



**INTERNATIONALE KOMMISSION ZUM SCHUTZE DES RHEINS  
COMMISSION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DU RHIN**

---

**Recommandation pour l'extension de la surveillance du Rhin par  
des methodes de biotests**

Essen, juillet 1990

## Recommandation pour l'extension de la surveillance du Rhin par des méthodes de biotests

### 1. Surveillance des émissions

La surveillance des rejeteurs à la sortie de la station d'épuration et la surveillance d'écoulements d'eau de refroidissement représentent un système d'avertissement qui tient compte des domaines conservation de la preuve ainsi que prévention dans le sens de la protection de la santé humaine (p.ex. arrêt de l'utilisation de filtrats de rive pour la production d'eau potable). Il faut s'efforcer d'utiliser pour les eaux usées à la composition complexe les mêmes méthodes de tests biologiques (notamment test sur poissons et daphnies) qui sont également disponibles pour la surveillance directe des eaux (immission).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de surveillance continue des rejeteurs effectuée à l'aide de biotests. Un échange d'informations intensif et le cas échéant une concertation sur la poursuite du développement ou l'utilisation de biotests chez les rejeteurs devraient cependant avoir lieu dans le cadre de la CIPR. Il convient de tenir compte dans le cadre du PAR de l'utilisation de biotests chez les rejeteurs.

### 2. Surveillance des immissions

Le test en continu sur poissons et daphnies qui est déjà appliqué à quelques stations de mesures sur le Rhin, porte surtout sur la détermination de la toxicité (aiguë) à court terme. Le test sur daphnies peut, à partir du critère reproduction, être également utilisé pour la détermination de la toxicité chronique, mais il ne faut pas dans ce cas l'utiliser comme test d'indication rapide. Si les daphnies ne se multiplient pas en un certain laps de temps c'est qu'il existe des effets d'inhibition de la reproduction, des effets par conséquent chroniques. Le test continu sur les daphnies et le test sur les poissons sont effectués pour contrôler les modifications intervenant dans la flottaison.

Lors du déclenchement d'alerte par les biotests utilisés, il convient de procéder à l'analyse chimique des échantillons d'eau prélevés pour obtenir des renseignements sur les produits chimiques provoquant l'effet toxique.

Il faut s'efforcer d'étendre l'utilisation du test sur poissons et daphnies aux stations internationales de mesures où le risque potentiel d'accidents existe.

En outre, il conviendrait également d'utiliser à moyen terme des méthodes de tests continus avec des organismes des niveaux trophiques: bactéries et algues afin de pouvoir également recenser des substances qui ont en premier lieu un effet sur des organismes végétaux et sur des bactéries.

Pour résumer, on constate qu'avec les méthodes d'analyse physico-chimique et l'analyse biologique, les biotests représentent aussi bien au niveau des émissions qu'à celui des immissions un élément essentiel à l'amélioration de la protection des eaux

# ANNEXE

## COMMISSION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DU RHIN CONTRE LA POLLUTION

### Applicabilité de méthodes de biotests permettant la surveillance des émissions et des immissions dans le Rhin

#### 1. Généralités

L'ensemble des problèmes relatifs aux accidents survenus dans le Rhin nécessite une surveillance continue plus sévère de la qualité des eaux à l'échelon international aussi le sous-groupe P1 "écosystèmes" a-t-il été chargé de vérifier l'applicabilité de méthodes de biotests pour la surveillance des émissions et des immissions du Rhin. Le mandat correspondant était libellé comme suit:

- c. Avant début mai 1989 établir une vue d'ensemble des biotests selon l'annexe B du PAR, disponibles actuellement, tout en indiquant la sensibilité spécifique des tests (p.ex. mode d'indication, domaine de concentration et groupes de substances) afin de pouvoir évaluer leur applicabilité éventuelle pour une surveillance des rejeteurs.
- d. Avant début octobre 1989: examiner si un programme moniteur biologique continu est approprié pour détecter une crue soudaine de substances ayant un effet toxique dans le Rhin, tout en indiquant les systèmes biologiques de contrôle à utiliser et établir une évaluation des coûts.
- e. Examiner si différents tests permettent d'évaluer la qualité des eaux et des rejets.

