1980). A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **107**, 150-155.
- Rivière, J. L., Devaux, A., Gonin, O., and Monod, G. (1990) Effect of β -naphthoflavone and MCPA on liver and kidney drug-metabolizing enzymes from the carp, *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **19**, 276-284.
- Schroeder G. D., Ross-Lewandowski, S., and Davis, E. M. (1991). Evaluation of the toxic effects of selected municipal wastewater effluents on aquatic invertebrates. *Environ. Technol.* **12**, 757-768.
- Slooff, W., Van Kreijl, C. F., and Baars, A. J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface water in the Netherlands. *Aquat. Toxicol.* **4**, 1-14.
- Soimasuo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Petänen, T., Ristola, T., and Oikari, A. (1995). Biomarker responses along a pollution gradient: effects of pulp and paper mill effluents on caged white fish. *Aquat. Toxicol.* **31**, 329-345.
- Spies, R. B., Felton, J. S., and Dillard, L. (1982). Hepatic mixed-function oxidases in California flatfishes are increased in contaminated environments and by oil and PCB ingestion. *Mar. Biol.* **70**, 117-127.

- van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A. and Vermeulens, N. P. E. (1991). Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**, 43-47.
- van der Weiden, M. E. J. (1993). Cytochrome P450 1A induction in carp as biological indicator for the aquatic contamination of chlorinated polyaromatics. Thesis, University of Utrecht, Research Institute Toxicology, ISBN 90-393-0376-2.
- Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B., and Garric, J. (1991). In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*), *Aquat. Toxicol.* **21**, 255-266.
- Vindimian, E., Namour, P., Munoz, J. F., Gril, J. J., Migeon, B., Garric, J. (1993). Ethoxyresorufin-o-deethylase induction in fish from a watershed exposed to a non-point source pollution of agricultural origin. *Wat. Res.* **27**, 449-455.
- Wright, I. A., Chessman, B. C., Fairweather, P. G., and Benson, L. J. (1995). Measuring the impact of sewage effluent on the macroinvertebrate community of an upland stream: the effect of different levels of taxonomic resolution and quantification. *Aust. J.Ecol.* **20**, 142-149.

TABLE 1

Concentrations of pollutants in chub muscle from the Chalaronne river (June 95)

$\mu\text{g/g}$ lipid weight	upstream town	upstream WWTP	downstream WWTP
PCB 101	ND	0.43	0.071
PCB 138	ND	0.664	0.095
PCB 153	ND	0.586	0.143
PCB 180	ND	0.313	0.071
lindane	0.233	0.469	0.143
HCB	ND	0.039	0.024
Chlordane	0.633	ND	ND
pp'DDE	0.667	1.445	0.643
phenol	ND	ND	11.9
methylphenol	ND	ND	1.19
Lipids % wet weight	3	2.6	4.2

Note. ND, not detected.

TABLE 2

Contaminants concentrations in sediments of the three sites from the Chalaronne river (September 95)

mg/kg dry weight	upstream	upstream WWTP	downstream	Reference ^a
Metals				
Arsenic	4.9	6	4.4	5
Cadmium	1.7	1.9	1.8	0.5
Chromium	69	65	66.1	25
Copper	13.4	38.6	57.9	20
Mercury	0.13	1.1	3.1	0.1
Nickel	29	27.7	28.7	10
Lead	30.3	74	73.6	20
Zinc	85	175	199	75
PAHs				
Benzo(a)pyrene	ND	0.28	0.26	
Benzo(b+k)fluoranthène	ND	0.41	ND	
Chrysene	ND	0.39	0.39	
Fluoranthene	0.15	0.38	0.33	
Fluorene	0.05	0.13	0.07	
Naphtalene	ND	0.1	ND	
Phenanthrene	0.13	0.35	0.24	
Pyrene	0.17	0.39	0.35	
PCBs	ND	ND	ND	

Note.^aFrom Water Agency of Rhône-Méditerranée-Corse 1994. A sediment is said to be contaminated when concentrations are two-fold these reference levels. DW, dry weight. ND, not detected.

TABLE 3

Liver somatic index* of chub (*Leuciscus cephalus*) collected from the 3 sites located in the Chalarronne river in 1995

Season	sex	upstream town	upstream WWTP	downstream WWTP
June	Female	1.66±0.54 (10)	NM	1.80±0.30 (10)
	Male	1.52±0.64 (10)	NM	2.06±0.60 (10) ^a
September	Female	1.12±0.37 (19)	1.33±0.42 (12)	1.98±0.48 (14) ^{ab}
	Male	0.90±0.40 (10)	1.44±0.68 (10) ^a	2.51±0.39 (9) ^{ab}

Note. LSI* (liver wt (g) * 100/body wt (g)). Values are mean ± SD. Number of fish examined are indicated in parentheses. ^aSignificantly different from upstream town (Mann-Whitney test $P \leq 0.05$). ^bSignificantly different from upstream WWTP (Mann-Whitney test $P \leq 0.05$) NM= not measured.

FIGURE 1

Geographical locations of the Chalaronne river and the Chatillon-sur-Chalaronne WWTP.

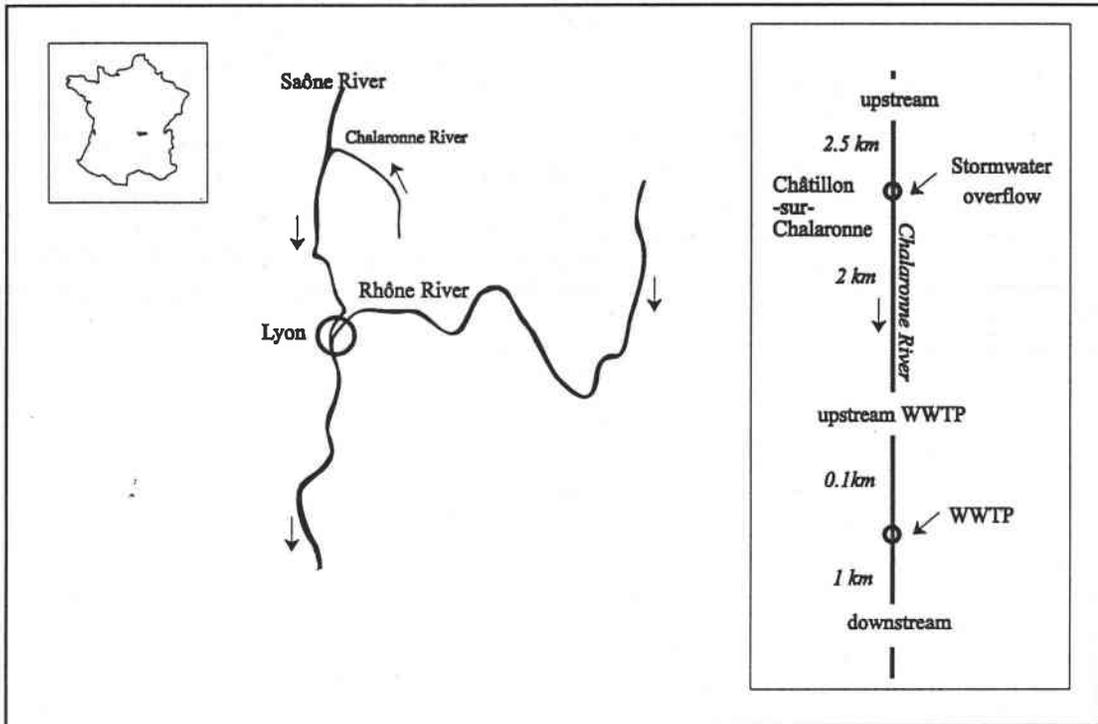
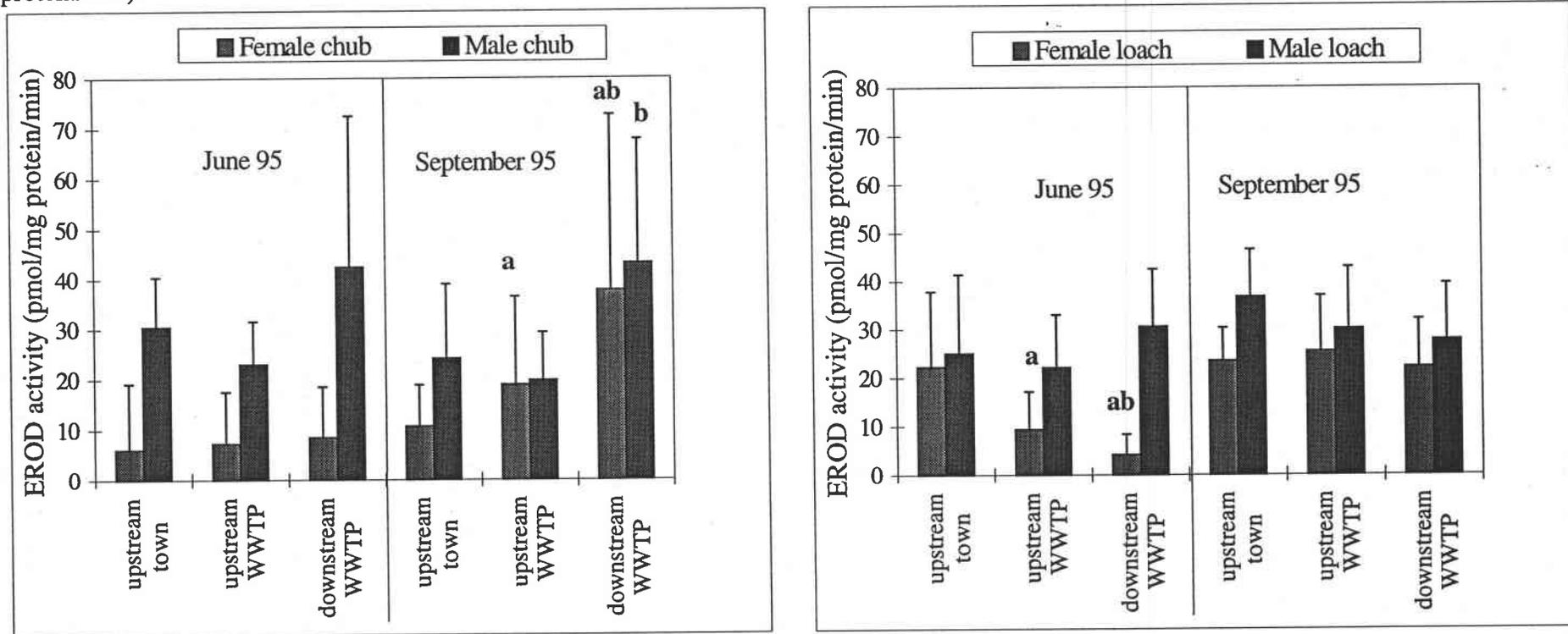


