



**HAL**  
open science

# Caractérisation des rejets urbains de temps de pluie et de leurs impacts sur l'oxygénation de la Seine

Martin Seidl

► **To cite this version:**

Martin Seidl. Caractérisation des rejets urbains de temps de pluie et de leurs impacts sur l'oxygénation de la Seine. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 1997. Français. NNT : . tel-00523123

**HAL Id: tel-00523123**

**<https://pastel.hal.science/tel-00523123v1>**

Submitted on 29 Oct 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



NS 22397(4)

X

**CARACTERISATION des REJETS URBAINS  
de TEMPS de PLUIE et de leurs IMPACTS  
sur l'OXYGENATION de la SEINE**

Martin Seidl

Thèse soutenue le 29 septembre 1997  
devant Jury composé de:

Président et Directeur de thèse : Pierre SERVAIS

Rapporteurs : Jean-Claude BLOCK  
Dominique FONTVIEILLE

Examineurs : Thorkild HVITVED-JACOBSEN  
Michel GOUSAILLES  
Jean-Michel MOUCHEL



“L'eau m'échappe... me file entre les doigts. Et encore! Ce n'est pas même pas si net qu'un lézard ou une grenouille: il m'en reste aux mains des traces, de taches, relativement longues à sécher ou qu'il faut essuyer. Elle m'échappe et cependant me marque, sans que j'y puisse grand-chose. Idéologiquement c'est la même chose: elle m'échappe, échappe à toute définition, mais laisse dans mon esprit et sur ce papier des traces, des taches sans formes.”

Francis Ponge, 1948

## **PREFACE**

Ce document reflète 4 ans de mon travail doctoral au sein du Cergrene, laboratoire commun à l'École Nationale des Ponts et Chaussées et à l'École Nationale de Génie Rural et des Eaux et Forêts. J'ai choisi pour une thèse en articles pour différentes raisons. D'un côté le fait qu'elle soit écrite dans la langue anglaise, permettra une plus large diffusion en dehors des frontières françaises et de l'autre côté l'article en soit est devenue une forme de valorisation de plus en plus demandée par le monde de recherche.

Avant de me perdre dans des thèses et antithèses, je voudrais remercier surtout Jean Marie qui m'a donné de bonnes idées, mais aussi du boulot et qui m'a poussé quand il le fallait, Pierre pour sa disponibilité et son attention, Peter pour son accueil à Québec, que je ne voulais pas quitter, Catherine Paffoni et Marc, qui ne m'ont jamais dit non quand j'ai demandé des données, Viviane qui ne m'a refusé aucune analyse, Stéphanie pour sa patience avec ProSe, Cathy et Emma pour leur soutien moral et finalement tout le monde du Cergrene et du Labam sans qui les campagnes de mesures, ou la poursuite de ma thèse n'auraient pas abouti.





## Résumé

Les rejets urbains par temps de pluie constituent un problème majeur pour les gestionnaires de l'eau en région parisienne. Une meilleure caractérisation des matières organiques rejetées par temps de pluie permet de mieux évaluer la désoxygénation du milieu récepteur, la Seine.