Lors de la surveillance des substances nuisibles sur la seule base du monitoring chimique, on recense surtout des pollutions spécifiques de la substance et ponctuelles. Les méthodes d'analyse des résidus dans des organismes spécifiques de la

substance (biomonitoring actif et passif) sont également à attribuer au monitoring chimique.

Des connaissances toxicologiques ne sont cependant disponibles que pour une partie des substances nuisibles, il semble donc nécessaire de mettre encore en place, sur la base d'un monitoring biologique, un système de surveillance fonctionnant en continu et il paraît utile de le combiner au contrôle physico-chimique.

Du point de vue conceptionnel, une distinction peut être faite entre des méthodes de recherche au niveau subcellulaire, concernant tout l'organisme ou la population ou qui sont basées sur le niveau biocénotique supérieur (écosystème).

D'énormes difficultés apparaissent lors de l'étude de modifications au niveau de la population et de l'écosystème: Compte tenu de la complexité des rapports qui doivent être déterminés par des études relatives à l'importance de la production et à la détermination de l'abondance et de la composition des espèces à différents niveaux trophiques compte tenu également de la dynamique saisonnière de l'écosystème, il se pourrait que la preuve scientifique de modifications d'origine anthropogène ne puisse pas être apportée avant des années. En revanche, les études au niveau subcellulaire et au niveau des organismes qui à titre de comparaison, ont été effectuées en un laps de temps court, fournissent des informations sur l'existence d'un potentiel actif écotoxique mais elles présentent un inconvénient, à savoir que la preuve d'une toxicité aiguë ou chronique ne permet pas en général de conclure à des modifications dans la population ou même dans l'écosystème. Pour un monitoring biologique utile, il faut donc appliquer toutes les stratégies de mesures, l'observation à long terme de modifications dans les écosystèmes aquatiques et les études de la toxicité aiguë et chronique.

Au sens strict du terme, les biotests peuvent indiquer une toxicité aiguë. Dans ce cas, ils constituent un système d'avertissement biologique qui doit répondre aux exigences de l'indication rapide des effets de substances nuisibles au niveau des organis-

mes. A cette fin, on détermine par la technique de la mesure les réactions d'organismes placés artificiellement dans le milieu à examiner. Les méthodes de biotests qui actuellement sont déjà standardisées concernent surtout les réactions de mortalité, d'inhibition ou de mutagénicité.

En République fédérale d'Allemagne, l'élaboration d'un "concept cadre du projet de recherches pour le développement, l'essai et la mise en application de méthodes de biotests permettant la surveillance des eaux du Rhin" à laquelle ont participé des experts néerlandais, a eu lieu au cours des deux dernières années (P 14/89). Ce document de travail comporte d'importants détails techniques sur les méthodes de biotests qui peuvent être actuellement utilisées ou doivent être encore soumises à des essais.

Il existe en principe deux possibilités pour l'utilisation d'un système d'avertissement biologique, le contrôle des rejets d'eaux usées (émissions) et la surveillance directe des eaux (immisions).

## 2. Méthodes de biotests pour la surveillance des émissions

Lors de la surveillance des eaux usées à l'aide de méthodes tests biologiques, il convient en principe de faire une distinction entre la surveillance du rejet d'eaux usées épurées ou d'eaux de refroidissement dans le cours d'eau et celle de flux partiels d'eaux usées avant l'entrée dans les stations d'épuration de l'entreprise. Seule cette dernière peut au sens propre du terme, être qualifiée de "système d'avertissement précoce": Lors du déclenchement de l'alerte par les méthodes tests biologiques utilisées, il existe la possibilité de détourner les flux partiels d'eaux usées dans des bassins de réception ou de rétention à part avant une détérioration aiguë de la capacité de dégradation microbienne dans le fonctionnement de la station d'épuration. L'utilisation de toximètres de bactéries pour la surveillance biologique semble donc suffisante pour l'objectif de protection "maintien du bon fonctionnement de la station d'épuration".

