

UNIVERSITE DE METZ - FRANCE
Centre des Sciences de l'Environnement

CETESB
(Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) Sao Paulo - BRESIL

THESE

présentée le 19 Décembre 1995
pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de METZ
mention "Toxicologie de l'Environnement"

**EVALUATION ECOTOXICOLOGIQUE DU RESERVOIR
GUARAPIRANGA, SP-BRESIL,
EN RELATION AVEC LE PROBLEME DES ALGUES
TOXIQUES ET DES ALGICIDES**

par

Pedro Antonio ZAGATTO

Directeurs de recherche :

Professeur Paule VASSEUR (Université de METZ)
Professeur Sandra Maria F. de Oliveira Azevedo (Université Fédérale
de RIO DE JANEIRO)

Membres du Jury :

Professeur Jean-François FERARD, Université de METZ
Professeur Jeanine GARNIER (rapporteur), Université de ROUEN
Docteur Michel GUERBET (rapporteur), Université de ROUEN
Professeur Benoît RETHER, Université de STRASBOURG
Professeur Paule VASSEUR, Université de METZ

UNIVERSITE DE METZ - FRANCE
Centre des Sciences de l'Environnement

CETESB
(Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) Sao Paulo - BRESIL

THESE

présentée le 19 Décembre 1995
pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de METZ
mention "Toxicologie de l'Environnement"

**EVALUATION ECOTOXICOLOGIQUE DU RESERVOIR
GUARAPIRANGA, SP-BRESIL,
EN RELATION AVEC LE PROBLEME DES ALGUES
TOXIQUES ET DES ALGICIDES**

par

Pedro Antonio ZAGATTO

Directeurs de recherche :

Professeur Paule VASSEUR (Université de METZ)
Professeur Sandra Maria F. de Oliveira Azevedo (Université Fédérale
de RIO DE JANEIRO)

Membres du Jury :

Professeur Jean-François FERARD, Université de METZ
Professeur Jeanine GARNIER (rapporteur), Université de ROUEN
Docteur Michel GUERBET (rapporteur), Université de ROUEN
Professeur Benoît RETHER, Université de STRASBOURG
Professeur Paule VASSEUR, Université de METZ

- REMERCIEMENTS -

Ce travail a été réalisé à CETESB (Compagnie de Technologie de Assainissement Environnementale), Sao Paulo, Brésil, sous la direction de Dra. Sandra Maria Felicia de Oliveira, de l'Université Fédéral de Rio de Janeiro. Je voudrais la remercier pour ses conseils et l'accueil qu'elle m'a toujours réservé.

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance et mon admiration au Professeur Paule Vasseur, Directeur du Centre des Sciences de l'Environnement (CSE), à Metz, pour toute l'attention qu'elle m'a toujours portée. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes de la CETESB et du CSE qui, de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser cette thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements à la CETESB et plus spécialement au Dr. Denise, pour l'opportunité qu'ils m'ont donné de suivre cette formation en Ecotoxicologie.

Toute l'équipe du laboratoire d'Ecotoxicologie Aquatique, Daniel, Rosalina, Sandra, Eduardo et spécialement à Marcia Aparecida Aragao de la CETESB qui m'a particulièrement aidé ainsi que :

Maria do Carmo Carvalho et Dr. Célia Sant'Anna, pour l'identification des algues.

Mara, Magali et Marcelo pour l'analyse de chlorophylle et pour l'échantillonnage des poissons.

Toutes les personnes qui ont participé aux analyses physico-chimiques et qui m'ont aidé pour l'échantillonnage des eaux et sédiments.

L'Institut Adolfo Lutz, Brésil, qui nous a fourni les souris.

Un grand merci à Claudine pour son aide précieuse dans l'achèvement de ce mémoire.

Je remercie Maryline de sa collaboration et de son attention à me faciliter les démarches administratives.

*Je voudrais témoigner toute mon affection
et ma reconnaissance à
Maria, Bruna et Nuno
(meus amores).*

RESUME

Ce travail concerne le biomonitoring des eaux du réservoir Guarapiranga, qui sert de source d'eau potable pour une partie de la population de Sao Paulo, Brésil.

Les caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et écotoxicologiques des eaux et des sédiments et la bioaccumulation du cuivre par les organismes aquatiques du Guarapiranga ont été étudiées ainsi que la toxicité des cyanophycées isolées de ce réservoir.

L'intérêt du charbon activé pour la rétention des toxines algales et l'écotoxicité des algicides, sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène, utilisés pour empêcher les blooms d'algues ont été étudiés en deuxième partie. Une proposition de limites maximales admissibles d'algues toxiques dans les eaux, est proposée à l'issue de cette recherche.

Sur la base des mesures de phosphate total, orthophosphate, chlorophylle-*a*, communautés phytoplanctoniques et transparence de l'eau, le réservoir Guarapiranga, peut être classé comme méso à hypereutrophique ; les teneurs totales en phosphates et en cuivre ont souvent excédé les standards de qualité des eaux pour la préservation de la vie aquatique.

Parmi les cyanophycées isolées du réservoir, les souches *Oscillatoria quadripunctulata*, *O. limnetica*, *O. amphibia*, *Phormidium sp*, *Microcystis incerta* et une souche de *Microcystis aeruginosa*, ont présenté une toxicité aiguë sur la souris. Seule l'algue *O. redekei* s'est révélée présenter des effets de toxicité aiguë sur *Daphnia*.

En ce qui concerne les algicides, les algues filamenteuses sont apparues plus sensibles au peroxyde d'hydrogène qu'au cuivre. Parmi les différents groupes d'organismes testés, les microcrustacés sont les plus sensibles aux algicides. L'action du mélange cuivre et peroxyde d'hydrogène s'est révélée expérimentalement moins qu'additive, c'est à dire inférieure à la somme des effets de chacun des algicides.

Nous avons montré que les organismes planctoniques sont de bons indicateurs de la contamination de l'eau par le cuivre. Le niveau de cuivre accumulé dans les muscles des poissons est bas et peut être considéré comme acceptable pour la consommation.

En ce qui concerne l'élimination de toxines d'algues, le charbon activé s'est révélé un adsorbant efficace et utile dans le traitement d'épuration de l'eau ; 15 mg de charbon retiennent jusqu'à 5mg, en poids sec, d'extraits d'algues toxiques de référence, *Cylindrospermopsis raciborskii* et *Microcystis aeruginosa*, dont la DL₅₀ est de 12 et 30 mg/Kg, respectivement.

Le niveau de contamination des sédiments du réservoir peut être considéré de moyennement à hautement pollué par le cuivre, bien qu'il n'induisse pas de toxicité aiguë sur *Hyaella*. Dans les deux stations d'échantillonnage, la contamination la plus élevée se trouve près du captage d'eau.

Ce travail montre que ce réservoir présente une dystrophie, une contamination par le cuivre élevée avec des conséquences au plan écotoxicologique.

Abstract

This biomonitoring study was carried out in Guarapiranga reservoir which is an important source for drinking water in Sao Paulo city, Brazil. Physico-chemical, biological and ecotoxicological results of the water and sediments from the Guarapiranga reservoir are hereby reported with the results of copper bioaccumulation. Toxicity of cyanophytes isolated from this reservoir, toxin retention by active charbon, toxicity studies of the algicides, hydrogen peroxide and copper sulfate, towards aquatic organisms and the proposition of the maximal allowable limits of the toxic algae in the water are presented too.

Based on the total phosphate, orthophosphate, chlorophyll-a contents, as well as on the phytoplanktonic communities and water transparency, the Guarapiranga reservoir could be described as meso-hypereutrophic. Phosphate and copper levels exceeded the standards of water quality required for preservation of aquatic life.

Among the isolated species of cyanophytes, *Oscillatoria quadripunctulata*, *O. limnetica*, *O. amphibia*, *Phormidium* sp, *Microcystis incerta* as well as one of three strains of *M. aeruginosa*, all were acutely toxic to mice. For *Daphnia* only *O. redekei* caused acute toxicity.

Hydrogen peroxide and copper sulfate were then tested for their algicidal activities. Filamentous algae were more sensitive to the hydrogen peroxide than to copper. However, these two products were more toxic to microcrustaceans than to algae and fish species. The acute toxicity of these algicide mixtures is less than additive.

Nevertheless, planktonic organisms were good indicators for copper concentration in water. In fact, copper was slightly bioaccumulated in fish muscles. Fish could still be considered as acceptable for human consumption.

The retention capability of activated charcoal was tested for the algal toxins. 15 mg of the adsorbant was sufficient to retain up to 5mg of toxic algae dry weight.

The Guarapiranga sediments could be considered as moderately to highly polluted by copper, although the sediments did not cause toxicity to *Hyallela*. The highest polluted area of this reservoir is located near the water catchment.

Our results show that the reservoir is characterized by a dystrophic process, high algicide concentrations and subsequent toxicity of the water.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABNT	Association brésilienne de normes techniques
APHA	American Public Health Organisation
AWWA	American Water Works Service Company
Camp.	Campagne d'échantillonnage
CE ₅₀	concentration induisant 50 % d'effet ou de réponse
CE(I) ₅₀ algues	concentration effective (ou inhibitrice) de 50% de la croissance algale
CETESB	Compagnie de Technologie de Assainissement Environnementale
CL ₅₀	concentration létale 50%
CMA	concentration maximale acceptable
CONAMA	législation fédérale du Conseil National de l'Environnement
DSE	dose sans effet à court terme
DL ₅₀	dose létale 50%
DBO	demande biologique en oxygène
FBC	facteur de bioconcentration
IA	indice d'additivité
IET	indice d'état trophique
i.p	injection intrapéritonéale
mgpt/L	mg de platine/litre
NOEC	concentration sans effets observés
NPJB	la souche d'algue est originaire du lac JB(Jardim Botanique-SP) et a été isolée par le NP-Nucleo de Pesquisa de la UFRJ
OD	oxygène dissous
p.c.	poids corporel
S	somme des actions toxiques
s.d.	sans date
SABESP	Compagnie d'Assainissement de l'Etat de Sao Paulo
rpm	rotation par minute
UFRJ	Université Fédérale de Rio de Janeiro

SOMMAIRE

1 - INTRODUCTION	1
2 - OBJECTIFS	7
3 - MATERIEL ET METHODES	8
3.I - L'eau	8
3.I.1. Analyses physico-chimiques et chlorophylle/phéophytine	9
3.I.2. Détermination quali-quantitative du phytoplancton	9
3.I.3. Toxicité de l'eau	9
3.I.4. Isolement des cyanophycées	9
3.I.4.1. cultures d'algues	10
3.I.4.2. estimation du poids sec des cyanophycées	11
3.I.4.3. préparation des algues pour les tests sur souris	11
3.I.4.4. tests de toxicité sur souris	12
3.I.4.5. tests de toxicité sur Daphnia	12
3.II. Algicides	13
3.II.1. Tests sur microcrustacés et poissons sur différents types d'eaux	13
3.II.2. Tests sur algues	14
3.II.3. Influence des algicides sur la toxicité des cyanophycées	14
3.II.4. Effet interactif des algicides	15
3.III. Analyse de l'accumulation du cuivre par les organismes aquatiques et le sédiment	17
3.III.1. Phytoplancton et zooplancton	17
3.III.2. Poissons	18
3.III.3. Sédiments	18
3.IV. Etude des capacités d'adsorption des toxines algales par le charbon activé	19
3.V. Etablissement de concentrations maximales admissibles en algues toxiques dans les eaux brutes	21

4 - RESULTATS ET DISCUSSION	22
4.I. Caractérisation physico-chimique, biologique et écotoxicologique des eaux du Guarapiranga sur la période d'étude	22
4.I.1. Analyses physico-chimiques	22
4.I.2. Analyses écotoxicologiques	28
4.I.3. Communautés phytoplanctoniques	31
4.II. Toxicité des cyanophycées isolées du réservoir Guarapiranga	36
4.II.1. Toxicité sur souris	36
4.II.2. Etablissement de critères d'acceptabilité concernant la présence d'algues toxiques dans l'eau utilisée pour la potabilisation	39
4.II.3. Toxicité des cultures de cyanophycées sur <i>Daphnia</i>	41
4.III. Toxicité du sulfate de cuivre et du peroxyde d'hydrogène sur les organismes aquatiques	44
4.III.1. Toxicité du sulfate de cuivre sur microcrustacés et poissons	44
4.III.2. Toxicité du peroxyde d'hydrogène sur microcrustacés et poissons	46
4.III.3. Toxicité du sulfate de cuivre et du peroxyde d'hydrogène sur algues	47
4.III.4. Influence du cuivre et du peroxyde d'hydrogène sur la toxicité des cyanophycées	48
4.III.5. Toxicité du mélange de sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur <i>Daphnia</i>	49
4.IV. Accumulation du cuivre	51
4.IV.1. Par les algues lors d'essais en laboratoire	51
4.IV.2. Phytoplancton et le zooplancton	52
4.IV.3. Poissons	54
4.V. Caractérisation des sédiments du Guarapiranga	57
4.VI. Rétention des toxines algales par le charbon activé en poudre	61
5 - CONCLUSIONS ET CONSIDERATIONS FINALES	66
6 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71

8 - ANNEXES

- A** Résumé des conditions expérimentales mises en oeuvre dans les essais sur poissons, microcrustacés et algues.
Composition du milieu ASM-1 pour les cyanophycées.
- B** Seuil de sensibilité des techniques expérimentales.
- C** Résultats des variables physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques.
- D** Résultats de CE_{50} -48h des essais d'interaction du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*

1-INTRODUCTION

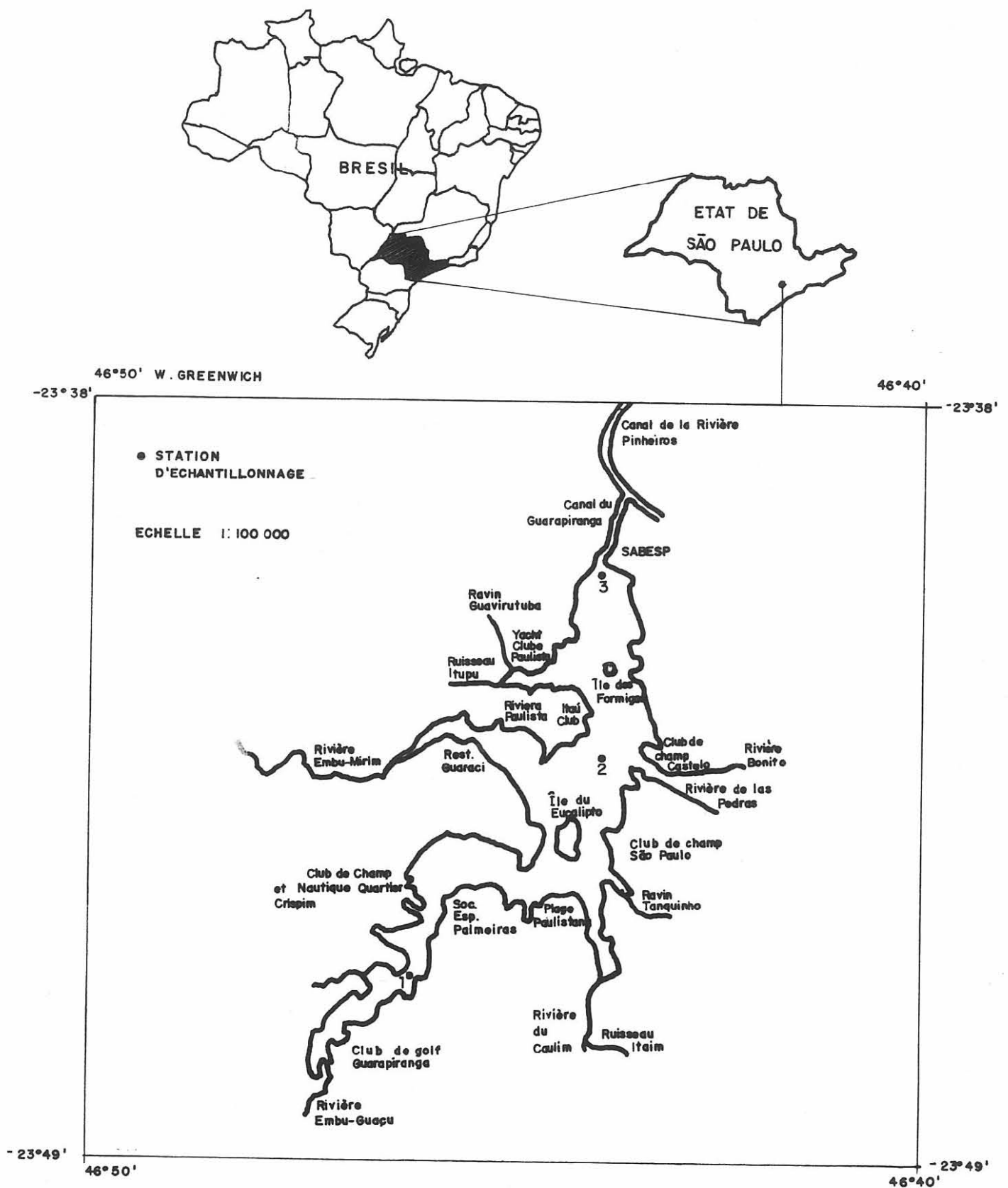


Fig.1 - LOCALISATION DU RESERVOIR GUARAPIRANGA ET EMLACEMENT DES STATIONS D'ECHANTILLONNAGE

1 - INTRODUCTION

Le réservoir du Guarapiranga a été construit par l'ancienne Compagnie d'électricité Light S/A, pendant les années 1906 à 1908, afin de régulariser les débits de la rivière Tietê et de produire l'énergie électrique. En 1927, son usage s'est étendu à l'approvisionnement en eau potable pour la ville de São Paulo. Actuellement, ce réservoir est le deuxième producteur d'eau pour cette métropole et satisfait aux besoins de 25% de ses habitants, avec un débit de $11\text{ m}^3/\text{s}$ environ.

Situé à 740 mètres d'altitude, à une latitude de $23^\circ 43'$ et à $46^\circ 32'$ de longitude ouest, le réservoir a une superficie de 34 km^2 , un volume de $195 \times 10^6\text{ m}^3$; sa profondeur est de 7m en moyenne, 13 m au maximum et son périmètre de 85 km (CETESB, 1983 ; CALEFFI *et al.*, 1993). Il draine une région de 631 km^2 (figure 1).

Ce réservoir appartient au bassin de la rivière Tietê et il est formé par les rivières Guarapiranga, Embu-Guaçu, Embu-Mirim et d'une vingtaine d'affluents de moindre importance et de plus faible débit.

Selon l'Arrêté n° 24806 du 25 juillet 1955, les eaux du bassin du Guarapiranga doivent permettre la préservation de la vie aquatique. La loi n° 11 du Conseil d'Etat du Contrôle de la Pollution des Eaux, en 1956, a interdit le déversement de tous rejets, domestique et industriel, dans ce bassin (CECPA, 1959 ; PEDROSO, 1960).

En 1960, le gouvernement de l'Etat de São Paulo a créé une Commission du bassin Guarapiranga, afin de préserver et de contrôler la qualité sanitaire des eaux du réservoir. Cette commission a révisé la législation existante et a conclu que la contamination des eaux destinées à l'approvisionnement public constituait un crime pénal (OLIVEIRA, 1961). Ses travaux marquent le début des recherches relatives aux aspects sanitaires du bassin du Guarapiranga, même si quelques études sur les données physico-chimiques de ces eaux avaient été réalisées antérieurement (ROCHA, 1976).

Selon PEDROSO (1960), la contamination bactérienne évaluée par le nombre de coliformes était acceptable pour l'approvisionnement public jusqu'en 1960. Il a cependant recommandé que les sources de contamination soient mieux contrôlées par l'étude de la capacité assimilatrice du réservoir.

Dans les années 60, les préoccupations étaient l'apparition de blooms d'algues, du fait des problèmes rencontrés dans le réservoir Billings de la même région de São Paulo, causés par la pollution domestique et industrielle. La minéralisation des matières organiques résultant de la pollution fournit en effet des conditions idéales pour le développement du phytoplancton.

Le Plan de Contrôle de la Pollution des eaux, mis en place par Arrêté 50.592 du 29/10/68, a eu comme objectifs le maintien de la qualité des eaux, la réduction et l'élimination des sources de pollution existantes (MACEDO *et al.*, 1972).

Selon la législation en vigueur (Arrêté n° 10755, du 22 de novembre de 1977-CETESB, 1982), les eaux du réservoir Guarapiranga sont actuellement réglementées comme des eaux de Classe 1, adéquates à la préservation des communautés aquatiques ; le déversement d'effluents même traités, dans ces eaux n'est pas admis. (Législation CONAMA n° 20, du 18 juillet de 1986-BRASIL, 1986 ; Arrêté n° 8468, Art. 10).

Les problèmes dans ce réservoir sont apparus avec le développement de l'agglomération autour du bassin, avec la construction d'autoroutes et de lotissements (REVISTA DAE, 1992). En trois décades, la population du bassin du Guarapiranga est passée de 176.000 à 2,9 millions d'habitants, dont 550.000 habitants sur les bords immédiats du réservoir (S.R.H., 1994). Les mesures réglementaires visant à freiner et à contrôler l'occupation des sols n'ont pas réussi à enrayer le défrichage ni l'installation de bidonvilles aux marges du réservoir. La ville de São Paulo s'est étendue jusqu'au bassin, sans qu'une infrastructure de protection de la qualité des eaux ne soit mise en place ni qu'un réseau de canalisation et d'épuration des eaux d'égouts n'aient été installés (MELCHOR *et al.*, 1975 ; CETESB, 1992-a).

Pendant la période de 1971 à 1974, la qualité sanitaire du réservoir s'était révélée satisfaisante, puisque dans les sites les plus pollués les valeurs de demande biologique en oxygène, d'oxygène dissous et de coliformes étaient conformes aux normes d'utilisation : la valeur de DBO à l'embouchure de la rivière Embu-Mirim était de 2,7 mg/L, alors que la limite établie par la législation brésilienne est de 5 mg/L. La présence de quelques organochlorés et de mercure, quoique faible, avait cependant été détectée, ces substances provenant de l'application de pesticides et de l'activité industrielle (ROCHA, 1976).

En 1983, une augmentation de l'azote et des phosphates a été trouvée, ce qui témoignait d'une eutrophisation du réservoir Guarapiranga. Un bloom d'algues *Anabaena spiroides*, provoqué par l'apport de nutriments par les principales rivières affluentes, a été noté la même année (CETESB, 1983).

De 1980 à 1989, onze accidents de mortalités de poissons ont été enregistrés dans ce réservoir, dont six causés par l'application d'algicides destinés à empêcher les blooms d'algues (CETESB, 1992b).

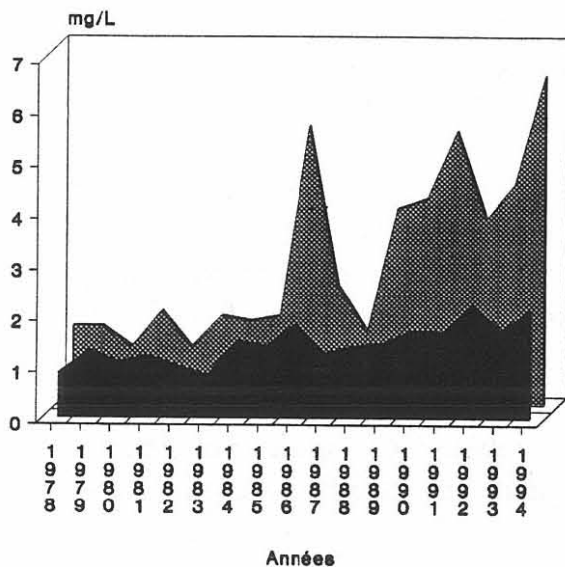
Selon MANCUSO (1992), le réservoir ne présente pas de stratification en ce qui concerne la température, même pendant les mois les plus chauds ; à l'exception de mars 1987, où une variation notable de la température entre la surface et le fond a été enregistrée. Mais une étude de la CETESB (1992c) révélait une stratification pour ce qui concerne l'oxygène dissous : de plus faibles concentrations étaient constatées en profondeur pendant la journée dans la région proche du captage d'eau potable. Ces conditions peuvent favoriser l'eutrophisation comme en témoignent les valeurs de chlorophylle plus élevées à ce niveau.

KORTMANN (1994) a confirmé que les eaux profondes du réservoir Guarapiranga contiennent moins de 3 mg d'oxygène dissous /L, et qu'elles sont anaérobiques pendant les heures les plus chaudes de la journée ; ces conditions favorisent le relargage de phénols, de magnésium et de phosphates des sédiments dans la colonne d'eau. Il conclut que la charge de phosphates des sédiments constitue une source continue de nutriments pour le phytoplancton et peut contribuer à l'apparition de blooms de cyanophycées.

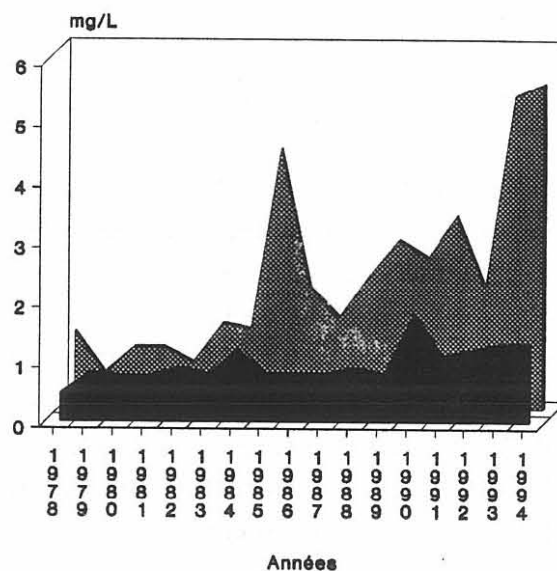
CALEFFI *et al.* (1992) et ZANARDI *et al.* (1992) ont constaté que (i) les eaux présentaient, à certains endroits, une qualité inacceptable pour la préservation et le maintien de la vie aquatique ; (ii) 20 stations d'échantillonnage étaient eutrophisées, (iii) quatre autres étaient mésotrophiques.

CALEFFI *et al.* (1993), en utilisant l'indice de Carlson qui tient compte des éléments azotés, phosphorés et de la turbidité, ont montré que les eaux proches du captage pour le traitement de potabilisation étaient eutrophiques à cause des concentrations en phosphates. Dans la région centrale du

Rivière Embu-Mirim



Captage de l'eau du Guarapiranga.



Rivière Embu-Guaçu.

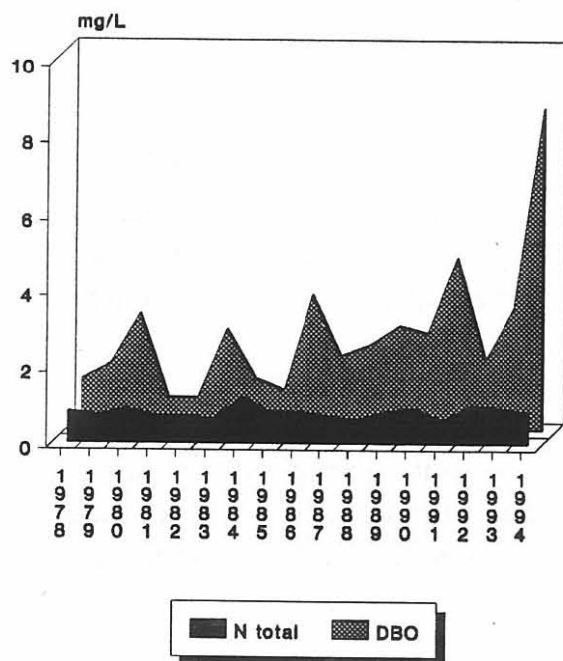


Fig. 2 Augmentation de la charge de N-total et DBO par les affluents et la station de captage de l'eau du réservoir Guarapiranga.

réservoir, les eaux étaient mésotrophiques, quoique l'utilisation de cuivre comme algicide pouvait biaiser l'interprétation des données.

Du fait de la croissance démographique autour du bassin, la pollution dans le réservoir s'est encore aggravée au cours de ces dernières années. Cela s'est traduit par l'augmentation significative d'azote ammoniacal, des coliformes totaux et des phosphates. Tous les affluents, sans exception, ont des taux de coliformes totaux et fécaux supérieurs aux normes ; cependant les rivières Embu-Guaçu et Embu-Mirim contribuent le plus à la charge en nutriments (CETESB, 1991-a). La figure 2 montre l'augmentation des nutriments dans ces tributaires et dans la zone de captage du réservoir.

Le déversement d'égouts dans les affluents des zones les plus peuplées, entraîne une augmentation progressive de la charge organique et, par conséquent une détérioration graduelle de la qualité des eaux du réservoir MANCUSO (1992).

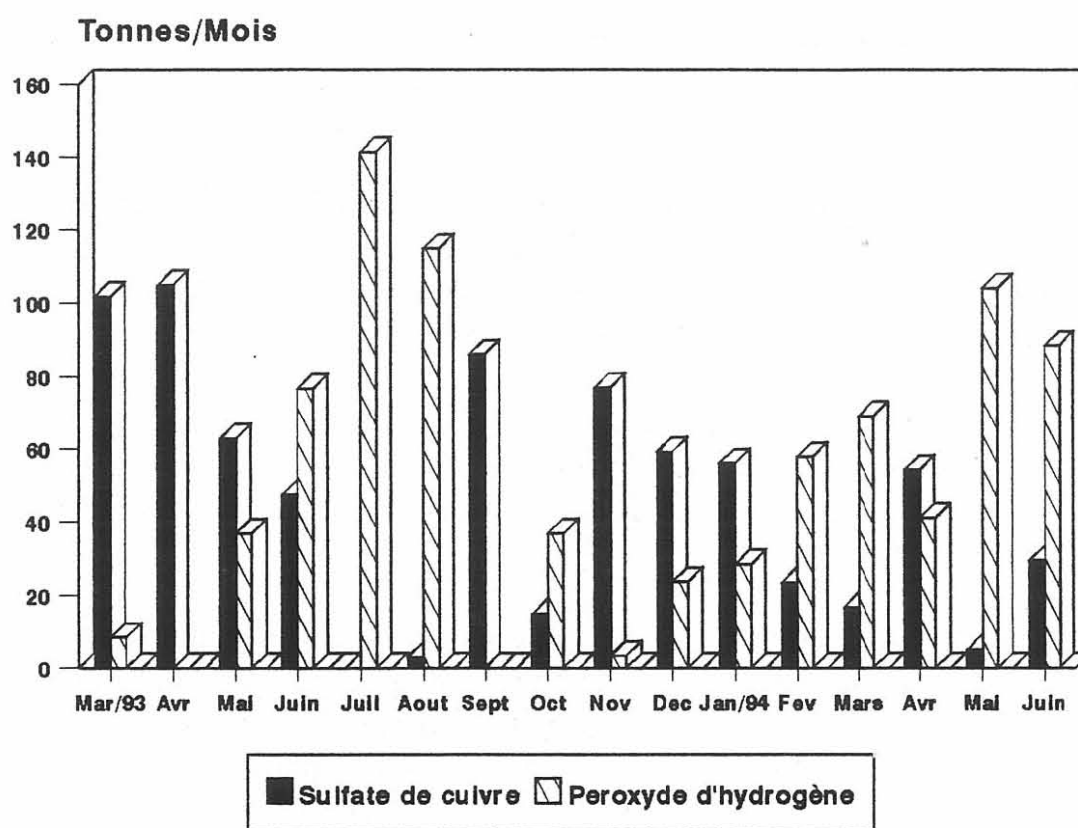
Au-delà de la pollution organique d'origine domestique, 115 industries contribuent à la pollution du bassin avec une charge résiduelle de 449 kg DBO/jour. Cette charge est due en majorité à une seule industrie responsable de l'apport de 418 kg DBO/jour (SMA, 1990).

En 1990, l'eutrophisation du réservoir a été de notoriété publique, avec l'apparition d'un bloom de cyanophycées, *Anabaena solitaria*, responsable de problèmes de goût et d'odeur de l'eau et de troubles gastro-intestinaux chez les consommateurs.