Un bassin versant expérimental a été choisi en proche banlieue Parisienne pour étudier les eaux usées par temps de pluie. Les résultats montrent que les flux sont une fonction du cycle journalier des eaux usées et de l'intensité des pluies. En journée par temps sec, les teneurs en polluants et les débits sont plus élevées que pendant la nuit. Les flux des polluants déversés pendant la journée sont ainsi supérieurs aux flux rejetés la nuit à pluie égale. Dans les réseaux de petite taille et de faibles pentes, un dépôt de temps sec peut être remis en suspension par des pluies intenses et augmenter temporairement la charge polluante. Les matières organiques du réseau en temps sec sont mieux et plus rapidement dégradables qu'en temps de pluie. La biodégradabilité des matières en suspension dans le réseau diminue avec l'intensité des pluies en raison d'un apport de carbone faiblement dégradable par les eaux de ruissellement et les dépôts en réseau. L'effet toxique des rejets urbains de temps de pluie sur le milieu récepteur a été étudié au laboratoire sur une population mixte du phytoplancton de la Seine. Nos études montrent que les rejets peuvent diminuer la production primaire de la Seine de l'ordre de 60% après une dilution au cinquième, cette inhibition est principalement due aux micropolluants organiques et partiellement aux métaux lourds, dont le zinc. Les effets varient fortement avec la composition des rejets, la toxicité des métaux en particulier dépendant de leur état de complexation. Le comportement de la matière organique et des bactéries hétérotrophes rejetées par temps de pluie dans le milieu récepteur a été étudié en Seine après d'importants rejets du principal déversoir de la région parisienne. Lorsque la dilution du rejet est inférieure à 10%, les effets sur le milieu sont peu sensibles. Les masses d'eau usée ont pu être suivies in situ à l'aide de la conductivité et des concentrations d'oxygène. Une relation entre la quantité de carbone organique dissous biodégradable rejetée et le déficit d'O<sub>2</sub> a pu être établie. La matière organique fixée aux matières en suspension sédimente très rapidement et ne participe pas directement à la désoxygénation. La désoxygénation in situ est principalement due aux bactéries allochtones, apportées par le rejet, de taille supérieure à 1 µm. Leur croissance est plus élevée que celle des bactéries fluviales, mais leur vitesse de disparition l'est aussi. Les polluants toxiques du rejet sont susceptibles de diminuer la production du phytoplancton et d'aggraver ainsi les déficits de près d'un milligramme d'oxygène voire plus en période de forte production. Ces données permettent des simulations détaillées de l'évolution de l'oxygène dissous en Seine suite aux principaux rejets de l'agglomération parisienne.



## Abstract

The discharge of combined sewers to the river Seine during summer storms is one of the major problems the Water Authorities of the Parisian urban area have to deal with. A better characterisation of the discharged pollution will allow a more accurate evaluation of the oxygen depletion *in situ*. The composition of organic matter transported by combined sewers during dry and wet weather was studied in an experimental catchment of city Boulogne, near Paris. The concentrations of organic carbon were higher during dry weather than during wet weather, due to dilution by run off. The dry weather organic matter was thereby significantly more degradable than during wet weather. The degradability decreased with rainfall intensity. During the day, the dry weather flows and the concentration of pollutants were higher than during the night. The flux of pollutants discharged during the day was therefore higher than for an equivalent rainfall during the night. The discharged waste water has an effect not only on oxygen depletion but also on phytoplankton. During laboratory assays with natural phytoplankton, we have observed severe effects of filtered effluent on the primary production. Depending on CSO, an *in situ* dilution of 20% of waste water may decrease the net production by 30%. By this way, the inhibition may lower the oxygen deficit by a few percent. An important part of this effect is due to heavy metals like zinc. Their toxicity will depend of the way they are complexed. The degradation of organic matter *in situ* was characterised by means of study of waste water masses issued from the major overflow of Parisian area. The pollution plug was followed for more than 20 km using conductivity and oxygen measurements. Conductivity and ammonium were confirmed to be conservative and therefore good tracers of waste waters. We have observed that the oxygen deficit was related to the mass of discharged BDOC, rather than to the suspended solids or POC, which was especially due to high settling velocity of the discharged solids. However an excess of DOC of unknown origine, was observed *in situ* after the overflows. The oxygen deficit was mainly caused by allochthonous bacteria larger than 1  $\mu\text{m}$ . Their specific activity was 3 to 4 times higher, compared to the small autochthonous bacterial population. Most of the microbial processes evaluated had higher rates than suggested by previous works. The results obtained allowed a better modelling of the CSO's impacts in the river Seine.



## **Collaborations :**

- AESN: Agence de l'Eau Seine-Normandie  
51 r Salvador Allende, 92027 Nanterre
- AERM: Agence de l'Eau Rhin-Meuse  
BP19, 5716 Moulins-les-Metz
- CIG: Centre d'Informatique Géologique, Ecole des Mines de Paris  
35 r St Honoré, 77305 Fontainebleau
- CRITER: Centre de Recherche Interdépartemental pour  
le Traitement des Eaux Résiduaires  
SIAAP, 82 r Kléber, 92700 Colombes
- GMMA: Groupe de Microbiologie des Milieux Aquatiques ULB  
campus de la Plaine CP221, B1050 Bruxelles, Belgique
- INRS -Eau: Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec  
CP7500 St Foy, Québec, G1V4C7 Canada
- IBM: Institut de Biogéochimie Marine, Ecole Normale Supérieure  
Montrouge
- LABAM: Lab. de Bioélectrochimie et des Analyses du Milieu, Université Paris XII  
61 ave Gal de Gaulle, 94010 Créteil Cedex
- SAFEGE: SAFEGE Ingénieurs Conseils  
15/27 r du Port, 92007 Nanterre Cedex
- SIAAP Clichy: Usine de Clichy, SIAAP  
25 r Fournier, 92110 Clichy
- SNS: Service de la Navigation de la Seine  
9 île de la Loge, 78380 Bougival Cedex