L'inventaire des méthodes de biotests actuellement utilisées dans les Etats membres de la CIPR pour la surveillance des émissions indique ceci:

### Suisse

A ce jour, la Suisse n'utilise pas régulièrement des biotests pour la surveillance des émissions.

### France

Les biotests utilisés en France (contrôle des eaux usées et des eaux de surface pour la prise d'eau potable) figurent dans le tableau ci-après. On n'utilise actuellement que des biotests statiques.

	daphnie 24 h	mikrotox	mutagénicité (Ames)	(triton)	test alerte (truite)	poisson 8 jours (1)	algue(2)	inhibition cholines- térase	biodégra- dabilité (bactér.)
Agence Financière de Bassin (*)	+	+	(+)	R			(+)	(+)	
Traiteurs d'eau		+	+		+				
Industries -bassin Rhin-Meuse (#)	+	+					(+)		+
Industries -autres ssins (#)	+	+					(+)		

(\*) Les 6 agences sont commanditaires des tests cités qui sont réalisés dans des laboratoires indépendants

(#) Y compris lixiviats d'eaux usées de décharge

R = étude en cours  
(+) emploi épisodique

(1) Brachydano rerio  
(2) selenastrum, chlorelle

Les expériences acquises jusqu'à présent sont expliquées brièvement:

Le test daphnie-24h est utilisé en premier lieu pour l'établissement du montant de la redevance pour les eaux usées.

Le test daphnie-24h est utilisé en second lieu à l'occasion d'études réalisées chez un exploitant d'installation qui a demandé l'assistance technique de l'Agence de l'Eau. Dans ce cas, il est associé au test Microtox qui donne des résultats comparables (en ordre de grandeur), mais plus rapidement et à moindre prix.

A l'occasion, on utilise surtout le test d'Ames comme test de mutagénicité; son utilisation est à développer dans le but de contrôler l'efficacité du traitement des rejets.

A l'heure actuelle, les tests sur poisson ou sur algue sont utilisés quelquefois seulement pour des besoins relativement spécifiques, de même que le test d'inhibition de la cholinestérase qui ne répond que si l'échantillon contient des organophosphorés ou des carbamates.

Globalement, l'intérêt des biotests pour la surveillance des eaux ou des rejets commence seulement à être perçu, et les techniques doivent encore évoluer dans le sens d'une plus grande souplesse et portabilité.

#### République fédérale d'Allemagne

Aux fins de détermination de la nocivité des eaux usées, on utilise, conformément à la loi relative aux redevances d'eaux usées en vigueur en République fédérale d'Allemagne, le test statique sur poisson qui permet de fixer la redevance pour les eaux usées. Les biotests sont surtout utilisés actuellement pour la surveillance des immissions. Cependant, quelques rejeteurs utilisent déjà les biotests pour l'autocontrôle:

#### Surveillance des émissions par les rejeteurs

BASF, Ludwigshafen

Test sur poisson

Test sur daphnie

Hoechst AG, Hoechst

Test sur poisson

Test sur daphnie

Bayer AG, Leverkusen, Dormagen, Uerdingen

Test sur poisson

Test sur daphnie

Test de consommation de O<sub>2</sub>

Les efforts déployés en République fédérale d'Allemagne selon § 7 a WHG pour utiliser des tests statiques de toxicité dans les quatre niveaux trophiques bactéries, algues petits crustacés et poissons tant pour l'indication et l'évaluation de flux partiels d'eaux usées à l'intérieur de l'entreprise contenant des substances dangereuses que comme paramètres pour la surveillance administrative du rejet d'eaux usées sont fournis indépendamment de la fixation de la redevance pour les eaux usées mentionnée ci-dessus. Les biotests sont importants pour les rejets d'eaux usées et les flux partiels d'eaux usées dans la mesure où les exigences pour l'épuration des eaux usées doivent répondre à l'état de la technique quand les eaux usées contiennent des substances dangereuses. Les analyses chimiques ne sont pas suffisantes pour les eaux usées à la composition complexe, aussi faut-il procéder en plus au recensement sommaire du danger potentiel pour les eaux par des systèmes de mesure de la toxicité. Les méthodes de biotests disponibles seront réalisées de manière discontinue suivant les besoins de l'administration sous forme d'essai en batch. Si l'administration constate que les eaux usées industrielles remplissent les conditions selon § 7a WHG, c'.-à-d. qu'elles correspondent à l'" état de la technique " fixé pour chacun des secteurs industriels, la redevance pour les eaux usées fixée auparavant conformément à la loi relative aux redevances pour les eaux usées peut être divisée par deux.

En cas de nécessité, des biotests sont utilisés par les autorités responsables du contrôle en République fédérale d'Allemagne pour effectuer à l'improviste le contrôle des rejeteurs.

Pays-Bas

Pour l'octroi d'une autorisation de rejet d'eaux usées, les Pays-Bas disposent de biotests (semi-) statiques permettant d'évaluer des effluents mais ceux-ci ne sont pas encore tous suffisamment testés pour l'instant. Ces biotests sont les suivants:

Type de test	Réalisation
aigu: bactéries (Mikrotox) algues (chlorelle/scenedesmus) puces d'eau (daphnies) poissons (poecilia) mutagénicité (Xad + Ames)	fabricant OCDE 202 OCDE 202 OCDE 203 OCDE 471
semi-statique: puces d'eau (daphnies), 21 d poissons (poecilia), 14 d	OCDE 202 OCDE 204
par la technique d'épuration: inhibant la nitrification inhibant la respiration	NEN 6511 NEN 6512
spécifique (Entw./Anw.): phytotoxicité (Entenflott) poissons-Els (Zebrafisch) mutagénicité des poissons (notobranchius)	-- -- --

L'utilisation de biotests ne s'avère utile que si des connaissances relatives à la technologie des procédés et des analyses chimiques ne sont pas suffisantes pour une évaluation adéquate de la tolérance pour l'environnement des effluents.

Lors de la mise au point des autorisations relatives aux eaux usées, on préfère utiliser aux Pays-Bas des combinaisons de tests effectués avec des organismes de niveaux trophiques différents: Mikrotox, algues, puces d'eau, poissons et le test de Ames pour la mutagénicité. Outre les tests aigus, on réalise, si né-

cessaire, des tests plus longs avec des puces d'eau et/ou des poissons.

Afin d'apprécier les effets négatifs éventuels des eaux usées sur le processus d'épuration biologique, des tests d'inhibition de la nitrification et de la respiration sont utilisés.

Aux fins de contrôle régulier des autorisations concernant les eaux usées, la réalisation de biotests (semi-) statiques doit être claire et simple.

Aux Pays-Bas, une telle application de biotests (semi-) statiques se limite actuellement à l'utilisation d'un test à court terme sur des poissons ou des puces d'eau pour l'évaluation des effluents dans des entreprises de formulation des pesticides. On étudie actuellement d'autres possibilités pour utiliser cette fonction de contrôle.

Les biotests en continu (systèmes de bioalerte) permettent de régler le processus et de déclarer des accidents. Leur utilisation est toujours utile étant donné que la composition des effluents est généralement complexe, que ces derniers sont susceptibles de varier fortement et que des moniteurs de sélection de substances ne peuvent quantifier que des composants individuels mais pas mesurer des effets.