Les apparitions de blooms de cyanophycées ont été fréquentes dans le monde au cours de ces décennies, et de nombreuses espèces toxiques ont été trouvées. Des cas d'intoxications humaines, d'animaux domestiques et sauvages, ont été rapportés dans les différents parties du monde (HAMMER, 1968 ; RICHARD *et al.*, 1983 ; COOD *et al.*, 1989 ; FALCONER, 1989 ; CARMICHAEL, 1994).

Les cyanophycées peuvent entraîner des problèmes gastro-intestinaux, cutanés et oculaires. Certaines souches de *Microcystis* sont dotées d'un potentiel cancérigène hépatique et peuvent provoquer la mortalité chez les animaux (CARMICHAEL, 1992). Ces effets peuvent être consécutifs à la consommation d'eau non traitée contenant des algues toxiques et/ou des toxines, mais aussi à celle d'eau insuffisamment traitée en station

Fig.3 Application des algicides pendant la période de mars/93 à juin/94



d'épuration (HOFFMANN, 1976 ; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992 ; FUJIKI, 1992).

En ce qui concerne la toxicité des blooms des cyanophycées, leur mécanisme d'action est loin d'être élucidé : par ailleurs tous les blooms et toutes les souches de cyanophycées ne produisent pas nécessairement des toxines (SIVONEN, 1990 ; ZAGATTO & ARAGÃO, 1992).

Les risques que présentent les blooms d'algues toxiques, de plus en plus fréquents dans le réservoir Guarapiranga, impliquent d'améliorer les procédés d'épuration de l'eau, surtout pendant les périodes critiques ce qui augmente le coût du traitement.

Le sulfate de cuivre est utilisé mondialement comme algicide aux concentrations de 0,2 à 1 mg/L (ELDER & HORNE, 1978 ; HAWKINS & GRIFFITHS, 1987 ; CARMICHAEL, 1992). Actuellement, dans le réservoir Guarapiranga, l'application de cet algicide est pratiquement journalière afin d'obtenir des concentrations à un mètre de profondeur de 0,3 à 0,5 mg/L (PARO, M.C., communication personnelle).

Le peroxyde d'hydrogène à 51% est utilisé à la concentration de 1 à 1,5 mg/L pour l'élimination des cyanophycées filamenteuses. La figure 3 montre les quantités de produits appliquées pendant la période de notre étude de Mars 93 à Juin 94.

Bien qu'ils soient nécessaires pour le contrôle des blooms d'algues, les algicides peuvent avoir un impact négatif pour l'environnement et induire des mortalités de poissons. D'autres organismes peuvent aussi être affectés mais leur mortalité n'est pas toujours détectable car moins spectaculaire.

FALCONER (1991) a rapporté des cas d'hépatointérite en Australie, avec hospitalisation d'environ 150 personnes qui avaient consommé l'eau d'un réservoir sujette à un bloom de *Cylindrospermopsis raciborskii* et préalablement traitée par le sulfate de cuivre. Le sulfate de cuivre en provoquant la lyse cellulaire des cyanophycées a entraîné la libération de leurs constituants toxiques (HAWKINS *et al.*, 1985 ; CARMICHAEL, 1992).

Préoccupé par la fréquence de blooms d'algues toxiques dans le réservoir du Guarapiranga, le Secrétariat de L'Etat de la Santé, en 1993, a établi un

protocole de coopération technique entre plusieurs institutions, impliquant entre autre la CETESB qui a été chargée d'évaluer la toxicité algale et de contrôler la qualité des eaux du réservoir. Un programme d'Assainissement de l'environnement du bassin du Guarapiranga a été établi en vue d'assurer la prévention, le traitement et la réglementation du bassin du Guarapiranga.

2-OBJECTIFS

2 - OBJECTIFS

Nos objectifs au cours de cette recherche ont été de:

- évaluer la variabilité saisonnière de la qualité des eaux du réservoir du Guarapiranga en utilisant des paramètres physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques ;
- étudier la toxicité de quelques espèces de cyanophycées isolées des eaux du réservoir et l'efficacité du charbon activé dans l'élimination des toxines algales ;
- évaluer l'accumulation du cuivre dans les sédiments, dans les communautés phytoplanctoniques, zooplanctoniques et piscicoles du réservoir ;
- étudier la toxicité aiguë et chronique des algicides, sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur les algues, les microcrustacés et les poissons.

3-MATERIEL ET METHODES

Tab.1 Récapitulatif des différentes campagnes d'échantillonnage et des analyses effectuées sur les échantillons prélevés au cours de l'étude

[illegible]

3 - MATERIEL ET METHODES

3.1. L'eau

Trois stations d'échantillonnage ont été choisies du réservoir Guarapiranga : station 1, à l'entrée du réservoir, proche du quartier Crispim ; station 2, au milieu du réservoir devant le club Castelo ; et station 3 proche du captage d'eau de la SABESP. La localisation des stations est représentée sur la figure 1.

Lors d'études antérieures, réalisées par la CETESB (1992c), une grande diversité algale a été trouvée dans la région centrale du réservoir, vraisemblablement favorisée par l'absence d'utilisation d'algicides jusqu'en 1992 (données fournies par la SABESP). La station 2 a été sélectionnée pour l'isolement des algues et le prélèvement bimestriel d'eau pour les analyses physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques. Pendant la période de Mars 1993 à avril 1994, huit campagnes d'échantillonnage ont été réalisées. Les échantillons d'eaux ont été prélevés en surface. Les modalités décrites dans le guide CETESB (1988) ont été suivies pour chaque type d'analyse.

Les déterminations du pH, de l'oxygène dissous (méthode de Winkler), de la température, de la transparence de l'eau (disque de Secchi) et de la luminosité (avec photomètre), ont été réalisées sur le terrain. Les échantillons d'eau ont été analysés au laboratoire en ce qui concerne l'azote, les phosphates, la chlorophylle-a, la phéophytine-a, le cuivre total, la turbidité, le phytoplancton, et la toxicité chronique sur microcrustacés.

Aux trois stations, les eaux et les sédiments ont été prélevés en février, avril et juin 1994 pour les analyses de toxicité, les analyses de cuivre et l'étude de sa bioaccumulation par les espèces aquatiques.

La chronologie des campagnes d'échantillonnage et les analyses effectuées sur les échantillons prélevés aux trois stations sur l'ensemble de la période d'étude sont présentées dans le tableau 1.

Les analyses physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques des eaux, des sédiments et des poissons réalisées à chacune des différentes campagnes d'échantillonnage sont détaillées dans le tableau 2.

Tab. 2 Récapitulatif des analyses physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques effectués à chacune des différents campagnes d' échantillonnage des eaux, des sédiments et des poissons

EAUX				
Analyses physico-chimiques	Essais de toxicité	Phytoplancton total	Phytoplancton concentré sur tamis 20µ après 175µ	Zooplancton concentré sur tamis de 180 µ après 500µ
PO4 P total N.amoniacal total N.Kjeldhal N.nitrate N.nitrite pH OD Transparence Turbidité Temperature Chlorophylle a Phéophytine a Dureté Cuivre total	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (7jours)	identification et comptage	concentration de cuivre poids sec isolement des cyanophycées essais sur souris essais sur <i>Daphnia</i>	concentration de cuivre poids sec

Sédiments	
Essai de toxicité sur <i>Hyallela cf. azteca</i>	. concentration de cuivre . granulometrie

Poissons
concentration de cuivre . muscles . viscères

3.I.1. Analyses physico-chimiques, chlorophylle/phéophytine

Les concentrations en azote, en phosphate, en cuivre et la turbidité ont été déterminées selon les méthodologies de la 17^{ème} Edition du Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1989).

Chlorophylle et phéophytine ont été mesurées, après extraction organique des pigments par l'acétone et analyse spectrophotométrique à 664 nm (CETESB, 1990-a).

3.I.2. Détermination quali-quantitative du phytoplancton

Les analyses quantitatives des communautés phytoplanctoniques ont été réalisées au microscope inversé selon la norme CETESB (1978) à partir du comptage des cellules ou filaments par millilitre.

L'identification des espèces phytoplanctoniques a été faite en suivant les clés de classification décrites par PRESCOTT (1962) ; PHILLIPOSE (1967) ; BOURRELLY (1968, 1970, 1972) ; KOMAREK (1974) ; KOMAREK & PRAHA (1983).

3.I.3. Toxicité de l'eau

La toxicité chronique a été évaluée en étudiant la survie et la reproduction de *Ceriodaphnia dubia* lors d'essais de 7 jours. Dix organismes, juvéniles (<24h), placés dans 10 béchers contenant 15 mL de l'échantillon d'eau ont été utilisés. Tous les deux jours, cette solution a été renouvelée, la survie et la reproduction des organismes-test ont été enregistrées (CETESB, 1991-b). L'analyse statistique des données de reproduction et survie des organismes utilisée dans ce test a été développée par l'US-EPA (1989).

3.I.4. Isolement des cyanophycées

Le phytoplancton de la station 2 a été concentré par traîneau vertical au tamis de 20 µm, et l'échantillon amené au laboratoire pour l'isolement des cyanophycées. Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement des algues :

- isolement par microcapillaires de verre (VIEIRA & TUNDISI, 1979). Après capture, le filament ou la cellule a été lavé plusieurs fois en milieu de culture stérilisé ASM-1 pour cyanophycées (GIBSON & SMITH, 1982), transféré en tube à essais contenant le milieu de culture et incubé sous luminosité de 1500 lux à température de 25°C. La composition du milieu ASM1 est donnée en annexe A.
- sur plaques de milieu solide ASM-1 à 1% d'agar, sur lesquelles l'échantillon de phytoplancton est déposé. Les plaques sont incubées dans les mêmes conditions de lumière et de température que précédemment. Après croissance, quelques colonies isolées sont transférées avec un fil de nickel en tubes à essais contenant le milieu liquide ASM-1.
- par lavage de 10 mL d'échantillon du phytoplancton concentré, en tamis de 30µm, avec de l'eau déminéralisée et le milieu ASM-1 stérilisé. Le matériel lavé est introduit dans des erlenmeyers avec 100 mL de milieu ASM-1, sous agitation continue à 175 rpm et dans les mêmes conditions de lumière et de température que précédemment. En cas de croissance des algues, celles-ci sont isolées par la technique de microcapillaires de verre.

L'algue est ensuite repiquée en erlenmeyers contenant 200 mL de milieu ASM-1 (inoculum), soumis à une agitation continue, une photopériode 12/12, une luminosité de 1500 lux et une température de 25° C. Les souches mères algues ainsi obtenues ont été maintenues en tubes à essais et incubées dans les conditions mentionnées plus haut.

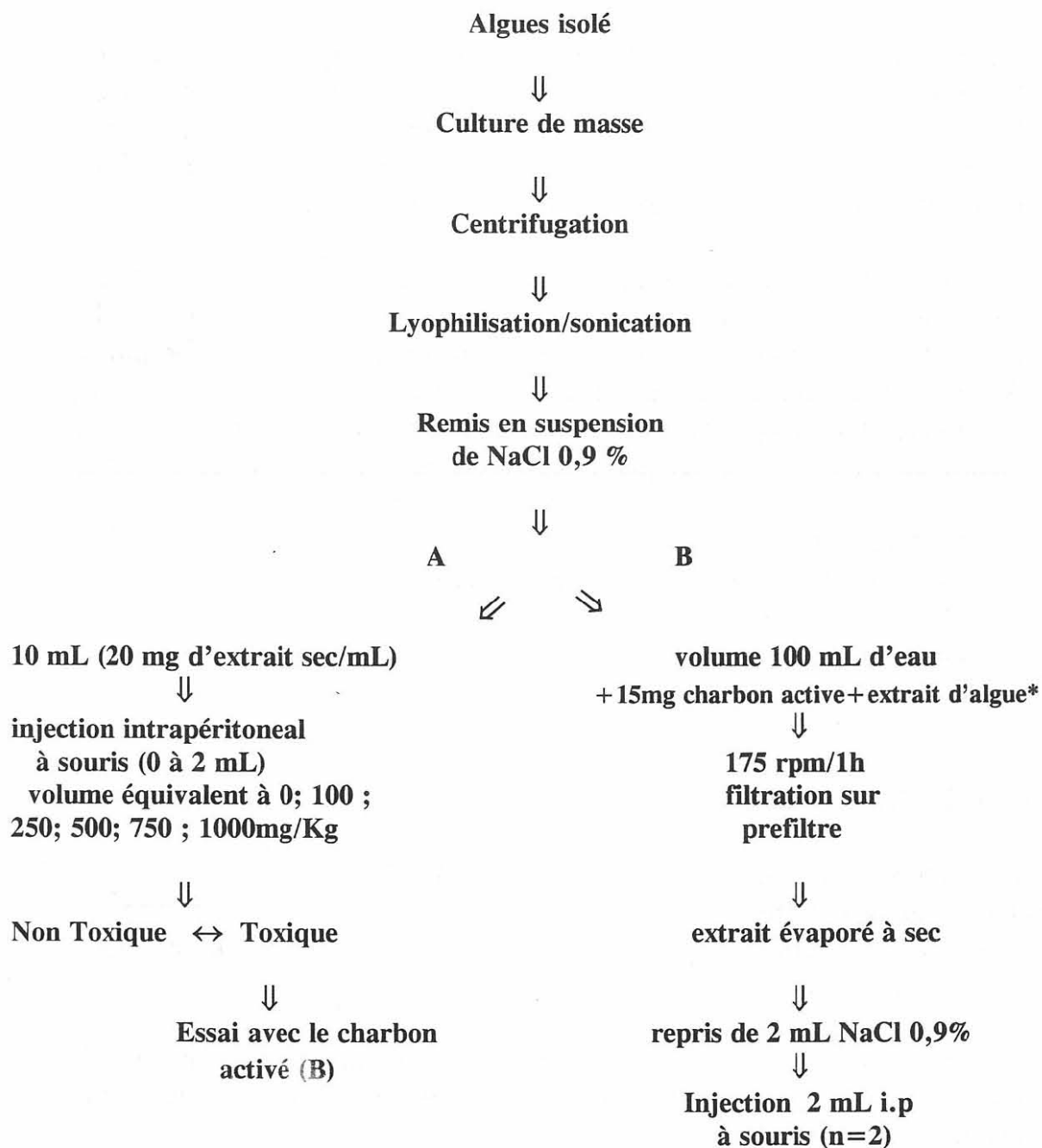
3.I.4.1. Cultures d'algues

Pour l'obtention d'une biomasse suffisante pour les tests de toxicité, les cultures algales ont été préparées en flacons de verre contenant six litres de milieu ASM-1, stérilisés, et inoculés par 200 mL de culture en phase exponentielle de croissance (USEPA, 1971).

Les cultures ont été maintenues sous aération continue, une luminosité de 1500 lux, une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité et une température de 25°C.

Les cultures de cyanophycées, en phase exponentielle de croissance ont été évaluées quant à leur toxicité aiguë sur souris et sur *Daphnia similis* afin de

Fig. 4 Schéma des protocoles de préparation des extraits d'algues pour les essais souris. (A) essais de screening de toxicité avec des concentrations croissantes d'extrait ; (B) essais réalisés avec les souches toxiques et les souches de référence, destinés à évaluer la capacité de rétention des toxines sur charbon.



* 0; 1,25; 5; 10; 20; 40 mg pour les algues de référence
25 mg pour les algues isolées du Guarapiranga

déterminer les concentrations maximales admissibles d'algues dans l'eau brute.

3.I.4.2. Estimation du poids sec des cyanophycées

Cette estimation a été réalisée sur 10 replicats. Les échantillons d'algues sont mis à sécher à l'étuve à 105° C pendant 24 heures, dans des coupelles d'aluminium placées deux heures en dessiccateur avant la pesée (USEPA, 1971).

Le poids sec de 10 mL de milieu ASM-1 sans algues (témoins) a été soustrait de la pesée correspondante aux 10 mL d'algues.

Le poids sec des algues a été déterminé de la manière suivante :

$$\text{Poids sec d'une algue ou filament (mg)} = \frac{\text{Valeur moyenne du poids sec de 10 ml d'algue dans les 10 replicats} - \text{Valeur moyenne de 10ml de milieu ASM-1 dans les 10 replicats}}{\text{nombre de cellules ou filaments dans 10mL}}$$

3.I.4.3. Préparation des algues pour les test sur souris

Les cultures en masse, en phase exponentielle de croissance, d'environ 15 à 20 jours, ont été centrifugées à 6000g, pendant 15 à 20 minutes, en conditions réfrigérées. Les algues ont été concentrées sous faible volume, congelées, puis lyophilisées.

Les lyophilisats obtenus ont été remis en suspension par une solution saline de NaCl 0,9% (20 mg d'algues lyophilisées par mL de solution saline). Les algues ont été lysées par traitement de la suspension aux ultrasons pendant trois minutes (sonicateur Merie Branson). La solution a été maintenue une nuit dans le réfrigérateur, avant d'être utilisée pour les tests sur souris.

Le protocole de préparation des extraits d'algues pour les essais sur souris est schématisé dans la figure 4.

3.I.4.4. Tests de toxicité sur souris

Les mâles de la souche de souris, Swiss Webster de 20-30 g, utilisés au cours des expériences proviennent de l'Institut Adolfo Lutz, São Paulo-Brésil, proche de notre laboratoire. Les animaux ont été utilisés pour les essais dans les 24 heures suivant leur fourniture par l'Institut. Dans l'intervalle, ils ont été nourris et maintenus en conditions d'élevage identiques à celles de l'Institut d'origine.

Les tests ont été réalisés selon la norme CETESB (1993-a), par injection intrapéritonéale de l'extrait algal à différentes concentrations (1000 ; 750 ; 500 ; 250 ; 100 mg/Kg p.c). Trois animaux tests ont été utilisés pour chaque concentration et chaque témoin. Les animaux témoins reçoivent seulement la solution saline de NaCl, au volume maximum utilisé pour la plus grande concentration testée, soit 2mL.

Les résultats des tests sont exprimés en terme de Dose Létale 50 (DL₅₀-24h; mg/Kg p.c.), déterminée par la méthode statistique Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1978).

Les souris mortes en moins de 4 heures de test sont disséquées, leur foie est prélevé pour l'étude de l'hépatotoxicité, pouvant se traduire par une augmentation du poids du foie (RICHARD *et al.*, 1983 ; SIVONEN, 1990). Les souris témoins sont sacrifiées à la fin des essais, et leur foie prélevé et examiné.

3.I.4.5. Tests de toxicité sur *Daphnia similis*.

Toutes les cultures de cyanophycées, en phase de croissance exponentielle, ont été évaluées quant à leur toxicité aiguë sur *Daphnia* (ABNT, 1993-a).

Le test consiste en l'exposition de 20 jeunes *Daphnia*, réparties en quatre tubes à essais, contenant chacun 10 mL de culture de cyanophycées de 1 à 18 millions de cellules ou filaments/mL à différentes dilutions. Cette procédure a été utilisée aussi avec les cultures de cyanophycées lysées par sonication pour étudier les effets des toxines pouvant être relarguées dans le milieu.

Tab. 3 - Organismes et méthodes utilisés dans les essais de toxicité

ORGANISMES	ESPECES	DUREE	CONDITIONS	REFERENCES
Poissons	<i>Brachydanio rerio</i> <i>Poecilia reticulata</i> <i>Cheirodon notomelas</i> <i>B. rerio</i> (stade larvaire)	4 jours 4 jours 4 jours 7 jours	semi-statique semi-statique semi-statique semi statique	ABNT (1993-b) ABNT (1993-b) ABNT (1993-b) CETESB (1994)
Microcrustacés	<i>Daphnia similis</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i> (chronique)	24-48 h 7 jours	statique semi-statique	ABNT (1993-a) CETESB (1991-b)
Algues	<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Pseudoanabaena galeata</i> <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	4 jours 4 jours 4 jours 4 jours	statique statique statique statique	ABNT (1992-a) ABNT (1992-a)* ABNT (1992-a)* ABNT (1992-a)*

* Méthode modifiée : le milieu LC OLIGO a été substitué par le milieu ASM1

Afin de vérifier le relargage de toxines dans le milieu liquide, pendant la période de croissance des cyanophycées lors des cultures en masse, la toxicité du milieu ASM1 et des cultures algales a été également testée. La séparation des cellules du milieu a été réalisée par centrifugation à 6000g, pendant 15 minutes ; le surnageant, sans algues, a été testé sur les daphnies.

3.II. Algicides

Les produits utilisés pour combattre les blooms d'algues, sont le sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, produit Merck n° 2790) et le peroxyde d'hydrogène (solution à 51% (160 Vol.), IX 501 de la Peróxidos do Brasil Ltda).

Des tests de toxicité aiguë et chronique sur les poissons autochtones et allochtones, sur les microcrustacés et sur les algues ont été réalisés. Les espèces étudiées et les méthodes d'essais mises en oeuvre sont présentées dans le tableau 3. Les conditions expérimentales sont résumées en annexe A.

3.II.1. Tests sur microcrustacés et poissons sur différents types d'eaux

Les tests de toxicité ont été réalisés avec différents types d'eau afin de comparer les effets des algicides dans les eaux naturelles et dans l'eau de référence.

Les types d'eaux utilisés dans les tests de toxicité sont les suivants:

- eau reconstituée avec une dureté totale de 40 - 48 mg/L CaCO_3 (USEPA, 1989).
- eau du réservoir Pedro Beicht, dureté totale de 40 - 48 mg/L, filtrée sur tamis pour plancton de 30 μm . Cette eau est utilisée pour maintenir les cultures de microcrustacés et est considérée de bonne qualité.
- eau du réservoir Guarapiranga, filtrée aussi sur tamis pour plancton, et avec une dureté totale de 23 mg/L.

La dureté totale a été déterminée par titrimétrie selon la méthode ABNT (1992-b).

Dans les tests, différentes concentrations d'algicides ont été testées, le rapport entre deux concentrations successives étant inférieur à 2.

Les résultats des tests de toxicité aiguë sur poisson et *Daphnia* ont été exprimés en concentration létale 50, CL_{50-96h} et CE_{50-48h} mg/L, respectivement.

Les résultats des tests chroniques de 7 jours sur microcrustacés *Ceriodaphnia dubia* et sur poissons, *Brachydanio rerio*, ont été exprimés en terme de concentration sans effet observé (NOEC), déterminée statistiquement selon la méthode USEPA (1989).

3.II.2. Tests sur algues

Pour chaque concentration de produit testé deux réplicats ont été préparés et les inoculum de cultures d'algues y ont été additionnés. Les flacons-tests ont été incubés à température de 25 ° C, sous une luminosité de 2500 lux et sous agitation continue de 175 rotations par minute. Les comptages ont été réalisés au jour initial et tous les deux jours ; les algues ont été fixées à l'aide de deux gouttes de lugol pour 5 ml d'échantillon.

La croissance algale a été suivie par comptage cellulaire au microscope, en chambre de Sedgwick-Rafter ou de Neubauer.

En fin d'essais (96 h) la concentration d'algicide qui inhibe 50% de la croissance algale est déterminée. Le programme statistique Trimmed Spearman Karber a été utilisé (HAMILTON *et al.*, 1978).

3.II.3. Influence des algicides sur la toxicité des cyanophycées

Pour évaluer les modifications de la toxicité des cyanophycées, induites par les algicides utilisés, des souches de cyanophycées toxiques et non toxiques ont été cultivées en présence de concentrations sublétales de peroxyde d'hydrogène et de sulfate de cuivre. Ces concentrations sublétales ont été déterminées à partir des résultats des tests de toxicité sur algues.

Les algues ont été cultivées en présence des concentrations d'algicides suivantes :

M. aeruginosa(NPJB) souche toxique, + 0,25mg/L H₂O₂

M. aeruginosa (Guarap 1992), souche non toxique, + 0,25 mg/L H₂O₂

P. galeata (2^{ème} camp), souche non toxique, + 0,6 mg/L H₂O₂

M. aeruginosa (NPJB), souche toxique, + 0,25 mg CuSO₄.5H₂O

M. aeruginosa (Guarap1992), souche non toxique, + 0,25 mg CuSO₄.5H₂O

P. galeata (2^{ème} camp), souche non toxique, + 1,18 mg CuSO₄.5H₂O

O. quadripunctulata(Guarap1992), souche toxique, +1,18 mg CuSO₄.5H₂O

Chaque suspension d'algue cultivée, en présence d'algicide, a été centrifugée, après 15 à 20 jours, puis lyophilisée. Le matériel séché a été remis en suspension dans une solution saline (NaCl 0,9%) et sa toxicité aiguë a été évaluée sur souris.

La teneur de cuivre accumulé dans les algues a été mesurée après calcination du matériel biologique. Les cendres ont été dissoutes dans l'acide nitrique p.a. et la solution obtenue analysée par absorption atomique, selon APHA (1989).

3.II.4. Effet interactif des algicides

Le sulfate de cuivre et le peroxyde d'hydrogène étant utilisés alternativement pour combattre les algues vertes et les cyanophycées, l'un des objectifs de cette étude a été également d'évaluer l'effet interactif de ces deux composés. Trois séries de tests sur *Daphnia similis* ont été réalisées, en utilisant un mélange en différentes proportions de chaque composé, en prenant comme base les valeurs de CE_{50-48h} du sulfate de cuivre et du peroxyde d'hydrogène. Deux séries sont réalisées en utilisant l'eau du Guarapiranga filtrée sur membrane AP20 et une série autre a été réalisée en eau reconstituée.

Nous nous sommes inspirés des travaux de MARKING (1977) pour étudier les effets d'interaction entre le cuivre et le peroxyde d'hydrogène

Tab. 4 : Exemple de calcul des interactions entre deux substances A et B.

CE50 de A : 0,016 mg/L (= Ai)

CE50 de B : 0,115 mg/L (= Bi)

Proportions des solutions Ai et Bi testées, respectivement	Concentration de A et B dans le mélange qui provoque 50% d'effet		(S) Somme des actions toxiques
	Am	Bm	
01:01	0,011	0,082	1,40

Exemple de calcul de S

$$S = A_m/A_i + B_m/B_i$$

$$\begin{aligned} S &= 0,011/0,016 + 0,082/0,115 \\ &= 0,688 + 0,713 \\ &= 1,40 \end{aligned}$$

Résultat : effets de A et B moins qu'additifs

Calcul de l'indice d'additivité IA = S(-1) + 1

$$IA = - 0,40$$

Résultat : le mélange est près de moitié moins toxique que la somme de A et B individuels

La détermination d'un indice d'activité toxique est basée sur l'unité de toxicité du mélange, qui peut être exprimée selon la formule (MARKING, 1977):

$$(A_m / A_i) + (B_m / B_i) = S$$

où : A et B sont deux agents toxiques

i et **m** sont respectivement les valeurs de CL_{50} de la substance individuelle (**i**) et en mélange (**m**).

S est la somme des effets

A_m = concentration de A dans le mélange qui provoque 50% d'effet

B_m = concentration de B dans le mélange qui provoque 50% d'effet

A_i = concentration de A qui provoque 50% d'effet (CE_{50} de A seul)

B_i = concentration de B qui provoque 50% d'effet (CE_{50} de B seul)

S permet de déterminer si l'effet du mélange est additif ou non:

$S > 1$; l'effet est moins qu'additif;

$S = 1$; l'effet est additif;

$S < 1$; l'effet est plus qu'additif.

MARKING (1977) a défini un indice d'additivité (IA) pour exprimer le degré de toxicité du mélange :

Si S est > 1 , $IA = S - 1$

Si S est < 1 , $IA = 1/S - 1$

Cette formule permet d'évaluer qualitativement et quantitativement l'interaction. L'indice d'additivité permet d'évaluer le facteur d'augmentation ou de diminution de la toxicité : cette transformation est réalisée rapidement par report de la valeur de l'indice sur une échelle qui donne directement le facteur d'amplitude de la toxicité (RAND & PETROCELLI, 1985).

Un exemple de calcul est donné dans le tableau 4.

3.III. Analyse de l'accumulation du cuivre par les organismes aquatiques et les sédiments

Aux stations 1, 2 et 3 (Fig. 1), au cours des campagnes d'échantillonnage des mois de février (été), avril (automne) et juin (hiver) de 1994, l'eau de surface a été prélevée pour l'analyse de cuivre et la toxicité chronique sur *C. dubia*.

Le phytoplancton, le zooplancton et les sédiments ont été échantillonnés simultanément pour évaluer le niveau de contamination par le cuivre.

Les sédiments ont été testés sur l'amphipode *Hyallela cf. azteca*, selon la méthode décrite en 3.III.3.

3.III.1 Phytoplancton et zooplancton (pour l'analyse de cuivre)

Le phytoplancton a été échantillonné sur le terrain par tamisage (20 µm) vertical et horizontal. Au laboratoire, la suspension de phytoplancton concentré est passée sur tamis de 175µm en vue d'éliminer les organismes zooplanctoniques éventuellement présents dans l'échantillon.

Le zooplancton a été collecté également sur le terrain parallèlement. Il a été concentré par tamisage (180µm). Au laboratoire, les débris éventuels ont été éliminés sur tamis de 500 µm.

Un aliquot est prélevé pour l'évaluation des poids secs du phytoplancton et zooplancton (105° C pendant 24h).

Les échantillons concentrés de phytoplancton et de zooplancton ont été acidifiés par l'acide nitrique p.a. pour la destruction de la matière organique nécessaire à l'évaluations des concentrations en cuivre (APHA, 1989).

Les teneurs en cuivre ont été exprimées en µg de cuivre par g de poids sec du phytoplancton ou du zooplancton. Le facteur de bioconcentration (FBC) du cuivre par le phyto et zooplancton a été déterminé selon la formule:

FBC = teneur de cuivre dans les algues/ teneur de cuivre dans l'eau

3.III.2. Poissons

Aux mois de Mars et Juin/1994, automne et hiver, deux campagnes d'échantillonnage des poissons du réservoir ont été réalisées aux stations 1 et 3, pour l'évaluation des niveaux de contamination en cuivre dans les muscles et les viscères.

Les organismes sont capturés au filet (mailles 1,5 ; 2 et 4 cm).

Après identification des poissons les muscles et les viscères sont prélevés pour l'analyse.

Pour la détermination de cuivre, les échantillons ont été séchés en étuve à 105° C, minéralisés par calcination au four à moufle suivie d'une solubilisation du résidu par l'acide nitrique p.a. Le métal a été analysé par spectrophotométrie d'absorption atomique (APHA, 1989) et les résultats exprimés en µg de cuivre par gramme de matériel sec.

3.III.3. Sédiments

Les sédiments des trois stations d'échantillonnage ont été prélevés avec une drague de Eckman, conditionnés en sachets plastiques et analysés quant au niveau du cuivre, par spectrophotométrie d'absorption atomique (APHA, 1989).

Les sédiments ont été séchés à 105°C, puis tamisés (tamis de 80 mesh), ont été minéralisés par l'acide chlorhydrique 0,1 N, en agitation continue pendant quatre heures.

Les tests de toxicité aiguë sur *Hyallela cf. azteca* ont été réalisés selon la méthodologie décrite par ARAUJO *et al.* (1993) : 200 g de sédiments sont placés en bécher contenant 800 mL d'eau de bonne qualité et soumise à une douce aération. Pour chaque échantillon, ont été préparés trois réplicats de 10 organismes chacun. A la fin des 12 jours de test, un dénombrement des organismes vivants est effectué dans chaque bécher.

3.IV. Etude des capacités d'adsorption des toxines algales par le charbon activé

Les extraits d'algues isolées du Guarapiranga qui ont entraîné des effets de toxicité lors des essais sur souris, sont traités ensuite par le charbon actif en vue d'évaluer les possibilités de rétention de cet adsorbant.

Les capacités d'adsorption sont évaluées en injectant par voie intrapéritonéale les extraits traités par le charbon activé, à des souris.

Le pouvoir de rétention des toxines algales par le charbon activé a été étudié à la quantité fixe de 15 mg de charbon pour différentes quantités d'algues (1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 et 25 mg).

Les algues toxiques du Guarapiranga, *Phormidium* sp (4^{ème} camp), *Oscillatoria amphibia* (5 et 8^{ème} camp), *O. limnetica* (6^{ème} camp) et *M. aeruginosa* (8^{ème} camp), ont été testées uniquement à la quantité maximale de 25 mg d'algues (poids sec) ce qui correspond à une concentration toxique de 1000 mg de poids sec d'algue par kg de poids de souris. Les 25 mg d'algues lyophilisées et soniquées ont été remis en suspension dans 100 mL d'eau déminéralisée (HOFFMANN, 1976) contenant 15 mg de charbon activé en poudre. Pour chaque traitement, deux replicats ont été effectués.