## Liste d'abréviations :

DOC:	dissolved organic carbon ( <i>français: COD</i> )
POC:	particulate organic carbon ( <i>français: COP</i> )
TOC:	total organic carbon ( <i>français: COT</i> )
BDOC:	biodégradable dissolved organic carbon ( <i>français: CODB</i> )
BPOC:	biodégradable particulate organic carbon ( <i>français: COPB</i> )
BTOC:	biodégradable total organic carbon ( <i>français: COTB</i> )
COD:	chemical oxygen demand ( <i>français: DCO</i> )
CSO:	combines sewer overflow ( <i>français: surverse de réseau unitaire</i> )
BOD:	biochemical oxygen demand ( <i>français DBO</i> )
SS:	suspended solids ( <i>français: MES</i> )
EDTA:	ethylene diamine tetra acetic acid
PAH	poly-aromatic hydrocarbon ( <i>français:HPA</i> )
NTA:	nitrilo triacetic acid
PCB:	polychlorinated biphenyls
PIREN:	Programme Interdisciplinaire en Recherche en Environnement
SIAAP:	Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne
RUTP:	Rejet urbain par temps de pluie





## SOMMAIRE

PRÉFACE  
RÉSUMÉ  
ABSTRACT  
COLLABORATIONS  
LISTE D'ABRÉVIATION  
SOMMAIRE

### INTRODUCTION

#### 1. CARACTERISATION de la MATIERE ORGANIQUE et de la BIOMASSE REJETEE par TEMPS de PLUIE par le RESEAU UNITAIRE

##### 1.1. RESEAU

**Caractérisation des matières organiques dans le réseau de Boulogne par temps de pluie**  
Biodégradable organic carbon and heterotrophic bacteria in combined sewer during rain events.  
Seidl M., G. Belhomme, P. Servais, J.M. Mouchel & G. Demortier  
*proceedings of 7<sup>th</sup> IUCSD Hannover Germany, September 1996* p.15

**Composition et flux du carbone organique et de la biomasse bactérienne par temps de pluie, sur un bassin versant expérimental**  
Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events  
Seidl M., P. Servais, M. Martaud, C. Gandouin & J.M. Mouchel  
*WATER SCIENCE TECHNOLOGY, janvier 1998* p.23

**Spéciation des matières organiques du réseau unitaire par temps de pluie et par temps sec**  
Comparison of parameters characterising organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather  
Pierre Servais, Martin Seidl & Jean-Marie Mouchel  
*soumis WATER ENVIRONMENT RESEARCH juillet 1997* p.33

##### Mesures de la respiration dans les eaux usées

Seidl M.,  
*"MESURES ET ENVIRONNEMENT" Actes de 7<sup>èmes</sup> journées du DEA STE, Mai 1996* p.51



## 1.2. MILIEU RECEPTEUR, LA SEINE

### **Transport et dégradation de la matière organique en Seine après un rejet urbain par temps de pluie.**

Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a Combined Sewer Overflow.

Seidl M., P. Servais & J.M. Mouchel  
*accepté WATER RESEARCH, février 1997*

*p.61*

## 2. EFFETS TOXIQUES de REJETS URBAINS sur le PHYTOPLANCTON

### **Evaluation de l'impact des rejets urbains par temps de pluie sur la production primaire du phytoplancton: contribution des métaux lourds**

Toxicity of combined sewer overflows on river phytoplankton: the role of heavy metals

Seidl M., V.Huang & J.M.Mouchel  
*accepté ENVIRONMENTAL POLLUTION décembre 1997*

*p.83*

### **L'effet de différents complexants organiques sur la toxicité du cadmium et du zinc chez l'algue verte *Selenastrum capricornutum*: Exception sur le modèle de l'ion libre**

Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model

Olivier Errecalde, Martin Seidl and Peter G. C. Campbell  
*WATER RESEARCH février 1998*