Les biotests en continu qui mesurent l'inhibition de la respiration ou de la nitrification, sont applicables en pratique.

L'examen de la possibilité d'utiliser les systèmes fonctionnant avec des poissons, des puces d'eau et des mollusques pour l'évaluation des eaux usées sera achevé dans quelques années. Les frais afférents à l'achat varient entre 30.000 hfl et 70.000 hfl. D'autres systèmes fonctionnant avec des algues, des insectes et des biodétecteurs se situent actuellement à différents stades de développement.

Actuellement, on n'utilise pas de biotests aux Pays-Bas pour fixer la redevance pour les eaux usées.

L'utilisation de biotests ne donne aucune indication sur les caractéristiques des eaux usées spécifiques de la substance. Pour cela, il faut effectuer un complément d'analyses chimiques.

### 3. Méthodes de biotests pour la surveillance des immissions

L'inventaire des méthodes de biotests utilisées actuellement dans les Etats membres pour la surveillance des immissions indique ceci:

#### Suisse

La nouvelle station de mesures internationale prévue à Bâle que la Suisse et le Bade-Wurtemberg devront mettre en place et faire fonctionner en commun, sera probablement équipée d'un test sur daphnies. L'utilisation en plus d'un test sur algues, bactéries ou d'inhibition de la cholinestérase fera l'objet d'un examen.

#### France

Deux possibilités semblent envisageables sur la base des connaissances disponibles en France; ces deux options ne se situent pas au même stade de développement.

La première option est celle d'un test Microtox effectué par la méthode en batch utilisée pour le contrôle des eaux fluviales qui doivent être traitées pour la production d'eau potable. Le test doit être effectué sous la responsabilité du traiteur d'eau potable. Ce système est en outre aisément adaptable aux eaux usées par l'intercalation d'une étape de dilution.

La deuxième option est en cours de développement, sur la base d'un test sur algue.

République fédérale d'Allemagne

Analyse des eaux du Rhin à l'aide de biotests effectuée par des administrations de la République fédérale d'Allemagne

## Bade-Wurtemberg:

Institut de la protection de l'environnement du Land, Karlsruhe

## Biotests dynamiques

à la

station de Maxau: test sur des poissons dans le courant  
test dynamique sur des daphnies  
appareil d'exposition permanente, contenant  
entre autres des crustacés du fleuve, des  
gammaridés, des asselles

En cas d'accident,

tests statiques

en plus en

laboratoire:

test sur les bactéries lumineuses  
test sur les algues  
test sur les daphnies  
test sur les gammares  
test sur les lentilles d'eau

## Rhénanie-Palatinat/Hesse:

Office de génie rural du Land, Mayence

Institut de l'environnement du Land de Hesse, Wiesbaden

Station commune de Mayence: test sur des poissons dans le  
(dynamique) courant  
test dynamique sur des daphnies

En cas d'accident en plus: test sur des bactéries lumineuses  
(statique) test sur des daphnies

## Rhénanie-du-Nord-Westphalie:

Office pour les eaux et les déchets du Land, Düsseldorf

Station de Bad Honnef: test sur des poissons dans le  
(dynamique) courant  
test dynamique sur des daphnies

Station de Düsseldorf: test sur des poissons dans le  
(dynamique) courant  
test dynamique sur des daphnies

Station de Kleve-Bimmen: test sur des poissons dans le  
(dynamique) courant  
test dynamique sur des daphnies

En cas d'accident en plus:      test sur des bactéries lumineuses  
 (tests statiques)                test de consommation de O<sub>2</sub>  
    test d'inhibition de la multi-  
    plication cellulaire des bactéries  
    test sur des algues  
    test sur des daphnies  
    test sur du cresson  
    test sur des poissons

Institut fédéral d'Hydrologie, Coblenze

Station de Coblenze:                test sur des poissons dans le  
 (dynamique)                        courant