Le charbon en poudre produit par la Sanney a été fourni par la SABESP. La quantité de 15 mg étudiée est celle utilisée dans la station de traitement des eaux, en cas d'apparition de blooms d'algues dans l'eau de captage du réservoir Guarapiranga.

Les solutions (algues + charbon) sont agitées à 175 rpm, pendant une heure : cette durée correspond au temps de contact de l'eau avec le charbon actif dans la station de traitement. Les solutions sont ensuite filtrées sur membranes Millipore AP20 et les 100 ml filtrés sont évaporés à sec au bain-marie à 45° C, pendant 24 heures au maximum. Le résidu sec est repris par 2 mL de solution saline à 0,9% qui sont injectés par voie intrapéritonéale chez la souris. Les souris sont mises en observation pendant 24 heures.

Afin de vérifier l'efficacité d'adsorption des toxines sur le charbon actif, deux souches de référence de cyanophycées toxiques, *M. aeruginosa* NPJB hépatotoxique et *Cylindrospermopsis raciborskii* neurotoxique, ont été testées à des quantités comprises entre 1,25 et 20 mg d'algues, dans les mêmes conditions. Des essais témoins sans charbon activé ont été conduits parallèlement.

D'autres témoins ont été réalisés pour évaluer si les membranes de filtration pouvaient retenir les toxines présentes dans les extraits d'algues. Les membranes utilisées pour la filtration, ont été lavées à l'eau déminéralisée et au méthanol pur. Après évaporation de la phase liquide, l'extrait a été remis en suspension par 2 mL de solution saline injectés par voie intrapéritonéale chez la souris.

3.V. Etablissement de concentrations maximales admissibles d'algues toxiques dans les eaux brutes.

Afin de déterminer le nombre de cellules de cyanophycées toxiques acceptables dans l'eau de captage, les critères suivants recommandés par KLAASEN *et al.* (1986) et USEPA (1990) ont été considérés :

- a) Dose sans effet (DSE) à 24 h, des différents souches de cyanophycées
- b) Facteur de sécurité de 1000 ou soit DSE/1000
- c) Consommation moyenne journalière d'eau par un individu adulte = 2 litres
- d) Poids moyen d'un individu adulte = 70 kg
- e) Poids sec d'algues.

Il a été déterminé :

a) l'ingestion journalière acceptable (IJA), où :

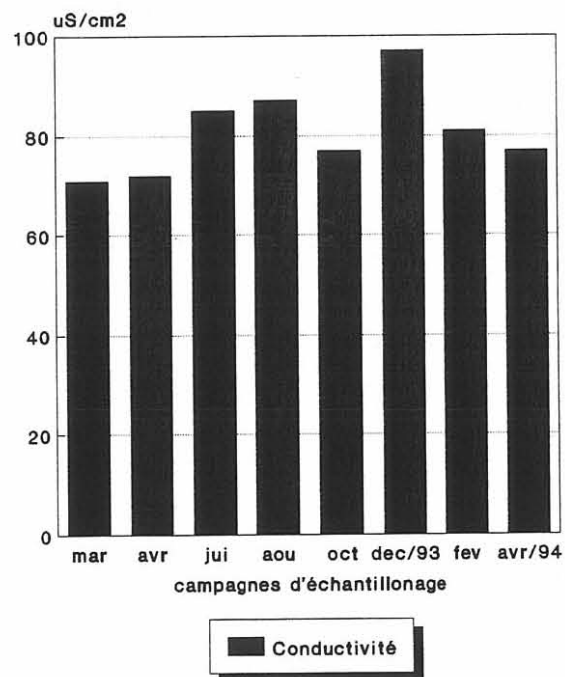
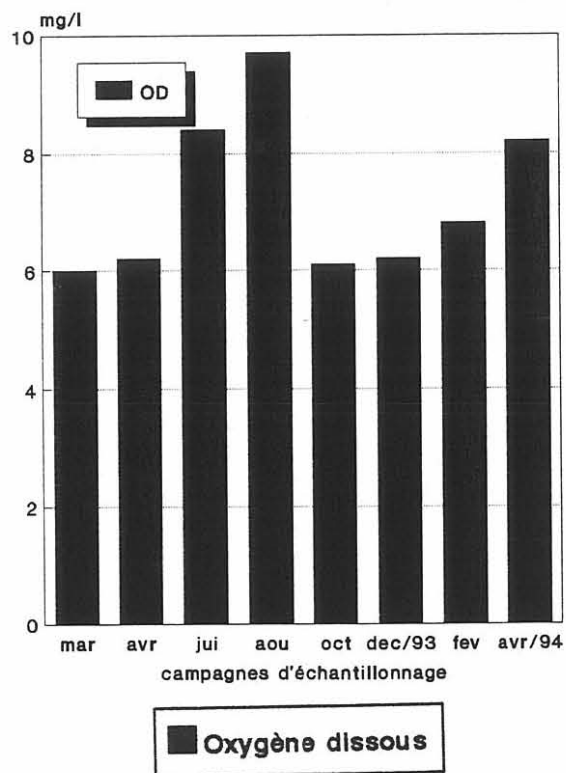
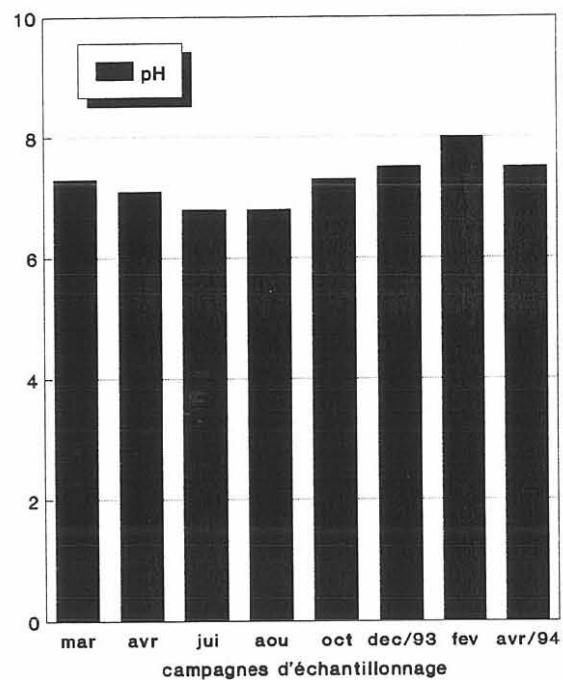
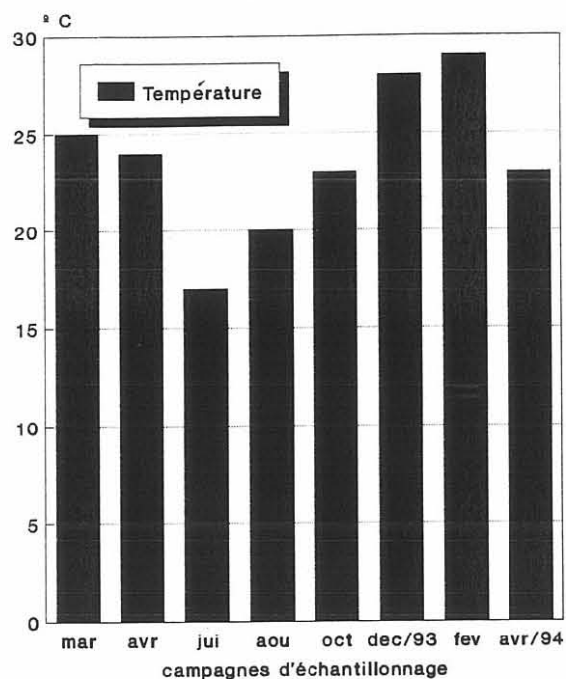
$$IJA = DSE / 1000 \times 70$$

b) la concentration maximale acceptable d'algues (CMA), où:

CMA = IJA/2 exprimée en nombre de cellules ou filaments d'algues toxiques par litre d'eau potable.

4-RESULTATS ET DISCUSSION

Fig. 5a- Données physico-chimiques des eaux du réservoir Guarapiranga, station 2



4 - RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE, BIOLOGIQUE ET ECOTOXICOLOGIQUE DES EAUX DU GUARAPIRANGA SUR LA PERIODE D'ETUDE.

4.1.1. Analyses physico-chimiques

Les figures 5a et 5b représentent les résultats des analyses physico-chimiques des eaux du réservoir Guarapiranga, station 2, (pH, Oxygène dissous, température, conductivité, dureté, transparence, concentrations en cuivre et luminosité). Les données numériques correspondantes à ces figures sont données dans l'annexe C.

► La **température** maximale de l'eau de 29°C a été enregistrée au cours du mois de février 94.

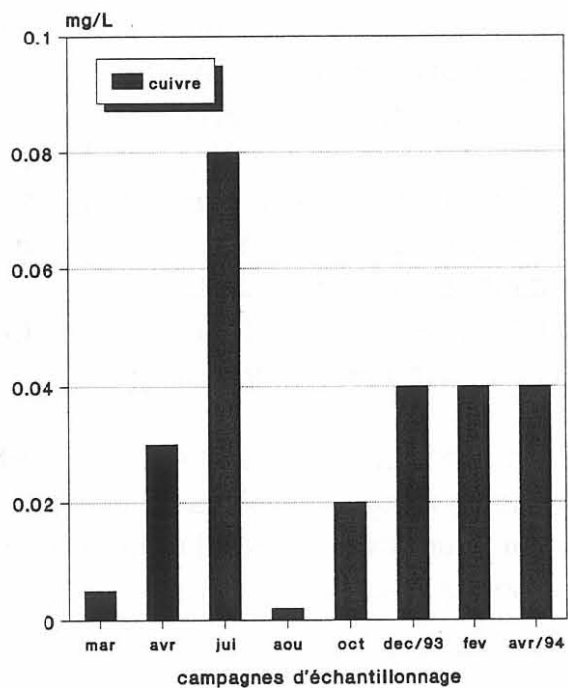
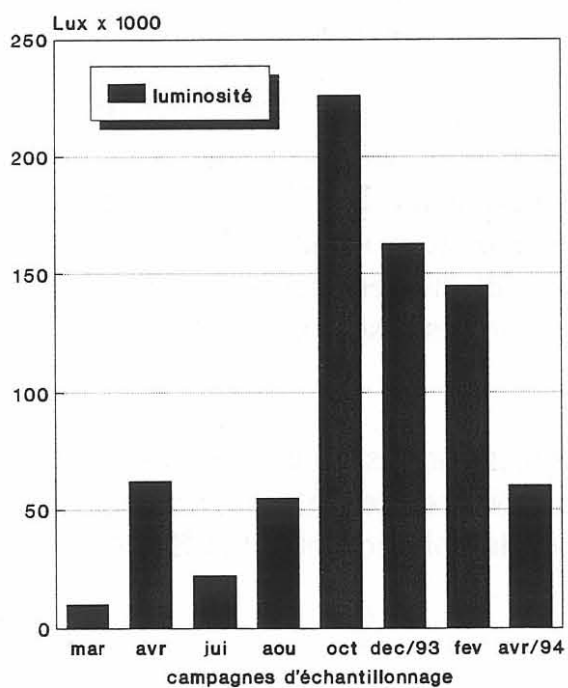
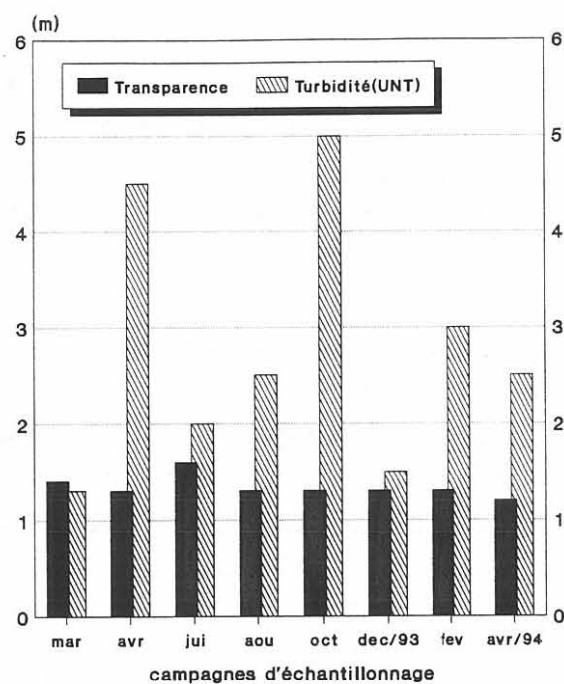
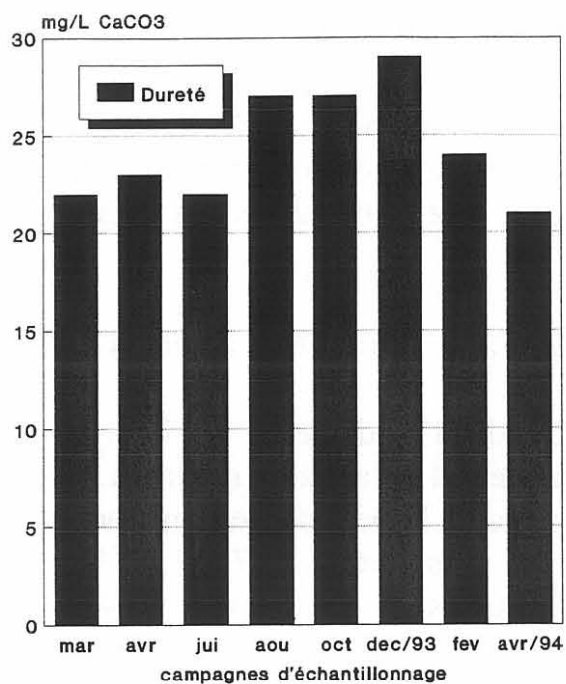
La valeur moyenne du **pH**, pendant la période d'étude, était de 7,3 ; la valeur maximale de 8 a été enregistrée en février 94 et la valeur minimale de 6,8 en juin et août 93. C'est naturellement pendant la période de juin à août 93 que la température de l'eau est la plus basse (17 et 20°C, respectivement), et les teneurs en **oxygène dissous** les plus élevées (8,4 et 9,7 mg/L) (Fig. 5a).

► La **conductivité électrique** a été pratiquement homogène pendant l'année où les valeurs se situent entre 72 et 97 $\mu\text{S}/\text{cm}$ avec une moyenne de 80 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La conductivité électrique est comme les précédents paramètres, une donnée fondamentale pour l'évaluation des gradients horizontaux et verticaux des milieux hydriques.

Ces valeurs sont en accord avec les données obtenues par MATSUMURA-TUNDISI *et al.* (1981), lors d'une étude limnologique de 23 réservoirs de l'Etat de São Paulo : dans la majorité des réservoirs, le pH se situait dans une gamme de 7 à 8. Le maximum de conductivité à 103 $\mu\text{S}/\text{cm}$ était notée dans les réservoirs de Barra Bonita et Bariri les plus eutrophisés, alors que les valeurs les plus faibles étaient trouvées dans les réservoirs de Rio Pardo et Rio Grande (respectivement 25 et 25,5).

En 1985, MAIER & TAKINO (1985) avaient enregistré dans le réservoir Guarapiranga des niveaux de conductivité moindre, de 36 à 53 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ce qui peut être mis en relation avec un niveau de pollution plus faible à cette époque qu'à l'heure actuelle.

Fig. 5b- Données physico-chimiques des eaux du réservoir Guarapiranga, station 2



◆ L'eau du Guarapiranga présente une **dureté** de 23 à 29 mg de CaCO_3/L (Fig 5b), ce qui correspond à une qualité d'eau douce, c'est à dire inférieure à 50 mg/L (USEPA, 1989). La dureté des eaux est l'un des principaux facteurs de toxicité des agents inorganiques (WAIWOOD & BEAMISH, 1978 ; CALAMARI *et al.*, 1980). Les sels de métaux sont moins toxiques dans les eaux plus dures, ce qui est attribué aux effets antagonistes des cations naturels, Ca, Mg, Na et K (DOUDOROFF & KATZ, 1953).

L'eutrophisation des lacs et des réservoirs est liée au potentiel nutritionnel des macro et microéléments, responsable de l'augmentation de la productivité du milieu hydrique. En terme de qualité, les eaux peuvent être classées oligotrophique, mésotrophique et eutrophique : la teneur en chlorophylle, les niveaux de nutriments (N et P), les communautés phytoplanctoniques et la transparence des eaux sont des paramètres essentiels pour la mesure du stade trophique de l'écosystème aquatique.

◆ La **transparence** des eaux, mesurée par le disque de Secchi, est un bon paramètre de mesure du niveau de pénétration de la lumière dans l'environnement aquatique. Les eaux du Guarapiranga (station 2) avec une transparence de 1,3 m peuvent être considérées comme eutrophes.

Selon HENRY (1993), les eaux d'une transparence inférieure à 3 m de profondeur doivent être considérées comme eutrophes, de 3 à 6 m mésotrophes, et supérieure à 6 m oligotrophes. La transparence a été pratiquement constante pendant toute l'année : la valeur moyenne était de 1,3 m et la valeur la plus élevée a été détectée en juin 93 (1,6 m) et la plus faible en avril 94 (1,2 m).

◆ Les plus grandes valeurs de **luminosité** ont été enregistrées d'octobre/93 à février/94, et les plus faibles de mars à août/94 (Fig. 5b). L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de corrélation entre l'intensité lumineuse et les variables physico-chimiques et biologiques analysées.

◆ Le **phosphate total** (Fig. 6), dans toutes les campagnes d'échantillonnage, a présenté des valeurs supérieures à 0,025 mg/L, concentration fixée par la législation brésilienne. Par contre, les teneurs en **orthophosphates**, forme de phosphate soluble biodisponible, sont restées relativement faibles aux campagnes d'avril 93, octobre 93 et avril 94 : ces valeurs sont au dessous des limites de détection de la méthode. Pour les autres prélèvements, les valeurs d'orthophosphates varient de 0,005 à 0,025 mg/L.

Fig.6 Teneurs en phosphore de l'eau du
réservoir Guarapiranga, station 2

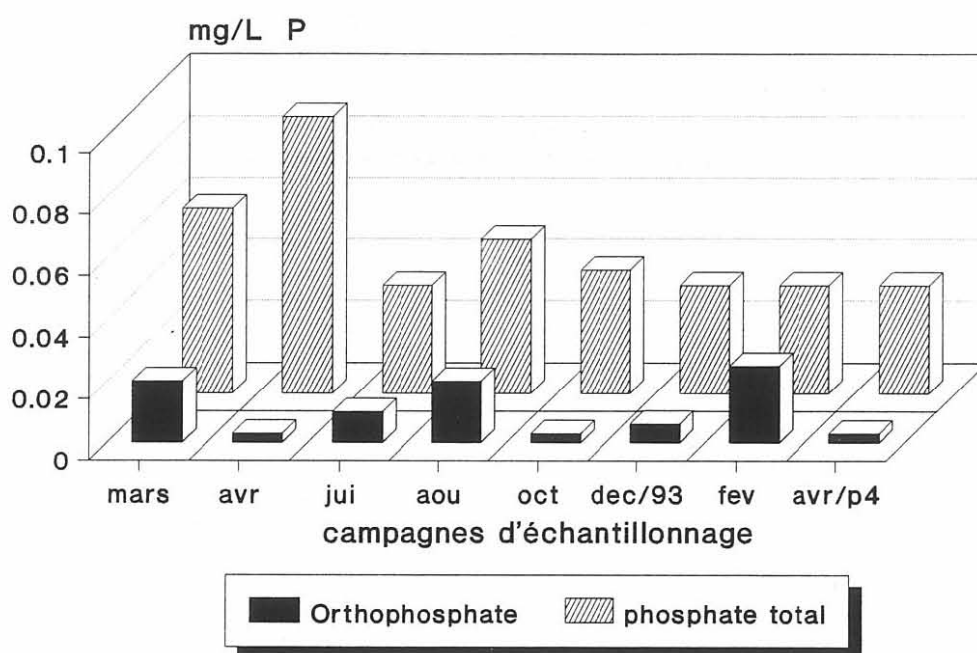


Fig.7 Teneurs en azote de l'eau du réservoir Guarapiranga, station 2

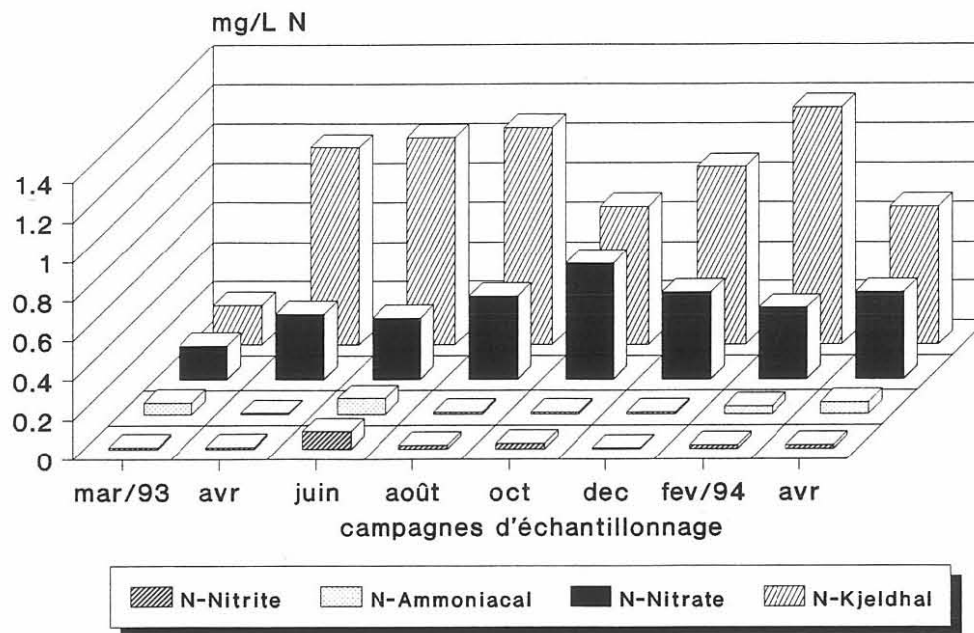
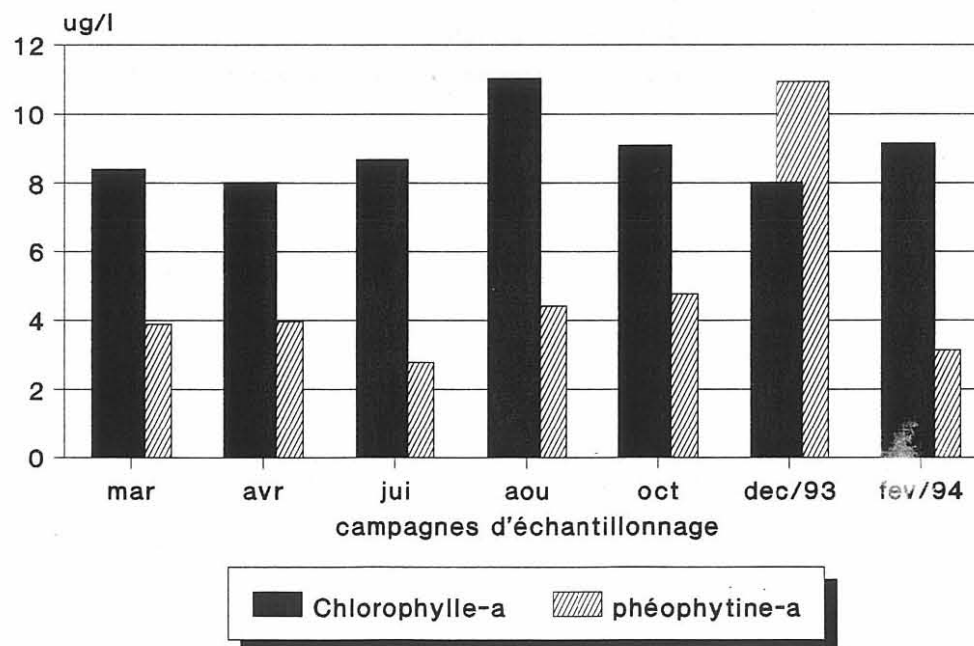


Fig.8 Chlorophylle et phéophytine de l' eau du Guarapiranga, station 2



◆ En mars 93, les teneurs en **azote** sont les plus basses, comme celles des communautés phytoplanctoniques (Figs. 7 et 11.). Les valeurs moyennes des éléments azotés sont conformes à la réglementation, ainsi qu'en témoignent les valeurs moyennes en N-Kjedhal, N-nitrate, N-nitrite et N-amoniacal total de 0,828 ; 0,383 ; 0,025 et 0,034 mg/L, respectivement. Les standards de qualité des eaux de classe I, selon la loi n°20 CONAMA (Conseil National de l'Environnement du Brésil) sont de 10 mg/L pour les nitrates et 1mg/L pour les nitrites.

VOLLENWEIDER (1968) a établi une classification des eaux selon les teneurs en N-inorganique total (N-amoniacal, Nitrate, Nitrite) comme suit :

niveau de trophie	N-inorganique total (mg/L)
Oligo-mesotrophique	0,228 - 0,392
meso-eutrophique	0,343 - 0,618
eutro-politrophique	0,420 - 2,370

Si la réglementation CONAMA est respectée, il apparaît que les eaux du réservoir Guarapiranga pourraient être considérées comme méso à politrophique selon VOLLENWEIDER, en particulier au niveau de la station 2 où la valeur moyenne est de 0,442 mg/L en N-inorganique total.

◆ La teneur moyenne de **chlorophylle-a** est de 9 µg/L, avec des extrêmes de 8 en avril et de 11 µg/L en août 93 (Fig. 8). La phéophytine-a est de 4µg/L environ, avec un pic de 10,93µg/L en décembre/93, valeur importante qui témoigne de la présence de matières biologiques en décomposition.

SALAS & MARTINO (1990) ont défini des critères d'eutrophisation sur la base des teneurs en chlorophylle-a selon l'échelle suivante :

Oligotrophique	0 à 4 mg/m ³
Mésotrophique	4 à 10 mg/m ³
Eutrophique	10 à 100 mg/m ³

Ces auteurs rapportent par comparaison les critères de chlorophylle (en µg/L) fréquemment utilisés au niveau international et mentionnés ci-après.

Type d'environnement	USEPA (1974)	RAST & LEE (1978)	NAS (1978)
Oligotrophique	< 7	0 - 2	0 - 4
Mesotrophique	7 -12	2 - 5	4 - 10
Eutrophique	> 12	> 6	> 10

En considérant ces valeurs de référence, les eaux du réservoir Guarapiranga peuvent être classées entre méso et eutrophique en tenant compte des valeurs de chlorophylle.

Les valeurs trouvées dans ce réservoir sont élevées si on les compare à celles trouvées dans d'autres réservoirs. TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI (1981), ont obtenu des taux de chlorophylle entre 0,82 à 5,03 ug/L dans plusieurs lacs brésiliens.

♦ TOLEDO (1995), en se basant sur les données de l'ensemble des réservoirs de l'Etat de São Paulo, a fait quelques ajustements dans la formule originelle de l'indice de Carlson pour caractériser l'état trophique des eaux, en utilisant les paramètres transparence, phosphate, orthophosphate et chlorophylle a.

L'indice d'état trophique (IET) peut être exprimé à partir des précédents paramètres, comme suit :

$$IET(S) = \frac{10 (6 - 0.64 + \ln S)}{\ln 2} \quad \text{où } S = \text{mesure du Sechhi (m)}$$

$$IET(P) = \frac{10 (6 - \ln (80.32/P))}{\ln 2} \quad \text{où } P = \text{phosphate (mg/m}^3\text{)}$$

$$IET(CL) = \frac{10 (6 - 2.04 - 0.695 \ln CL)}{\ln 2} \quad \text{où } CL = \text{chlorophylle-a (mg/m}^3\text{)}$$

$$IET(PO_4) = \frac{10 (6 - \ln (21,67/P))}{\ln 2} \quad \text{où } PO_4 = \text{orthophosphate}$$

En appliquant ce modèle aux données moyennes de phosphate total, d'orthophosphate, de chlorophylle et de transparence des eaux du réservoir Guarapiranga, les valeurs d'indice d'état trophique sont les suivantes :

IET(S)	=	47
IET(P)	=	51
IET (Chl)	=	67
IET (PO ₄)	=	49
IET Moyen	=	54

Sur la base des critères établis par SALAS et MARTINO (1990), il apparaît que les IET pour la transparence, les phosphates et orthophosphates correspondent à un état mésotrophique et pour la chlorophylle à un niveau eutrophique.

Les eaux peuvent globalement être classées dans la bande limite entre méso/eutrophique.

CRITERES POUR CLASSIFICATION DE L'ETAT TROPHIQUE (SALAS & MARTINO, 1990)

Ultra oligotrophique	IET < 24
Oligotrophique	IET > 24 - 44
Mesotrophique	IET > 44 - 54
Eutrophique	IET > 54 - 74
Hyper eutrophique	IET > 74

Il est important de souligner que l'application des algicides, cuivre et peroxyde d'hydrogène, dans le réservoir Guarapiranga, complique l'utilisation des indices de trophie, étant donné que les algicides influent sur la productivité et, par conséquent sur la transparence de l'eau et la libération des composants intracellulaires dans le milieu.

◆ Les niveaux de **cuivre** dans l'eau du Guarapiranga, au niveau de la station 2, dépassaient la valeur réglementaire de 0,02 mg/L relative à la qualité des eaux, dans tous les échantillons exceptés ceux de mars et août/93, (BRASIL, 1986), (Fig. 5b et annexe C).

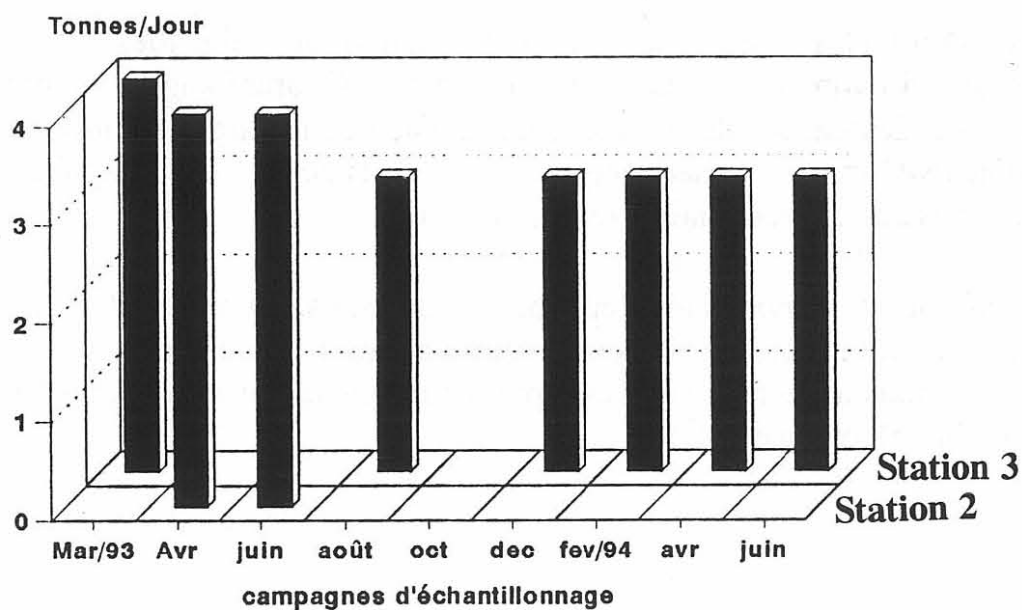
Tab. 5 - Résultats des essais de toxicité chronique (7 jours) sur *Ceriodaphnia dubia* avec les échantillons d'eau brute (non diluée°

analyse	station n°	échantillonnage								
		9 3						9 4		
		M	A	J	A	O	D	F	A	J
		1è	2è	3è	4è	5è	6è	7è	8è	9è
Toxicité sur <i>C. dubia</i>	1							NT	NT	NT
	2	NT	NT	TA	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	3							TA	TA	NT

NT = Non toxique : pas d'effet toxique sur la survie et la reproduction après 7 jours d'exposition

TA = Toxicité aiguë : 100% de mortalité après 24 - 48 h

Fig. 9 Quantité de sulfate de cuivre utilisée pour le traitement des eaux du Guarapiranga- au cours des différentes campagnes



4.I.2. Analyses écotoxicologiques

A la station 2, des effets de toxicité aiguë sur *Ceriodaphnia dubia* ont été enregistrés avec les eaux prélevées lors de la troisième campagne d'échantillonnage en juin 93 : 100% de mortalité a été obtenu après 24 à 48 heures d'exposition (Tab. 5 et annexe C). La teneur en cuivre de 0,08 mg/L de cet échantillon explique la toxicité élevée. Simultanément était notée une valeur la plus élevée de la transparence de l'eau qui pouvait alors résulter d'effets toxiques sur les communautés planctoniques. Lors de la campagne de Juin 93 quatre tonnes de sulfate de cuivre en amont et aval de la station 2 avaient été déversées (Fig. 9).