*p.103*

## 3. MODELISATION des IMPACT de REJETS URBAINS par TEMPS de PLUIE en SEINE

### **Simulation des déficits d'oxygène dissous dans la Seine en aval de déversoirs d'orage à l'aide du modèle ProSe**

Even S., J.M. Mouchel, M.Seidl, P. Servais & M.Poulin  
*accepté ANNALES DE LIMNOLOGIE décembre 1997*

*p.127*

## 4. DISCUSSION GENERALE

*p.143*

## 5. CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

*p.163*

## BIBLIOGRAPHIE (récapitulation)

*p.169*



## **INTRODUCTION**



“Dans le monde où nous vivons, les phénomènes économiques étant défini par la production et la consommation, où la seule préoccupation est d'adapter l'une à l'autre, et c'est déjà malaisé, l'eau apparaît comme un *produit* bizarre dont les caractéristiques rendent difficile la pleine saisie du problème. L'eau d'abord vient toute seule, du ciel, comme elle veut et quand elle veut. Trop abondante parfois, trop rare en certains lieux et à certaines époques, jamais docile. Sans elle, la vie n'existerait pas”

(CCI 1980)

Par son abondance et ses qualités physico chimiques l'eau joue un rôle de vecteur dans la presque totalité des usages qu'en fait l'homme. L'eau absorbe facilement, sous forme dissoute ou en suspension, toutes sortes de substance en modifiant sa qualité. La nature a construit le monde et l'homme, dans ses usages et ses habitudes, disposant de processus de régénération et, tant que la population n'est pas trop élevée, la nature arrive grâce à l'auto-épuration des cours d'eau à maintenir un écosystème diversifié et abondant. Mais l'urbanisation, l'industrialisation et l'usage de produits de synthèse ont totalement bouleversé cet équilibre.

Paris est né de l'eau. Ses premiers habitants, les Parisii, étaient un peuple qui fondaient leur commerce sur l'existence de la Seine. Au cours des siècles c'est encore la Seine et ses affluents, qui guideront l'extension de la ville. Les premiers aménagements d'assainissement de Paris, datent de l'Empire romain, quand les ingénieurs n'hésitaient pas à construire des aqueducs, parcourant des dizaines de kilomètres. Depuis les travaux de Belgrand et de Haussman, les ramifications des réseaux d'eau potable et d'eaux usées n'ont pas cessé de se modifier et de se multiplier pour mieux servir la ville. La Seine est un fleuve de petite taille au regard de l'énorme concentration de population et d'activités qui s'est développée sur l'ensemble de son bassin; le fonctionnement de ce fleuve est aujourd'hui fortement contrôlé par les aménagements construits, barrages réservoirs, prises d'eau, rejets et stations de traitement des eaux usées. Les conflits d'usage sont inévitables.

La gestion des équipements existant, la programmation des nouveaux ouvrages et en particulier la modernisation de l'assainissement urbain en temps sec et en temps de pluie demandent un niveau de connaissance et de finesse de prévision qui n'est pas actuellement encore atteint. Pour répondre à ce besoin, la connaissance de l'écosystème fluvial de la Seine devrait être renforcé à partir des observations approfondies sur le terrain et d'une analyse expérimentale détaillée de chacun des mécanismes intervenant. Un groupe de travail constitué pour donner suite à ce besoin, soutenu financièrement et matériellement par les gestionnaires a vu le jour: le PIREN Seine. Les principaux axes de ce projet interdisciplinaire en recherche en environnement ont été i) l'axe fluvial, ii) le corridor fluvial, iii) les barrages réservoirs, iv) les bassins versants ruraux et v) les bassins versants urbains. Le programme se poursuit aujourd'hui, cherchant toujours à compléter et intégrer les connaissances acquises sur le bassin de la Seine.