En cas d'accident en plus:      test sur des bactéries lumineuses  
 (tests statiques)                test sur des algues  
    test sur des daphnies  
    test sur des poissons

D'autres biotests font actuellement en République fédérale d'Allemagne l'objet d'une mise au point et d'une expérimentation dans le cadre d'un projet de recherches encouragé par l'Office fédéral de l'Environnement, Berlin. Ces 6 projets partiels concernent en détail:

1. test sur des bactéries lumineuses et test de production d'oxygène des algues
2. toxalerte et behavioquant, coordination
3. électrode de cyanobactéries et moniteur WRC pour poissons
4. Fluorescence spontanée des algues
5. Fluorescence retardée des algues
6. Conteneur de laboratoire

#### Pays-Bas

Analyse des eaux du Rhin à l'aide de biotests effectuée par des administrations des Pays-Bas.

Rijkswaterstaat (DBW/RIZA), Lelystad

Station de Lobith:  
(dynamique)

test sur des poissons dans le  
courant  
test sur des daphnies à partir de  
1990

En cas d'accident, tests  
statiques en plus

test sur des bactéries lumineuses  
test stat. sur des daphnies  
test sur des poissons  
test sur des larves de moustiques

#### 4. Extension de la surveillance du Rhin par des méthodes de biotests

##### 4.1 Surveillance des émissions

La surveillance des rejeteurs à la sortie de la station d'épuration et la surveillance d'écoulements d'eau de refroidissement représentent un système d'avertissement qui tient compte des domaines conservation de la preuve ainsi que prévention dans le sens de la protection de la santé humaine (p.ex. arrêt de l'utilisation de filtrats de rive pour la production d'eau potable). Il faut s'efforcer d'utiliser pour les eaux usées à la composition complexe les mêmes méthodes de tests biologiques (notamment test sur poissons et daphnies) qui sont également disponibles pour la surveillance directe des eaux (immission).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de surveillance continue des rejeteurs effectuée à l'aide de biotests. Un échange d'informations intensif et le cas échéant une concertation sur la poursuite du développement ou l'utilisation de biotests chez les rejeteurs devraient cependant avoir lieu dans le cadre de la CIPR. Il convient de tenir compte dans le cadre du PAR de l'utilisation de biotests chez les rejeteurs.

##### 4.2 Surveillance des immissions

Le test en continu sur poissons et daphnies qui est déjà appliqué aux stations de mesures sur le Rhin dont il a été fait mention, porte surtout sur la détermination de la toxicité (aiguë) à court terme. Le test sur daphnies peut, à partir du critère reproduction, être également utilisé pour la détermination de la toxicité chronique, mais il ne faut pas dans ce cas l'utiliser comme test d'indication rapide. Si les daphnies ne se multiplient pas en un certain laps de temps c'est qu'il existe des effets d'inhibition de la reproduction, des effets par conséquent chroniques. Le test continu sur les daphnies et le test sur les poissons sont effectués pour contrôler les modifications intervenant dans la flottaison.

Lors du déclenchement d'alerte par les biotests utilisés, il convient de procéder à l'analyse chimique des échantillons d'eau prélevés pour obtenir des renseignements sur les produits chimiques provoquant l'effet toxique.

Il faut s'efforcer d'étendre l'utilisation du test sur poissons et daphnies aux stations internationales de mesures où le risque potentiel d'accidents existe.

En outre, il conviendrait également d'utiliser à moyen terme des méthodes de tests continus avec des organismes des niveaux trophiques: bactéries et algues afin de pouvoir également recenser des substances qui ont en premier lieu un effet sur des organismes végétaux et sur des bactéries.

Pour résumer, on constate qu'avec les méthodes d'analyse physico-chimique et l'analyse biologique, les biotests représentent aussi bien au niveau des émissions qu'à celui des immissions un élément essentiel à l'amélioration de la protection des eaux