FIGURE 2

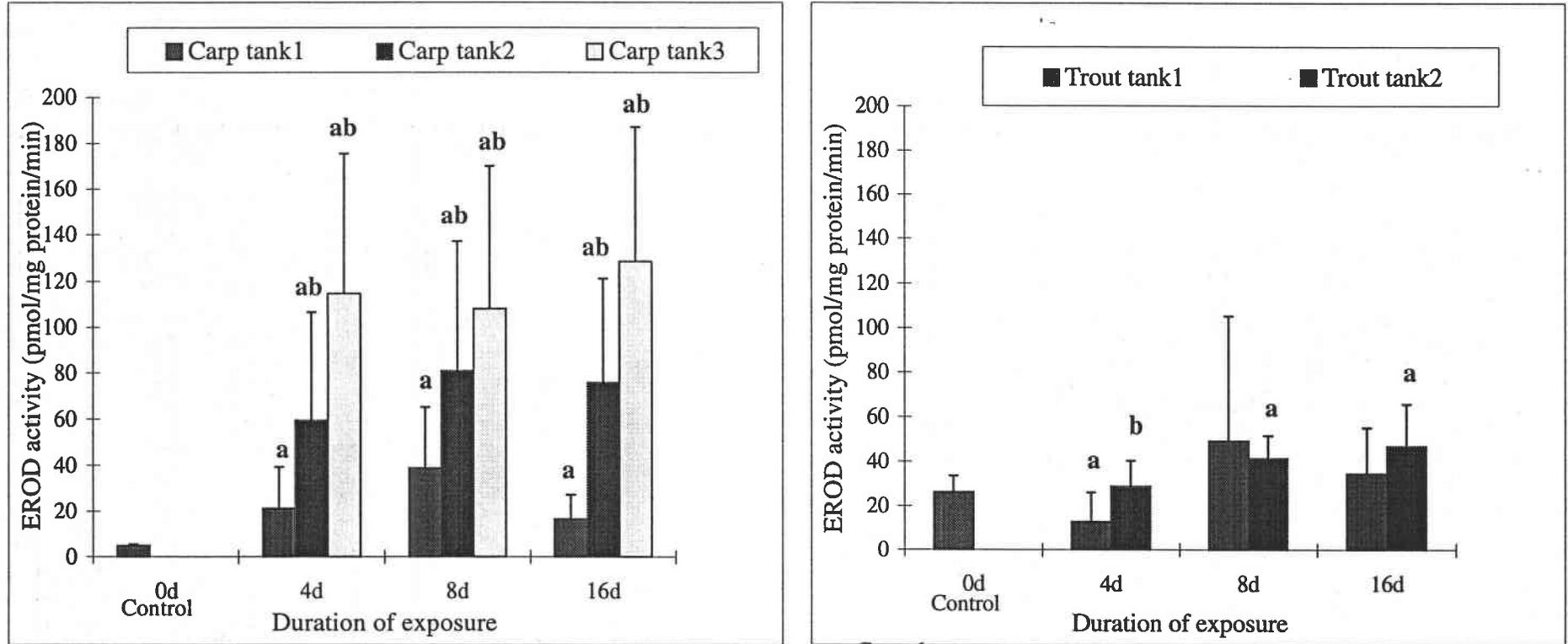
EROD activity of chub and loach caught in the Chalaronne at three sites in June and September 95 (mean \pm SD of 8 to 19 fishes in pmol/mg protein/min).



Note. ^aSignificantly different from upstream town (Mann-Whitney test $P \leq 0.05$). ^bSignificantly different from upstream WWTP (Mann-Whitney test $P \leq 0.05$).

FIGURE 3

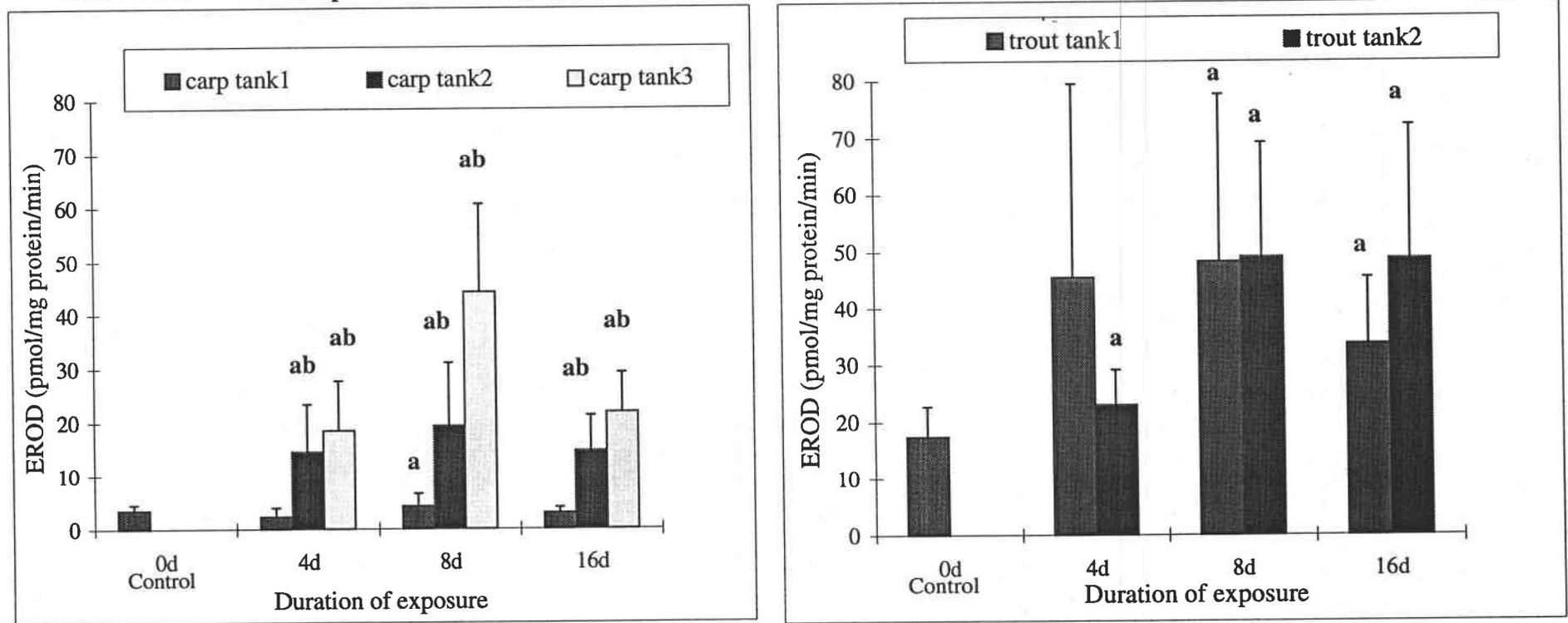
EROD activity in carp and trout (mean \pm sd of 10 trouts and 10 to 20 carps in pmol/min/mg protein) exposed to WWTP effluent and Chalaronne water in on-site experimental tanks from the 24th of May to the 9th of June 95.



Note. Tank1: Chalaronne water upstream from WWTP. Tank2: 50% WWTP effluent / 50% upstream Chalaronne water. Tank3: 100% WWTP effluent. ^aSignificantly different from the control (Mann-Whitney test $P \leq 0.05$). ^bSignificantly different from the Chalaronne water exposed fish.

FIGURE 4

EROD activity in carp and trout (mean \pm sd in groups of 10 trouts and 12 carps in pmol/min/mg protein) exposed to WWTP effluent and Chalaronne water in on-site experimental tanks from the 11th to the 26th of September 95.



Note. Tank1: Chalaronne water upstream from WWTP. Tank2: 50% WWTP effluent / 50% upstream Chalaronne water. Tank3: 100% WWTP effluent. ^aSignificantly different from the control (Mann-Whitney test $P \leq 0.05$). ^bSignificantly different from the Chalaronne water exposed fish.

Article 2

Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia Dubia* chronic toxicity test.

Water Research, sous presse

**IMPACT ASSESSMENT OF A WASTEWATER TREATMENT PLANT
EFFLUENT USING INSTREAM INVERTEBRATES AND THE
CERIODAPHNIA DUBIA CHRONIC TOXICITY TEST.**

A. KOSMALA^{1*}, S. CHARVET², M.-C. ROGER² and B. FAESSEL²

¹ Laboratoire d'écotoxicologie (E-mail : anne.kosmala@cemagref.fr / Fax number : 33 (0)4 78 47 78 75 / Tel number : 33 (0)4 72 20 87 88)

² Laboratoire de Diagnose des Systèmes Aquatiques

Cemagref, Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, 3 bis quai Chauveau, 69336
LYON cedex 09, FRANCE

* Author to whom correspondence should be addressed

Impact of a wastewater treatment plant effluent

Abstract : The purpose of this study was to assess the specific impact of a wastewater treatment plant (WWTP) effluent on the receiving water. A combination of a field survey and laboratory toxicity tests was used to detect a possible cause-effect relationship between the plant discharge and the receiving water quality. In addition to biological and chemical quality of the river upstream and downstream from the WWTP outfall, we assessed Hydropsychid life cycle as a field bio-indicator. Laboratory experiments were carried out using the 7-day *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. Field and laboratory studies were performed simultaneously almost every month from March 95 to February 96. Throughout the year, we observed a biological degradation at downstream site compared to upstream site based on biological indices, while we detected a constant chronic toxicity from *C. dubia* test. Field and laboratory indicators showed that the effect of the WWTP effluent on organisms was at its highest in summer. By studying both the effluent and the receiving water, we showed that not only the concentration of the effluent in the river but also its quality explain the impact of the WWTP effluent in summer. Thanks to field investigation, we detected the impact of the WWTP above the outfall, the WWTP upstream site being polluted by the stormwater overflow. Disturbances described were due to nutrient loading from the organic matter and to micropollutants contained in the WWTP effluent.

Key words : *Ceriodaphnia dubia*, *Hydropsyche angustipennis*, caddisflies, benthic macroinvertebrates, chronic toxicity test, wastewater treatment plant effluent, impact assessment.

INTRODUCTION

The purpose of this study was to measure the impact of a wastewater treatment plant (WWTP) on the receiving water. Measuring such an impact is a challenge because of the variability and the complexity of the effluent. Moreover, multi-point source pollution, added to agricultural pollution, often makes it impossible to establish a clear relationship between *in situ* effects and discharges. As Chapman (1986), Monda *et al.* (1995), Bervoets *et al.* (1996) recommended, chemical analyses, ecological survey and effluent toxicity tests were combined to discriminate between the effects of the discharge and those of the background pollution. This combination was developed for sediment quality monitoring by Chapman (1986, 1990) as the Triad approach. Variability of effluent quality and its impact were recorded by a monthly sampling design during a period of one year.

By comparing chemical analyses and macroinvertebrate studies made at WWTP upstream and downstream sites, we tried to describe the disturbances that occurred in the receiving water. We also worked on changes in one invertebrate family population structure and in the development of invertebrate species (global instar distribution, annual development cycle and morphometric measures). Indeed, studies dealing with individual and population responses helped to record physiological disturbances which could explain ecosystem changes (Forbes and Forbes 1994). Hydropsychid caddisflies were chosen because of their high abundance, their wide distribution and their important role in the ecology of lotic ecosystems (Vuori and Parkko 1996).