Aucune mortalité ni aucun effet toxique sur la reproduction n'ont été notés au cours des autres campagnes d'échantillonnage.

Pour ce qui concerne les stations 1 et 3 étudiées en 94, seules les eaux de la station 3 ont présenté une toxicité à court terme avec 100 % de mortalité des microcrustacés en février et avril.

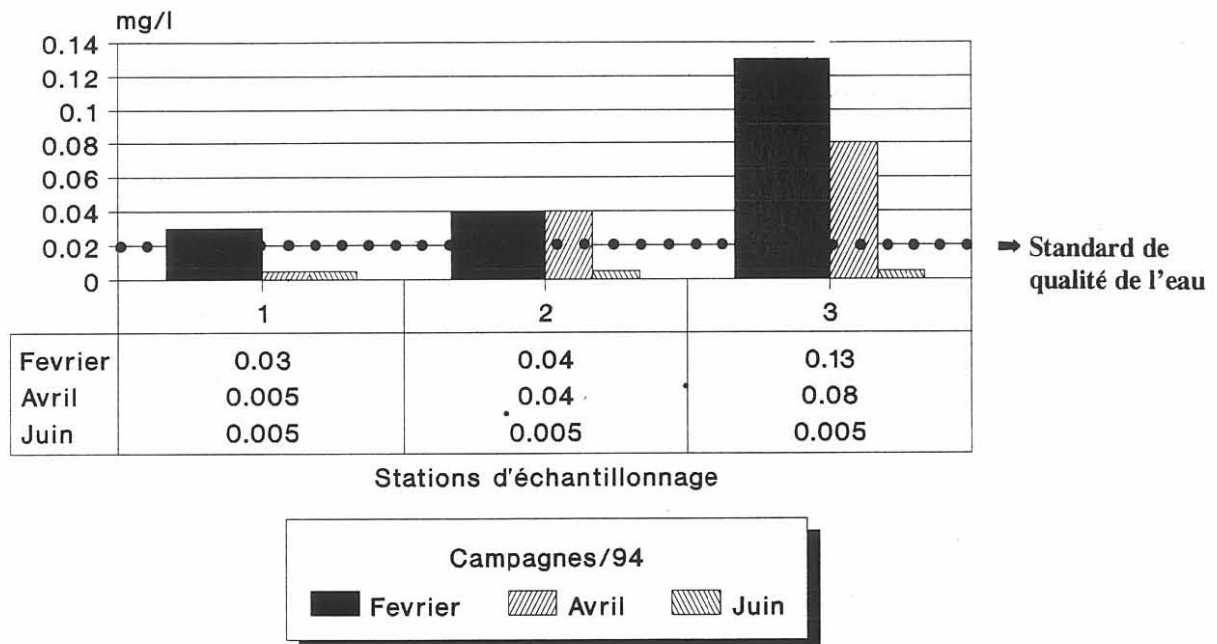
L'analyse des données en cuivre au cours des trois campagnes d'échantillonnage de février, avril et juin/94 (Fig. 10) montre que les teneurs de cuivre dans l'eau vont croissant de la station 1 à la station 3. Les concentrations les plus élevées sont trouvées à la station 3, en février et avril 94, avec des valeurs respectives de 0,13 et 0,08 mg/L. Ces concentrations sont à mettre en rapport avec les effets de toxicité aiguë sur *C. dubia* (Tab.5).

Ces résultats s'expliquent par l'utilisation d'algicides en quantité plus grande à la station 3, en particulier en février et avril 94 (Fig. 9). Les concentrations basses en cuivre en juin peuvent être expliquées par l'échantillonnage, qui est fait de manière aléatoire par rapport aux sites de déversement du cuivre.

Bien qu'aucune application d'algicide ne soit effectuée à la station 1, les concentrations de cuivre dépassaient le standard de qualité dans l'échantillon d'eau de février 94. Ceci témoigne de l'apport vraisemblable de contaminants de cuivre par la rivière Embu-Guaçu. Par contre, au cours des deux autres campagnes, le niveau de cuivre dans l'eau était inférieur à la limite de détection de la méthode, 0,005 mg/L, (Fig.10).

La toxicité du cuivre dans les eaux continentales est attribuée au Cu^{2+} et à CuOH^+ , mais non au carbonate de cuivre ou à l'hydroxyde de cuivre qui

Fig.10 Teneurs en cuivre de l'eau du réservoir Guarapiranga



sont des formes insolubles. Il est cependant difficile de différencier analytiquement les formes chimiques présentes et de déterminer celles qui sont biodisponibles (BROWN *et al.*, 1974). L'analyse par absorption atomique mesure les teneurs en cuivre total, sans permettre de différencier les différentes formes de métal.

Ces effets de toxicité aiguë sur daphnies des eaux du Guarapiranga traitées par le cuivre laissent présager des effets toxiques sur les autres espèces aquatiques. Ces résultats sont à mettre en relation avec les mortalités de poissons observées fréquemment dans ce réservoir au cours de ces cinq dernières années (CETESB, 1992-b).

La CETESB, a inclus dans son programme de monitoring des eaux, outre l'étude des variables physico-chimiques, des essais de toxicité chronique sur *Ceriodaphnia* sur 50 stations de rivières et de réservoirs de l'Etat de São Paulo. Parmi ces stations figurait le réservoir du Guarapiranga. Sur les deux années 93 et 94, 75% des échantillons ont présenté une toxicité se traduisant par des effets de mortalité et une inhibition de la reproduction (CETESB, 1994-b, 1995-a, sous presse). **L'eau qui présente une toxicité aiguë ou chronique nous paraît inadéquate pour la préservation de la vie aquatique.**

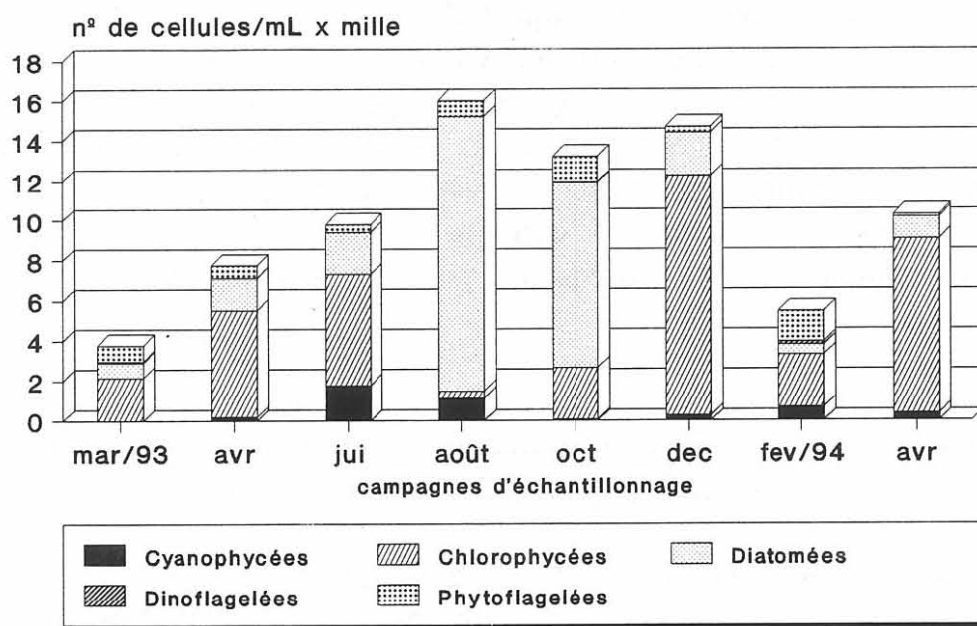
Il est important de souligner que les concentrations de cuivre détectées dans les eaux du réservoir Guarapiranga, toxiques pour la vie aquatique, sont **plus faibles que les standards de potabilité fixés à 1mg/L** en cuivre total (BRASIL, 1990).

Les standards de potabilité sont en fait établis, non sur des critères d'innocuité ou de risque pour la santé, mais sur les modifications des critères gustatifs et organoleptiques induites par cet algicide (ENVIRONNEMENT CANADA, 1988).

Au cours de ces dernières années (1993/94), le monitoring de la qualité des eaux pour la consommation humaine, réalisé par la SABESP, a montré que le niveau de cuivre dans l'eau potable restait inférieur à 0,05 mg/L, alors que des concentrations en cuivre atteignant 0,17 mg/L pouvaient être détectées dans l'eau brute (données fournies par la SABESP).

Les effets du cuivre sont mal connus ; c'est un élément essentiel, bénéfique à dose infime, qui peut aussi causer des effets toxiques à doses plus élevées, surtout chez les individus plus sensibles (RICHTER & AZEVEDO NETO,

Fig.11 Fréquence des algues dans le réservoir du Guarapiranga, station 2



1991). La limite entre les concentrations toxiques et les concentrations bénéfiques est difficile à établir.

Il faut aussi rappeler que des traitements au peroxyde d'hydrogène sont effectuées simultanément aux traitements par le cuivre. Il n'y a pas de monitoring du peroxyde d'hydrogène effectué dans les eaux, compte tenu sans doute de son instabilité. Toutefois sa décomposition rapide n'exclut pas la production d'intermédiaires et de produits d'oxydation des composés organiques dont les effets pour la vie aquatique peuvent être dommageables. Il pourrait en être de même pour le consommateur en absence de traitement d'épuration tertiaire insuffisant.

4.I.3. Communautés phytoplanctoniques

La fréquence et la densité des groupes d'algues identifiées dans les eaux du réservoir sont présentées dans la figure 11. La liste des groupes trouvés pendant la période d'étude est donnée dans la figure 12.

On observe une prédominance des chlorophycées dans toutes les campagnes, excepté en août et octobre 93 (4 et 5^{ème} campagnes), où les diatomées étaient majoritaires.

La plus grande diversité des microalgues a été trouvée dans le groupe des chlorophycées qui représentait 61,5% des taxons enregistrés. Viennent ensuite les diatomées avec 15,7%, les phytoflagellés 12%, les cyanophycées 8,4% et les dinoflagellés 2,4%.

Parmi les chlorophycées, les *Chlorococcales* prédominaient dans toutes les campagnes. Par ordre de représentation décroissante venaient ensuite les genres *Scenedesmus* (1 ; 3 ; 5 ; et 8^{ème} campagnes) ; *Monoraphydium* (2^{ème} camp), *Dictyosphaerium* (4^{ème} camp) ; *Mougeotia* (6^{ème} camp) et *Chorella* (7^{ème} camp).

Dans le groupe des diatomées, les genres les plus représentés étaient *Rhizosolenia* (1 et 3^{ème} camp), *Synedra* (2 et 6^{ème} camp), *Asterionella* (4 ; 5 et 8^{ème} camp) et *Aulacosira* (7^{ème} camp).

Les genres prédominants de phytoflagellés sont *Dynobryon*, *Cryptomonas* et *Chlamydomonas*.

Fig.12 - Espèces algales du réservoir Guarapiranga, identifiées pendant la période de mars/93 à avril/94 (Station 2)

Groupes	campagnes d'échantillonnage							
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
Chlorophycées								
<i>Ankistrodesmus</i> sp								
<i>A. falcatus</i>								
<i>Chlorococcales</i>								
<i>Chlorella</i> sp								
<i>Crucigeniella</i> sp								
<i>Dictyosphaerium pulchelum</i>								
<i>D. ehrenbergianum</i>								
<i>Dictyosphaerium</i> sp								
<i>D. elegans</i>								
<i>Elakatothrix</i> sp								
<i>Golenkinia radiata</i>								
<i>Golenkinia</i> sp								
<i>G. paucispina</i>								
<i>Monoraphidium contortum</i>								
<i>Monoraphidium</i> sp								
<i>M. minutum</i>								
<i>Mougeotia</i> sp								
<i>Oocystis</i> sp								
<i>Scenedesmus acuminatus</i>								
<i>S. desticulatus</i>								
<i>S. bicaudatus</i>								
<i>S. quadricauda</i>								
<i>Scenedesmus</i> sp								
<i>S. spinosus</i>								
<i>S. opoliensis</i>								
<i>Staurodesmus</i> sp								
<i>Tetraedrom caudatum</i>								
<i>Tetraedron</i> sp								
<i>T. regulare</i>								
<i>T. incus</i>								
<i>T. minimum</i>								
<i>Treubaria</i> sp								
<i>T. setigera</i>								
<i>Volvocales</i>								
<i>Chlorococcum</i> sp								
<i>Closteriopsis</i> sp								
<i>Coelastrum reticulatum</i>								
<i>Coelastrum</i> sp								
<i>Cosmarium</i> sp								
<i>Crucigenia tetrapedia</i>								
<i>Euastrum</i> sp								
<i>Zygnematales</i>								
<i>Franceia</i>								
<i>Micractinium</i> sp								

Continuation

<i>Schroederia</i> sp								
<i>Staurostrum</i> sp								
<i>Eutetramorus fottii</i>								
<i>Pediastrum duplex</i>								
<i>Tetrallantos lagerheimii</i>								
<i>Tetrastrum</i> sp								
<i>Coenochloris</i> so								
Diatomées								
Centrique non identifiées								
<i>Cyclotella</i> sp								
<i>C. meneghiniana</i>								
<i>Melosira</i> sp								
<i>Nitzshia</i> sp								
Penada non identifié								
<i>Rhizosolenia</i> sp								
<i>Synedra</i> sp								
<i>Navicula</i> sp								
<i>Asterionella formosa</i>								
<i>Asterionella</i> sp								
<i>Aulacosira granulata</i>								
Cyanophycées								
<i>Chroococcus</i> sp								
<i>Oscillatoria planctonica</i>								
<i>Oscillatoria</i> sp								
<i>O. quadripunctulata</i>								
<i>Synechococcus</i> sp								
<i>Chroococcales</i>								
Colonies non identifiées								
Dinoflagellés								
<i>Peridinium</i> sp								
espèces non identifiées								
Flagellées								
<i>Cryptomonas</i> sp								
<i>Dinobryum</i> sp								
<i>Euglena</i> sp								
colonies non identifiées								
Formes non identifiées								
<i>Trachelomonas</i> spp								
<i>T. volvocina</i>								
<i>Euglenales</i>								
<i>Lepocincles</i> sp								
<i>Chlamidomonas</i> sp								

Le groupe des cyanophycées comprenant *Synechococcus*, *Chroococcales* et *Oscillatoria* était moins fréquemment représenté. Pendant cette période, un seul bloom de *Microcystis incerta* a été enregistré dans la région proche de l'embouchure de la rivière Guavirituba.

DERISIO & PERKINS (1981), dans une étude de ce même réservoir, ont observé aussi une prédominance des chlorophycées (63,6%) et des diatomées (32,7%). La CETESB (1992c) pendant la période d'octobre 91 à février 92, rapportait aussi la prédominance des chlorophycées (81,6% du total des organismes), suivie des phytoflagellés (8,6%), des diatomées (7,9%), des cyanophycées (1,5%) et des dinoflagellés (0,4%).

Dans ce travail, les plus grandes densités de phytoflagellés sont enregistrées lors des campagnes d'août et décembre 93 (Fig. 11), c'est à dire en début de printemps et en été. Ces mêmes constatations ont été faites par REYNOLDS (1984).

En appliquant l'indice de trophie proposé par MARGALEF (1983), sur la base du nombre total de cellules d'algue/mL :

oligotrophique 0 à 10 cell/mL

eutrophique 10^2 à 10^4 cell/mL

hypereutrophique 10^4 à 10^6 cell/mL

les eaux du réservoir, à la station 2, peuvent être considérées, comme eutrophiques. Lors de quelques campagnes (4 ; 5 ; 6 et 8^{ème} campagnes), de très hautes valeurs de densité algale ont été évaluées qui permettraient de les classer hyper-eutrophiques.

La communauté phytoplanctonique est souvent sujette à une réorganisation de sa composition et de sa densité relative. SMITH (1993) mentionne que la composition algale est influencée par la relation N : P. Un rapport N : P > 29 est peu favorable au développement des cyanophycées. COOD *et al.* (1989) ont confirmé que la population des cyanophycées était dominante quand le taux N:P était < 29.

Un développement de blooms d'*Anabaena* a été détecté quand la relation N:P était < à 15:1. Des taux supérieurs (35 : 1) ne favorisent pas les blooms de cyanophycées et augmentent 80 fois la population de flagellés (STOCKNER & SHORTREED, 1988).

Le rapport N : P dans les eaux du Guarapiranga a été élevé dans la majorité des prélèvements, avec une moyenne de 44:1 ; ce qui peut expliquer la faible représentation des cyanophycées dans la station 2.

Toutefois le rapport N : P n'est pas suffisant à lui seul pour expliquer la dominance de quelques populations car d'autres variables physico-chimiques peuvent influencer le métabolisme des algues. HENRY & TUNDISI (1982) ont vérifié que le vent, la lumière, l'agitation de l'eau, les nitrates et le molybdène avaient des rôles importants dans le développement du phytoplancton.

Tab. 6 - Cyanophycées du réservoir Guarapiranga, station 2,
du phytoplancton concentré, pendant la période d'étude.

1ème campagne mar-93	2ème campagne avr-93	3ème campagne jun-93	4ème campagne aoû-93
non détectées	<i>Chroococcus sp</i> <i>Pseudoanabaena galeata*</i> <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> <i>Oscillatoria planctonica</i> <i>Synechococcus sp</i>	<i>Pseudoanabaena galeata*</i> <i>Oscillatoria sp</i> <i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	<i>Phormidium sp *</i> <i>Synechococcus sp</i>

5ème campagne oct-93	6ème campagne dec-93	7ème campagne mar-94	8ème campagne avr-94
<i>Chroococcales</i> <i>Oscillatoria amphibia*</i> <i>Oscillatoria sp</i> <i>Microcystis aeruginosa*</i>	<i>Chroococcus sp</i> <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> <i>Oscillatoria limnetica*</i> <i>Oscillatoria sp</i>	<i>Chroococcales</i> <i>Microcystis incerta*</i> <i>Oscillatoria sp</i> <i>Oscillatoria redekei*</i>	<i>Chroococcus sp</i> <i>Microcystis aeruginosa*</i> <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> <i>Oscillatoria amphibia*</i>

*Espèces isolées et testées sur la souris et sur *Daphnia*

4.II. TOXICITE DES CYANOPHYCEES ISOLEES DU RESERVOIR GUARAPIRANGA

4.II.1. Toxicité sur souris

Les espèces de cyanophycées identifiées au cours des huit campagnes d'échantillonnage sont présentées dans le tableau 6.

Ces espèces ont été cultivées en laboratoire de manière à obtenir une biomasse suffisante pour pouvoir évaluer leur toxicité chez la souris. Les extraits aqueux de ces différentes espèces algales ont été préparés et injectés par voie intrapéritonéale aux souris ainsi qu'il a été décrit dans le chapitre matériel et méthodes (parag.3.I.4.3 et 3.I.4.4).

Il n'a pas été possible de cultiver les algues *Synechococcus*, *Chroococcus* et *O. planctonica*. L'isolement de ces algues n'a pu être mené à bien, même en utilisant la technique du microcapillaire, la plus efficace pour l'isolement.

Les résultats des essais de toxicité aiguë sur souris sont présentés dans le tableau 7. Ils montrent que les souches *P. galeata* et *O. redekei* ne sont pas toxiques à court terme ; par contre *M. incerta* (7^{ème} camp), *O. amphibia* (5 et 8^{ème} camp), *Phormidium sp* et *O. limnetica* présentaient des valeurs de DL₅₀ comprises entre 496 à 707 mg/Kg.

La toxicité de *O. quadripunctulata*, isolée en 1992 et testée simultanément, se caractérisait par une DL₅₀ de 742 mg/kg : cette valeur est conforme à celle obtenue habituellement et témoigne que la toxicité de cette espèce n'est pas modifiée par la culture en laboratoire.

Avant le commencement de ce travail, en 1991, nous avons isolé une souche de *M. aeruginosa*, non toxique. Deux autres de ces souches ont été à nouveau isolées en 1993/94 (5 et 8^{ème} campagnes). Seule celle de la 8^{ème} campagne a présenté une toxicité aiguë (DL₅₀ - 24h, de 224 mg d'algue en poids sec/Kg de poids corporel de souris). Cette souche s'est révélée hépatotoxique, avec un rapport pondéral foie/souris de 8,9 %, alors que le rapport est de 5 à 6% dans les conditions normales.

L'espèce *Microcystis aeruginosa* est la cyanophycée la plus souvent incriminée dans les cas d'intoxication animale et humaine. Les blooms de cette espèce ont été enregistrés dans toutes les parties du globe (CARMICHAEL *et al.*, 1985 ; SIVONEN *et al.*, 1990 ; SKULBERG *et al.*, 1992). La toxicité de *M. aeruginosa* n'est pas systématique, 7 des 14 souches de *M. aeruginosa* testées par LUKAK & AEGERTER, (1993)

Tab. 7 - Toxicité aiguë sur la souris des cyanophycées isolées dans le plancton total, au cours des différentes campagnes. DL50 exprimée en mg d'algue (poids sec) par Kg p.c.souris

Espèces	DL50 - 24h (mg/Kg)
<i>Pseudoanabaena galeata</i> (2ème camp.)	Non toxique
<i>Pseudoanabaena galeata</i> (3ème camp.)	Non toxique
<i>Phormidium sp</i> (4ème camp.)	545
<i>Oscillatoria quadripunctulata</i> *	742**
<i>Oscillatoria amphibia</i> (5ème camp.)	687
<i>Oscillatoria limnetica</i> (6ème camp.)	707
<i>Oscillatoria redekei</i> (7ème camp.)	Non toxique
<i>Oscillatoria amphibia</i> (8ème camp.)	687***
<i>Microcystis aeruginosa</i> *	Non toxique
<i>Microcystis aeruginosa</i> (5ème camp.)	Non toxique
<i>Microcystis aeruginosa</i> (8ème camp.)	224
<i>Microcystis incerta</i> (7ème camp.)	496

*Espèces isolées avant cette étude

** valeur moyenne de 3 tests

*** DL50; 48 heures

n'étaient pas toxiques sur souris. Les toxines peuvent être hépatotoxiques, ou neurotoxiques.

Les toxines des espèces de *M. aeruginosa* isolées, sont généralement des microcystines : ce sont des peptides hépatotoxiques qui causent une cytolyse et une dégénérescence hépatique (FALCONER, 1989). Les symptômes d'intoxication sont : faiblesse, diarrhées, extrémités froides et hépatomégalie (CARMICHAEL, 1992).

Le premier travail sur l'identification de toxines de *M. aeruginosa*, au Brésil, a été décrit par AZEVEDO *et al.* (1994), qui montre que la souche NPJB produit deux différents types de microcystines. Cette souche de référence, *M. aeruginosa* NPJB, que nous avons utilisée dans ce travail, est originaire du lac JB (Jardin Botanique-Sao Paulo) et a été isolée par le NP (Nucleo de Pesquisa) de l'Université de Rio de Janeiro, Brésil.

En ce qui concerne *Pseudoanabaena*, SIVONEN (1990) a isolé quatre souches de ce genre, qui n'ont pas présenté de toxicité aiguë.

Le genre *Oscillatoria* est aussi responsable de fréquentes intoxications : l'agent hépatotoxique présente une structure peptidique (LINDHOLM *et al.*, 1992).

Pour les espèces isolées d'*Oscillatoria* dans ce travail (*O. amphibia*, *O. limnetica* et *O. redekei*) nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données sur leur toxicité. Les espèces toxiques sont surtout *O. rubescens* et *O. agardhii*.

LINDHOLM & MERILUOTO (1991) ont étudié la distribution de toxines de *O. agardhii*, dans un lac eutrophe en Finlande, et observé que les blooms toxiques avaient lieu pendant la période estivale.

BERG *et al.* (1988), ont testé deux souches de *O. agardhii*, isolées d'un bloom dans un lac de Norvège, et trouvé des valeurs de DL₅₀ sur souris de 100 mg/Kg et 500 mg/Kg, pour chacune des variétés isolées. LUUKKAINEN *et al.* (1993) ont caractérisé les microcystines produites par *O. agardhii* isolées en Finlande.

Il est reconnu que pour une même espèce, la toxicité varie selon les souches et les conditions environnementales.

On connaît certains facteurs environnementaux propices à la croissance des cyanophycées dans les milieux hydriques : une température comprise entre 15 et 30 °C, un pH de 7 à 9, et une abondance en nutriments, azotés et phosphatés (CARMICHAEL, 1992).

En ce qui concerne la production de toxines, en laboratoire, plusieurs études ont tenté de la corréler avec des facteurs abiotiques comme la luminosité, le pH, la température et les concentrations en nutriments (SIVONEN, 1990 ; WICKS & THIEL, 1990). Les résultats varient selon les souches testées mais ne sont pas concluants.

La variabilité entre différentes souches d'une même espèce peut être attribuée à des facteurs environnementaux, mais aussi à des facteurs génétiques. Comme il apparaît dans la suite du travail, les trois souches de *M. aeruginosa*, isolées du réservoir Guarapiranga et qui ont été cultivées en laboratoire, dans les mêmes conditions de luminosité, pH, température, nutriments, présentent des potentialités toxiques différentes.

4.II.2. Etablissement de critères pour l'acceptabilité concernant la présence d'algues toxiques dans l'eau utilisée pour la potabilisation

L'absence de critères quant à la présence de cyanophycées potentiellement toxiques, rend difficile les actions de prévention et de contrôle. Ces critères pourraient être basés sur le nombre maximal de cellules algales ou de filaments présents dans l'eau de captage sans risque toxique pour le consommateur.

Un des objectifs principaux de l'utilisation des résultats de tests de toxicité est l'obtention de données de base pour l'évaluation de risques, pour l'homme et/ou l'environnement, comme cela est réalisé pour l'établissement de critères de qualité de l'eau. L'évaluation du risque présenté par les algues toxiques implique de déterminer des niveaux de sécurité. Deux composantes du risque toxique doivent être connues : les concentrations d'exposition (quantité de cellules ou filaments ou toxines) et leurs effets potentiels à ces concentrations (toxicité inhérente du produit biologique) (US.EPA, 1986).

L'approche traditionnelle pour l'établissement du niveau de sécurité des agents chimiques pour l'homme amène à considérer la consommation moyenne d'eau par jour (deux litres pour chaque individu d'un poids de 70

Tab. 8 - Proposition de concentrations maximales acceptables de cyanophycées toxiques dans l'eau utilisée pour la production d'eau potable

Algues	DL50;24h (mg/Kg)	DSE (aiguë) (mg/Kg)	DSE x facteur de 0,001	IJA (mg/jour)	CMA (mg/L)	Poids des algues (mg poids sec) par cell. ou filament (mg)	CMA (nbre de cellules ou filaments/mL)
<i>C. raciborskii</i>	12	5	0,005	0,35	0,175	$3,93 \cdot 10^{-7}$	445
<i>M. aeruginosa</i> (NPJB)	35	25	0,025	1,75	0,875	$4,49 \cdot 10^{-9}$	194877*
<i>M. aeruginosa</i> (8ème camp.)	224	50	0,05	3,5	1,75	-	-
<i>M. incerta</i> (7ème camp.)	497	250	0,25	17,5	8,75	-	-
<i>Phormidium</i> sp (4ème camp.)	547	250	0,25	17,5	8,75	$3,45 \cdot 10^{-8}$	253623
<i>O. amphibia</i> (5ème camp.)	687	250	0,25	17,5	8,75	-	-
<i>O. amphibia</i> (8ème camp.)	687	250	0,25	17,5	8,75	-	-
<i>O. limnetica</i> (6ème camp.)	707	500	0,5	35	17,5	$4,96 \cdot 10^{-8}$	352823
<i>O. quadripunctulata</i> (1992)	742	500	0,5	35	17,5	$1,33 \cdot 10^{-7}$	131579

* Cellules

DSE = Dose sans effet à court terme

IJA = Ingestion journalière acceptable (DSE/1000x70 Kg)

CMA = Concentration maximale acceptable d'algues (IJA/ 2 Litres)

kg), la valeur de la dose sans effet de toxicité aiguë ou chronique de la substance étudiée, les données de (bio)dégradation et la bioaccumulation du produit. Un facteur de sécurité est appliqué à la dose sans effet (DES). Ce facteur peut varier de 10 à 1000 (USEPA, 1980, 1990).

En utilisant les données de base décrites au tableau 8, pour l'établissement des limites maximales acceptables des algues dans l'eau brute, il est possible de calculer l'ingestion journalière acceptable (IDA) et la concentration maximale acceptable d'algues (CMA) en mg d'algues par litre d'eau et en nombre de cellules ou de filaments par millilitre.

Pour les algues *M. aeruginosa*, *M. incerta* et *O. amphibia* du Guarapiranga, seules les données de poids sec ont pu être déterminées ; la CMA sera donc exprimée uniquement en mg/L.

De l'ensemble des espèces isolées du réservoir Guarapiranga, décrites dans le tableau 8, la CMA la plus restrictive concerne la souche *M. aeruginosa* (8^{ème} camp), avec une valeur de 1,75 mg d'algues (poids sec) par litre d'eau. Pour les autres souches les CMA varient de 8,75 à 17,5 mg/L.

Les souches toxiques de référence *C. raciborskii* et *M. aeruginosa*(NPJB), isolées dans d'autres milieux aquatiques de l'Etat de São Paulo, ont des CMA plus restrictives, de 0,175 mg/L et 0,875 mg/L, respectivement.

Le nombre de cellules ou filaments maximum admissible correspondant au poids sec pour l'ensemble des algues est présenté dans le tableau 8.

L'établissement de concentrations maximales acceptables d'algues est une opération critiquable et complexe parce que beaucoup de données manquent sur les toxines des algues étudiées. La connaissance des effets écotoxicologiques des toxines à court et à long terme permet d'établir les CMA avec plus de précision, en diminuant ou même en éliminant la valeur du facteur d'incertitude (facteur de sécurité). Il faut rappeler encore, que la toxicité des espèces varie selon le génotype de chaque souche, par conséquent le nombre de cellules ne peut à lui seul refléter la réalité. Si la toxicité des souches du réservoir Guarapiranga se maintient à des niveaux constants, les CMA peuvent être utiles en première approche pour les mesures de contrôle d'algues. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires ; le développement de standard de qualité implique des études expérimentales en vue de mieux connaître les espèces responsables de la

Tab. 9 - Toxicité aiguë (24h), sur *Daphnia similis*, des cyanophycées isolées: (1) cellules entières; (2) cellules lysées.

Espèces	Traitement	% d'immobilité
<i>P. galeata</i> (2ème camp.)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>P. galeata</i> (3ème camp.)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>Phormidium sp</i> (4ème camp.)	1	Non toxique
<i>M. aeruginosa</i> (5ème camp.)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>O. limnetica</i> (6ème camp.)	1	Non toxique
<i>M. incerta</i> (7ème camp.)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>O. redekei</i> (7ème camp.)	1	95%
	2	100%
<i>M. aeruginosa</i> (8ème camp.)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>O. amphibia</i> (8ème camp.)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>M. aeruginosa</i> *	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>O. quadripunctulata</i> *	1	10%
	2	20%
<i>M. aeruginosa</i> (NPJB)	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>Selenastrum capricornutum</i> **	1	Non toxique
	2	Non toxique
<i>C. raciborskii</i> ***	1	100%
	2	100%

* Espèces isolées avant ce travail

** Chlorophycée de référence

*** Espèce toxique de référence

production des toxines dans l'environnement et les mécanismes de leur apparition, les niveaux d'exposition humaine, les effets sur les mammifères et sur les écosystèmes, les méthodes analytiques de détection, les transformations chimiques des toxines dans l'eau, les calculs de risque sur la population et les techniques de potabilisation.