Les rejets urbains en temps de pluie (RUTP) sont d'actualité depuis une vingtaine d'années et ont fait l'objet de nombreuses recherches en France et à l'étranger. Les équipes participant au PIREN Seine constituent depuis plusieurs années un cadre de recherche sur les rejets urbains. Les thèses de Bachoc (1992) et Chebbo (1992) ont permis de spécifier l'ordre de grandeur et la variabilité des principaux paramètres des rejets ou des eaux de pluies susceptibles d'être déversées, soit les volumes et débits déversés, MES,  $\text{NH}_4$ , DBO, DCO et les micro polluants métalliques. La création d'une base de données sur la qualité des rejets par temps de pluie par Saget (1994) a permis d'avoir un support pour le dimensionnement des ouvrages. Les recherches doctorales de Florez Rodriguez (1992) et Lebreton (1996) ont montré la variabilité de la spéciation des métaux particuliers en milieu urbain. Lebreton a étudié le potentiel de solubilisation des métaux particuliers, tandis qu'Estebe (1996) a étudié la dynamique des particules et des métaux rejetées en Seine. Les concentrations in situ après les RUTP pourront être ainsi suffisamment élevées pour nuire à la production primaire et aggraver les déficits d'oxygène dus aux déversements en temps de pluie. En milieu récepteur, les recherches de Barillier (1992) ont permis de caractériser la dégradation des matières organiques rejetées par temps sec dans le milieu fluvial Seine. L'application des nouveaux concepts de la dégradation bactérienne de la matière organique, formulés auparavant par Servais (1987) a donné une nouvelle impulsion à la modélisation. La thèse de Even (1995) a été ainsi entièrement consacrée à la modélisation de la qualité en Seine et notamment en région parisienne. Une étude des relations entre les rejets et les déficits observés en aval des principaux déversoirs Clichy et La Briche, est actuellement en cours de réalisation (Delbec *in prep.*). Cependant les connaissances acquises se montrent insuffisantes pour valider l'application de ces concepts aux les déficits d'oxygène provoqués par les RUTP.

*La place de la thèse présentée ici doit être vue comme une suite logique des travaux antérieurs vers une meilleure compréhension des impacts des RUTP en Seine. Le travail se concentre sur 3 compartiments intervenant dans le bilan d'oxygène: les bactéries hétérotrophes - la matière organique rejetée - le phytoplancton. Les 2 premiers paramètres déterminent l'ampleur du déficit d'oxygène et le troisième la modifie. Les thèmes étudiés sont liés à la modification du bilan d'oxygène du milieu récepteur par le RUTP due i) aux caractéristiques des rejets tels que le fractionnement du carbone organique biodégradable et la biomasse bactérienne hétérotrophe, ii) à la biodégradation in situ iii) à l'inhibition de la production primaire.*

## **Les rejets urbains en temps de pluie: l'état des connaissances**

Les zones urbaines constituent incontestablement une perturbation majeure des écosystèmes fluviaux. Le corridor fluvial de la Seine, a été très fortement aménagé en milieu urbain. Les effluents en temps sec ou les rejets en temps de pluie, perturbent le milieu fluvial sur des dizaines voire des centaines de kilomètres à l'aval. Les rejets d'une agglomération ne se limitent malheureusement pas aux eaux résiduaires des stations d'épuration. Les effluents industriels ou domestiques non raccordés aux réseaux d'assainissement contribuent à la pollution diffuse, difficilement quantifiable. En temps de pluie, l'évacuation de l'eau lessivant

les surfaces imperméabilisées perturbe le milieu récepteur. Les impacts des rejets urbains par temps de pluie sur un écosystème fluvial peuvent être divisés en trois catégories i) la désoxygénation due aux apports de matières organiques dégradables, ii) la présence des microorganismes pathogènes, issus du réseau d'assainissement et iii) l'inhibition des processus biologiques par les micro polluants organiques et inorganiques.

### Caractérisation

Les eaux déversées forment un mélange d'eaux de ruissellement moyennement chargées et d'eaux usées avec de fortes teneurs en carbone, azote, phosphore et bactéries auxquelles s'ajoutent des solides érodés dans le réseau. Les matières organiques tels que les protéines, les polysaccharides ou les graisses constituent 80% des solides du réseau en temps sec (Raunkjaer et al 1994). Les eaux de ruissellement contiennent en moyenne une dizaine de milligramme de DCO et DBO<sub>5</sub> par litre avec un rapport DBO/DCO faible, tandis que leur teneurs dans les eaux usées par temps sec s'élèvent plutôt à une centaine de mg/l et un rapport DBO/DCO élevé. Les concentrations des MES peuvent être du même ordre de grandeur dans les deux cas, avec environ 2 fois plus de matières minérales et 10 fois plus de micro polluants dans les solides ruisselés (NWRW 1989, Sogreah 1993). Des études consacrées aux solides en réseau d'assainissement de grandes villes françaises, ont montré que l'essentiel des micro polluants organiques comme les PCB et HAP, aussi bien que des polluants inorganiques tel que les métaux Pd, Cu et Zn apportés au milieu récepteur, sont liés aux particules et notamment à leur fraction fine (Chebbo 1992). Les concentrations des métaux en réseaux en temps de pluie peuvent s'élever à quelques milligrammes par litre, dépassant de cent fois les normes de potabilité (Chebbo et al 1995). Parmi les bactéries hétérotrophes du réseau, on trouve les coliformes et les streptocoques fécaux, indicateurs de la pollution fécale, témoignant de la présence de bactéries pathogènes. Leur nombre de l'ordre de 10<sup>10</sup> par litre est un million de fois plus élevé que dans les milieux naturels (Morinigo et al 1992).