In addition, toxicity tests were made to detect a possible cause-effect relationship between an identified discharge and the observed field impact. As no (or little) acute toxicity was revealed testing WWTP effluent on different organisms (Metikosh *et al.* 1980, Craig *et al.* 1991, Arbuckle and Alleman 1992), we chose the chronic toxicity test using *Ceriodaphnia dubia* (Mount and Norberg 1984). This test is largely used to check the toxicity of effluents : it

belongs to the battery of tests proposed by USEPA (1991) for the biological control of effluents. Moreover, the *Ceriodaphnia dubia* chronic test is the most sensitive test among existing sublethal tests (Garric *et al.* 1996, Neiheisel *et al.* 1988).

MATERIAL AND METHODS

Study area

The study area is the Chalaronne stream above and below the Châtillon-sur-Chalaronne WWTP which pours its effluents into this river. It is situated on the Dombes plateau, some 30 kms north east of Lyon (Fig. 1). The WWTP receives domestic and industrial (pharmaceutical, plastic and metal industries) discharges and has a capacity of 6,000 inhabitants. The Chalaronne river is a third order stream (Strahler 1957) which belongs to the drainage basin of the Saône river. This lowland river (gradient of 2.7 m / km) runs on sediments deposited during the Riss glaciation. The stream bottom is covered with a mixture of cobbles, clay and loess.

Field and laboratory experiments were carried out from March 1995 to February 1996 approximately every month according to the hydrological conditions. For field experiments, two sites were chosen above and below the WWTP discharge. They had similar substrates, current velocities and water depths. In both sites, we sampled invertebrates and river water for conventional chemical analyses. Once a year, we collected sediments and fish for micropollutant analysis. (Sites above and below the WWTP were separated by a riffle area which prevents fish transfer.) For this analysis, an additional reference site situated upstream from the city (site A) was sampled (see Fig. 1). Each month, a 24h composite effluent sample proportional to the WWTP flow was collected using a refrigerated Contronic PSW2000 sampler which preserved the effluent at $T^{\circ} < 4^{\circ}\text{C}$. This effluent sample was used for conventional chemical analysis. Both effluent and river water were used for toxicity tests

Impact of a wastewater treatment plant effluent

which started less than 48h after the beginning of the 24h effluent sampling. Sampling for toxicity testing were performed at the maximum within the two weeks preceding the invertebrate sampling (Table 1).

The flow of both the river above the effluent discharge and the WWTP effluent were recorded. The river flow data, collected by a gauging station, were available on a database managed by Rhône-Alpes DIREN (DIrection Régionale de l'ENvironnement). For WWTP effluent, we set a flowmeter which registered the continuous flow. Together these allowed us to detect the floods and to calculate the instream waste concentration (IWC) which is the ratio of WWTP effluent in the river. For toxicity testing, the IWC was estimated using real time river flow data. IWC obtained by real time was found to be different from the IWC calculated by validated river flow data in 2 cases out of 10 : in May and July during the low water period.

Chemical analysis

Temperature, conductivity, dissolved oxygen, Suspended Matter (SM), NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Ptot were measured in the river and effluent samples. River sediment (June 95) and fish muscle (September 95) analyses were performed using a multi-residue procedure suitable for the determination of 132 organic molecules (EEC 1990). 10 g of 10 chub (*Leuciscus cephalus*) muscles were pooled. Organic extracts obtained from fish muscle and sediment using dichloromethane and Soxhlet extraction were analysed with GC-MS, GC-FID-ECD and HPLC. For fish muscle, the extraction was microwave-assisted. Metal contents in the sediment were determined by atomic absorption spectrophotometry.

Instream invertebrates

Macroinvertebrates were collected from riffle areas with a Surber sampler (with a net of 250 μm mesh-width) and from pool areas by raking sediment along the bank with a hand-net. Five

Impact of a wastewater treatment plant effluent

samples were collected in the riffle and five in the pool covering together an area of 1m². With the hydropsychid larvae, five extra random riffle samples were taken at each site in order to cover a total riffle area of 1m². Samples were preserved in 10% formalin.

In the laboratory, samples were washed through a column of 3 sieves (2.5 mm, 1.25 mm, 0.63 mm) and the coarse gravel was removed. The macroinvertebrates were then sorted, counted and identified under a binocular microscope. Biological index (IBG) was determined using AFNOR NF T 90-350 (1992).

Hydropsychid larvae were identified down to species. *Hydropsyche angustipennis* Curtis and *H. pellucidula* Curtis were retained for further measurements concerning life cycle. Head capsule widths (HC) were measured using a micrometer fitted in the binocular microscope in order to determine the instar of the larvae. Our protocol allowed us to collect the last three instars and partially the second instar. The larvae of the first instar were discarded as species identification was impossible. Body surfaces (S) were obtained by image analysis. Images were taken using a CCD monochrome camera and computer with a data logger board (512*512 pixel). Then, they were treated using Visilog 4.1 software (Noesis, France). Additional morphological analyses (including HC, S and wet weight) were performed from a set of 100 individualised animals sampled in August. Wet weight (W) was obtained using a Sartorius RC 210 D balance with a precision of 0.01 mg.

Toxicity testing

WWTP effluent and river water from the upstream site were frozen at the laboratory at T° < -18°C in polyethylene containers to ensure the best possible preservation during the 7-day test (Naudin *et al.* 1995). Within 24h of sample collection, a semi-static 7-day *Ceriodaphnia dubia* test was performed using USEPA (1991) guidelines. A laboratory water - mixed natural (80% v/v) and deionized water - (hardness 80-100 mg/L CaCO₃) was used for stock culture.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

Four different samples were simultaneously tested : an upstream WWTP Chalaronne water, a 90% effluent concentration, a mixture of Chalaronne water and effluent at the IWC (see § study area) and the laboratory water. Survival, reproduction and growth of the organisms exposed were assessed during the test. The reproduction of *C. dubia* was estimated by counting the neonates daily. The length of adults was measured at the end of the test. The test solutions were prepared and renewed daily using stored samples. Daphnids were fed every day by a mixture of yeast, algae and fish food. Physico-chemical parameters (pH, dissolved oxygen, conductivity) were measured daily.

Data analysis

Statistical analysis for toxicity tests was performed using Toxstat 3.0 software (Gulley *et al.* 1989). Ceriodaphnid survival, reproduction and growth data were statistically analysed according to USEPA (1991) flow charts. Statistical analyses (including principal components factor analysis (PCA), ANOVA, Wilcoxon matched pair test, linear regression, T-test) for IBG, chemical analysis and hydropsychid population were performed using Statistica software (Statsoft Inc., Tulsa, US).

RESULTS

Water quality

The study of the flow of the effluent and the river allowed us to distinguish a low river water period from July to September accompanied by a high instream waste concentration (IWC>10%) (Table 1 and Fig. 2).

Conventional chemical parameters measured in the river water did not allow us to clearly distinguish the WWTP downstream site from the upstream site. (Only 3.1% of the total variability of chemical parameters was able to separate the upstream from the downstream site

Impact of a wastewater treatment plant effluent

according to a computation of between class inertia associated with PCA.) Thus, SM, NO_3^- temperature and dissolved oxygen variations were explained by other factors than the WWTP outfall (Fig. 3). First of all, SM variations measured in the river were affected by the river flow and upstream supply. SM were at high concentration in effluent samples of rainy periods (effluent of April and March, Fig. 4). NO_3^- measured in the river depended also on upstream supply. And last, temperature and dissolved oxygen variations, important parameters for the macroinvertebrate distribution, were caused by the season.

As with conventional analyses, we detected no significant micropollutant concentration between the two sites above and below the WWTP. Thus, polychlorinated biphenyls (PCB), HCB, lindane, pp'DDE detected in fish and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) detected in sediments upstream and downstream from the WWTP effluent discharge but not at the site upstream from the town (Table 2 et Table 3). It is the same for metals in sediments : we did not notice any significant metal concentration differences between the two sites above and below the WWTP whereas we recorded some metal concentration differences between the two sites respectively above and below the town.

However, some chemical parameters allowed us to measure differences between the WWTP upstream and downstream sites. First, conductivity and NH_4^+ , NO_2^- , PO_4^{3-} concentrations were at higher levels at the WWTP downstream site than the upstream site especially in summer. This was in accordance with the chemical characteristics of dry summer effluent samples (effluent of June, July and September) whose conductivity and NH_4^+ and PO_4^{3-} concentrations were higher than other effluent samples. Moreover, phenol and methylphenol had accumulated in fish only below the WWTP. Finally, Cu and Hg were detected at higher concentrations at the WWTP downstream site than the upstream site.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

Biological quality

Biological indices fluctuated between 7 and 14 upstream from the WWTP, and between 6 and 12 downstream (Table 1). For all the sampling period, the biological index was significantly lower downstream than upstream (Wilcoxon matched pairs test, $p=0.008$). The biggest difference upstream versus downstream was noticed in September ($\Delta= 8$).

IBG varied versus time at upstream and downstream sites. At the upstream site, the variability was due among other things to an overestimation of the indicator group by the Leptophlebiidae (7) which were at the limits of their ecological requirement (present only two months with less than 6 individuals) (Table 4). From March to July, IBG was inferior or equal to 10 if we disregard the Leptophlebiidae. Between July and September, the biological quality of the river upstream from the WWTP was improving. This improvement was detectable downstream only from October on.

Toxicity testing

Ceriodaphnids exposed to river water were considered as controls : reproduction and growth measured on these organisms were higher than those measured on organisms exposed to laboratory water. The latter was poorer in some chemical substances. Two experiments out of the 13 planned, failed (in June and August) : reproduction in the controls was less than the acceptable average (15 or more young per surviving female).

In May and July, significant mortality occurred in the 90% effluent tested (Fisher exact test ; $p<0.05$) after 7 days (Table 5). However, this mortality was not significant when measured after only 48hrs of exposure, which correspond to acute time exposure. Chronic toxicity of the 90% effluent tested was revealed for all the tests (except for the test of April) regarding both parameters : reproduction and growth.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

For the river water and effluent diluted to the IWC, no significant mortality occurred (minimum of 90% surviving females). The chronic toxicity of the effluent at the estimated IWC was revealed in February, May, July and November. The two sublethal parameters used (growth and reproduction) appeared to be complementary even if reproduction was found to be often more sensitive than growth. In February, May and November, the tested IWC was overestimated.