En ce qui concerne les concentrations maximales acceptables de cyanophycées, rien n'a été trouvé dans la littérature. CARMICHAEL (communication personnelle, 1994) nous a informé d'une proposition de critère en Australie de 5000 cellules/L dans l'eau brute, toutefois celle-ci n'a pas dépassé le stade de la proposition. Dans ce domaine il reste beaucoup à faire et de nombreuses investigations sont encore nécessaires.

4.II.3. Toxicité des cultures de cyanophycées sur *Daphnia*

Toxicité des cellules et filaments

Les cellules algales entières, mais aussi les cellules lysées par sonication, ont été évaluées quant à leur toxicité aiguë sur *D. similis*. Les essais sur cellules entières et cellules lysées ont été réalisés simultanément à partir d'une même culture. Toutes les espèces isolées du Guarapiranga et d'autres espèces toxiques ont été testées. Les cultures algales en phase de croissance exponentielle, contenant de 1 à 18 millions de cellules ou filaments/mL, ont été testées à différentes dilutions.

O. redekei est responsable d'effets de toxicité importants sur *Daphnia* : une concentration algale de 1 million de filaments/mL entraîne l'immobilisation de 90% des organismes en 24 h d'exposition ; alors que l'espèce *O. quadripunctulata* a entraîné 10 à 20% d'immobilisation des microcrustacés (Tab. 9). L'immobilisation précède la mortalité.

Les souches de *C. raciboskii* (neurotoxique), *M. aeruginosa* NPJB (hepatotoxique) et *S. capricornutum* (chlorophycée non toxique) servaient de souches de référence dans cette étude. *C. raciboskii* à la concentration de 2300 filaments/mL a entraîné des effets toxiques à court terme sur 100% des daphnies.

On peut constater que les cellules lysées ont une toxicité du même ordre de grandeur et à peine plus élevée, que celle des algues entières.

Les invertébrés aquatiques et les poissons n'ont pas la même sensibilité aux cyanotoxines que les mammifères (CARMICHAEL, 1992). JUNGSMANN *et al.* (1991) n'ont pas détecté de toxicité aiguë des trois souches de *Microcystis* sur *D. pulicaria*. Cependant, ces algues ont causé une inhibition du taux de filtration de la nourriture par ces organismes, avec des conséquences à long terme sur les populations.

De la même façon, STANGENBERG (1967) et NIZAN *et al.* (1986) ont montré lors d'expériences en laboratoire que les cellules de *M. aeruginosa* étaient dépourvues de toxicité sur *D. longispina* et *D. magna* alors qu'elles étaient toxiques sur souris.

La survie, la croissance et la reproduction de *D. pulicaria* et *D. thorata* sont réduites par *O. agardhii*. Malgré un taux de mortalité, les survivants se reproduisent normalement en présence de cyanophycées. Les causes de la diminution de taux de filtration de nourriture ne sont pas bien élucidées. Il est possible que les filaments interfèrent dans le processus d'alimentation et aient des effets physiques indirects sur les organismes (INFANTE & ABELLA, 1985).

GLIWICZ & LAMPERT (1990), en travaillant avec une souche de *C. raciborskii* n'ont pas observé de mortalité sur les trois espèces de *Daphnia*, mais ont constaté une diminution de taux de filtration. Ils ont conclu que l'inhibition serait due à l'action des filaments. ZAGATTO *et al.* (1994) ont démontré que la souche neurotoxique de *C. raciborskii*, soniquée ou non (filaments lysés ou entiers) était extrêmement toxique sur *Daphnia similis*, ce qui témoigne du rôle des toxines sur les microcrustacés.

De nombreux auteurs n'ont pas détecté de toxicité aiguë des cyanophycées sur les organismes zooplanctoniques : ceci peut s'expliquer par une adaptation physiologique et comportementale des microcrustacés avec les algues toxiques ainsi que l'ont rapporté DeMOTT *et al.* (1991). Dans ce travail, la souche *O. redekei* provoque une toxicité aiguë sur *Daphnia*, tandis que *O. quadripunctulata* a entraîné uniquement des indices de toxicité.

KIVIRANTA *et al.* (1993) ont montré que quelques hépto et neurotoxines sont toxiques sur des larves de moustique *Aedes aegypti*. Ils ont avancé l'hypothèse que les toxines des algues présentes dans les cyanophycées font partie des mécanismes de défense des algues contre les prédateurs zooplanctoniques.

Les essais sur *Daphnia* et sur la souris ont été réalisés avec les mêmes souches d'algues et la plupart des essais ont été effectués simultanément. Les résultats obtenus montrent que la sensibilité des daphnies est différente de celle des souris. Seule la souche de référence (*C. raciborskii*) a révélé une toxicité à la fois sur la *Daphnia* et sur la souris. La souche *O. redekei* n'a pas été toxique sur la souris, alors qu'elle l'a été sur *Daphnia similis*.

Les blooms d'algues toxiques dans les réservoirs peuvent avoir une signification écologique importante pour l'environnement, puisque les populations des espèces sensibles à l'action des toxines peuvent être réduites et même éliminées de la chaîne trophique.

Toxicité des surnageants des cultures algales

Le milieu de culture ayant contenu les cyanophycées a été testé sur *D. similis*. Les algues ont été séparées par centrifugation des suspensions cultivées en laboratoire.

Les résultats des essais sur ces surnageants d'algues n'ont pas révélé de toxicité aiguë.

Ces résultats montrent que pendant la phase de croissance des algues en laboratoire, il n'y a pas eu production de substances extracellulaires pouvant présenter une toxicité aiguë sur *Daphnia*. Il en est de même pour le milieu de culture de *O. redekei* et *O. quadripunctulata* dont les filaments eux-mêmes étaient au contraire toxiques sur *Daphnia*.

Tab. 10 - Toxicité aiguë et chronique du sulfate de cuivre sur les organismes aquatiques, dans différents types d'eaux (mg/L)

Organismes	EAUX		
	reconstituée	Pedro Beicht	Guarapiranga
<i>B. rerio</i> (CL50; 96h)	0,11	0,51	0,39
<i>P. reticulata</i> (CL50; 96h)	0,1	0,69	-
<i>C. notomelas</i> (CL50; 96h)	0,1	1,34	-
<i>D. similis</i> (CE50; 48h)	0,01	0,14	0,12
<i>B. rerio</i> (NOEC 7 Jours)	0,05	0,25	-
<i>C. dubia</i> (NOEC 7 Jours)	0,025	0,05	0,05

NOEC = Concentration sans effet toxique observé

4.III. TOXICITE DU SULFATE DE CUIVRE ET DU PEROXYDE D'HYDROGENE SUR LES ORGANISMES AQUATIQUES.

4.III.1. Toxicité du sulfate de cuivre sur microcrustacés et poissons

La toxicité du sulfate de cuivre a été évaluée et comparée en eau reconstituée et naturelle. Les eaux du Guarapiranga et du Pedro Beicht ayant servi à ces essais ont été prélevées en juin 94 à la station 2. Aucun déversement de cuivre n'était effectué à cette époque sur ce site et nous avons vérifié l'absence de contamination par le cuivre des échantillons d'eau prélevés.

Dans l'eau reconstituée, le sulfate de cuivre a présenté pratiquement la même toxicité aiguë sur les trois espèces de **poissons** testés (CL_{50} ; 96h: 0,11 ; 0,10 et 0,10 mg/L) ; par contre les valeurs de CL_{50} dans l'eau naturelle étaient plus variables (Tab.10). Dans les eaux naturelles de Pedro Beicht et du Guarapiranga, la toxicité du cuivre est moindre que dans l'eau reconstituée, et ceci pour tous les essais effectués. La toxicité est deux à dix fois plus faible selon la qualité des eaux naturelles.

Les **microcrustacés** *D. similis* et *C. dubia* sont apparus plus sensibles au sulfate de cuivre que les trois espèces de poisson. La CE_{50-48h} sur *D. similis* est de 0,01 mg/L, soit une valeur 10 fois plus faible que chez le poisson. La différence est moins marquée à moyen terme comme en témoignent les valeurs de NOEC- 7j de 0,025 et 0,05 mg/L chez *C. dubia*, contre 0,05 et 0,25 mg/L chez *B rerio*, obtenues respectivement en milieu eau reconstituée et eau naturelle de Pedro Beicht.

La plus faible toxicité du cuivre dans l'eau naturelle peut s'expliquer par les caractéristiques du milieu hydrique, le pH, la dureté, la présence d'acides humiques. Dans le cas présent, la dureté n'explique pas cette différence, puisqu'elle est plus faible dans l'eau du Guarapiranga (23-27 mg/L) que dans l'eau reconstituée (40-48 mg/L) et celle de Pedro Beicht (40-48 mg/L). D'autres constituants hydriques sont responsables de cette diminution de toxicité de l'eau du réservoir ; l'influence d'une complexation du métal par les acides humiques est une hypothèse à étudier.

La dureté de l'eau est un facteur très important pour la biodisponibilité des métaux qui conditionne leur toxicité. DAMATO *et al.* (1989) avaient obtenu des valeurs de CL_{50-96h} de 0,08 mg/L de sulfate de cuivre pour le poisson *P. reticulata* en eau douce de dureté de 10 à 12 mg/L de $CaCO_3$. Pour des eaux de dureté 20 mg/L, la CL_{50-96h} serait de 0,18 mg/l de cuivre d'après PICKERING & HENDERSON (1966). Le même auteur a trouvé une toxicité vingt fois plus faible dans une eau de dureté à 360 mg/L.

WINNER & FARRELL(1976), PHIPPS *et al.* (1984), en utilisant de l'eau reconstituée, ont obtenu des valeurs de CE_{50-48} et 72 h de cuivre sur *Daphnia*, de 0,026 à 0,0086 mg/L, qui sont des données proches de celles obtenues dans notre travail. Ils montrent aussi que différentes espèces de *Daphnia* testées ont la même sensibilité au cuivre.

WINNER (1985) souligne que les acides humiques présents dans les écosystèmes aquatiques réduisent significativement la toxicité des métaux, du fait de phénomènes de complexation, d'adsorption et de réactions d'échanges ioniques avec la matière organique. Il en résulte des interactions diminuant la biodisponibilité des éléments minéraux initialement sous forme ionique soluble et par conséquent une diminution de la toxicité (TOLEDO s.d.).

Les standards de qualité des eaux sont généralement obtenus par des tests écotoxicologiques, qui utilisent des conditions expérimentales définies. L'utilisation d'une eau reconstituée comme milieu standard est la règle. Cependant, l'extrapolation de ces données à l'environnement, n'est pas directe et nécessite de prendre en compte la composition du milieu naturel. Autrement le risque de sous-estimer ou surestimer la toxicité est constant.

Si on considère la NOEC obtenue en milieu naturel pour l'espèce la plus sensible (pour *Ceriodaphnia dubia* 0,05 mg/L de sulfate de cuivre, équivalent à 0,012 mg/L de cuivre), il apparaît qu'elle est inférieure au standard de qualité des eaux qui est de 0,02 mg/L de cuivre selon la législation en cours (BRASIL, 1986). Cela signifie que cette valeur standard est inadéquate pour la préservation de la vie aquatique. Il serait plus judicieux d'établir cette norme à partir de la valeur de NOEC obtenue en eau naturelle, voire en eau reconstituée. Si l'on prend en compte la valeur obtenue sur *D.similis*, en utilisant l'eau reconstituée (0,0025lg/L en cuivre), le standard serait plus faible.

Tab.11 - Toxicité aiguë et chronique du peroxyde d'hydrogène sur les organismes aquatiques, dans différents types d'eaux (mg/L)

Organismes	Eaux		
	reconstituée	Pedro Beicht	Guarapiranga
<i>B. rerio</i> (CL50;96h)	6,65	5,74	5,19
<i>P. reticulata</i> (CL50;96h)	4,32	11,34	-
<i>C. notomelas</i> (CL50;96h)	5,3	2,78	-
<i>D. similis</i> (CE50; 48h)	0,1	0,18	0,22
<i>B. rerio</i> (NOEC 7 Jours)	5	5	-
<i>C. dubia</i> (NOEC 7 Jours)	0,1	0,1	0,25

NOEC = Concentration sans effet toxique observé

4.III.2. Toxicité du peroxyde d'hydrogène sur microcrustacés et poissons

La toxicité du peroxyde d'hydrogène est semblable pour les trois espèces de poissons testés dans l'eau reconstituée (CL₅₀-96h 6,65 ; 4,42 et 5,3 mg/L) (Tab.11).

Pour *B. rerio*, les valeurs de CL₅₀-96h du peroxyde d'hydrogène sont pratiquement égales dans les trois types d'eaux testées. La toxicité de H₂O₂ n'est pas plus faible en milieu naturel qu'en eau reconstituée, contrairement au cuivre.

Daphnia et *Ceriodaphnia* sont plus sensibles que les poissons avec le peroxyde d'hydrogène aussi bien pour les essais à court qu'à long terme

En comparant les toxicités aiguë et chronique pour un même groupe d'organismes testés en condition semi-statique, on constate que les valeurs sont très proches. Ceci signifierait que le peroxyde d'hydrogène est une substance qui aurait des effets toxiques rapides qui s'amplifieraient très peu avec la durée d'exposition.

MARTIN *et al.* (1993) mentionnent que le peroxyde d'hydrogène, aux concentrations de 12, 20 et 30 mg/L a une action rapide sur les bivalves du milieu dulçaquicole *Dreissena polymorpha*. Les effets sont moindres sur les autres organismes aquatiques. Cependant, KELLY *et al.* (1992) ont mis en évidence une augmentation de l'hépatocarcinogénicité chez les truites alimentées avec une nourriture contaminée au peroxyde d'hydrogène à 3000 mg/Kg.

Les données de la littérature sur le peroxyde d'hydrogène pour les organismes aquatiques sont peu nombreuses. Les données existantes sont difficilement comparables, compte tenu des différences de concentration des formulations utilisées et des différences méthodologiques entre les essais.

Les CL₅₀-96h de H₂O₂ présentées par la SOLVAY/INTEROX (1990/92) sont de 37 mg/L pour les poissons : ces valeurs témoignent d'une toxicité près de 8 fois plus faible que celle obtenue dans ce travail. Pour *Daphnia*, la CL₅₀-24h donnée par cette société est de 7,7 mg/L ce qui témoigne aussi d'une toxicité nettement moindre (un facteur trente) par rapport à nos résultats (CE50-48h 0,1 à 0,2 mg/L).

Tab. 12 - Toxicité du peroxyde d'hydrogène et du sulfate de cuivre sur les algues

Espèces	CE(I)50; 96h, mg/L	
	Peroxyde d'hydrogène	Sulfate de cuivre
Cyanophycées		
<i>M. aeruginosa</i> (NPJB)	0,59	0,51
<i>O. quadripunctulata</i>	0,69	2,34
<i>P. galeata</i> (2ème camp.)	0,73	3,30
Chlorophycées		
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	3,17	0,28

4.III.3. Toxicité du sulfate de cuivre et du peroxyde d'hydrogène sur algues

Le peroxyde d'hydrogène présente pratiquement le même degré de toxicité sur les trois cyanophycées étudiées, avec des CE_{50} -96 h de l'ordre de 0,6 à 0,7 mg/L (Tab. 12). *M. aeruginosa* avec une CE_{50} de 0,5 mg/L apparaît plus sensible au sulfate de cuivre que les algues filamenteuses *O. quadripunctulata* et *P. galeata* dont les CE_{50} sont supérieures à 2 mg/L.

Les cyanophycées testées sont apparues dans l'ensemble moins sensibles que *S. subspicatus* au cuivre et inversement plus sensibles au peroxyde d'hydrogène. Ces résultats ne confirment pas les conclusions de McKNIGHT & MOREL (1980), selon lesquelles les algues bleues, surtout les filamenteuses, seraient plus sensibles au cuivre que les chlorophycées.

Les travaux de SOLVAY/INTEROX (1990/92) confirment ces résultats selon lesquels la toxicité du peroxyde d'hydrogène serait plus importante pour les cyanophycées et donnent les valeurs de CL_{50} -24h suivantes:

<i>Anabaena</i>	1,8 ppm
<i>Anabaena variabilis</i>	5,5 ppm
<i>Chlorella emersoni</i>	15 ppm
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	37 ppm

Le peroxyde d'hydrogène est considéré par l'INTEROX comme un agent inhibiteur du processus de photosynthèse et donc un algicide.

Parallèlement aux essais sur microcrustacés, poissons et microalgues, il serait nécessaire d'étudier les effets écotoxicologiques de ces deux algicides sur les organismes non cibles. Ces informations seraient utiles pour minimiser l'impact de ces substances sur les écosystèmes aquatiques lors de leur utilisation pour l'élimination des microalgues dans le réservoir Guarapiranga.

Une mise au point des méthodes analytiques de détection et de monitoring de la qualité des eaux serait préalablement nécessaire.

Tab. 13 - Toxicité aiguë sur la souris, des algues cultivées en milieu ASM-1 et en milieu ASM-1 additionné de sulfate de cuivre :
0,25 mg/L en CuSO₄.5H₂O pour les souches de *M. aeruginosa*
1,18 mg/L en CuSO₄.5H₂O pour *P. galeata* et *O. quadripunctulata*

Espèces	DL50; 24h, mg/Kg; sur souris	
	en milieu ASM1	en milieu ASM1 + Cuivre
<i>P. galeata</i> (2ème camp.)	NT*	NT*
<i>M. aeruginosa</i> (5ème camp.)	NT	NT
<i>M. aeruginosa</i> (NPJB)	42	32
<i>O. quadripunctulata</i>	742	707

*NT = Non toxique

Tab. 14 - Toxicité aiguë sur la souris, des algues cultivées en milieu ASM-1 et en milieu ASM-1 additionné 0,25 mg peroxyde d'hydrogène/L

Espèces	DL50; 24h, mg/Kg; sur souris	
	en milieu ASM1	en milieu ASM1 + peroxyde
<i>P. galeata</i> (2ème camp.)	NT*	NT*
<i>M. aeruginosa</i> (5ème camp.)	NT	NT
<i>M. aeruginosa</i> (NPJB)	42	35

*NT = Non toxique

4.III.4. Influence du cuivre et du peroxyde d'hydrogène sur la toxicité des cyanophycées

Les effets du cuivre ou d' H_2O_2 sur la toxinogénèse des cyanophycées ont été étudiés en exposant ces algues à des concentrations équivalentes aux valeurs de NOEC évaluées lors des essais précédents. Les concentrations de cuivre utilisées sont de 0,06 mg/L pour *Microcystis* et 0,33 mg/L pour les algues filamenteuses *P. galeata* et *O. quadripunctulata* (correspondantes à 0,25 et 1,18 mg/L de sulfate de cuivre respectivement).

L'exposition à H_2O_2 est effectuée à 0,25 mg/L pour toutes les espèces.

Les algues ont été exposées pendant 15 à 20 jours, le temps nécessaire pour obtenir une quantité d'algues suffisante pour les essais souris. La préparation des extraits d'algues a été faite selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes (Fig. 4., parag.3.I.4.3).

Les résultats des essais sur souris montrent que les souches *Pseudoanabaena galeata* (2^{ème} campagne) et *Microcystis aeruginosa* (5^{ème} campagne), qui étaient sans effet sur la souris, restent dépourvues de toxicité aiguë lorsqu'elles sont cultivées en présence de cuivre (Tab. 13). Les souches de référence de *M. aeruginosa* NPJB et *Oscillatoria quadripunctulata* qui étaient toxiques, ont présenté une toxicité analogue avec ou sans cuivre. Les valeurs de DL_{50-24h} , qui étaient de 42 mg d'algue *M. aeruginosa* NPJB (poids sec)/Kg souris (poids corporel) et de 742 mg/kg (*O. quadripunctulata*) en l'absence de cuivre, sont de 32 et 707 mg/Kg respectivement en présence du métal.

Les résultats sont identiques avec H_2O_2 : aucune modification significative de la toxicité sur souris n'a été enregistrée lorsque les cyanophycées sont cultivées en présence de faibles concentrations d'algicides (Tab.13).

Il existe peu de travaux sur l'influence des agents chimiques sur la production des toxines algales. UTKILEN & GJOLME (1992) ont étudié l'effet du fer sur la production de toxines de *M. aeruginosa*. et montré qu'une augmentation de la production de toxines pouvait résulter de l'augmentation de la teneur en fer de l'eau et de l'intensité lumineuse.

LUKAC & AEGERTER (1993) ont étudié l'influence des métaux lourds sur la production de toxines d'une souche toxique de *M. aeruginosa*. Ces

auteurs ont montré que de tous les métaux testés incluant le cuivre, seul le zinc s'est révélé être nécessaire à la croissance algale et à la production de microcystine. Nous n'avons pas trouvé de travaux dans la littérature sur l'influence du peroxyde d'hydrogène sur la production des toxines algales.

Les mécanismes biochimique et génétique de la production des toxines algales ne sont pas bien connus. Les effets des polluants d'origine anthropogénique, comme les métaux et d'autres composés organiques sur ces mécanismes ont été très peu étudiés.

La température supérieure à 20°C, le pH de 6 à 9, le taux de N : P de 10-6:1, la faible turbulence de l'eau, l'environnement stratifié, le temps de rétention de l'eau et les macro et microéléments sont des facteurs qui contribuent pour la formation de blooms des cyanophycées (CARMICHAEL, 1992). Les facteurs environnementaux comme la lumière, la température, le pH et les nutriments paraissent affecter la production de toxines dans les expérimentations en laboratoire (WATANABE & OISHI, 1985), cependant, LUKAC & AEGERTER (1993) mentionnent que la production de cyanotoxines n'est pas associée simplement à un seul facteur, mais à un ensemble de conditions environnementales, encore mal connues.

4.III.5. Toxicité du mélange de sulfate de cuivre et de peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*.

Dans le cas de l'application séquentielle des algicides, sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène, dans le réservoir Guarapiranga, il est important de connaître leur comportement dans l'environnement et leurs effets d'interaction sur les organismes non cibles.

Les effets combinés des substances en mélange peuvent être au plan toxicologique simplement additifs, mais aussi synergiques (plus qu'additifs) ou antagonistes (moins qu'additifs).

Plusieurs modèles ont été proposés pour l'évaluation de la toxicité des substances chimiques en mélange. Ils diffèrent par les méthodes expérimentales et en particulier par les modes d'expression des résultats (SPRAGUE, 1970 ; MARKING, 1977 ; FAO, 1980 ; ALABASTER 1981 ; HERMENS *et al.* 1985). Une synthèse bibliographique de ces méthodes a été faite par RAND & PETROCELLI (1985).

Tab.15 - Toxicité aiguë et additivité du sulfate de cuivre et du peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*.

Numéro du test	Substances	CE50; 48 h: mg/L		(S) somme des actions toxiques (valeurs moyennes)	(IA) Indice d'additivité S(-1)+1
		individuelles	Concentrations moyennes de la substance dans le mélange induisant 50% d'effet		
1	sulfate de cuivre peroxyde d'hydrogène	0,063 0,160	0,092 0,148	1,81	-0.81
2	sulfate de cuivre peroxyde d'hydrogène	0,077 0,192	0,089 0,189	2,13	-1.13
3	sulfate de cuivre peroxyde d'hydrogène	0,016 0,115	0,011 0,082	1,42	-0.4
Indice d'additivité moyen					-0.78

Les effets combinés du cuivre et de H_2O_2 ont été évalués sur *D. similis* selon la méthode décrite en 3.II.4. Les CE_{50} des produits individuels ont été mesurées dans un premier temps. Nous avons ensuite préparé successivement :

- (i) des solutions des deux toxiques à des concentrations équivalents à leur CE_{50} respective (soit A_i et B_i)
- (ii) une série de mélanges comportant différentes proportions de ces deux solutions, ainsi qu'il est indiqué en annexe D (1 :1 ; 1:2 ; 1:3 ; 1:4 ; 2:1 ; 3:1 et 4:1).
- (iii) puis des dilutions à l'aide du milieu d'essai daphnie de chacun des mélanges précédents.

Ces dilutions seront testées pour leur toxicité sur daphnies et les résultats traités afin de déterminer le niveau de dilution entraînant 50% d'immobilisation des microcrustacés. Les concentrations de cuivre et de H_2O_2 correspondantes seront calculées (soit A_m et B_m).

Les valeurs de cuivre et de H_2O_2 correspondantes aux CE_{50} des solutions individuelles ou en mélange sont présentées dans le tableau 15.

Trois séries d'essais ont été réalisées, deux en utilisant l'eau du Guarapiranga et une en eau reconstituée, afin de déterminer si les effets éventuels d'interaction pouvaient être influencés par l'eau du milieu.

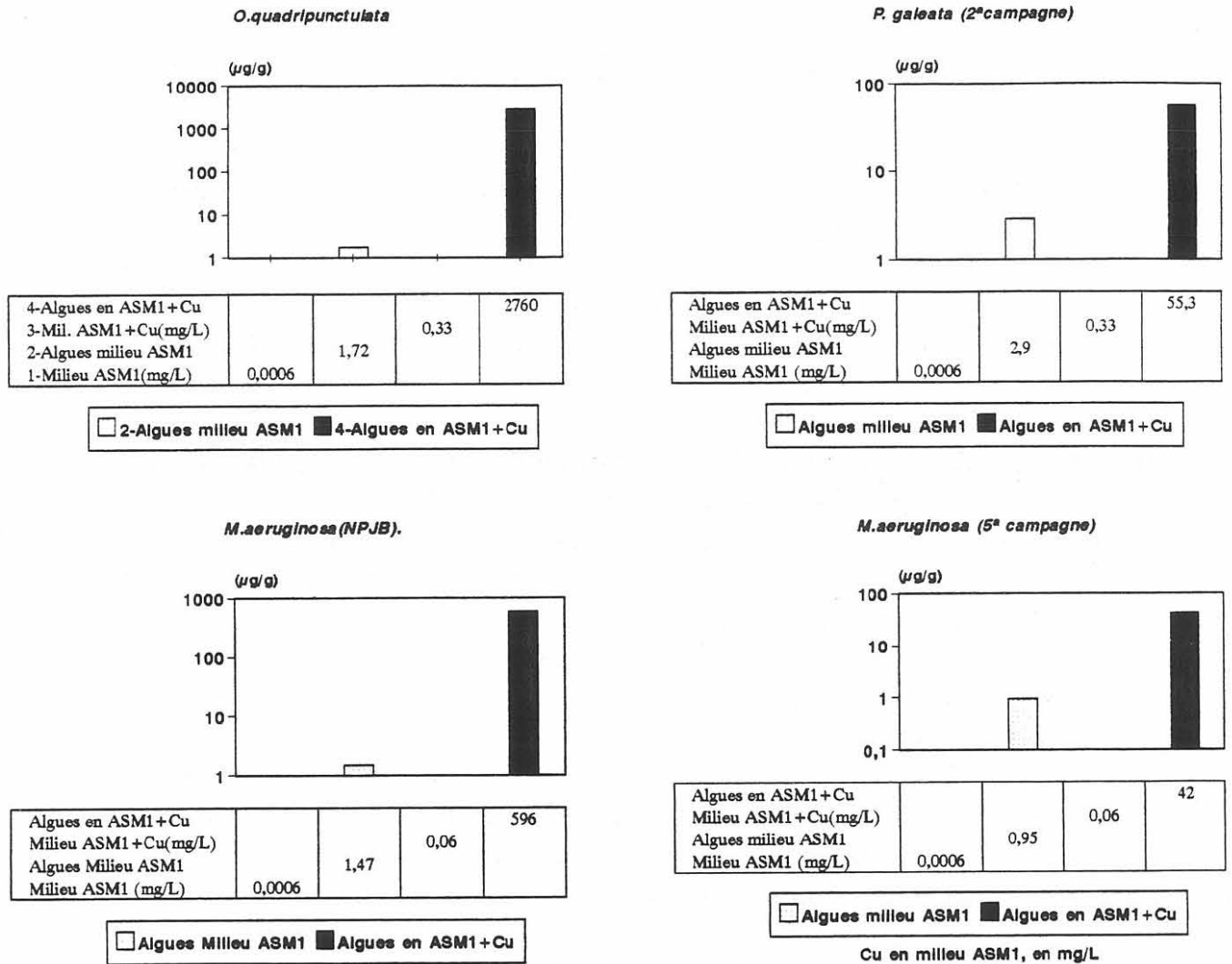
Les valeurs de CE_{50} -48h obtenues dans les trois séries d'essais sont rapportées dans le tableau 15.

Les valeurs de S (somme des actions toxiques) calculées ainsi qu'il est indiqué en 3.II.4. sont dans tous les cas supérieures à 1, quelles que soient les proportions de sulfate de cuivre et de peroxyde d'hydrogène en mélange. Les trois séries d'essais concluent donc à un effet moins qu'additif.

L'indice d'additivité calculé sur l'ensemble des données, toutes eaux confondues, est de - 0,78, ce qui signifie que la toxicité du mélange, par rapport aux valeurs de CE_{50} des substances testées individuellement, est environ 0,5 fois moindre.

*La toxicité du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène étant moins qu'additive, des effets de toxicité aiguë supérieurs à ceux attendus avec les deux substances utilisées individuellement, semblent donc exclus sur *D. similis*.*

Fig. 13 - Essais d'accumulation du cuivre par les algues. Les teneurs de cuivre, en mg/L, dans le milieu témoin (ASM1), et le milieu contaminé par ajout de cuivre sont représentées parallèlement aux concentrations du metal bioaccumulé par les algues, exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'algues sèches



4.IV. ACCUMULATION DU CUIVRE

4.IV.1. Par les algues lors d'essais en laboratoire

Des essais d'accumulation du cuivre par les algues ont été réalisés sur les souches :

Oscillatoria quadripunctulata

Pseudoanabaena galeata (2^{ème} camp.)

Microcystis aeruginosa NPJB (toxique)

Microcystis aeruginosa (5^{ème} camp.)

Les concentrations de cuivre utilisées sont de 0,06 mg/L pour *Microcystis* et 0,33 mg/L pour les algues filamenteuses *P. galeata* et *O. quadripunctulata* (équivalentes à 0,25 et 1,18 mg/L de sulfate de cuivre respectivement).

Les résultats des essais d'accumulation du cuivre par les quatre souches de cyanophycées après 15 à 20 jours d'exposition sont représentés dans la figure 13.

Les teneurs en cuivre dans les milieux témoins et contaminés sont figurées parallèlement aux concentrations de cuivre bioaccumulé.

Les résultats montrent une accumulation du cuivre par les algues. Les espèces *O. quadripunctulata* et *M. aeruginosa* NPJB sont celles qui accumulent le plus le cuivre, avec un facteur de bioconcentration, respectivement, voisin de 8.000 et 10.000.

Le facteur est plus faible pour les deux autres souches. Il n'excède pas 700. Il serait intéressant de poursuivre ces investigations afin d'expliquer ce résultat. L'hypothèse que l'exposition au cuivre modifierait la paroi des algues ou certains constituants biochimiques impliqués dans les phénomènes de bioaccumulation et diminuerait leurs capacités d'accumulation, est à vérifier. Mais un problème d'ordre analytique n'est pas exclu.

Les quantités totales de cuivre accumulé par les algues dans les milieux de culture témoins ASM-1, où le cuivre est utilisé comme microélément à la concentration de 0.0006 mg/L, sont faibles par rapport à celles accumulées par les algues en milieu contaminé.