La qualité des eaux de ruissellement dépend de l'intensité de la pluie, tandis que la qualité de l'eau usée suit un cycle jour/nuit. Le flux polluant des rejets va ainsi fortement varier avec les conditions météorologiques et l'heure du déversement. Différentes études de petits bassins versants, montrent des forts flux de polluants au début de la pluie, diminuant vers la fin. Cette évolution est due à l'augmentation du volume transité suite au ruissellement, mais aussi au changement de qualité. Les premières masses d'eau, contenant une proportion élevée d'eau usée et parfois des dépôts resuspendus, vont être suivies par des masses d'eau composées majoritairement d'eau de ruissellement.

### Rejets

La consommation d'eau potable à Paris est de l'ordre de 220 L/j /habitant. La quantité d'eau usée en résultant est doublée par le nettoyage des chaussées, réserves de chasse et fuites diverses. Avec une densité moyenne de 300 capital/ha ceci résulte dans une production de 130 m<sup>3</sup>/ha/j (Sogreah 1993). 80% des eaux usées de l'agglomération parisienne sont transportés par 5 collecteurs gravitaires vers la station d'épuration à Achères. Près de la moitié de l'eau usée (1\*10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>/j) de l'agglomération parisienne transite par l'usine de prétraitement et de

refoulement de Clichy. Clichy forme un noeud sur le réseau unitaire en périphérie de l'agglomération et par son emplacement géographique aussi le déversoir majeur du bassin versant de Paris. Les débits déversés par temps de pluie peuvent monter à 35 m<sup>3</sup>/s pendant quelques heures atteignant des volumes de plus de 100 000 m<sup>3</sup>. La période de retour de ces déversements est de l'ordre de 25 jours. La DCO et les MES sont sensiblement plus élevées durant les déversements, par rapport au temps sec, tandis que la DBO<sub>5</sub> a une tendance inverse (Paffoni 1984). Par temps de pluie la Seine reçoit plusieurs dizaines, voir une centaine de petits rejets, constituant une pollution diffuse, difficilement quantifiable. Le déversoir de Clichy qui a les débits les plus élevés, ne représente que de 10 à 20% du volume total, déversé en Seine par temps de pluie. Les résultats montrent que les réseaux unitaires rejettent les flux les plus élevés en polluants organiques. Le réseau séparatif est une solution pour le rejet des matières biodégradables, responsable des déficits d'oxygène, mais il apporte une quantité plus élevée des micro polluant organique et inorganiques. Les rejets des zones industrielles représentent des risques les plus élevés, contrairement aux zones résidentielles, qui provoquent des impacts minimales (NWRW, 1991).

### Impacts

Les matières solides rejetées, sédimentent rapidement et constituent un stock de polluants organiques, inorganiques et de bactéries. Les bactéries pathogènes survivent bien et relativement longtemps dans les dépôts et les sédiments, et constituent ensuite un danger potentiel pour la santé publique (Marino et al 1991, NWRW, 1989). Mais l'effet le plus problématique constitue cependant la diminution abrupte des teneurs en oxygène dans le milieu récepteur, responsable d'importantes mortalités piscicoles. L'ampleur du déficit va dépendre de la charge en matières biodégradables, en bactéries et des caractéristiques du milieu récepteur. La morphologie et l'hydrographie de la rivière vont ensuite déterminer l'étendue de l'impact (Harremoes 1988).