Hydropsychid observations

- Hydropsychid family

Hydropsychids were the indicator group most often used in our study to calculate biological indices (Table 1). Whereas the same four hydropsychid species were found above and below the effluent discharge - *H. angustipennis* Curtis, *H. pellucidula* Curtis, *H. siltalai* Döhler and *H. exocellata* Dufour (Fig. 5) - , the effluent appeared to modify the *Hydropsyche* population structure. Indeed, among these four species, only *H. angustipennis* was well-represented downstream (87% of Hydropsychidae). So the difference of the number of individuals of this species upstream versus downstream was not statistically significant ($p= 0.13$ Wilcoxon matched pair test). On the contrary, *H. pellucidula*, which was the most abundant species upstream (47% of the Hydropsychidae), did not exceed 30 individuals downstream in any sample (11% of the Hydropsychidae). The same disappearance at the downstream site was noted for *H. siltalai* which was well-represented upstream and for *H. exocellata* which was the rarest hydropsychid species upstream.

- *H. angustipennis* and *H. pellucidula* populations

Head width frequency distribution of *H. angustipennis* from the two sites for all the study period allowed us to recognise 4 instars with the same head capsule (HC) widths observed by

Impact of a wastewater treatment plant effluent

Edington and Hildrew (1995) : instar 2 with a HC width between 0.3 and 0.5 mm, instar 3 with HC: 0.5 - 0.7 mm, instar 4 with HC: 0.7 - 1.1, instar 5 with HC: 1.1 - 1.7.

For the whole study period, the distribution of *H. angustipennis* instars was different comparing the upstream versus the downstream site : whereas the numbers of 4th and 5th instars were almost the same in both sites, the 2nd and 3rd instars were less abundant downstream than upstream from the WWTP (downstream, they represented 37% of the upstream population) (Fig. 6).

The same distribution was obtained for *H. pellucidula*. (Fig. 7). All the instars were less numerous downstream than upstream, but the 2nd instar was particularly affected and it was absent downstream.

H. angustipennis was found to have a one year life cycle with an emergence period between May and June and the 4th instar stage as overwintering instar (Fig. 8). The distribution of instars with time was approximately the same between the WWTP upstream and downstream sites except in August and September during the growth period.

For *H. angustipennis* of the August sample, we obtained three relations between weight or surface and head capsule width for the upstream site (Table 6). The determination coefficient R^2 was higher for surface - weight regression than for surface or weight and head width regression. These organisms have a continuous growth of surface and weight and a discontinuous growth of the head capsule. At the downstream site, we did not succeed in determining a regression line between weight and surface and weight and head capsule width because of a widespread distribution of weight or surface for the same head capsule. By mixing the upstream and downstream data and obtaining a multiple regression equation (where all the coefficients except the site coefficient were significant, Fisher, $p < 0.05$), we showed that, for the same head capsule width i.e. same instar, the surface of *H. angustipennis* individuals was bigger downstream. This result was confirmed by surface distribution of the

H. angustipennis 5th instar that we succeeded in separating from the others instar stages, for all the sampling period. Thus, whereas globally no difference between the two sites was observed (ANOVA $p=0.46$), the 5th instar larvae of *H. angustipennis* from the 20th July sample was found to be significantly bigger downstream than upstream (T-test, $p<0.05$).

DISCUSSION

Detection of the WWTP effluent impact

First, ammonia and phosphorus, detected particularly in summer at the WWTP downstream site, were known to be brought by WWTP effluents (Morris *et al.* 1992, Monda *et al.* 1995, Garric *et al.* 1996). Organochlorines (including PCBs), PAHs, and metals found in the river under study, were detected in WWTP effluents (Marchand *et al.* 1989, Lara-Cazenave *et al.* 1994, Makepeace *et al.* 1995) or in fish contaminated by sewage outfall (Brown *et al.* 1986, Miskiewicz and Gibbs 1994). However, for such compounds, the presence of the city of Châtillon and the stormwater effluents were more important than WWTP discharge in explaining the contamination increase.

Then, macroinvertebrate community structure was influenced by the WWTP discharge as was the case in other studies (Kondratieff and Simmons 1982, Monda *et al.* 1995, Wright *et al.* 1995).

The population structure of the hydroptychid family was also affected by WWTP discharge because of different sensitivity of species. This was already observed by Petersen (1986) for a hydroptychid guild where *H. angustipennis* was also found to be the most tolerant species. Studies on species development allowed us to detect some mechanisms of disturbances of the ecosystem functioning such as the disappearance of the young hydroptychid larvae, some morphological modifications of *H. angustipennis* and some disturbances during the larval development. Vuori and Parkko (1996) already found that larval growth was delayed in

Impact of a wastewater treatment plant effluent

polluted sites. Petersen and Petersen (1984) also observed that pulp mill effluent prolonged and delayed emergence. The prolongation of emergence of *H. angustipennis* would disrupt life cycle synchrony having an effect on reproductive success and competition between closely related species.

At last, WWTP effluent tested showed some chronic toxicity as already observed by Schroder *et al.* (1991).

Variations in the WWTP effluent impact

- Temporal variations

In summer, between WWTP upstream and downstream sites, we noticed :

- the biggest disturbance through biological indices
- the disappearance of *H. angustipennis* young larvae which were present in summer following the life cycle of this species and hydropsychid morphological disturbances
- a peak of toxicity through chronic test. (Comparison with time of toxicity test results is delicate because of possible health variations of the exposed organisms (DeGraeve and Cooney 1987)).

Two causes could be put forward to explain the peak of impact during summer. First, there was an increase of the IWC which was then higher than 14%. Second, there was a change in effluent quality which was more concentrated regarding conductivity and contained a high concentration of NH_4^+ . On the contrary, the lack of reaction of laboratory and field organisms was characteristic of rainy periods when both effluent and river are load in suspended matter.

Metikosh *et al.* (1980) and Craig *et al.* (1991) found that WWTP winter samples were more toxic than summer samples. They explained this by an inferior plant performance associated with lower operating temperatures. Differences in seasonal toxicity highlight the site-specific characteristic of such studies.

- Spatial variations

Thanks to chemical differences measured between sites above and below the town, we were able to reveal the pollution caused by stormwater overflow from combined sewers. Moreover, the global improvement of the biological river quality registered at both sites after summer could be related to a combination of the end of nitrate load and flow increase. A field survey, such as the biological and chemical quality assessment of a river, integrates all the instream disturbances such as flow or chemical disturbances from agricultural practices (Monda *et al.* 1995, Bervoets *et al.* 1996).

Cause-effect relationships : characterization of the WWTP effluent impact

First, water temperature was discarded as a cause of insect larvae disturbances as no difference between WWTP upstream and downstream sites was measured using this parameter.

Hydropsychidae is made up of saprobionte collector-filterers organisms. The conspicuous abundance of *H. angustipennis* in small rivers in relation to other species such as *H. pellucidula* and *H. siltalai* is a fairly good indicator of modest organic enrichment (Edington and Hildrew 1995). Moreover, the increase of *H. angustipennis* body surface observed between WWTP downstream and upstream sites could be due to trophic brought of such type of effluent.

As previously reported by Schroder *et al.* (1991), no relationship could be closely established between conventional pollutants analysed and toxic effect, except for un-ionized ammonia. Thus, the biggest disturbance in the instream invertebrate structure between upstream and downstream sites was when the chemical analyses revealed a high load of ammonia. Moreover, toxicity observed through *C. dubia* test in July could be linked to NH₃

Impact of a wastewater treatment plant effluent

concentration reaching 0.1 mg/l in the effluent : such a concentration is close to chronic toxicity concentrations reported for invertebrates (Gersich and Hopkins 1986, Arthur *et al.* 1987). Finally, as hydropsychid young larvae were more affected by the WWTP discharge than old larvae, we could suspect acute toxicity caused by ammonia. Vuori and Parkko (1996) explained the increased mortality of the older instar stages of an hydropsychid population by the presence of bioaccumulative pollutants.

However, as we detected the presence of organic compounds or metals in the receiving water, we could identified these compounds as additional causes of toxicity as some authors (Birge *et al.* 1989, Craig *et al.* 1991, Garric *et al.* 1996) showed.

Comparison of the different approaches

In our study, we noticed that whereas it was only in summer that we detected some differences in chemical water quality between downstream and upstream sites, biological indices showed a disturbance of the biological quality of the river due to the WWTP discharge during the whole year. Biological investigations appeared to be more a sensitive indicator of WWTP effluent disturbance than chemical analysis.

Moreover, no toxicity was suspected through *C. dubia* exposed to river water sampled at the upstream site whereas the biological index showed a degraded upstream site. Indeed, because benthic invertebrate community is exposed to the temporal variations in the quality of the effluent, this could be a more sensitive indicator of disturbance than the *C. dubia* test, as Clements and Kiffney (1994) already observed.

In spite of the difference of sensitivity of field survey and toxicity testing, we observed the same responses with both approaches. Throughout the year, we detected a chronic toxicity at 90% effluent concentration tested using *C. dubia* while we observed a difference between upstream and downstream sites through biological indices. In summer, we detected a chronic

Impact of a wastewater treatment plant effluent

toxicity at IWC through the *C. dubia* bioassay, when the difference of biological indices between the two sites was biggest. Thus, previous researchers (Eagleson *et al.* 1990, Dickson *et al.* 1992) had demonstrated good agreement between results of 7-d chronic toxicity tests using *Ceriodaphnia dubia* and benthic community structure. Through chemical analysis, we also detected a more important impact in summer.

A field survey integrates all the instream disturbances. The combination of a field survey and effluent toxicity testing helped us to reveal the effect of a one-point discharge such as a WWTP effluent. Our integrate approach differed from the Triad approach (Chapman 1986) as we known the disturbance source and we could study it. Studying both the receiving water and the effluent allowed us to show that the impact of a WWTP effluent was due not only to the instream waste concentration but also to the quality of the effluent.

CONCLUSION

Through analytical, biological and toxicological approaches, we managed to detect disturbances due to WWTP effluent. Chemical investigations helped us to reveal ammonia and to a lesser extent micropollutants as factors of WWTP effluent impact on a receiving water. Biological investigations revealed the effects of WWTP effluent on the receiving water with a decrease of instream invertebrates diversity. Toxicity testing indicated the potential toxicity of the effluent. Finally, studies on hydropsychid species populations showed disturbances which could have consequences on ecosystem functioning and allowed us to distinguish the effect of organic matter and ammonia. Temporal studies allowed us to detect seasonal variations of WWTP while field survey showed upstream influences.

As we have already noted (Kosmala *et al.*, in press), the combination of field survey and effluent study allowed us to distinguish the effects of the WWTP among various factors of disturbances. Thus, as Bervoets *et al.* proposed in 1993, impact assessment of effluent should

Impact of a wastewater treatment plant effluent

always include an ecological survey of the receiving water, a whole effluent toxicity testing, and chemical analysis.

Acknowledgement

This research was partly supported by the French Ministry of the Environment through grant n° DRAEI 92133. Hervé PELLA is to be thanked for his support in image analysis and Henri TACHET for his comments on the manuscript.