Une étude réalisée par JENSEN *et al.* (1982) montre que, outre les parois algales, les constituants intracellulaires ont aussi la capacité de séquestrer des quantités significatives de métaux. Les trois constituants les plus

Fig.14 - Concentration du cuivre dans le phytoplancton du Guarapiranga, en mg/g

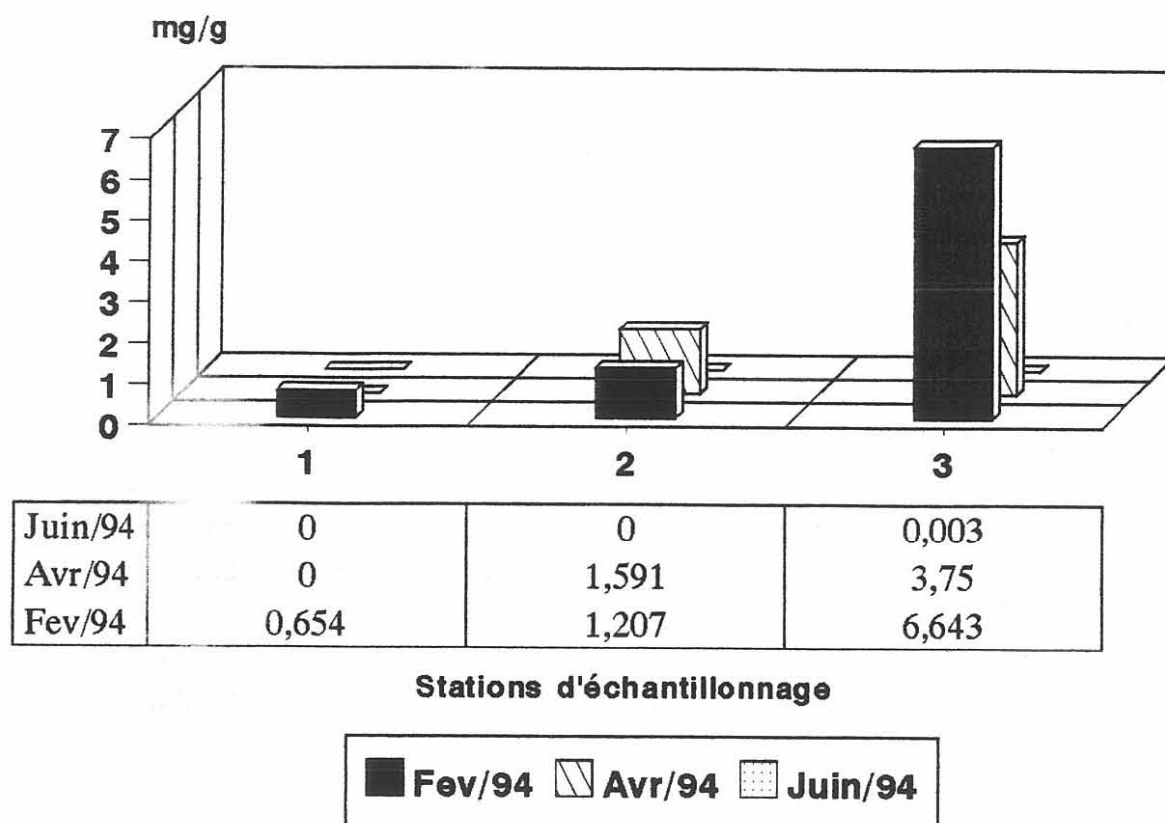
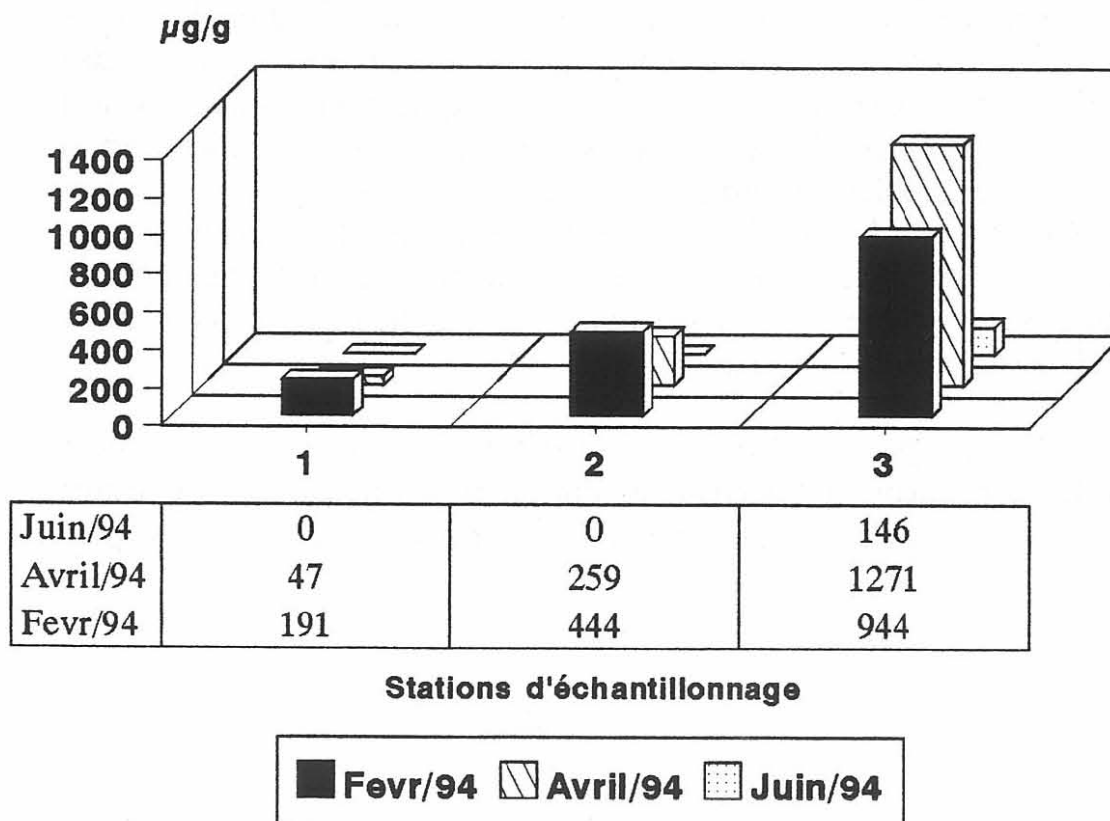


Fig.15 Concentrations de cuivre dans le zooplancton du réservoir Guarapiranga, exprimées en $\mu\text{g/g}$ (poids sec)



efficaces de ce point de vue sont : (1) les polyphosphates qui fixent les cations par suite de leurs charges de surface négatives ; (2) les lipides, même s'ils ne possèdent pas les capacités de fixation les plus importantes ; (3) et les protéines qui sont les constituants cellulaires les plus chélateurs des métaux.

JARDIM & PEARSON (1984) ont démontré que les algues cyanophycées, en présence de cuivre, ont la capacité de libérer des substances extracellulaires capables de détoxifier et complexer les métaux, et de réduire les taux de cuivre biodisponible dans l'eau.

Les algues ont des capacités de fixation importantes vis à vis des cations divalents, qui seront mises à profit pour leur élimination de l'eau dans les procédés d'épuration tertiaire. Cette absorption des cations, le cuivre par exemple, peut présenter des avantages pour la croissance algale à doses faibles ; à doses plus élevées, des effets de toxicité peuvent en résulter, non seulement pour les algues elles-mêmes, mais aussi indirectement pour les autres espèces, les consommateurs de phytoplancton en particulier (OSWALD, 1989).

4.IV.2. Accumulation du cuivre par le phytoplancton et le zooplancton

L'accumulation de cuivre par le phytoplancton et le zooplancton du réservoir Guarapiranga, au cours des trois campagnes d'échantillonnage, est représentée dans les figures 14 et 15. Les concentrations de cuivre mesurées dans l'eau prélevée simultanément sont rappelées en bas de ces deux figures à titre de comparaison. Ces concentrations avaient été présentées antérieurement (rappel de la figure 10).

La teneur en cuivre dans le phytoplancton a été trois à sept fois supérieure à celle du zooplancton, ce qui souligne une rétention du métal plus élevée par les algues. Les teneurs maximales trouvées dans le phytoplancton sont de l'ordre de 6,6 mg/g (en matière sèche) à la station 3 en février 94. Simultanément, les teneurs mesurées dans le zooplancton voisinent les 1 mg/g (poids sec). Ces teneurs importantes s'expliquent par des concentrations élevées du cuivre dans l'eau.

En ce qui concerne l'accumulation du cuivre dans ces deux groupes d'organismes, aux différentes stations d'échantillonnage, il apparaît que

l'accumulation est croissante de la station 1 à la station 3 ; le phénomène étant plus marqué à la station 3 où le sulfate de cuivre est déversé plus fréquemment et en plus grande quantité. L'accumulation est moindre en période hivernale pendant laquelle l'algicide est appliqué à moins grande échelle, comme le montrent les teneurs relativement basses mesurées en juin (Figs.13 et 14).

L'accumulation de métaux résulte de processus de biosorption, incluant l'adsorption sur les surfaces externes, l'absorption au travers des membranes cellulaires, par voie alimentaire et par filtration de l'eau.

On parle de *bioconcentration* lorsque le processus d'accumulation s'effectue à partir de l'eau. Le terme de *bioaccumulation* est utilisé lorsque la voie alimentaire est impliquée.

Le terme "effet d'accumulation par la chaîne alimentaire" est utilisé lorsqu'il y a transfert du métal apporté par l'alimentation, sans augmentation des concentrations dans les tissus du consommateur (prédateur) (GERHARDT, 1993). S'il y a augmentation des concentrations dans les organismes situés au niveau trophique supérieur (prédateur), on parle de *biomagnification*.

En considérant les teneurs de cuivre dans l'eau (Fig. 10) et l'accumulation moyenne par les organismes, on obtient des facteurs moyens de bioconcentration de 40.000 pour le phytoplancton.

Pour le zooplancton, qui se nourrit surtout de phytoplancton, nous n'avons pas mis en évidence de biomagnification même si la concentration de cuivre relevée dans certains cas peut être élevée : la concentration la plus élevée est celle de 1,27 mg/g, notée en avril à la station 3.

Selon (GERHARDT, 1993) le cuivre ne se biomagnifierait pas dans la chaîne alimentaire aquatique, l'accumulation dans les animaux allant décroissant quand le niveau trophique des organismes augmente ; ceci est en accord avec nos résultats.

Plusieurs espèces d'invertébrés échantillonnés dans des sites contaminés de la rivière Arkansas aux USA ont présenté des teneurs en cuivre de 10 à 150 mg/Kg (KIFFNEY & CLEMENTS, 1993), valeurs bien inférieures à celles trouvées dans le phyto et zooplancton à la station 3. Ces auteurs concluent que les résultats de bioconcentration de métaux sur les organismes peuvent servir de bioindicateurs de la qualité des eaux de l'écosystème, ainsi qu'il en ressort également des conclusions de notre travail.

Tab.16 - Accumulation du cuivre ($\mu\text{g/g}$) dans les muscles et les viscères des poissons échantillonnés dans le réservoir Guarapiranga aux stations 1 et 3

Espèces	Station 1			
	Campagnes d'échantillonnage			
	Mars/94		Juin/94	
	muscles	viscères	muscles	viscères
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,46	102	-	-
<i>Leporinus octofasciatus</i>	0,28	-	0,21	0,31
<i>Cyphocharax modestus</i>	0,5	-	0,23	1,49
<i>Astyanax fasciatus</i>	-	-	3,66	1,11
<i>Tilapia rendalli</i>	0,43	70,5	-	-
<i>Hoplias malabaricus</i>	3,55		-	-

Espèces	Station 3			
	Campagnes d'échantillonnage			
	Mars/94		Juin/94	
	muscles	viscères	muscles	viscères
<i>Oreochromis niloticus</i>	-	-	0,41	98,5
<i>Astyanax fasciatus</i>	-	-	0,32	1,08
<i>Salminus hilarii</i>	-	-	0,23	0,44
<i>Geophagus brasiliensis</i>	1,01	-	0,22	-
<i>Leporinus octofasciatus</i>	1,36	7,25	-	-
<i>Cyphocharax modestus</i>	0,5	52,9	-	-

Le phyto et le zooplancton ainsi que le cuivre présent dans ces organismes et dans l'eau seront éliminés lors du traitement pour la potabilisation des eaux. L'épuration sera donc réalisée par traitements de coagulation, de filtration qui retiendra les particules en suspension et enfin par une chloration.

4.IV.3 Accumulation du cuivre par les poissons

Les résultats des analyses du cuivre total des poissons échantillonnés dans les stations 1 et 3, au cours de deux campagnes, mars et juin 94, sont présentés dans le tableau 16.

Les données obtenues montrent que, d'une manière générale, les viscères accumulent plus le cuivre que les muscles. Pour l'espèce de tilapia *O. niloticus* et *T. rendalli*, l'accumulation dans les viscères peut être 200 fois plus importante que dans les muscles.

Les poissons prélevés au niveau de la station 3 n'ont pas présenté de contamination significativement supérieure à ceux de la station 1, ni dans les muscles ni dans les viscères.

Les valeurs de cuivre trouvées dans les muscles des poissons se situent entre 0,02 à 3,7 $\mu\text{g/g}$ (valeur moyenne de 0,9 $\mu\text{g/g}$), alors que dans les viscères, elles varient entre 0,3 et 102 $\mu\text{g/g}$, avec une valeur moyenne de 34 $\mu\text{g/g}$. Ces valeurs de cuivre dans les viscères résultent vraisemblablement de l'ingestion de matières d'origine organique sédimentaire ou alimentaire (phytoplancton et zooplancton) contaminées par le cuivre.

La norme concernant le cuivre d'origine alimentaire est fixée à 30 mg/kg d'après l'Arrêté 55871 de 26/03/1965 (BRASIL, 1965). En tenant compte des teneurs en cuivre de la chair des poissons (poissons éviscérés), il apparaît que les teneurs trouvées dans les différentes espèces piscicoles du réservoir Guarapiranga, sont conformes à la norme alimentaire en ce qui concerne l'alimentation humaine.

Dans un travail sur l'évaluation de la contamination du poisson dans le bassin de la rivière Cubatão, réalisé par la CETESB (1990-b) la teneur en cuivre des viscères était également plus élevée que celle des muscles, avec des valeurs de 0,7 à 169 $\mu\text{g/g}$ dans des viscères, contre 0,02 à 0,98 $\mu\text{g/g}$ dans des muscles.

SLOTTERDIJK (1980) a trouvé des valeurs de 0,5 à 3,0 $\mu\text{g/g}$ en cuivre dans les poissons du Saint Laurent au Canada, avec une moyenne de 0,7 $\mu\text{g/g}$; ces valeurs sont proches de celles trouvées dans ce travail. L'auteur mentionne que ces concentrations ne présentent pas de problèmes pour la consommation humaine. GUAY (1986) dans cette même rivière, avait révélé des concentrations minimales et maximales de cuivre de 0,55 à 1,30 $\mu\text{g/g}$ suivant les chez différentes espèces de poissons : Les organismes juvéniles reflétaient plus les variations locales de la contamination que les poissons adultes, plus mobiles.

LIMA (1990) a détecté dans les muscles de poissons détritivores (*Prochilodus scrota*) 1,77 $\mu\text{g/g}$, contre 8,88 $\mu\text{g/g}$ pour les poissons piscivores (*Hoplias malabaricus*) et 0,35 $\mu\text{g/g}$ pour les herbivores (*Schizodon nasutus*), dans la station écologique de Jataí-SP Brésil.

PFEIFFER *et al.* (1985), dans une étude de contamination par les métaux lourds de la Baie de Sepetiba(RJ), ont détecté des valeurs de cuivre chez les poissons entiers de l'ordre de 0,14 à 4,45 $\mu\text{g/g}$ dans quatre différentes espèces ; ils ont considéré que ces valeurs étaient très faibles, de l'ordre de celles rapportées dans la littérature pour des sites non contaminés par ce métal.

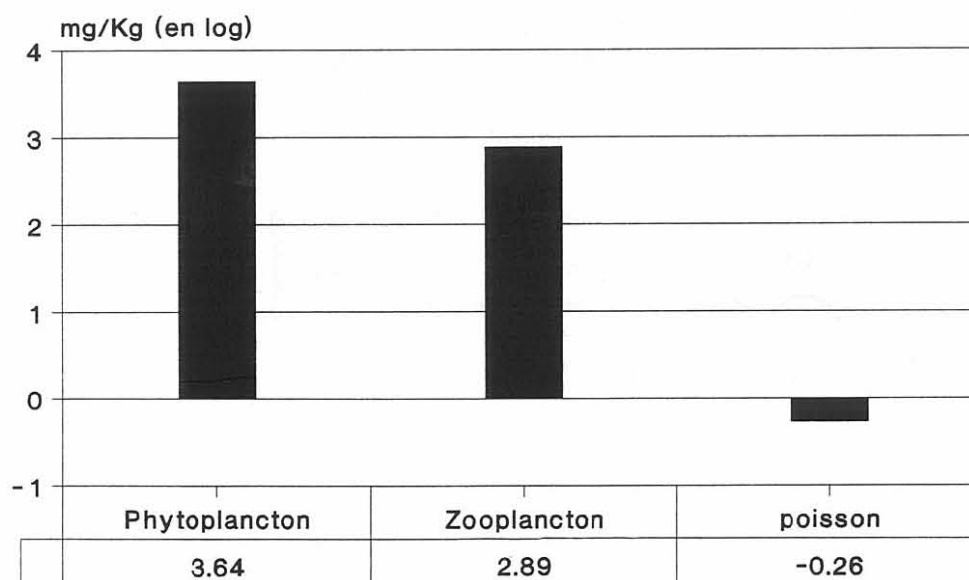
En conclusion, les données obtenues pour le réservoir Guarapiranga indiquent que la qualité de la chair des poissons est propre à la consommation en ce qui concerne le cuivre. Cependant, le nombre de campagnes d'échantillonnage réalisé dans ce travail est faible ; compte tenu de l'application journalière de cuivre comme algicide, il est indispensable de poursuivre ce type d'investigation et de contrôler l'accumulation du métal dans la chair des poissons qui peut contribuer directement à la contamination humaine.

Analyse globale de l'accumulation du cuivre dans les organismes aquatiques.

L'analyse comparative du niveau d'accumulation du cuivre dans les différents groupes d'organismes (phytoplancton, zooplancton et poissons), montre que le cuivre n'est pas biomagnifié dans la chaîne trophique (Fig.16).

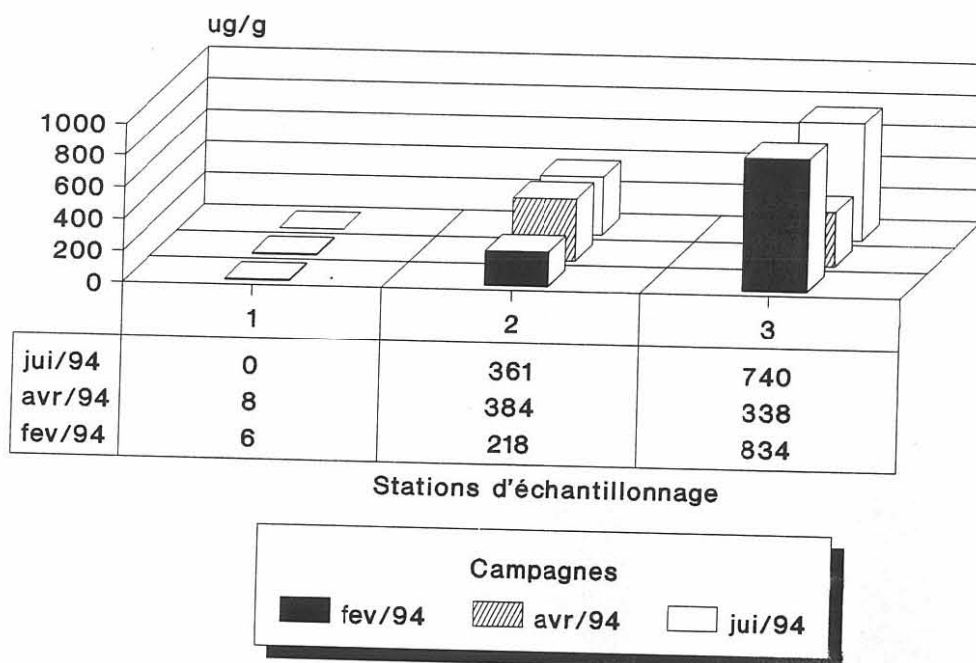
Le cuivre accumulé diminue avec l'augmentation du niveau trophique de la chaîne aquatique. Ces résultats viennent corroborer les données de la littérature, selon lesquelles, au contraire du mercure et du cadmium, le cuivre ne serait pas un métal biomagnificateur.

Fig.16 Concentration de cuivre dans les différents organismes du réservoir Guarapiranga, station 3



Valeurs moyennes en cuivre à la station 3

**Fig.17 - Teneur de cuivre des
sédiments du réservoir Guarapiranga**



4.V CARACTERISATION DES SEDIMENTS DU GUARAPIRANGA

Les analyses physico-chimiques et écotoxicologiques des sédiments

Les résultats des analyses des sédiments (Fig. 17) ont mis en évidence une augmentation croissante de la teneur en cuivre de la station 1 à la station 3, lors des trois campagnes d'échantillonnage.

L'accumulation du cuivre dans les sédiments de la station 2, est environ 50 fois supérieure à celle de la station 1, tandis qu'elle reste deux fois plus faible que celle de la station 3 ; à l'exception de la campagne d'avril/94, où la valeur du cuivre dans la station 3 a été semblable à celle de la station 2. Les moyennes aux stations 1, 2 et 3 sont respectivement de 5 mg/kg, 248 mg/kg, et 637 mg/kg de sédiments (poids sec).

Dans une étude réalisée par la CETESB en 1992 (1992-c), des valeurs moyennes de cuivre détectées dans les sédiments étaient de 1,8 mg/Kg dans la station 1 ; 41.5 mg/kg à la station 2 et 79 mg/kg à la station 3. Les données actuelles témoignent d'une augmentation de 6 à 8 fois le niveau de cuivre dans les sédiments des stations 2 et 3, sur une période de deux ans.

Le cuivre dans l'eau se complexe facilement et se fixe rapidement sur les matières organiques et les particules en suspension avant de se retrouver au niveau des sédiments qui constituent le compartiment le plus pollué des milieux aquatiques.

Des études de contamination des sédiments par les métaux, incluant le cuivre, réalisées pour ESTEVES *et al.* (1981), montrent que les niveaux de cuivre trouvés dans 16 réservoirs de l'Etat de São Paulo, varient de 8 à 61 mg/kg (Tab. 17). LIMA (1990) a détecté des valeurs de 2 à 8 mg/kg dans des ravins et des lagons de l'Etat de São Paulo.

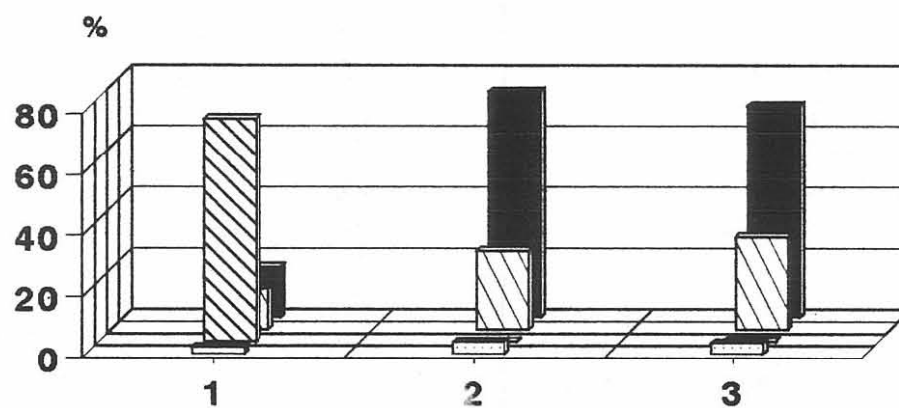
Dans les réservoirs de Pirapora et Rasgão et dans la rivière Paraíba do Sul, qui reçoivent des apports importants de pollution, (rejets d'égouts domestiques et des effluents industriels), des teneurs en cuivre de l'ordre de 92 à 167 mg/kg ont été trouvés dans les sédiments (Tab.17).

BOWDEN (1976) a défini une échelle de contamination par les métaux pour le classement des sédiments. En ce qui concerne le cuivre, les différents niveaux de qualité sont les suivants:

Tab. 17 Compilation des données de la littérature sur les teneurs en cuivre de différents environnements aquatiques

Locaux	valeurs moyennes en Cu (mg/Kg)	source bibliographique
Réservoir: Rio Pari	55	ESTEVEES et al. (1981)
Salto Grande-SP	43	id.
Xavantes-SP	8	id.
Piraju-SP	16	id.
Jurumirin-SP	10	id.
Rio Novo-SP	16	id.
Jupia-SP	37	id.
Marimbondo-SP	41	id.
Volta Redonda-SP	20	id.
Jagurá-SP	27	id.
Graminha-SP	16	id.
Limeira-SP	21	id.
Ibitinga-SP	28	id.
Promissão-SP	22	id.
Barra Bonita-SP	28	id.
Bariri-SP	61	id.
Aratiaia-SP	9	id.
Rivière Paraíba do Sul-RJ	92	MALM et al. (1989)
Bassin Rivière Cubatão-SP	9	CETESB(1990-b)
Ravin Cafundó-SP	5	LIMA (1990)
Ravin Boa Sorte-SP	2	id.
Ravin Jataí-SP	7	id.
Etang Diogo-SP	6	id.
Etang Quilômetro-SP	7	id.
Etang Infernã-SP	8	id.
Etang Óleo-SP	7	id.
Réservoir Barra Bonita -SP	167	CETESB (1995-b sous press)
Réservoir Tecelagem-SP	81	id.
Réservoir Rasgão	166	id.
Réservoir Pedro Beicht-SP	66	id.
Bassin de Tokio- Japon	86	KITANO et al. (1980)
Lac Ontario- Canada	48	MUNAWAR et al. (1983)
Lac St Clair - Canada	16	MUNAWAR et al. (1985)
Lac Eire - Canada	43	id.
Rivière Niagara - Canada	45	id.
Rivière Détroit - Canada	48	id.
4 lacs canadiens	2 à 59	ANKLEY et al. (1994)

Fig.18 Teneur en matière organique et granulométrie des sédiments du réservoir (valeurs moyennes de trois campagnes)



Argile	16,46	69,6	69,6
limon	13,26	25,75	30,3
sable	73,1	0,1	0,13
Matière organique	2,25	4,05	3,7

stations d'échantillonnage



Sédiments non pollués	< 25 mg/kg
Sédiments modérément pollués de	25 à 50 mg/kg
Sédiments hautement pollués	> 50 mg/kg

D'après les critères établis par BOWDEN, les teneurs de cuivre obtenues dans le sédiment du réservoir Guarapiranga sont telles que les stations 2 et 3, respectivement 248 et 637 mg/kg, sont classées hautement polluées. La station 1 où le niveau de cuivre est faible, peut être considérée par contre comme non polluée.

Des essais de toxicité ont été réalisés sur des microinvertébrés benthiques : l'amphipode *Hyalloa cf azteca*. Les tests de toxicité effectués sur tous les échantillons, prélevés aux trois stations lors des trois campagnes, n'ont pas révélé de mortalité lors des essais de 12 jours.

Les résultats des analyses de cuivre des eaux de chaque bécier à la fin des essais sur *Hyalloa* n'ont pas montré de contamination de l'eau par le cuivre. Ces résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas de relargage du cuivre à partir des sédiments.

Les questions qui sont restent posées à l'issue de ces essais sont relatives à :
(i) la biodisponibilité du cuivre dans les sédiments et sa toxicité réelle pour les espèces benthiques qui reste à établir,
(ii) et la représentativité et la sensibilité du test sur *Hyalloa* en laboratoire.

Le teneur en matière organique du sédiment des trois stations est relativement faible (environ de 2%) : les sédiments de la station 1 contiennent essentiellement des sables, tandis que ceux des stations 2 et 3 renferment de manière prédominante des argiles (Fig. 18). En dehors du fait que les apports de cuivre sont beaucoup plus faibles dans la station 1 qu'aux deux autres stations, la faible teneur en argile peut aussi expliquer le niveau de contamination assez bas des sédiments comparée aux deux autres sites.

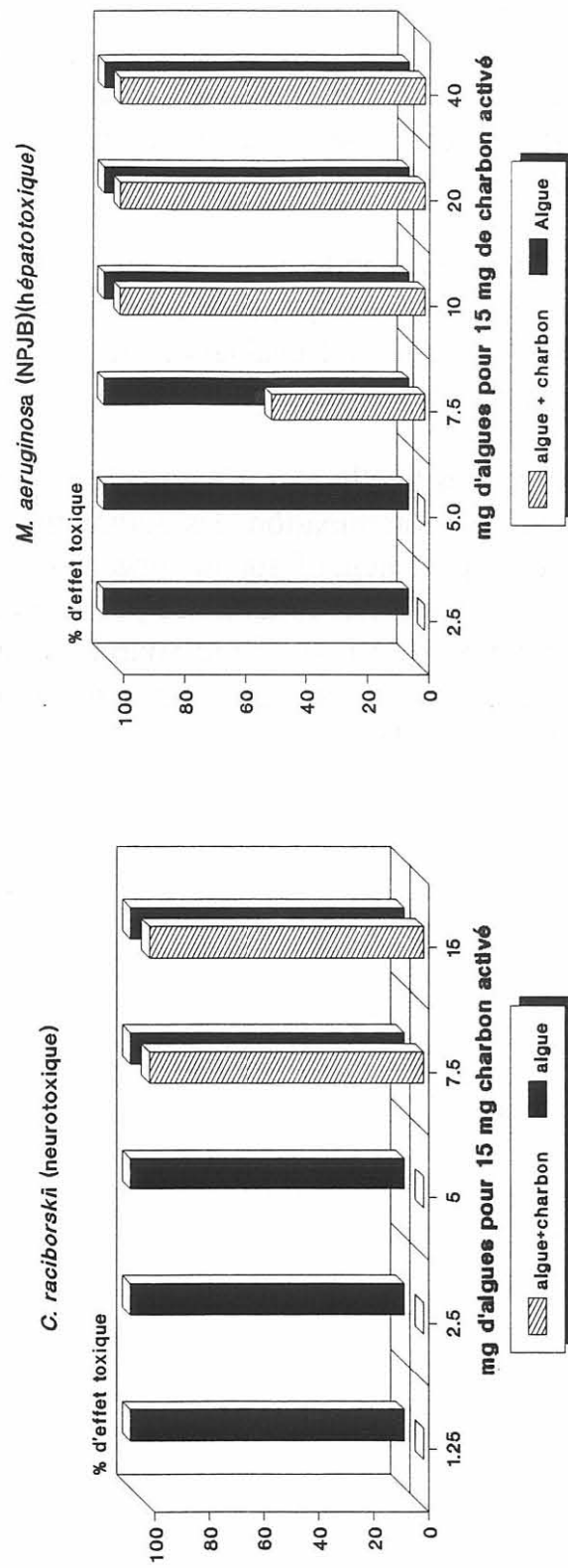
FORSTNER *et al.* (1993) utilisent le «background» géochimique de la région pour l'évaluation du niveau de contamination des sédiments et la concentration du contaminant dans les fractions de limon et d'argile. Selon le modèle qu'il a développé et en utilisant une valeur de «background» géochimique de 45 mg/Kg (TUREKIAN & WEDEPOHL, 1961), les conclusions sont identiques aux précédentes : le sédiment du Guarapiranga à la station 1 peut être considéré comme non pollué, à la station 2 modérément pollué et à la station 3 de modérément à hautement pollué.

Les contaminants au niveau du compartiment sédimentaire interagissent avec les constituants de la matrice solide. Les mécanismes d'interactions sédiment/eau ne sont pas bien connus. Les contaminants associés aux sédiments sont moins disponibles. La faible biodisponibilité des métaux dans le sédiment est directement liée aux formes de liaisons du métal avec les particules et à sa complexation avec les composés organiques et avec les éléments minéraux comme les carbonates, les hydroxydes de fer et de manganèse (BROWN *et al.*, 1974 ; KITANO *et al.*, 1980).

Les études sur les communautés benthiques associées à des analyses physico-chimiques et écotoxicologiques, peuvent fournir des informations complémentaires et indispensables pour l'évaluation de la qualité et de la biodisponibilité des contaminants des sédiments.

Même si l'étude des communautés benthiques n'a pas été réalisée au niveau des stations 2 et 3, les taux de contamination des sédiments par le cuivre peuvent laisser envisager un impact négatif sur les organismes peuplant ce compartiment. Par ailleurs, ces sédiments contaminés peuvent constituer une source continue de contamination de l'eau ; cette source de contamination peut persister très longtemps et bien après que l'origine de la contamination ait cessé (GUCHTE & LEEUWEN, 1988).