References

- AFNOR (1992) Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN). NF T90-350. Association française de normalisation, 5p.
- Arbuckle W.B. and Alleman J.E. (1992) Effluent toxicity testing using nitrifiers and MicrotoxTM. *Water Environ. Res.* **64**, 263-267.
- Arthur J.W., West C.W., Allen K.N. and Hedtke S.F. (1987) Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrates species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 324-331.
- Bervoets L., Baillieul M., Blust R., De Boeck G. and Verheyen R. (1993) Impact assessment of industrial effluents on freshwater ecosystems. *Sci. Total Environ., Suppl.* 1123-1128.
- Bervoets L., Baillieul M., Blust R., and Verheyen R. (1996) Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. *Environ. Pollut.* **91**, 333-341.
- Birge W. J., Black J. A., Short T. M., and Westerman A. G. (1989) A comparative ecological and toxicological investigation of a secondary wastewater treatment plant effluent and its receiving stream. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 437-450.
- Brown D.A., Gossett R. W., Hershelman P. and Ward C. F. (1986) Municipal wastewater contamination in the Southern California bight : part I- metals and organic contaminants in sediments and organisms. *Mar. Environ. Res.* **18**, 291-310.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

- Chapman P.M. (1986) Sediment quality criteria from the sediment quality triad : an example. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**, 957-964.
- Chapman P.M. (1990) The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci. Total. Environ.* **97/98**, 815-825.
- Clements W. H. and Kiffney P. M. (1994) Integrated laboratory and field approach for assessing impacts of heavy metals at the Arkansas river, Colorado, *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 397-404.
- Craig G. R., Montheith H. M. and Orr P. L. (1991) Acute and chronic toxicity evaluation of Ontario Canada STP effluents, Seventeenth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Vancouver, British Columbia, Canada, November 5-7, (1990) *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* **1774** (1-2), 207.
- DeGraeve G.M. and Cooney J.D. (1987) *Ceriodaphnia* : an update on effluent toxicity testing and research needs. *Environ. Toxicol. Chem.* **6**, 331-333.
- Dickson K.L., Waller W.T., Kennedy J.H. and Amman L.P. (1992) Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 1307-1322.
- Eagleson K. W., Lenat D. L., Ausley L.W. and Winborne F. B. (1990) Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 1019-1028.
- Edington J. M. and Hildrew A. G. (1995) Caseless caddis larvae of the British isles. Freshwater biological Association. Scientific publication n°53. Series Editor : J.M. Elliott
- EEC (1990): liste 1 de la directive 76/464 du Conseil Européen. Circulaire n° 90-55.
- Forbes V. E. and Forbes T. L. (1994) *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman and Hall, London, 247pp.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

- Garric J., Vollat B., Nguyen D.K., Bray M., Migeon B. and Kosmala A. (1996) Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents. *Water Sci. Technol.* **33**, 83-91
- Gersich F. M. and Hopkins D. L. (1986) Site specific acute and chronic toxicity of ammonia to *Daphnia magna* Straus. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**, 443-447.
- Gulley D.D., Boelter A.N. and Bergman H.L. (1989) Toxstat Datasys Statistical software, Release 3.0. Department of zoology and physiology, University of Wyoming, Laramie, WY.
- Kondratieff P. F. and Simmons G. M. (1982) Nutrient retention and macroinvertebrate community structure in a small stream receiving sewage effluent. *Arch. Hydrobiol.* **94**, 83-98.
- Kosmala A., Migeon B., Flammarion P. and Garric J. (in press) Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using fish biomarker EROD : field and on-site experiments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- Lara-Cazenave M. B., Levy V., Castetbon A., Potin-Gauthier M., Astruc M., and Albert E. (1994) Pollution of urban runoff waters by heavy metals. Part I : total metal. *Environ. Technol.* **15**, 1135-1147.
- Makepeace D. K., Smith D. W. and Stanley S. J. (1995) Urban stormwater quality : summary of contaminant data. *Critical Reviews in Environ. Sci. Technol.* **25**, 93-139.
- Marchand M., Caprais J. C., Pignet P. and Porot V. (1989) Organic pollutants in urban sewage and pollutant inputs to the marine environment. Application to the French shoreline. *Wat. Res.* **23**, 461-470.
- Metikosh S., Cairns V.W. and Jank B.E. (1980) Toxicity assessment of treated municipal effluents. Environment Canada, Ottawa, Ont., Report EPS 4-WP-80-1. 36pp.
- Miskiewicz A. G. and Gibbs P. J. (1994) Organochlorine pesticides and hexachlorobenzene in tissues of fish and invertebrates caught near a sewage outfall. *Environ. Pollut.* **84**, 269-277.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

- Monda D. P., Galat D. L. and Finger S. E. (1995) Evaluating ammonia toxicity in sewage effluent to stream macroinvertebrates : I. A multi-level approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28**, 378-384.
- Morris T., Fare G. and Spadone J. (1992) Toxicity reduction evaluation at the Linden Roselle Sewerage authority wastewater treatment plant. *Wat. Environ. Technol.* **5**, 8-16.
- Mount D.I. and Norberg T.J. (1984) A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* **3**, 425-434.
- Naudin S. Garric J., Vindimian E., Bray M., Migeon M., Vollat B. and Lenon G. (1995) Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**, 54-62.
- Neiheisel T.W., Horning W.B., Austern B.M., Bishop D.F., Reed T.L., and Estenik J.F. (1988) Toxicity reduction at municipal wastewater treatment plants. *J. Water Pollut. Control Fed.* **60**, 57-67.
- Petersen R.C. (1986) Population and guild analysis for interpretation of heavy metal pollution in streams. Community Toxicity Testing, ASTM STP 920, J. Cairns, Jr., Ed., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 180-198.
- Petersen L. B.-M. and Petersen R.C. Jr (1984) Effect of kraft pulp mill effluent and 4,5,6 trichloroguaiacol on the net spinning behavior of *Hydropsyche angustipennis* (Trichoptera). *Bull. Ecol.* **36**, 68-74.
- Schroder G.D., Ross-Lewandowski S. and Davis E.M. (1991) Evaluation of the toxic effects of selected municipal wastewater effluents on aquatic invertebrates. *Environ. Technol.* **12**, 757-768.
- Strahler A. N. (1957) Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions, American Geophysical Union.* **38**, 913-920.

Impact of a wastewater treatment plant effluent

U.S. Environmental Protection Agency (1991) Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 4th Ed. EPA 600/4/-90-027. Washington DC

Vuori K-M. (1995) Species- and population-specific responses of translocated hydropsychid larvae (Trichoptera, Hydropsychidae) to runoff from acid sulphate soils in the river. *Freshwater Biol.* **33**, 305-318.

Vuori K-M. and Parkko M. (1996) Assessing pollution of the river Kymijoki via hydropsychid caddis flies : population age structure, microdistribution and gill abnormalities in the *Cheumatopsyche lepida* and *Hydropsyche pellucidula* larvae. *Arch. Hydrobiol.* **136**, 171-190.

Wright I. A., Chessman B. C., Fairweather P. G., and Benson L. J. (1995) Measuring the impact of sewage effluent on the macroinvertebrate community of an upland stream : the effect of different levels of taxonomic resolution and quantification. *Aust. J. Ecol.* **20**, 142-149.

Xiang V.J., Schröder P. and Schwoerbel J. (1984) Phänologie und Nahrung der Larven von *Hydropsyche angustipennis* und *siltalai* (Trichoptera, Hydropsychidae) in einem Seeabfluss. *Arch. Hydrobiol., Suppl.* **66**, 255-292.

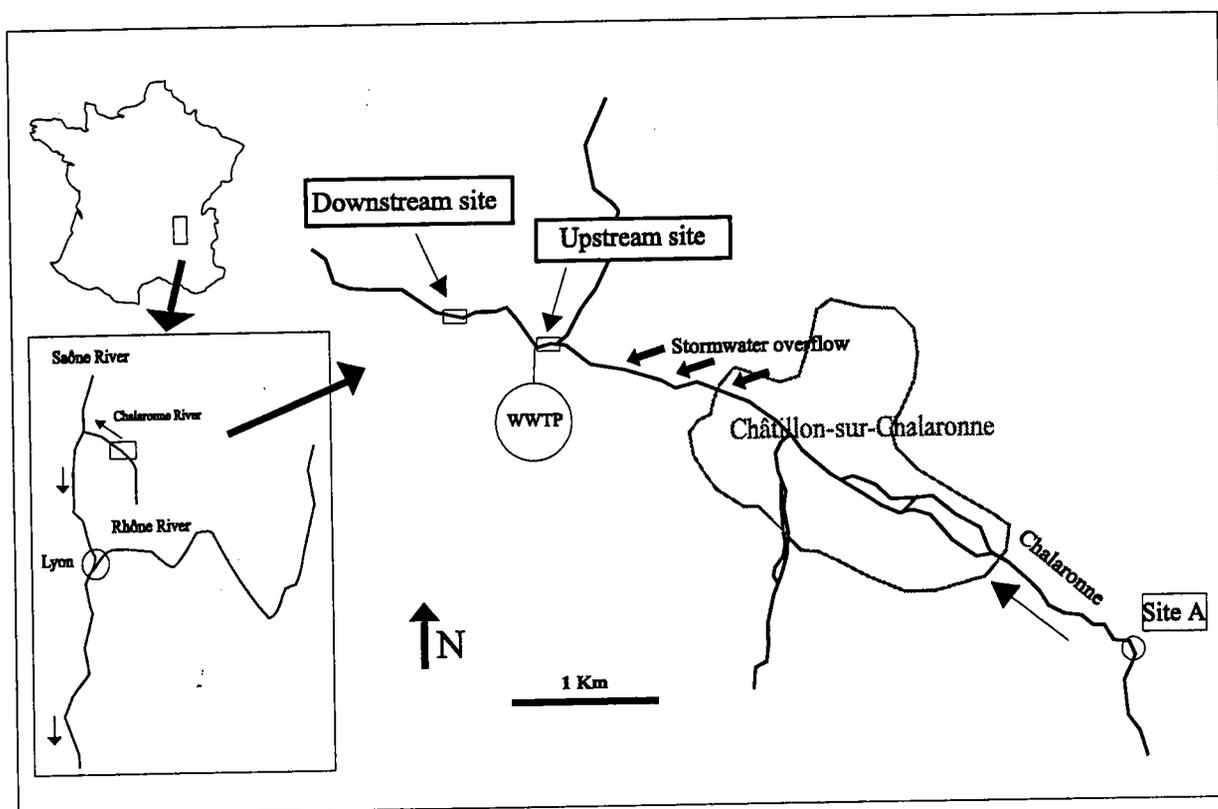


Fig. 1. Geographical locations of the Chalaronne river and the Châtillon-sur-Chalaronne WWTP. The location of WWTP, upstream and downstream sites are indicated. Site A was chosen for micropollutant analyses in the sediment (June 95) and in fish (September 95). The bold arrows indicate stormwater discharges located between the town and the WWTP (which come from the combined sewers).

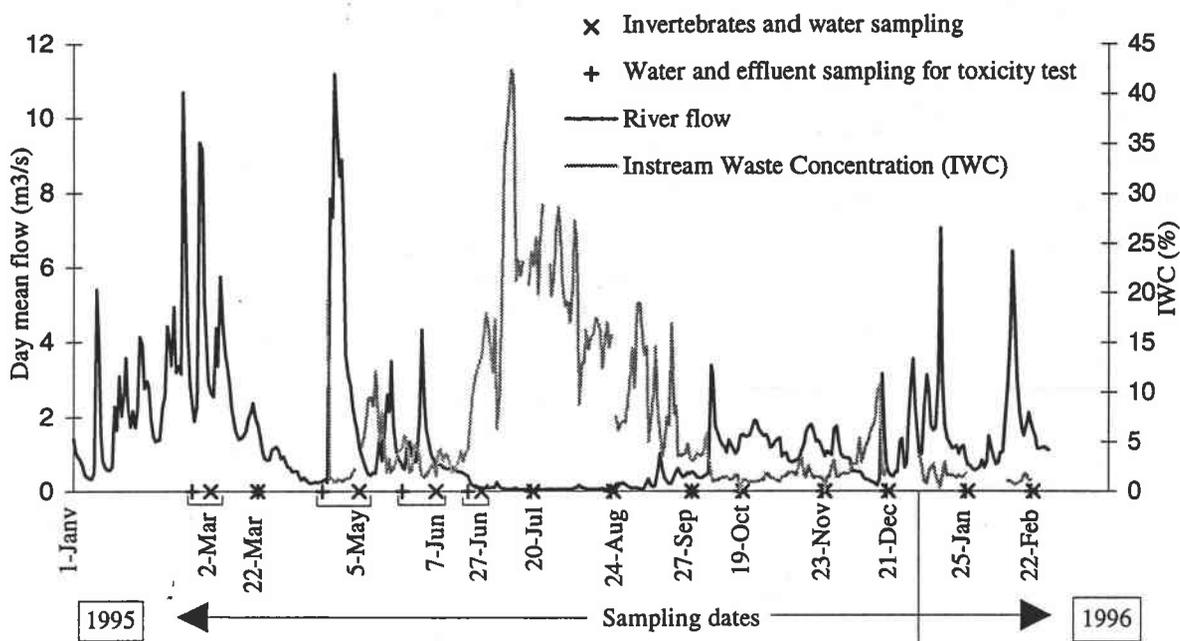


Fig. 2. Chalaronne river flow and instream wastewater concentration during the sampling period (March 95 to February 96). Dates mentioned are dates of invertebrates and river water sampling.

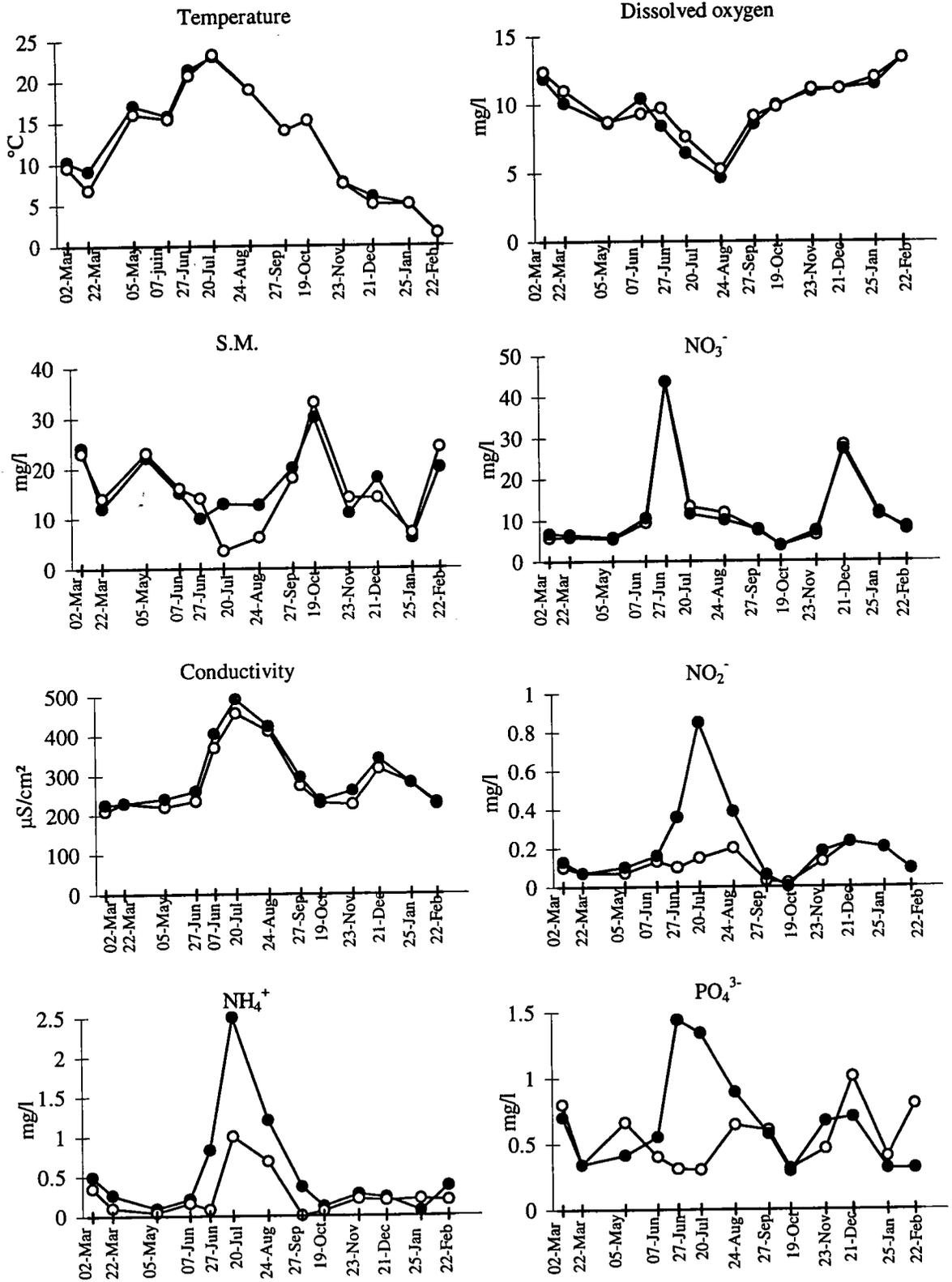


Fig. 3. Chemical analyses in Chalarronne water samples from WWTP upstream (°) and downstream (•) sites from March 95 to February 96 (see also Fig. 1). S.M. : suspended matter.

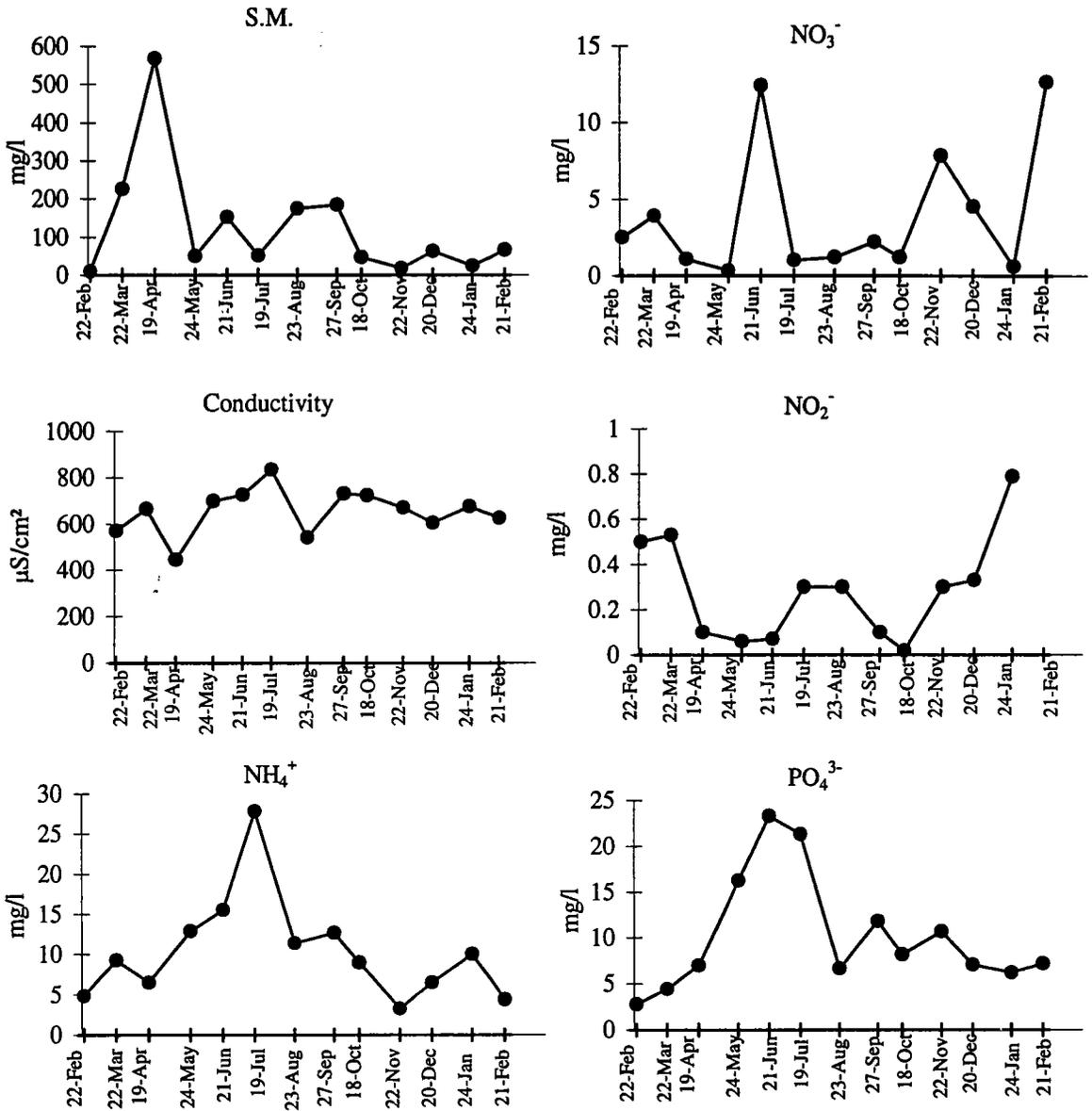


Fig. 4. Chemical analyses of WWTP effluent samples from March 95 to February 96. S.M. : suspended matter.