Fig. 19 Elimination de la toxicité des algues par le charbon activé



4.VI. RETENTION DES TOXINES ALGALES PAR LE CHARBON ACTIVE EN POUDRE

Des tests sur souris ont été réalisés pour évaluer la rétention des toxines des cyanophycées par le charbon.

Le charbon activé est utilisé au cours du traitement de coagulation lors de la potabilisation de l'eau, à la concentration de 15 mg/L. Nous avons voulu vérifier que ce traitement permettait de retenir les toxines algales éventuellement présentes dans l'eau du Guarapiranga.

Dans un premier temps les essais ont été réalisés avec les souches toxiques de cyanophycées *C. raciborskii* et *M. aeruginosa* antérieurement extraites du Guarapiranga ainsi qu'avec des souches isolées au cours de cette étude. Des quantités croissantes d'extrait algal ont été mélangées à 15 mg de charbon dans 100 ml d'eau, ainsi qu'il a été décrit dans le chapitre 3.4, en Matériel et Méthodes. L'extrait est testé pour évaluer sa toxicité sur souris et ceci par injection intrapéritonéale.

Les résultats des essais de rétention des toxines algales par le charbon activé en poudre sont représentés dans la figure 19.

Des quantités minimales de 1,25 mg d'algues *C. raciborskii* et de 2,5 mg d'algues *M. aeruginosa* (NPJB) s'étaient révélées létales pour 100% des souris d'un poids moyen de 20 g, en quelques minutes, après injection intrapéritonéale, lors des essais antérieurs (sans traitement par le charbon activé) : les valeurs de DL50-24h étaient de 12 mg/Kg (*C. raciborskii*) et 35 mg/Kg (*M. aeruginosa* NPJB).

Dans ces essais d'adsorption par le charbon activé, des quantités allant jusqu'à 15 et 40 mg d'algues de chacune des deux espèces précédentes, ont été traitées par 15 mg de charbon.

Les extraits d'algues testés sur souris n'ont pas présenté de toxicité jusqu'à des doses de 5 mg d'extrait, correspondant à 160 mg d'algues injectées par Kg de poids corporel de souris. Ces résultats sont indicateurs de l'efficacité du charbon activé pour la rétention des toxines dans ces conditions (Fig. 19).

Cependant à des doses supérieures, une toxicité était mise en évidence, ce qui témoigne d'une rétention partielle des toxines du milieu :

- dans les expérimentations sur *M. aeruginosa*(NPJB), souche hépatotoxique, 50% de mortalité des souris ont été relevés pour une quantité de 7,5 mg d'algues en présence de charbon activé,

Tab. 18 - Poids moyen (poids sec) des cyanophycées isolées

Algues	Poids de chaque	en mg
<i>O. quadripunctulata</i>	filament	$1,33 \cdot 10^{-7}$
<i>P. galeata</i>	filament	$2,78 \cdot 10^{-8}$
<i>Phormidium</i> sp	filament	$3,45 \cdot 10^{-8}$
<i>M. aeruginosa</i> NPJB	cellule	$4,49 \cdot 10^{-9}$
<i>O. limnetica</i>	filament	$4,96 \cdot 10^{-8}$
<i>C. raciborskii</i>	filament	$3,93 \cdot 10^{-7}$

- pour la souche neurotoxique *C. raciborskii*, des quantités de 7,5 mg d'algues traitées par le charbon actif ont entraîné 100% de mortalité des souris testées.

Il apparaît que 15 mg de charbon en poudre, a la capacité de retenir les hépato et neurotoxines des algues, équivalentes à des quantités de 5 mg d'algues en poids sec. Le rapport charbon/algue à retenir est de 3 : 1.

Nos essais ont été réalisés par mise en contact sous agitation de 15 mg de charbon avec l'extrait algal dans 100 mL d'eau. Avant d'extrapoler ces résultats aux conditions de traitement dans la station d'épuration, il serait nécessaire de vérifier (1) l'influence de la concentration du charbon, (2) l'influence des conditions d'agitation et de mise en contact sur l'efficacité de l'adsorbant. Nous pouvons conclure qu'un traitement par 15 mg de charbon peut retenir les toxines relatives à 5 mg d'algues, dans le cas où l'absorbant est utilisé sur colonne ou en solution dans un rapport de 150 mg de charbon/litre d'eau contenant 50 mg d'algues.

Considérant que:

- le poids de chaque filament de *C. raciborskii* est de $3,9 \times 10^{-7}$ mg (Tab.18)
- le poids de chaque cellule de *M. aeruginosa* (NPJB) est de $4,49 \times 10^{-9}$ mg (Tab.18)
- 15 mg de charbon activé en poudre retiennent une quantité de toxines correspondantes à 5 mg d'algues, dans nos conditions expérimentales,

il peut être conclu que 15 mg de charbon activé en poudre, peut retenir les toxines relatives à $1,28 \times 10^7$ filaments de *C. raciborskii* et $1,1 \times 10^9$ cellules de *M. aeruginosa*.

Le traitement par charbon activé permet de retenir une quantité de toxines correspondante à une concentration algale nettement supérieure à celle établie par les CMA présentées dans le tableau 8. Ce traitement augmente donc le facteur de sécurité en ce qui concerne le risque de toxicité pour l'homme par l'eau d'alimentation.

Tab. 19 - Essais avec le charbon activé pour l'évaluation de l'adsorption des toxines algales

Espèces	Traitement	Dose i.p (mg/Kg)	Résultats
<i>Phormidium</i> sp (4ème camp.)	charbon	872	toxique
	témoin	936	toxique
<i>O. amphibia</i> (5ème camp.)	charbon	891	toxique
	témoin	919	toxique
<i>O. limnetica</i> (6ème camp.)	charbon	878	toxique
	témoin	838	toxique
<i>O. limnetica</i> (8ème camp.)	charbon	907	toxique
	témoin	880	toxique
<i>M. aeruginosa</i> (8ème camp.)	charbon	1033	toxique
	témoin	976	toxique
<i>P. galeata</i> (2ème camp.)	charbon	907	non toxique
	témoin	880	non toxique
Controle charbon	charbon + eau	-	non toxique
Témoin membrane	lessivage	-	non toxique

Charbon = algue + charbon + eau

Témoin = algue + eau

i.p = dose intraperitonéale

Dans un deuxième temps, des essais identiques sur souris ont été réalisés avec les espèces algales présumées toxiques et isolées du Guarapiranga au cours des différentes campagnes (Tab.19). Sachant que la toxicité de ces souches est plus faible que celle des souches de référence, une seule quantité algale de 25 mg, équivalente à une dose intrapéritonéale de 1000 mg/Kg a été testée.

Les résultats des essais sont présentés dans le tableau 19. 100% de mortalité ont été obtenus dans tous les cas, à l'exception de *P. galeata* non toxique qui était utilisée comme contrôle négatif. Ces résultats témoignent de l'inefficacité du charbon dans ces essais, sûrement due à la quantité trop élevée d'algues utilisée.

Ces essais sur souris n'ont pas été répétés avec des quantités d'algues plus faibles, bien que cela aurait présenté un intérêt certain pour l'établissement d'une relation dose-effet.

Une analyse chromatographique serait utile pour l'identification et la quantification des toxines algales. Ce type d'analyse compléterait les essais biologiques sur souris et mériterait d'être intégré parmi les outils utilisés dans le biomonitoring des eaux.

Il est démontré dans la littérature que la fréquence des blooms toxiques, dans les réservoirs utilisés pour l'approvisionnement en eau, présente un risque potentiel pour la santé publique, avec une grande probabilité de survenue de gastro-entérites ou d'héptoentérites. Le risque de cancérogénèse hépatique lié aux cyanotoxines n'est pas exclu.

La fréquence des cyanophycées dans les eaux continentales est en augmentation, en particulier dans les sites pollués par des nutriments d'origine agricole et par des rejets domestiques et industriels, traités ou non (FALCONER, 1991 ; CARMICHAEL, 1992).

Les blooms d'algues, outre la production de toxines, peuvent aussi apporter un goût et une odeur désagréables à l'eau qui peuvent échapper aux procédures de traitement (HIMBERG *et al.*, 1989). Cependant le charbon activé peut retenir les composés organiques responsables de ces altérations organoleptiques, ce qui justifie encore l'utilisation du charbon dans les traitements de potabilisation (AWWA, 1987; RICHER & AZEVEDO NETO, 1991).

Au cours de ces dernières années, l'utilisation du charbon activé dans les systèmes de traitement des eaux a augmenté du fait de la présence de composés organiques potentiellement préjudiciables à la santé. FERREIRA FILHO (1993) pense que l'utilisation du charbon activé augmentera encore dans le futur, et devra être systématique pour le traitement de l'eau.

HOFFMANN (1976), KEIJOLA *et al.* (1988) et FALCONER *et al.* (1989) ont démontré que les toxines ne sont pas éliminées par les systèmes de traitements conventionnels incluant chloration, floculation et filtration, sans charbon actif. HOFFMANN (1976) a par contre démontré que le charbon activé aux concentrations de 80 à 800 mg/L retenait des concentrations significatives de différents types de cyanotoxines.

Ils concluent, que le charbon activé doit être un élément additionnel du processus de traitement des eaux, en particulier pendant la période de blooms d'algues.

KEIJOLA *et al.* (1988) ont démontré l'élimination effective des toxines de *Microcystis* et d'*Oscillatoria* par le traitement au charbon activé et par ozonation à une concentration de 1mg/L en O₃.

L'ozone a permis de détruire 50 mg de toxines/L, alors que le charbon activé à la dose de 20 mg/L permettait de retenir 90% de cette quantité. Des concentrations de 100 et 200 mg/L de charbon peuvent retenir des quantités plus élevées.

L'utilisation de charbon en poudre peut cependant poser quelques problèmes et entraîner par exemple une augmentation de la turbidité de l'eau traitée, sauf si un traitement à l'ozone a été appliqué simultanément. Mais l'ozone peut favoriser la flottaison des cyanophycées.

Ces auteurs recommandent donc une post-ozonation pour l'élimination des toxines. Les capacités oxydatives de l'ozone seraient d'autant plus bénéfiques que la charge en matière organique de l'eau aurait été préalablement abaissée par le traitement au charbon activé.

Ce travail montre que 15 mg de charbon a une capacité de rétention des neurotoxines de *C. raciborskii* et d'hépatotoxines de *M. aeruginosa* correspondant à 5 mg d'algues. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer la capacité d'absorption de différentes concentrations de charbon. Par ailleurs, on connaît mal les relations entre les propriétés physico-chimiques des charbons disponibles au Brésil, et leur

capacité d'adsorption/absorption en fonction de la surface et la porosité de la matrice granulaire.

DIAMADOPOULOS *et al.* (1992) soulignent en effet que les capacités d'adsorption sont fonction de la nature du charbon activé et de sa préparation donc de sa qualité. Ils ont montré que les capacités d'élimination du phénol décroissent proportionnellement à l'augmentation de la teneur en cendres du charbon.

Le charbon activé dont la teneur en cendres est quasiment nulle retiendrait quatre fois plus de phénol. Par contre les acides fulviques et arséniques seraient mieux éliminés en présence d'une matrice minérale.

Il serait indispensable de développer et d'implanter une méthodologie analytique pour la détection et l'identification des toxines algales dans l'eau. Les protocoles mis en oeuvre avaient pour objectif dans un premier temps de vérifier l'efficacité du traitement par le charbon actif, à éliminer les toxines. Il s'agira par la suite d'affiner ces protocoles en vue de déterminer les capacités maximales d'adsorption du charbon selon différents modes d'utilisation (concentrations, agitation, temps de contact et qualité des charbons disponibles).

Une stratégie analytique incluant des protocoles de séparation chromatographique serait nécessaire en vue d'évaluer le risque lié aux toxines algales contenues dans les eaux potables pour le consommateur.

5-CONCLUSIONS ET CONSIDERATIONS FINALES

5 - CONCLUSIONS ET CONSIDERATIONS FINALES

- Les niveaux de phosphate total, dans toutes les campagnes, exceptée celle d'avril/94, ont excédé le standard de qualité de l'eau réglementaire. En considérant les niveaux de phosphate total, d'orthophosphate, de chlorophylle-a et la transparence des eaux, exprimés par l'indice de l'état trophique, le niveau d'azote inorganique, le réservoir du Guarapiranga, peut être classé comme méso/eutrophique au niveau de la station 2. Sur la base des communautés algales il serait classé hypereutrophe.
- Les valeurs de cuivre détectées dans l'eau du réservoir, aux stations 2 et 3 ont excédé, dans la majorité des cas, la valeur réglementaire pour la protection de la vie aquatique. A la station 3, proche du captage d'eau par la SABESB, les plus hautes valeurs de cuivre dans l'eau ont été détectées : ceci expliquerait la toxicité de l'eau détectée dans les échantillons de février et d'avril/94. L'eau qui renferme des micropolluants à des concentrations pouvant engendrer des effets de toxicité aiguë et chronique, sur les organismes aquatiques, est impropre à la vie aquatique ; elle est par conséquent inacceptable pour une eau de Classe 1 qui réglementairement doit être exempte de toute contamination d'origine anthropogénique. Les hautes valeurs de cuivre dans l'eau résultent de la dispersion d'algicide. Compte tenu des données de toxicité chronique de 0,05 mg/L de sulfate de cuivre, soit 0,012 mg/L de cuivre obtenues sur *Ceriodaphnia dubia* en utilisant l'eau naturelle, un standard de qualité du cuivre dans l'eau de 0,01 mg/L serait plus adéquat pour la préservation de la vie aquatique que celui, en vigueur, de 0,02 mg/L. Si l'on prend en compte la valeur obtenue sur *Daphnia similis*, en utilisant l'eau reconstituée (CE₅₀-48h 0,0025 mg/L), le standard serait plus faible.
- Des cyanophycées isolées dans les eaux échantillonnées dans le bassin du Guarapiranga, six espèces se sont révélées toxiques sur souris : *O. quadripunctulata* ; *Phormidium sp* ; *O. limnetica* ; *O. amphibia*, *M. incerta* et *M. aeruginosa*. Seule la souche (*O. redekei*) a présenté une toxicité aiguë sur *Daphnia*. L'espèce *O. quadripunctulata* s'est révélée nettement moins toxique à court terme sur ces invertébrés aquatiques. Il est clair que les mammifères sont plus sensibles à la toxicité des cyanophycées que les microcrustacés du genre daphnie. Il serait intéressant d'étendre cette étude de toxicité à d'autres organismes

aquatiques. Il semblerait que les poissons soient également peu sensibles. Le problème posé est alors celui du transfert de ces toxines et de leurs métabolites, aux prédateurs et aux consommateurs. C'est effectivement le problème observé chez l'homme avec la consommation de bivalves marins contaminés par des dinoflagellés.

- Quoique quelques souches aient présenté une toxicité aiguë sur souris, cette toxicité est relativement faible par comparaison aux souches toxiques isolées dans d'autres milieux aquatiques.
- Pour les souches toxiques, les concentrations maximales acceptables d'algues dans l'eau brute que nous avons établies, ont été fixées à environ 400 à 350000 cellules ou filaments/mL.
- Nous avons vérifié dans ce travail, que pendant la phase exponentielle de croissance des cyanophycées, il n'y avait pas de libération de toxines dans le milieu, capables de causer des effets de toxicité aiguë, même dans le cas des souches toxiques pour la souris.
- Les microcrustacés sont apparus les plus sensibles des organismes exposés aux algicides sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène. Les deux algicides utilisés ont présenté une toxicité quasiment identique sur *M. aeruginosa*. Par contre, les algues filamenteuses *P. galeata* et *O. quadripunctulata* sont apparues plus sensibles au peroxyde d'hydrogène qu'au cuivre, ce qui justifie l'utilisation du peroxyde d'hydrogène.
- La toxicité du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène, en différentes proportions, s'est révélée être inférieure à la somme de la toxicité de chacun de ses deux constituants sur *Daphnia similis*, lors d'essais à court terme. On pourrait parler d'effets moins qu'additifs de ces deux algicides. En réalité les deux algicides sont utilisés en alternance, mais nous voulions vérifier que des problèmes de synergie toxiques pour les espèces non cibles n'apparaîtraient pas.
- Les algicides, en concentrations sublétales, n'influencent pas la toxicité des souches des cyanophycées étudiées.
- Quant au charbon activé, il présente un pouvoir de rétention important des toxines algales, qui justifie son utilisation dans le traitement des eaux pour

la potabilisation. Les essais complémentaires seront nécessaires pour déterminer ses capacités limites de rétention en fonction des conditions d'utilisation.

- Les essais en laboratoire montrent que les algues accumulent significativement le cuivre du milieu. Les données de terrain confirment cette accumulation : les organismes phytoplanctoniques sont ceux qui bioconcentrent le plus le cuivre de l'eau. Cette étude confirme que les organismes phytoplanctoniques et zooplanctoniques sont de bons indicateurs de la qualité des eaux, et reflètent le niveau de contamination de l'écosystème.
- Le niveau de cuivre dans les poissons reste, à l'exception des viscères, faible ; jusqu'à présent, la chair peut être considérée propre à la consommation humaine.
- En considérant les teneurs de cuivre accumulées dans les différents niveaux trophiques, nous avons montré que l'accumulation du cuivre présente des valeurs décroissantes, du phytoplancton au zooplancton et au poisson : ceci montre que le cuivre ne manifesterait pas un potentiel de biomagnification, jusqu'à présent dans l'écosystème du réservoir Guarapiranga.
- En considérant les critères de qualité des sédiments, rapportés dans la littérature, nous pouvons conclure que les sédiments des stations 2 et 3 du réservoir Guarapiranga peuvent être classés comme pollués, bien que les essais en laboratoire sur *Hyaella* réalisés avec les sédiments n'aient pas révélé de toxicité aiguë après 12 jours d'exposition. A la station 1, le niveau de cuivre est faible et comparable à ceux trouvés dans des réservoirs non pollués de l'Etat de São Paulo.

L'augmentation de la charge organique du réservoir Guarapiranga est allée croissante au cours de ces seize dernières années. Des données physico-chimiques et biologiques nous ont permis de vérifier la dégradation du milieu et de conclure que ce réservoir se caractérise, actuellement, par un état de dystrophie et de pollution notable.

Le niveau d'eutrophisation actuel de cet écosystème a contribué à favoriser la fréquence de blooms d'algues. Devant les problèmes causés par les algues - goût et d'odeur, dans la station de traitement des eaux et des risques pour la santé publique causés essentiellement par les cyanophycées, la SABESP, responsable de la potabilisation de l'eau a entrepris depuis quelques années, de contrôler les blooms d'algues en utilisant d'abord le sulfate de cuivre en tant qu'algicide. Actuellement le peroxyde d'hydrogène est aussi utilisé pour contrôler les cyanophycées filamenteuses, devenues moins sensibles au cuivre et donc plus fréquentes. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier si l'induction de métallothionéines est à l'origine de ces phénomènes de résistance.

Les données obtenues aux trois stations d'échantillonnage du réservoir nous ont amené à conclure que les eaux et les sédiments sont pollués par le cuivre, cette contamination est d'autant plus importante que le site est proche de la station de captage des eaux pour la potabilisation ; c'est en effet à ce niveau que les traitements par les algicides sont effectués quotidiennement. Bien que la bioaccumulation du cuivre dans la chair des poissons soit faible, les résultats ont révélé néanmoins un niveau de contamination important des organismes planctoniques par le cuivre.

Les algicides utilisés actuellement dans le réservoir Guarapiranga peuvent causer un effet délétère sur les organismes non cibles, sachant que les microcrustacés sont apparus particulièrement sensibles. Ces effets peuvent conduire à plus au moins long terme à un dysfonctionnement et à un déséquilibre de l'écosystème. Les mortalités des poissons fréquentes dans ce réservoir en témoignent.

Il est nécessaire de poursuivre cette étude sur la contamination du réservoir et en particulier celle sur le peroxyde d'hydrogène, car peu de données dans la littérature traitent de ses effets à court et à long terme sur les organismes aquatiques non cibles. De même on ne dispose pas d'informations sur les produits d'oxydation de la matière organique par le peroxyde d'hydrogène, la toxicité et la rémanence des intermédiaires de dégradation.

Les données obtenues montrent que le réservoir Guarapiranga est susceptible de produire des algues potentiellement toxiques. Il est essentiel de poursuivre l'utilisation du charbon actif en complément du traitement des eaux. Les expérimentations avec le charbon activé devront être affinées en vue de déterminer l'efficacité optimale de cet adsorbant. Le développement

de méthodes d'analyses des toxines, par séparation chromatographique nous semble nécessaire.

La protection des eaux du réservoir Guarapiranga a fait l'objet de plusieurs réglementations depuis le début des années 60. Plusieurs plans de protection ont été proposés. Il apparaît cependant que cette réglementation ne suffit pas à assurer la protection des ressources hydriques: en effet la charge polluante des eaux du réservoir a significativement augmenté au cours de la dernière décennie.

Il apparaît donc nécessaire de modifier la réglementation, et améliorer les stratégies de protection et de traitement. La mise en place d'un réseau de canalisation et d'un système de traitement des eaux d'égouts sont indispensables afin d'éviter la contamination de l'écosystème.

Les apports d'algicides sont également de nature à compromettre la qualité des eaux du réservoir dans le futur, si les moyens de lutte contre les cyanophycées ne sont pas modifiés. De ce point de vue, un traitement de filtration sur charbon activé complété par un traitement d'ozonation seraient une solution pour l'élimination des toxines des cyanophycées dans le cas de blooms d'algues. Dans le cas contraire, où aucune amélioration substantielle ne serait apportée au système de protection de la qualité des eaux du Guarapiranga, on peut s'attendre, dans un futur proche, à une détérioration de la qualité des eaux, qui nécessitera alors des traitements au coût prohibitif.

6-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

6 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1992a. Água- Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). ABNT, Norme technique, Réf. NBR. 12648, 8p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 1992b. Água :- Determinação da dureza total - Método Titulométrico do EDTA - Sodio. ABNT, Norme technique, Réf. NBR. 12621, 4 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 1993a. Água - Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus 1876 (Cladocera, Crustacea). ABNT, Norme technique, Réf. NBR 12713, 16 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 1993b. Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes. Parte II Sistema semi estático. ABNT, Norme technique, Réf. NBR 12715, 15 p.
- ALABASTER, J.S., 1981. Joint action of mixtures of toxicants on aquatic organisms. *Chem. Ind.*, 1 : 529-534.
- ANKLEY, G. T.; BENOIT, D.; BALOGH, J.C.; REYNOLDSON, T.B.; DAY, K.E.; HOKE, R.A., 1994. Evaluation of potential confounding factors in sediment toxicity tests with three freshwater benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13(4) : 627-635.
- APHA (American Public Health Association), 1989. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. 17^{ème} Ed. ISBN 087553 - 161X.
- ARAÚJO, R.P.A.; LORENZETTI, M.L.; BURATINI, S.V., 1993. Implantação de testes com *Hyalella pernix*, para avaliação da toxicidade de Sedimentos de água doce. São Paulo, CETESB. Rapport technique, 20 p.
- AWWA (American Water Works Service Company), 1987. Research Report, subject area : water treatment and operations. Rapport technique. Awwa research foundation : 192 p.

- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. ; NAMIKOSHI, M., 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.*, 00 : 1-5.
- BERG, K.; WYMAN, J.; CARMICHAEL, W.; DABHOLKAR, A., 1988. Isolated rat liver perfusion studies with cyclic heptapeptide toxins of *Microcystis* and *Oscillatoria* (freshwater cyanobacteria). *Toxicon*, 26 (9) : 827-837.
- BOURRELY, P., 1968. Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, tome II : Les algues jaune et brune - Baubée & Cia (Ed.), Paris, 468 p.
- BOURRELY, P., 1970. Les algues d'eau douce. Initiation à la Systématique Tome III : Les algues bleues. et rouges. Les eugléniens, peridiniens et cryptomonadiens. Baubée & Cia (Ed.), Paris, 512 p.
- BOURRELY, P., 1972. Les algues d'eau douce. Initiation à la systematique. Tome I : Les algues vertes. Boubée & Cia (Ed.), Paris. 670 p.
- BOWDEN, 1976 cité par LeBLANC & SUPRENANT, 1985.
- BRASIL, Ministério da Saúde. 1965. Decreto 55871 de 26/03/1965. Aditivos para bebidas et produtos alimentares. Legislation Fédéral, Brasília-DF.
- BRASIL, Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente, CONAMA - Resolução nº 20, de 18/06/86. Diário Oficial de União, 30/07/1986. Legislation Fédéral, Brasília-DF.
- BROWN, V.M.; SHAW, T.L. ; SHURBEN, D.G., 1974. Aspects of water quality and the toxicity of copper to rainbow trout. *Water Res.*, 8 : 797-803.
- CALAMARI, D.; MARCHETTI, R. ; VAILATI, G., 1980. Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri* RICH. *Water Res.*, 14 : 1421 - 1426.
- CALEFFI, S.; BEYRUTH, Z.; ZANARDI, E.; CARDOSO, E. ; SENDACZ, S., 1992. Qualidade da água da represa de Guarapiranga para o desenvolvimento e manutenção da fauna aquática. 1^{ère} Réunion Annuelle de l'Instituto de Pesca, 6 au 10 avril, São Paulo - SP p. 88.

- CALEFFI, S.; ZANARDI, E.; BEYRUTY, Z., 1993. Trophic State of Guarapiranga Reservoir in 1991/92. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 25 : 1306 - 1310.
- CARMICHAEL, W.W.; JONES, C.L.A.; MAHMOOD, N.A.; THEISS, W.C., 1985. Algal toxins and water-based diseases. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 15 (3) : 275-313.
- CARMICHAEL, W.W. 1992. A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. Environmental monitoring systems laboratory. Rapport technique EPA/600/R. 92/079. 141 p.
- CARMICHAEL, W.W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Scient. Am.*, janvier, 1994, 78-86.
- C.E.C.P.A. (Conselho Estadual de Controle da Poluição das Águas). 1959. Medidas de Proteção à bacia do Guarapiranga. Portaria nº 11 do C.E.C.P.A. *Rev. DAE*, 20 (33) : 7-13
- CETESB, São Paulo, 1978. Determinação de fitoplâncton marinho métodos qualitativo e quantitativo CETESB. Norme technique, Réf. NT 06 - Determinação Biológicas L5 302 ,16 p.
- CETESB, São Paulo, 1982. Legislação básica. Poluição Ambiental Estadual e Federal. CETESB, São Paulo. 75 p.
- CETESB, São Paulo, 1983. Estudo da Eutrofização do Reservatório Guarapiranga. Relatório Anual, 1982. São Paulo, CETESB. Rapport technique. 30 p.
- CETESB, São Paulo, 1988. Guia Técnico de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo, CETESB, 150 p.
- CETESB, São Paulo, 1990a. Determinação de pigmentos fotossintetizantes Clorofila *a,b,c* e feofitina-*a*. Norme technique, Réf. L5 306, São Paulo, CETESB. 22p.
- CETESB, São Paulo, 1990b. Contaminantes da bacia do rio Cubatão e seus reflexos na Biota Aquática. São Paulo, CETESB. Rapport technique. 81 p.

- CETESB, São Paulo, 1991a. Avaliação da Qualidade das Águas para fins Recreacionais. Reservatório do Guarapiranga. São Paulo, CETESB. Rapport technique. 12 p.
- CETESB, São Paulo, 1991b. Água-Avaliação da toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea). Norme technique, Réf. L5.022. São Paulo, CETESB, 25 p.
- CETESB, São Paulo, 1992a. Lei Estadual nº 898, de 18/12/75. Regiões Metropolitanas : Proteção dos mananciais, zoneamento Industrial. São Paulo, CETESB.
- CETESB, São Paulo, 1992b. Mortandade de peixes no Estado de São Paulo- Síntese da década de 80. São Paulo, CETESB. Rapport technique. 36p.
- CETESB, São Paulo, 1992c. Eutrofização e contaminação por metais no reservatório do Guarapiranga - Dados Preliminares. São Paulo, CETESB. Rapport technique, 33 p.
- CETESB, São Paulo. 1993a. Água-Teste para Avaliação da Toxicidade Aguda de Cianofíceas (Algas azuis). Norme technique, Réf. L5 025. 11 p.
- CETESB, São Paulo, 1994b ; (sous presse). Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB. Rapport technique.
- CETESB, São Paulo, 1995a ; (sous presse). Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB. Rapport technique.
- CETESB, São Paulo, 1994a. Metodologia para avaliação da toxicidade crônica com o peixe *Brachydanio rerio*. São Paulo, CETESB. Rapport technique. 19 p.
- CETESB, São Paulo, 1995b ; (sous presse). Contaminação de sedimentos da bacia do Rio Tietê. Dados fornecidos pelo Setor de Recuperação de Ecossistemas Aquáticos. São Paulo, CETESB. Rapport technique.
- COOD, G.A. & BELL, S.G., 1989. Eutrophication and toxic cyanobacteria in freshwaters. *Water Pollut. Control*, p. 225 - 231.

- COOD, G.A.; BELL, S.G.; BROOKS, W.P., 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol.*, 23 (3) : 1-13.
- DAMATO, M.; BEYRUTH, Z.; MUCCI, J.L.N.; ALVARENGA, C.D.; ROCHA, A.A., 1989. O sulfato de cobre como agente tóxico. *Ambiente*. 3 (1) : 26-31.
- DeMOTT, W.R.; ZHANG, Q.; CARMICHAEL, W.W., 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia* *Limnol. Oceanogr.*, 36 (7) : 1346-1357.
- DERISIO, J.C. & PERKINS, M.A., 1981. Os nutrientes (N e P) e a qualidade das águas do reservatório do Guarapiranga. *Rev. DAE*, 41 (125) : 39-44.
- DIAMADOPOULOS, E.; SAMARAS, P.; SAKELLAROPOULOS, G.P., 1992. The effect of activated carbon properties on the adsorption of toxic substances. *Water Sci. Technol.*, 25 (11) : 153-160.
- DOUDOROFF, P. & KATZ, M., 1953. Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. *Sewage Ind. Wastes*. 25 (7) : 802-838.
- ELDER, J.F. & HORNE, A.J., 1978. Copper cycles and CuSO_4 algicidal capacity in two California Lakes. *Environ. Manage.*, 2 (1) : 17-30.
- ENVIRONMENT CANADA. 1988. Guidelines for Surface Water Quality . Vol. 1,. Adrian Demayo and Margaret C. Taylor (Ed.). Ottawa, 218 p.
- ESTEVEES, F.A.; FERREIRA, J.R.; PESSENDRA, L.C.R.; MORTATTI, J., 1981. Analises preliminares sobre o teor e a distribuição de metais em sedimento de represas do Estado de São Paulo. IIº Seminário Regional de Ecologia Université Fédéral de Sao Carlos, p.323-345.
- ESTEVEES, F.A., 1988. Fundamentos de Limnologia. Editora Interciência/Finep, (Ed.), Rio de Janeiro, 575 p.,
- FALCONER, I.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; BUCKLEY, T.; HUYN, .V.L.; BRADSHAW, P., 1989. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *J. Am. Water Works Associ.*, 81 (2) : 102-105.

- FALCONER, I.R., 1991. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (Blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers. *Toxicity Assess.*, 4 : 175-184.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1980. Report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. Rapport technique n° 37, Roma.
- FERREIRA FILHO, S.S., 1993. Estudo comparativo do comportamento hidráulico de meios filtrantes de areia - antracito e areia - carvão ativado granular no tratamento de água. Memoire présenté à l'Ecole Polytechnique de l'Université de São Paulo pour obtenir le grade d'ingénieur, Vol. 1, 115-141.
- FORSTNER, U. & CALMANO, W., 1993. Sediment quality objectives and criteria development in Germany. *Water Sci. Technol.*, 28 (8-9) : 207 - 216.
- FUJIKI, H., 1992. Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2 activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development ? *Mol. Carcinog.*, 5 : 91-94.
- GERHARDT, A., 1993. Review of impact of heavy metals on stream invertebrates with special emphasis on acid conditions. *Water, air, soil pollut.*, 66 : 289-314.
- GIBSON, C.E. & SMITH, R.V., 1982. Freshwater Plankton In : The biology of Cyanobacteria, CARR, N.G. & WITTON, B.A. Ed.). Blackwell Scientific Publications. Berkeley. 688 p.
- GLIWICZ & LAMPERT, 1990 cité par DeMOTT, 1991.
- GUAY, G., 1986. Utilisation des jeunes poissons de l'année comme bioindicateurs des substances toxiques dans le fleuve Saint Laurent. (Tronçon fluvial : Cornwall - Portneuf) Rapport technique, Environment Canada. 132 p.
- GUCHTE, C. & LEEUWEN, C.J., 1988. Sediment Pollution. In : Manual on Aquatic Toxicology. KRUIJF, H.A.M.; ZWAST, D.; VISWANATHAN, P., N. (Ed.). New Delhi, Publishers Private Ltd. p., 180-191.

- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V., 1978. Trimmed Spearman - Karber method for estimated median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci.*, 11 :714-719;addendum 12 :417.
- HAMMER, U.T.,1968. Toxic blue green algae in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, 9 (10) : 221-229.
- HAWKINS, P.R.; RUNNERGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B. ; FALCONER, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50 (5) :1292-1295.
- HAWKINS, P.,R. & GRIFFITHS, D.J., 1987. Copper as an algicide in a tropical reservoir. *Water Res.*, 21 (4) : 475-480.
- HENRY, R. & TUNDISI, J.G., 1982. Evidence of limitation by molybdenum and nitrogen on the growth of the phytoplankton community of the lobo reservoir (São Paulo, Brazil). *Rev. Hydrobiol. Trop.*, 15 (3) : 201-208.
- HENRY, R., 1993. Eutrofização de reservatórios. Compilation de travaux fournis dans le cours, CETESB, 27/09 à 01/10/93.
- HERMENS, J.; LEEUWANGH, P.; MUSCH, A., 1985. Joint toxicity of mixtures of groups of organic, aquatic pollutants to Guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 9 : 321-326.
- HIMBERG, K., KEIJOLA, A.M.; HIISVIRTA, L.; PYYSALO, H., SIVONEN, K., 1989. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria : a laboratory study. *Water Res.*, 23 (8) : 979-984.
- HOFFMANN, J.R.H., 1976. Removal of *Microcystis* toxins in water purification processes. *Water S.A.* , 2 (2) : 58-70.
- INFANTE, A. & ABELLA, S.E.B., 1985. Inhibition of *Daphnia* by *Oscillatoria* in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.*, 30 (5) : 1046-1052.

- JARDIM, W. F. & PEARSON, H.W., 1984. A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria. *Water Res.*, 18 (8) : 985-989.
- JENSEN, T.E.; BAXTER, M.; RACHLIN, J.W.; JANI, V., 1982. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components especially polyphosphate bodies : an x-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut.*, (serie A), 27 : 119-127.
- JUNGMANN, D.; HENNING, M. ; JUTTNER, F., 1991. Are the same compounds in *Microcysts* responsible for Toxicity to *Daphnia* and inhibition of its filtering rate ? *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, 76 (1) : 47-56.
- KEIJOLA, A.M.; HIMBERG, K.; ESALA, A.L.; SIVONEN, K.; HIISVIRTA, L., 1988. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes : laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assess. An. Int. J.*, 3 : 43-56.
- KELLY, J.D.; ORNER, G.A.; HENDRICKS, J.D.; WILLIAMS, D.E. 1992. Dietary hydrogen peroxide enhances hepatocarcinogenesis in trout : correlation with 8 - hydroxy - 2 - deoxyguanosine levels in liver DNA. *Carcinog.*, 13 (9) : 1639-1642.
- KIFFNEY, P.M. & CLEMENTS, W.H., 1993. Bioaccumulation of heavy metals by benthic invertebrates at the Arkansas River, Colorado. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12 : 1507-1517.
- KITANO, J.; SAKATA, M.; MATSUMOTO, E., 1980. Partitioning of heavy metals into mineral and organic fractions in a sediment core from Tokyo Bay. *Geoch. Cosmochim. Acta*, 44 : 1279-1285.
- KIVIRANTA, J.; ABDEL-HAMEED, A.; SIVONEN, K.; NIEMELA, S. I.; GARLBERG, G., 1993. Toxicity of Cyanobacteria to mosquito larvae. Screening of active compounds. *Environ. Toxicol. Water Qual. : Intern. J.*, 8 : 63-71.
- KLAASEN, C.D.; ANDUR, O.M.; DOULL, J.M.D., 1986. Casarett and Doull's. Toxicology the basic science of poisons. Macmillan Publishing Company - 3^{ème} Ed., New York. 974 p.

- KOMAREK, S., 1974. The morphology and taxonomy of crucigenioid algae. (Scenedesmanaceae ; Chlorococcales). *Arch Protistent*, 116 : 1-75.
- KOMAREK, S. & PRAHA, D.F., 1983. Des phytoplankton des subwassers systematik und biologie - Chlorophyceae (Grünalgen). Chlorococcales. Stuttgart. 1042 pp.
- KORTMANN, R.W. 1994. Projeto Guarapiranga Phase I. Applied Limnological Assessment. Technical report Ecosystem Consulting Service, Inc. COVENTRY. 26p.
- LeBLANC, G.A. & SURPRENANT, D.C., 1985. A method of assessing the toxicity of contaminated freshwater sediments. In : Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Seventh Symposium. CARDWELL, R.D.; PURDY, R.; BAHNER, R.C. (Ed). Philadelphia, American Society for Testing and Materials, p., 269-283.
- LIMA, W.C.; TUNDISI, J.G. ; MARINS, M.A., 1979. A systemic approach to the sensitivity of *Melosira italica* (Ehr) Kutz. *Rev. Brasil. Biol.*, 39 (3) : 559-563.
- LIMA, N.R.W., 1990. Análises dos níveis de metais pesados no sistema hídrico da Estação ecológica do Jataí - SP. *Acta Limnol. Brasil.*, III, 1001 - 1021.
- LINDHOLM, T. & MERILUOTO, J.A.O., 1991. Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48 : 1629-1634.,
- LINDHOLM, T.; ERIKSSON, J.E.; RENIKAINEN, M.; MERILUOTO, J.A.O., 1992. Ecological effects of hepatotoxic cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 7 : 87-93.
- LUKAC, M. & AEGERTER, R., 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31 (3) : 293-305.
- LUUKKAINEN, R.; SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; FARDIG, M.; RINEHART, K.L.; NIEMELA, S.I., 1993. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (7) : 2204-2209.

- MACEDO, L.H.H.; MATOS, M.R.; PONTES, L.A.L.; AFINI, B.; YAMADA, J.; FONSECA, N.C.; OLIVEIRA NETTO, J.G.; CAVALIARI, E.; COTALT, N.; MONTEIRO, C.E., 1972. Bacia do Guarapiranga, controle da poluição. *Rev. DAE*, 32 (85) : 15-27.
- MAIER, M.H. & TAKINO, M., 1985. Limnologia de reservatórios do sudeste do Estado de São Paulo, Brasil III. Qualidade de água. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 12 (1) : 45-73.
- MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; FIZMANN, M.; AZCUE, J.M.P., 1989. Heavy metal concentrations and availability in the bottom sediments of the Paraíba do Sul - Guandu river system, R.J. Brazil. *Environ. Techn. Lett.*, 10 : 675-689.
- MANCUSO, P.,C.S., 1992. O reuso de água e sua possibilidade na região metropolitana de São Paulo. Thèse présentée à l'Université de Sao Paulo, pour obtenir le grade de Docteur en Santé Publique, 126 p .
- MARGALEF, R., 1983. Limnologia. Omega SA. (Ed.), Barcelona, 1010 p.
- MARKING, L.L., 1977. Method for Assessing additive toxicity of chemical mixtures. In : Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L. MAYER & HAMELINK, J.L.(Ed), ASTM STP 634, p 99-108.
- MARTIN, I.D.; MACKIE, G.L.; BAKER, M.A., 1993. Acute toxicity test and pulsed-dose delayed mortality at 12 and 22 degree C in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Contam. Toxicol.* 24 (3) : 389-398.
- MATSUMURA-TUNDISI, T.; HINO, K., CLARO, S.M., 1981. Limnological studies at 23 reservoirs in southern part of Brazil. *Verh. Int. Verenin. Limnol.*, 21 : 1040-1047.
- McKNIGHT, D.M. & MOREL, F.M.M., 1980. Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.*, 25 (1) : 62-71.
- MELCHOR, A.; SILVEIRA, A.; LOPEZ, G.M.; ARAUJO, R., 1975. Preservação de mananciais para abastecimento. Guarapiranga um modelo para preservação. *Rev. DAE*, 35 (102) : 14-25.

- MUNAWAR, M.; MUDROCH, A.; MUNAWAR, I.F.; THOMAS, R.L., 1983. The impact of sediment - associated contaminants from the Niagara river mouth on various size assemblages of phytoplankton. *J. Great Lakes Res.*, 9 (2) : 303 - 313.
- MUNAWAR, M.; THOMAS, R.L.; NORWOOD, W.; MUDROCH, A., 1985. Toxicity of Detroit river sediment - bound contaminants to ultraplankton. *J. Great Lakes Res.*, 11 (3) : 264-274.
- NAS, 1978 cité par SALAS & MARTINO, 1990
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUANA, M., KOYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W. W., FUJIKI, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118 : 424-424.
- NIZAN, W.S.; DIMENTMAN, C.; SHILO, M., 1986. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.*, 31 (3) : 497-502.
- OLIVEIRA, W.E., 1961. Proteção das águas da Bacia do Guarapiranga. *Rev. DAE*, 22 (42) : 86-94.
- OSWALD, W.J., 1989. Micro-Algae and waste water treatment. In : Micro-algal biotechnology. BOROWITZKA, M.A. & BOROWITZKA, L.J. (Ed.), University Press, Cambridge.
- PEDROSO, J.S.O., 1960. Medidas de Proteção das águas do Reservatório do Guarapiranga. *Rev. DAE*, 21 (36) : 53-57.
- PFEIFFER, W.C.; LACERDA, L.D.; FISZMAN, M.; LIMA N.R.W. 1985. Metais pesados no pescado da Bacia de Sepetiba, Estado do Rio de Janeiro, RJ. *Ciência e Cultura*, 37 (2) : 297-302.
- PHILLIPOSE, M.T., 1967. Chlorococcales - Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India. 365 p.

- PHIPPS, G.L.; HARDEN, E.N.L., LEONARD, E.N.; ROUSH, T.H.; SPEHAR, D.L.; STEPHAN, C.E.; PICKERING, Q.,H.; BUIKEMA, A.L. Jr., 1984. Effects of pollution of freshwater organisms. *J. Water Pollut. Control*, 56 (6) : 725-758.
- PICKERING, Q.H. & HENDERSON, C., 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. *Int. J. Air Water Pollut.*, 10 : 453-463.
- PRESCOTT, G.W., 1962. Algae of the Western Great Lakes area. W.M.C. BROW. Company Publishers. 977 p.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and applications. Hemisphere Publishing Corporation. Washington. 494 p.,
- RAST & LEE, 1978 cité par SALAS & MARTINO, 1990.
- REVISTA DAE. 1992. Saneamento. Para salvar o Manancial. *Rev. DAE*, 52 (164) : 8-35.
- REYNOLDS, C. S., 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. In : Ecology. BECK, E.; BIRKS, H. J. B. ; CONNOR, E. F.(Ed.), Cambridge, 384p.
- RICHARD, D. S.; BEATLE, K. A.; COOD, G. A., 1983. Toxicity of cyanobacterial blooms from freshwater. *Envion. Lett.*, 4 : 377-382.
- RICHTER, C.A. & AZEVEDO NETTO, J.M., 1991. Tratamento de Água - Tecnologia Atualizada. Edgard Blucher Ltda (Ed.), Sao Paulo, 332p.
- ROCHA, A.A., 1976. A limnologia, os aspectos ecológico-sanitários e a macrofauna bentônica da Represa do Guarapiranga na região Metropolitana de São Paulo. Thèse présentée au Departement de Zoologie de l'Institut de Sciences Biologique de l'Université de São Paulo, pour l'obtenir le grade de Docteur en Sciences. 194 p.

- SALAS, H.J. & MARTINO, P., 1990. Metodologias simplificadas para la evaluacion de eutrofication en lagos calidos tropicais. Organizacion Mundial de la Salud. Organizacion Panamericana de la Salud. CEPIS - Centro Panamericano de Engenharia Sanitária y Ciencias del Ambiente. 51 p.,
- SIVONEN, K., 1990. Toxic cyanobacteria in finnish fresh waters and the Baltic Sea. Memoire d'étude en Microbiologie. University of Helsinki, ISBN, 952-90-1864-9.
- SIVONEN, K. ; NIEMELA, S.I. ; NIEMI, R.M. ; LEPISTO, L. ; LUOMA, T.H.; RASANEN, L.A., 1990. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiol.*, 190 : 267 - 275.
- SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; ANDERSEN, R.A.; MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; SKULBERG, R., 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatoriallean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin - 2. *Environ.Toxicol. Chem.*, 11 : 321-392.
- SLOTTERDIJK, H., 1980. Concentration of PCB's, mercury and some other metals in lateral muscle of Northern pike, *Esox lucius* L., in the province of Quebec. Proceedings of the 10th Warm water workshop, 1980. Quebec, Canada. 89-115 p.
- SMA (Secretaria de Estado de Meio Ambiente), 1990. Recuperação Ambiental da Bacia do Guarapiranga. Parque Estadual do Guarapiranga. São Paulo, Rapport technique. 120 p.
- SMITH, V.H., 1993. Low nitrogen to ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. 12 août. (sans nom de périodique)
- SOLVAY-INTEROX, 1990/92. Hydrogen Peroxide as a growth inhibitor for blue green algae. Rapport technique, Research & Development Wildness laboratory.
- SPRAGUE, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilizing and applying bioassay results. Review paper. *Water Res.*, 4 : 3-32.
- SRH (Secretaria de Recursos Hídricos, Saneamento de Obras), 1994. Programa de Saneamento Ambiental da Bacia do Guarapiranga. Rapport technique, avril . 28 p.,

- STANGENBERG, M., 1967. Toxic effects of *Microcystis aeruginosa*. Extracts on *Daphnia longispina* O. F. Muller and *Eucypris virus* Jurine. *Hydrobiol.*, 32 : 81 - 88.
- STOCKNER, J.G. & SHORTREED, K.S., 1988. Response of *Anabaena* and *Synechococcus* to manipulation of nitrogen : phosphorus ratios in a lake fertilization experiment. *Limnol. Oceanog.*, 33 (6/1) : 1348 - 1361.
- TOLEDO, A.P., 1995, (sous presse). Informe preliminar sobre estudos para obtenção de um índice para avaliação simplificada do estado trófico de reservatórios de regiões quentes tropicais. (CETESB, São Paulo).
- TOLEDO, A.P., P., s.d. Relações entre o humus do solo e do ambiente aquático. Colloque Régional sur la matière organique des sols. Departement de Chimie de l'Université Fédéral de São Carlos-SP, 29-34.
- TUNDISI, J.G. & MATSUMURA-TUNDISI, T., 1981. Estudos limnológicos no sistema de lagos do médio Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. Compte-rendu du II Séminaire Régional d'Ecologie, Universidade Fédéral de São Carlos, Departement de Sciences Biologiques, São Carlos-Brésil, 133-258.
- TUREKIAN, K.K. & WEDEPOHL, K.H., 1961. Distribution of the elements in some major units of the earth's crust. *Geol. Soc. Am. Bull.*, 72 : 175-192.
- U.S.EPA.(Environmental Protection Agency), 1971. Algal assay procedure bottle test. Euthrophication Research Program. Rapport technique, 82p.
- U.S.EPA.(Environmental Protection Agency). 1974 cité par SALAS & MARTINO, 1990.
- U.S.EPA.(Environmental Protection Agency), 1980. Ambient water quality criteria for phthalate esters. Rapport technique EPA 440/5-80-067. 112 p.
- U.S.EPA.(Environmental Protection Agency), 1986. Quality criteria for water. Rapport technique EPA/440/5/-86/001. 398 p.
- U.S.EPA.(Environmental Protection Agency). 1989. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 2^e Ed., Rapport technique EPA/600/4-89/001. 161p.

- U.S.EPA.(Environmental Protection Agency), 1990. Risk assessment, management and communication of drinking water contamination. EPA/625/4-89.24. 87p.
- UTKILEN, H. & GJOLME, N., 1992. The effect of iron on toxin production in *Microcystis*. XII^{ème} Symposium International de recherche sur les Cyanophycées. Sjöarp, août 4-14.
- VIEIRA, A.H. & TUNDISI, J.G. 1979. Notas sobre o cultivo de algumas espécies de algas de água doce. *Rev. Brasil. Biol.*, 39 (3) : 703-706.
- VOLLENWEIDER, 1968 cité par ESTEVES, 1988.
- WAIWOOD, K. G. & BEAMISH, F.W.H., 1978. Effect of copper, ph and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Water Res.*, 12 : 611 - 619.
- WATANABE, M.F. & OISHI, S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 (5) : 1342 - 1344.
- WICKS, R.J. & THIEL, P.,G., 1990. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic african reservoir. *Environ. Sci. Technol.*, 24 : 1413 - 1418.
- WINNER, R.W. & FARRELL, M.P., 1976. Acute and Chronic toxicity of cooper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 33 : 1685-1691.
- WINNER, R.W.; KEELING, T.; YEAGER, R.; FARRELL,M.P., 1977. Effect of food type on acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwater Biol.*, 7 : 343 - 349.
- WINNER, R.W., 1985. Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Res.*, 19 (4) : 449 - 455.

ZAGATTO, P.,A. & ARAGÃO, M.A., 1992. Implantação de métodos para identificação de algas tóxicas. Rapport Annuel, CETESB, São Paulo, 23p

ZAGATTO, P.,A.; ARAGÃO, M.A.; BOBEDA, C.R.R.; AZEVEDO, S.M.F.O., 1994. Toxicidade aguda da alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. I^{er} Symposium Latino-Américain sur la Santé des Ecosystemes Aquatiques et sur la signification biologique des Bioensais. 17 au 19 octobre, São Carlos, Brésil.

ZANARDI, E. BEYRUTH, Z; CALEFFI, S; MAIER, M.H., 1992. Tendências do estado trófico do reservatório de Guarapiranga. I^{ère} Réunion Annuelle de l'Institut de la Pêche, 6 au 10 de avril, São Paulo, Brésil.

ANNEXES

ANNEXE - A

Résumé des conditions expérimentales mises en senne dans les essais sur:

poissons : *Cheirodon notomelas*
Poecilia reticulata
Brachydanio rerio

microcrustacés : *Ceriodaphnia dubia*
Daphnia similis
Hyallela cf. azteca

algues : *Scenedesmus subspicatus*
Pseudoanabaena galeata
Oscillatoria quadripunctulata
Microcystis aeruginosa

**Composition du milieu de culture
ASM-1 pour les cyanophycées**

Résumé des conditions utilisées dans les essais de toxicité sur poissons

Espèces	alochtones <i>P.reticulata/ B.rerio</i> autochtone <i>Cheirodon notomelas</i>
Taille des organismes (cm)	3,5 ± 1
Température °C	23 ± 1
photopériode (lumière/obscurité)	16:08
eau naturelle ou eau reconstituée	
dureté	23 - 48 mg/L
pH	7 à 8
Oxygène dissous	> 5
aération	Oui
type de test	semi-statique
volume de la solution test	1 L
renouvellement de 1/2 de la solution testée	à chaque 24 h
nombre de réplicats	1
nombre d' organismes/concentration	10
nourriture journalière	Non
période d' essais	4 jours
effet observé	léthalité
expression des résultats	CL50 - 96h

Résumé des conditions utilisées dans les essais de toxicité chronique sur poisson

Espèces	<i>Brachydanio rerio</i> (stade larvaire)
Température °C	25 ± 1°
photopériode (lumière/obscurité)	16:08
eau naturelle ou eau reconstituée	
dureté	23 - 48 mg/L
pH	7 à 8
Oxygène dissous	> 5
aération	non
type de test	semi-statique
volume de la solution test	200 mL
renouvellement de 1/2 de la solution testée	à chaque 24 h
nombre de réplicats	2
nombre d' organismes/concentration	10
nourriture	Non
période d' essais	7 jours
effet observé	létalité
expression des résultats	NOEC

Résumé des conditions utilisées dans les essais de toxicité sur *Ceriodaphnia dubia*

Température °C	25 ± 1
photopériode (lumière/obscurité)	16:08
eau naturelle ou eau reconstituée	
dureté	23 - 48 mg/L
pH	7 à 8
Oxygène dissous	> 5
aération	non
type de test	semi-statique
volume de solution test	15 mL
chambre test	bécher de 30 mL
nombre de réplicats	10
nombre d' organismes/concentration	10
renouvellement de la solution testée	tous les 2 jours
nourriture journalière	algue+ration fermentée
période d' essais	7 jours
effet observé	survie et reproduction
expression des résultats	NOEC

Résumé des conditions utilisées dans les essais de toxicité sur
Daphnia similis

Température °C	20 ± 1°
photopériode	obscurité
eau naturelle et eau reconstituée	
dureté	23 - 48 mg/L
pH	7 à 8
Oxygène dissous	> 5
aération	non
type de test	statique
volume de solution test	10 mL
chambre test	tube à essais de 10mL
nombre de réplicats	4
nombre d' organismes/concentration	20
nourriture	non
période d' essais	24 et 48 h
effet observé	immobilité
expression des résultats	CE50- 24 et 48 h

Résumé des conditions utilisées dans les essais de toxicité sur
Hyallela cf. azteca

Température °C	25 ± 1°
photopériode (lumière/obscurité)	16:08
eau naturelle ou eau reconstituée	
dureté	40 à 48 mg/L
pH	7 à 8
Oxygène dissous	> 5
aération	oui
type de test	statique
chambre test	bécher de 1 L
volume de sédiment testé/l' eau	200 g/800 mL
nombre de réplicats	3
nombre d' organismes/concentration	30
nourriture journalière	Ration granulée + ration fermentée
période d' essais	12 jours
effet observé	léthalité

Résumé des conditions utilisées dans les essais de toxicité sur les algues

Espèces	<i>Scenedesmus subspicatus</i> (Chlorophycées)
	<i>Pseudoanabaena galeata</i> (Cyanophycées)
	<i>Oscillatoria quadripunctulata</i>
	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Température °C	25 ± 1°
photopériode	continue
Milieu pour Chlorophycées	LC Oligo
Milieu pour Cyanophycées	ASM-1
pH	7 ± 0,3
Luminosité (Lux)	2500
agitation continue à	175 rpm
type de test	statique
volume de la solution test	100 mL
inoculum (cellules ou filaments/mL)	10 000
nombre de réplicats	2
contrôle de la croissance algale au microscope à	tous les 2 jours
période d'essais	4 jours
effet observé	inhibition de la croissance algale
expression des résultats	CE(I)50 - 96h

Milieu de culture ASM-1

Solution A

NaNO ₃ (g)	1,7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,41 g
CaCl ₂ .6 H ₂ O	0,29 g
ou	
CaCl ₂ .2 H ₂ O anhydre	0,219 g
Eau désionisée	200 mL

Solution B

KH ₂ PO ₄	0,87 g
ou	
KH ₂ PO ₄ .3 H ₂ O	1,14 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	1,78 g
Eau désidionisée	100 mL

Solution C

H ₃ BO ₃	2,48 g
MnCl ₂ .4 H ₂ O	1,39 g
FeCl ₃ .6 H ₂ O	1,08 g
ZnCl ₂	0,335 g
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,019 g
CuCl ₂	0,0014 g
Eau désidionisée	100 mL

Solution D

EDTA Na ₂	1,86 g
Eau désionisée	100 mL

Le milieu de culture est préparé de la façon suivante :

Ajouter dans un litre d'eau bidionisée

20 mL de la solution A

2 mL de la solution B

0,1 mL de la solution C

0,4 mL de la solution D

pH de 7 à 8

Cette mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes

ANNEXE - B

Seuil de sensibilité des techniques expérimentales

Analyses des eaux

Cu total (mg/L)	0,005
PO4 total.(mg/L)	0,003
P total (mg/L)	0,005
N-amoniacal total (mg/L)	0,005
N-Kjeldhal total (mg/L)	0,05
N-Nitrate (mg/L)	0,02
N-Nitrite (mg/L)	0,005

Analyses des Phytoplancton/zooplancton

Cu total ($\mu\text{g/g}$)	0,005
------------------------------	-------

Analyses des poissons et des algues

Cu total ($\mu\text{g/g}$)	1,0
------------------------------	-----

Analyses des sédiments

Cu total ($\mu\text{g/g}$)	1,0
------------------------------	-----

ANNEXE - C

Résultats des variables physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques

Résultats des variables physico-chimiques, biologiques et écotoxicologiques

Variables	Campagnes d'échantillonnage								Valeur moyenne
	1ème	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	8ème	
	mar-93	avril	juin	août	oct	dec	Fev-94	avril	
PO4 (mg/L)	0,02	<0,003	0,01	0,02	<0,003	0,005	0,025	<0,003	0,01
P. total (mg/l)	0,06	0,09	0,035	0,05	0,04	0,035	0,035	0,035	0,048
N. amon, total (mg/l)	0,06	<0,005	0,08	0,01	0,01	0,01	0,04	0,06	0,034
N. Kjeldhal (mg/l)	0,2	1	-	1,1	0,7	0,9	1,2	0,70	0,828
N. nitrate (mg/L)	0,17	0,33	0,31	0,42	0,59	0,44	0,36	0,44	0,383
N. nitrite (mg/l)	0,01	0,01	0,09	0,02	0,03	<0,005	0,02	0,02	0,025
pH	7,3	7,1	6,8	6,8	7,3	7,5	8	7,5	7,29
OD (mg/l)	6	6,1	8,4	9,7	6,1	6,2	7,2	8,2	7,24
Transparence (m)	1,4	1,3	1,6	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,34
Turbidité (UNT)	1,3	4,5	2	2,5	5	1,5	3	2,5	2,79
Luminosité (lux)	10100	62000	22000	55000	226000	163000	145000	60000	92887
Conductivité (µS)	71	72	85	87	77	97	80	77	80,8
Dureté (mg/L)	22	23	22	27	27	29	24	21	24,4
Couleur (mgpt/L)	10	10	10	20	<5	10	10	10	10
Température °C	25	24	17	20	23	28	29	23	23,6
Cuivre total (mg/l)	<0,005	0,03	0,08	<0,002	0,02	0,04	0,04	0,04	0,03
Pluie	oui	non	non	non	non	non	non	non	-
Chlorophylle a (ug/L)	8,4	8,02	8,69	11,03	9,09	8,02	9,16	-	8,91
Phéophytine a (ug/L)	3,89	3,96	2,77	4,41	4,76	10,93	3,13	-	4,83
Toxicité	NT	NT	TA	NT	NT	NT	NT	NT	-

NT=Non toxique : pas d'effet toxique sur la survie et la reproduction après 7 jours d'exposition

TA= Toxicité aiguë : 100 % de mortalité après 24 -48 h

ANNEXE - D

Résultats de CE₅₀-48h des essais d'interaction du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*

Résultats de CE50-48h, des essais d'interaction du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*

Essai n° 1 - réalisé en utilisant l'eau du Guarapiranga filtrée sur membrane AP20

SOLUTION A : CE50 de la solution de sulfate de cuivre : 0,063 mg/L

SOLUTION B : CE50 de la solution de peroxyde d'hydrogène : 0,157 mg/L

Proportions des solutions A et B testées, respectivement	Concentration A et B dans le mélange entraînant 50% d'effet		(S) Somme des actions toxiques
	CuSO ₄ .5H ₂ O	H ₂ O ₂	
01:01	0,095	0,152	1,96
01:02	0,092	0,146	1,9
01:03	0,074	0,119	1,53
01:04	0,083	0,132	1,71
02:01	0,102	0,162	2,11
03:01	0,103	0,165	2,15
04:01	0,098	0,157	1,32

Résultats de CE50-48h, des essais d'interaction du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*

Essai n° 2 - réalisé en utilisant l'eau du Guarapiranga filtrée sur membrane AP20

SOLUTION A : CE50 de la solution de sulfate de cuivre : 0,077 mg/L

SOLUTION B : CE50 de la solution de peroxyde d'hydrogène : 0,192 mg/L

Proportions des solutions A et B testées, respectivement	Concentration de A et B dans le mélange entraînent 50% effet		(S) Somme des actions toxiques
	CuSO ₄ .5H ₂ O	H ₂ O ₂	
01:01	0,100	0,220	2,43
01:02	0,096	0,203	2,30
01:03	0,092	0,193	2,19
01:04	0,073	0,157	1,76
02:01	0,103	0,215	2,45
03:01	0,086	0,180	2,05
04:01	0,075	0,157	1,79

Résultats de CE₅₀-48h, des essais d'interaction du mélange sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène sur *Daphnia similis*

Essai n° 3 - réalisé en utilisant l'eau reconstituée

SOLUTION A : CE₅₀ de la solution de sulfate de cuivre : 0,016 mg/L

SOLUTION B : CE₅₀ de la solution de peroxyde d'hydrogène : 0,115 mg/L

Proportions des solutions A et B testées, respectivement	Concentrations de A et B dans le mélange entraînant 50% d'effet		(S) Somme des actions toxiques
	CuSO ₄ .5H ₂ O	H ₂ O ₂	
01:01	0,011	0,082	1,40

RESUME

Ce travail concerne le biomonitoring des eaux du réservoir Guarapiranga, qui sert de source d'eau potable pour une partie de la population de Sao Paulo, Brésil.

Les caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et écotoxicologiques des eaux et des sédiments et la bioaccumulation du cuivre par les organismes aquatiques du Guarapiranga ont été étudiées ainsi que la toxicité des cyanophycées isolées de ce réservoir.

L'intérêt du charbon activé pour la rétention des toxines algales et l'écotoxicité des algicides, sulfate de cuivre et peroxyde d'hydrogène, utilisés pour empêcher les blooms d'algues ont été étudiés en deuxième partie. Une proposition de limites maximales admissibles d'algues toxiques dans les eaux, est proposée à l'issue de cette recherche.

Sur la base des mesures de phosphate total, orthophosphate, chlorophylle-*a*, communautés phytoplanctoniques et transparence de l'eau, le réservoir Guarapiranga, peut être classé comme méso à hypereutrophique ; les teneurs totales en phosphates et en cuivre ont souvent excédé les standards de qualité des eaux pour la préservation de la vie aquatique.

Parmi les cyanophycées isolées du réservoir, les souches *Oscillatoria quadripunctulata*, *O. limnetica*, *O. amphibia*, *Phormidium sp*, *Microcystis incerta* et une souche de *Microcystis aeruginosa*, ont présenté une toxicité aiguë sur la souris. Seule l'algue *O. redekei* s'est révélée présenter des effets de toxicité aiguë sur *Daphnia*.

En ce qui concerne les algicides, les algues filamenteuses sont apparues plus sensibles au peroxyde d'hydrogène qu'au cuivre. Parmi les différents groupes d'organismes testés, les microcrustacés sont les plus sensibles aux algicides. L'action du mélange cuivre et peroxyde d'hydrogène s'est révélée expérimentalement moins qu'additive, c'est à dire inférieure à la somme des effets de chacun des algicides.

Nous avons montré que les organismes planctoniques sont de bons indicateurs de la contamination de l'eau par le cuivre. Le niveau de cuivre accumulé dans les muscles des poissons est bas et peut être considéré comme acceptable pour la consommation.

En ce qui concerne l'élimination de toxines d'algues, le charbon activé s'est révélé un adsorbant efficace et utile dans le traitement d'épuration de l'eau ; 15 mg de charbon retiennent jusqu'à 5mg, en poids sec, d'extraits d'algues toxiques de référence, *Cylindrospermopsis raciborskii* et *Microcystis aeruginosa*, dont la DL₅₀ est de 12 et 30 mg/Kg, respectivement.

Le niveau de contamination des sédiments du réservoir peut être considéré de moyennement à hautement pollué par le cuivre, bien qu'il n'induisse pas de toxicité aiguë sur *Hyalella*. Dans les deux stations d'échantillonnage, la contamination la plus élevée se trouve près du captage d'eau.

Ce travail montre que ce réservoir présente une dystrophie, une contamination par le cuivre élevée avec des conséquences au plan écotoxicologique.