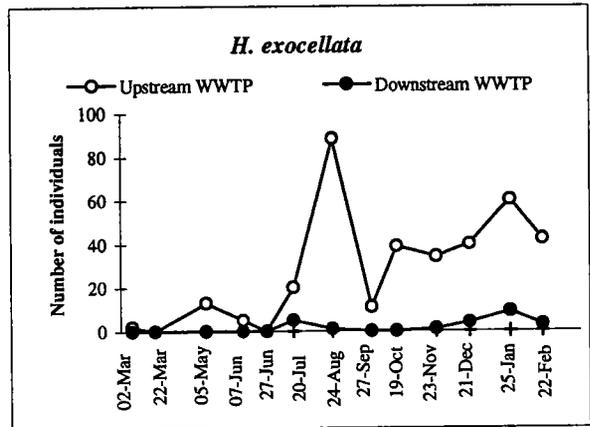
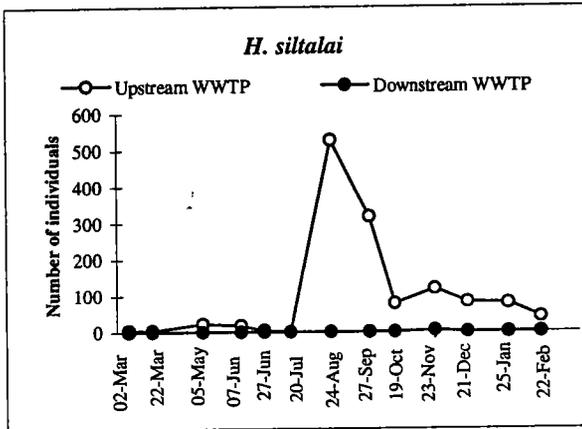
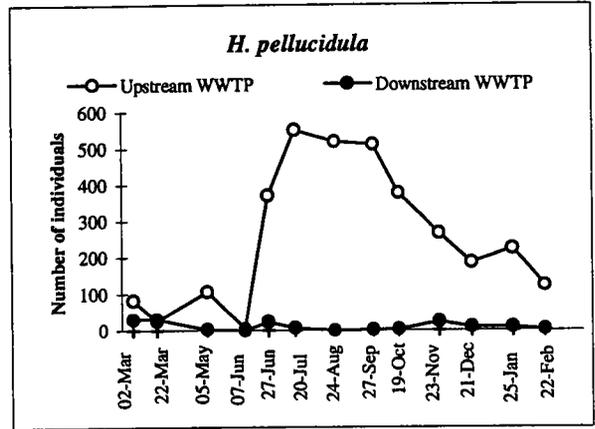
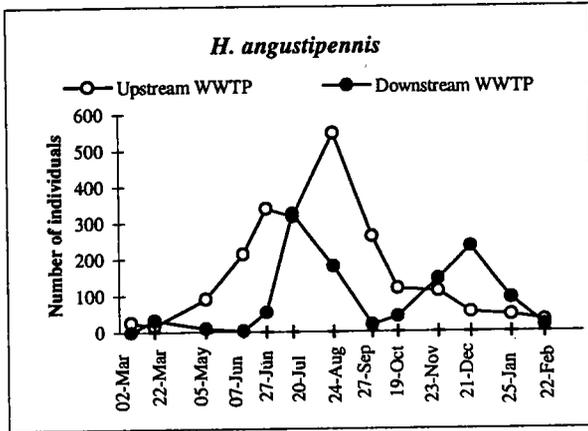


Fig. 5. Hydropsychidae abundance in Chalaronne river from March 95 to February 96.

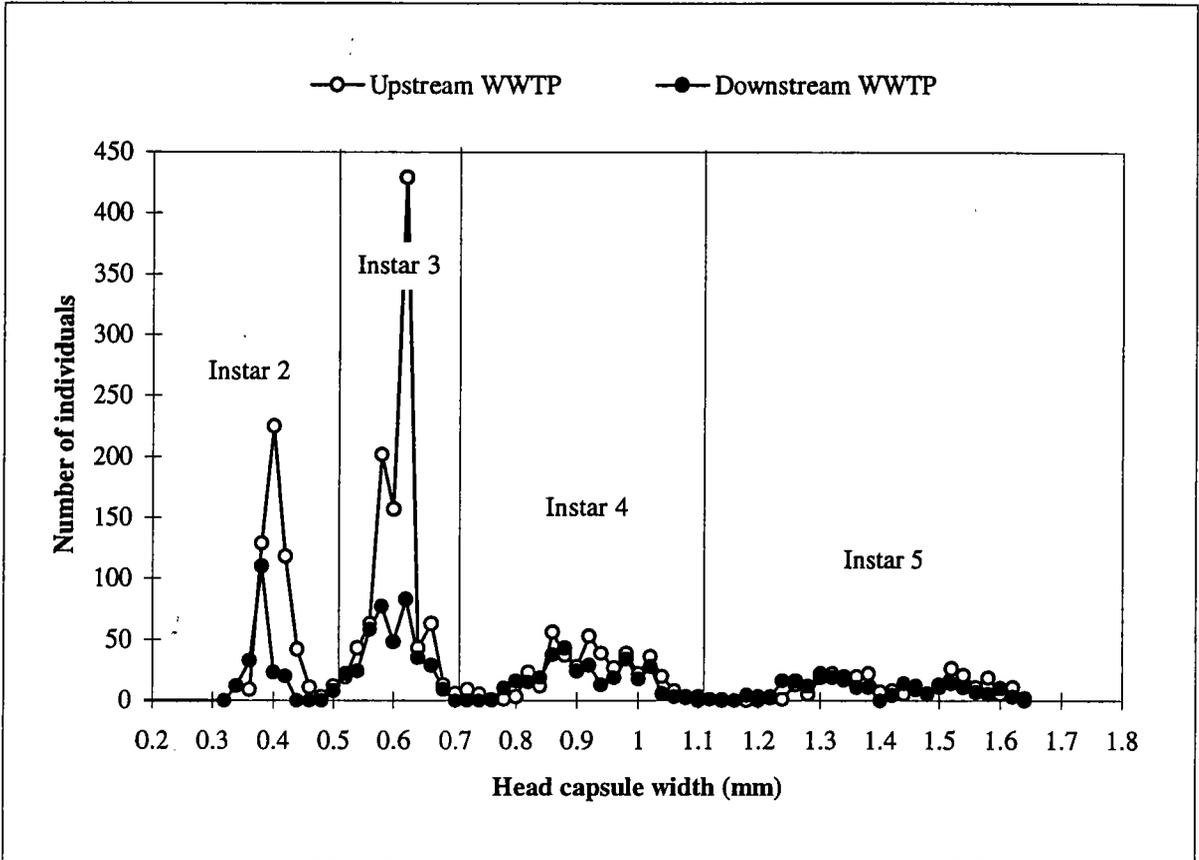


Fig. 6. Distribution of the larval instars of *H. angustipennis* in all samples (13 samples from March 95 to February 96).

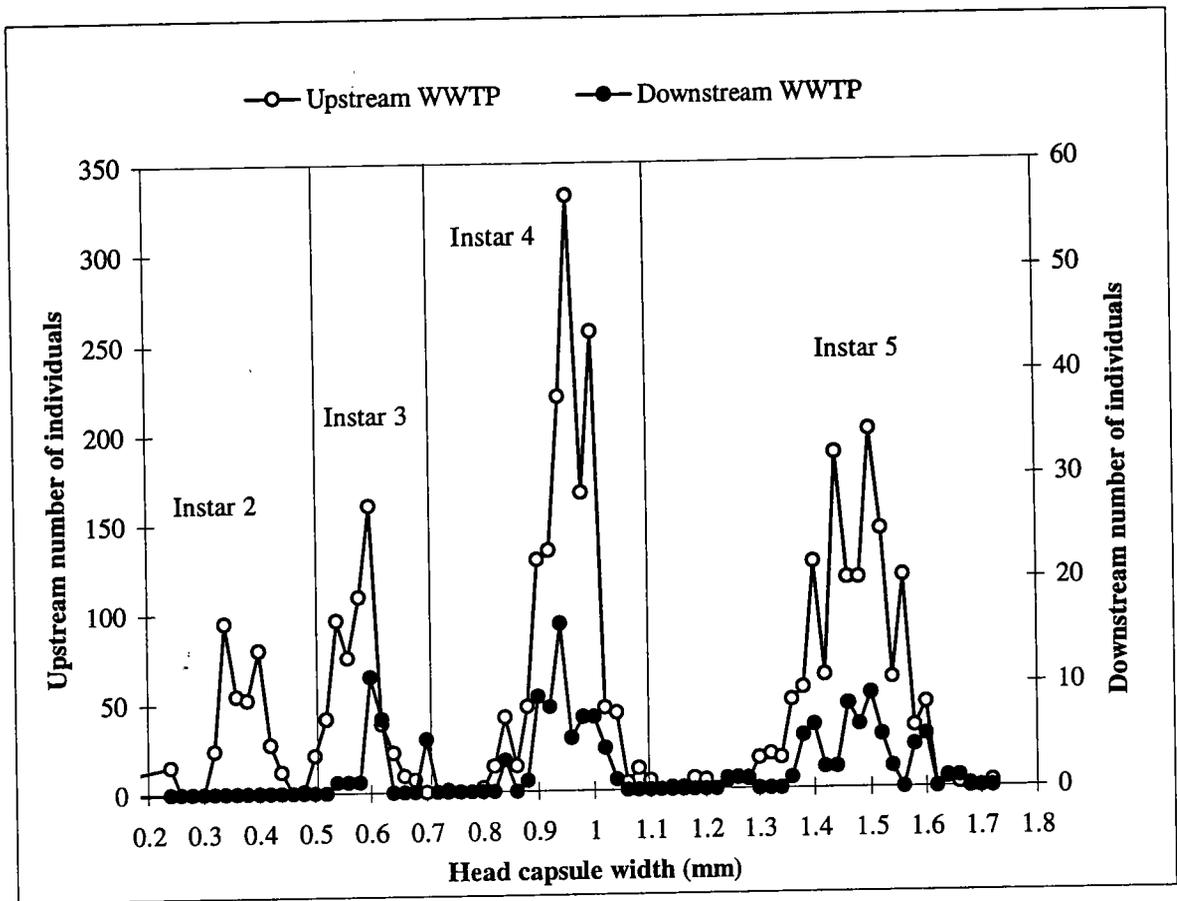


Fig. 7. Distribution of the larval instars of *H. pellucidula* in all samples (13 samples from March 95 to February 96).

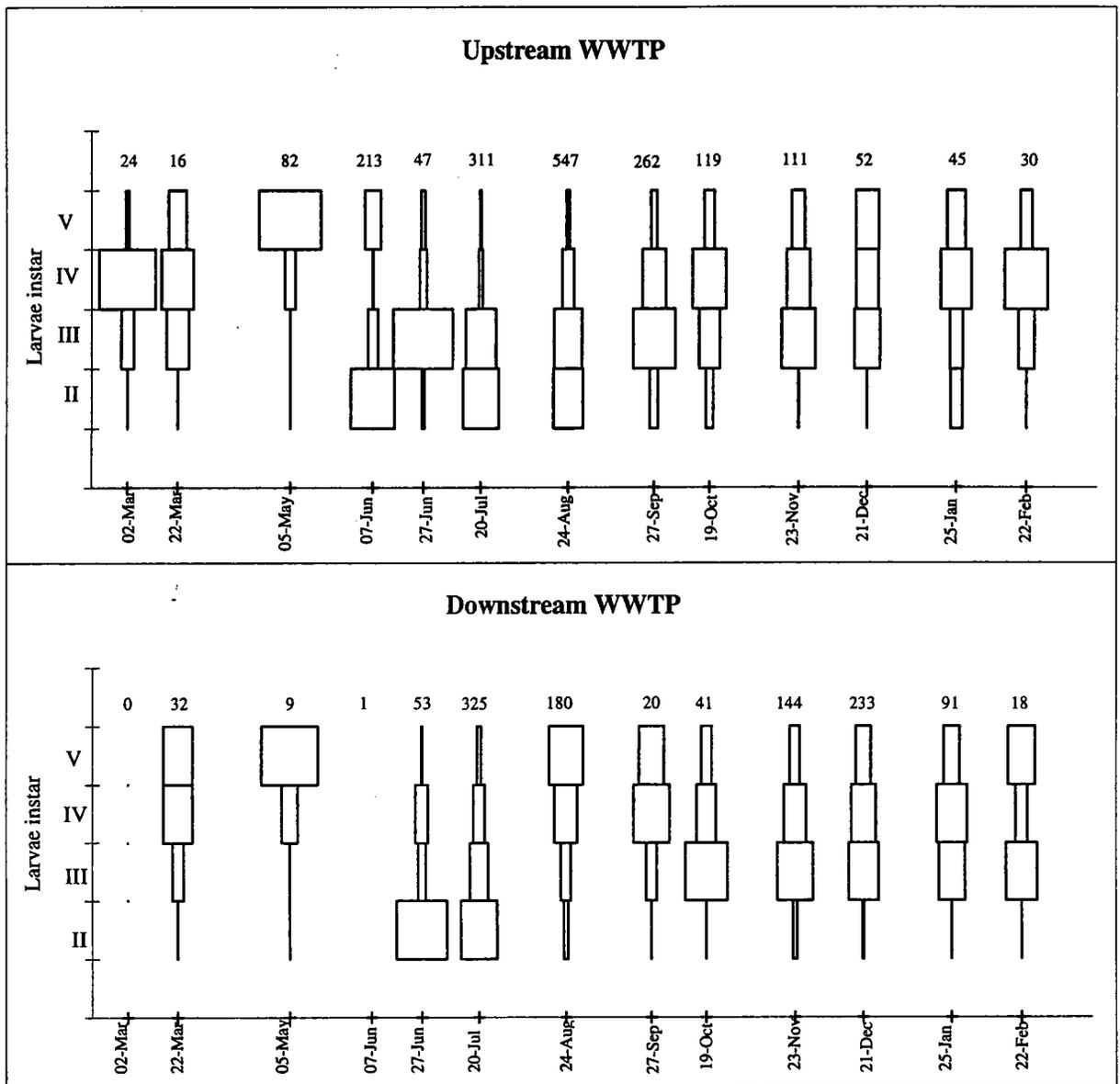


Fig.8. Distribution (in percent) of the different larval instars of *H. angustipennis* (Numbers on the top of the graph are total numbers of hydropsychids sampled each month).

Table 1. Sampling dates and corresponding effluent and river flows. For toxicity test, effluent and river water from WWTP upstream site were sampled while for invertebrates sampling, invertebrates and river water to be analysed were sampled from WWTP upstream and downstream sites.

Toxicity test sampling / Invertebrates sampling	Instream Waste Concentration ^a (%)	River flow (m ³ /s)
22-Feb / 02-Mar	NM ^b /NM	2.30 / 2.63
22-Mar	5	1.77
19-Apr / 05-May	12 / 3	0.27 / 1.19
24-May / 7-Jun	4 / 2	0.66 / 0.75
21 / 27-Jun	4 / 14	0.41 / 0.11
19 / 20-Jul	24 / 23	0.05 / 0.05
23 / 24-Aug	16 / 10	0.07 / 0.09
27-Sep	3	0.53
18 / 19-Oct	1 / 1	1.48 / 1.53
22 / 23-Nov	1 / 2	1.12 / 0.93
20 / 21-Dec	3 / 3	0.71 / 0.50
24 / 25-Jan	2 / 2	0.90 / 0.71
21 / 22-Feb	1 / 1	1.81 / 1.61
Min-Max (Mar95-Feb96)	0.3 - 42	0.03-11.20

^aobtained by validated river flow data from database

^bNM : not measured.

Table 2. Concentrations of pollutants in chub muscle from the Chalaronne river (June 95)

Concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$ lipid weight)	Upstream town (site A)	Upstream WWTP	Downstream WWTP
PCB 101	ND ^a	430	71
PCB 138	ND	664	95
PCB 153	ND	586	143
PCB 180	ND	313	71
lindane	233	469	143
HCB	ND	39	24
Chlordane	633	ND	ND
pp'DDE	667	1445	643
phenol	ND	ND	11900
methylphenol	ND	ND	1190
Lipids % wet weight	3	2.6	4.2

^aND : not detected (detection limit of $1\mu\text{g}/\text{kg}$ wet weight except for chlordane ($5\mu\text{g}/\text{kg}$) and for phenols ($30\mu\text{g}/\text{kg}$)).

Table 3. Contaminants concentrations in sediments of the three sites from the Chalaronne river (September 95)

Concentrations	Upstream town (site A)	Upstream WWTP	Downstream WWTP	Reference ^a
Metals (mg/kg dry weight)				
Arsenic	4.9	6	4.4	5
Cadmium	1.7	1.9	1.8	0.5
Chromium	69	65	66.1	25
Copper	13.4	38.6	57.9	20
Mercury	0.13	1.1	3.1	0.1
Nickel	29	27.7	28.7	10
Lead	30.3	74	73.6	20
Zinc	85	175	199	75
PAHs (µg/kg dry weight)				
Benzo(a)pyrene	ND	280	260	
Benzo(b+k)fluoranthène	ND	410	ND	
Chrysene	ND	390	390	
Fluoranthene	150	380	330	
Fluorene	50	130	70	
Naphtalene	ND	0.10	ND	
Phenanthrene	130	350	240	
Pyrene	170	390	350	
PCBs	ND	ND	ND	

^aFrom Water Agency of Rhône-Méditerranée-Corse 1994. A sediment is said to be contaminated when concentrations are two-fold these reference levels. ND : not detected (detection limit of 50 µg/kg dry weight).

Table 4. Values of the variables associated with biological indices (IBG, AFNOR NF T90-350, see text) in the Chalaronne river (March 95 to February 96).

Sampling dates	Indicator group				Number of taxa		Biological index	
	Upstream WWTP		Downstream WWTP		Upstream WWTP	Downstream WWTP	Upstream WWTP	Downstream WWTP
	Indicator taxa	Ind.V. ^a	Indicator taxa	Ind.V.				
2-Mar	Hydropsychidae	3	Hydropsychidae	3	16	13	7	7
22-Mar	Hydropsychidae	3	Hydroptylidae	5	26	20	10	10
5-May	Leptophlebiidae	7	Ephemerellidae	3	25	17	14	8
7-Jun	Hydropsychidae	3	Ephemerellidae	3	20	16	8	7
27-Jun	Psychomyidae	4	Hydropsychidae	3	24	19	10	8
20-Jul	Hydropsychidae	3	Hydropsychidae	3	19	19	8	8
24-Aug	Hydroptilidae	5	Hydropsychidae	3	23	18	11	8
27-Sep	Hydroptilidae	5	Baetidae	2	33	16	14	6
19-Oct	Leptophlebiidae	7	Psychomyidae	4	25	17	14	9
23-Nov	Hydropsychidae	3	Hydropsychidae	3	29	23	11	9
21-Dec	Psychomyidae	4	Psychomyidae	4	30	25	12	11
25-Jan	Ephemeridae	6	Ephemeridae	6	30	24	14	12
22-Feb	Ephemeridae	6	Ephemeridae	6	24	21	12	12
Min-Max		3-7		2-6	16-33	13-25	7-14	6-12

^aInd. V. : Indicator Value.

Table 5. *Ceriodaphnia dubia* adults survival, reproduction (in number of neonates : mean±SD) and length (in µm : mean±SD) at the end of a 7-d chronic toxicity test of WWTP effluents collected every month from March 95 to February 96. (*Ceriodaphnia dubia* were exposed to river water **A** and to two concentrations of WWTP effluent diluted with river water **B** and **C** (10 replicates per tested sample).

	A river water			B 90% effluent			C effluent at estimated IWC ^a			
	Survival	Neonates	Adult length	Survival	Neonates	Adult length	Survival	Neonates	Adult length	IWC (%)
24-Feb	10	33± 7	1029±50	10	14±6 *	813±204 *	9	23±11 *	988±66	NM ^b (50) ^c
24-Mar	10	36±10	1068±80	7	24±11*	979± 75	10	37± 5	1082±74	5
21-Apr	10	29± 4	931±46	10	23± 9	888± 44	9	28± 8	936±63	12
26-May	9	39± 7	983±50	0 *	-	-	9	30± 9 *	947±75	16
21-Jul	10	31± 8	1023±60	3 *	1± 1 *	683± 35 *	10	21± 9	929±58 *	14
29-Sep	10	34±11	999±64	8	9± 3 *	795± 71 *	9	40± 6	960±59	4
20-Oct	9	45±10	983±4	8	19± 7 *	941± 25	10	38± 9	997±38	1
23-Nov	9	27± 7	948±36	10	15± 5 *	901± 58	10	22± 3 *	925±47	2 (20)
22-Dec	10	21± 6	991±32	10	9± 3 *	883± 35 *	10	27± 6	978±35	3
26-Jan	10	27±11	1047±6	9	16±10*	984± 37 *	10	34±10	1034±55	2
23-Feb	10	43±13	1053±65	10	41±13	945± 78 *	10	46± 9	1024±42	1

* : significantly different (p<0.05) according to statistical test detailed in US EPA (1992)

^a estimated IWC : Instream Waste Concentration obtained by real time river flow data

^b NM : not measured

^c in parentheses : effluent concentration tested for C when effluent concentration tested different from IWC.

Table 6. Regressions between Weight (W), Surface (S) and Head Capsule width (HC) of *H. angustipennis* at WWTP upstream and downstream sites.

Upstream WWTP	Downstream WWTP
$\log W = 1.5 \log S - 0.6 \quad R^2 = 0.94$	ND ^a
$\log W = 2.6 \log HC + 0.9 \quad R^2 = 0.78$	ND
$\log S = 1.6 \log HC + 1 \quad R^2 = 0.77$	$\log S = 2.1 \log HC + 1 \quad R^2 = 0.72$
$\log S = 1 + 1.2 \log HC + 0.02 \text{ station} + 0.5 \text{ station} * \log HC$	$R^2 = 0.79$

^aND : not determined (regression not statistically significant).