Les études de l'impact des rejets urbains sur la Seine se sont concentrées sur l'impact des rejets de la station d'épuration de Paris à Achères. Le débit des eaux rejetées en Seine par temps sec est de l'ordre de 30 m<sup>3</sup>/s. Contrairement au déversoir de Clichy ce débit est constitué majoritairement d'eaux traitées. Les rejets peuvent être suivi in situ en raison de la différence entre les conductivités des effluent et de l'eau de Seine (Chesterikoff et al 1991, Barillier et al 1992). Les effluent représentent la source majeur d'apport de matière organique à la Seine en aval de Paris. Les COD et COP du rejet dépassent le valeur en Seine d'une dizaine de mg-C/l. Cependant 6-kilomètres après le rejet le COP de la Seine retrouve sa valeur normale. Garnier et al (1992) ont démontré que la station d'épuration constituait un apports important des bactéries allochtones composé majoritairement d'un population de taille supérieure à 1µm. Ces bactéries ont des activités spécifiques trois à quatre fois plus élevées que la population autochtone de plus petite taille et sont à l'origine de l'essentiel de la dégradation de la matière organique rejetée en rivière (Servais et al 1993). Grâce au travail de Servais, Garnier et Barillier et l'utilisation des méthodes sophistiquées un grande partie des biomasses et activités des différents compartiments de l'écosystème a pu être quantifiée: la microscopie en épifluorescence (Porte & Feig, 1980) permet de déterminer le nombre de bactéries et d'estimer leur biomasse, l'incorporation de marqueurs tritiés rend possible les

mesures de la production bactérienne et de leur disparition (Servais 1990), tandis que l'incorporation du carbone 14 permet d'évaluer la production primaire (Williams et al 1979). Dans le cas de la Seine les bactéries ont été divisées en deux compartiments: des bactéries inférieures à 1  $\mu\text{m}$ , et des bactéries supérieures à 1  $\mu\text{m}$  sujettes à la sédimentation. Les grosses bactéries ont un taux de croissance 3 à 4 fois plus élevé que les petites, mais subissent un taux de disparition due à la sédimentation et au broutage plus élevé que les petites (Barillier et al 1992).

Les effets biologiques, dépendant principalement des concentrations biodisponibles des (micro) polluants, vont être modulés par la distribution spatiale et temporaire des organismes et les interactions éventuelles dans la chaîne trophique. La base de la chaîne trophique en rivière est constituée par la production primaire du phytoplancton. Beaucoup de travaux de recherche ont été entrepris sur la toxicité des micro polluants sur les algues (Brauwiers 1984). Les métaux lourds possédant des comportements souvent similaires ont été particulièrement étudiés. Les résultats ont montrés que seulement le ion libre ou sous forme lipophile, peut engendrer des effets toxiques comme l'inhibition de la production primaire ou de la croissance (Tessier 1991). Cependant aucune méthode d'analyse disponible actuellement ne permet d'estimer des concentrations faibles de l'ion libre sans traitement préalable. Une solution a été trouvée sous forme de logiciels de calcul de spéciation, utilisant les constantes d'équilibre des composants d'un milieu connu, donné leur concentration totale. Des logiciel comme MINEQL+ ou MTQL ont été utilisées par plusieurs auteurs pour estimer les concentration de l'ion libre (Schecher 1992). Les résultats obtenus après des extractions avec les résines, confirment les ordres de grandeurs calculés.

## Modèles

Comme la qualité des eaux de la Seine est devenue une préoccupation majeure des gestionnaires de l'eau, plusieurs modèles ont été développés pour aider à l'aménagement du bassin. Parmi ces modèles on peut compter Kalito (Lesouef et al, 1982), Monet et ProSe (Billen et al 1995). Les trois modèles développent une approche monodimensionnelle de la qualité d'eau en rivière. Ils se distinguent d'une part par la description du système hydraulique, mais avant tout par des approches différentes de la modélisation des processus écologiques. Kalito requiert le calage de divers paramètres tel que la vitesse de la dégradation de la DBO, tandis que les modèles Monet et ProSe sont des modèles déterministes ne nécessitant pas de procédures de calage. Kalito a été développé il y a une vingtaine d'années par l'Agence de l'Eau Seine Normandie pour évaluer l'implantation des ouvrages de traitement des eaux usées. Il rend compte de l'évolution des principaux paramètres physico-chimique de la qualité d'eau. Monet et ProSe sont deux modèles récemment développés dans le cadre du PIREN Seine, construits autour d'un noyau commun le modèle Rive (Billen, 1993). Rive représente l'ensemble des processus écologiques, caractérisant le fonctionnement de l'écosystème aquatique de la Seine. Monet décrit de manière synthétique le bassin versant de la Seine et l'axe fluvial Paris - Poses. Il est utilisé principalement pour prédire les évolutions saisonnières de divers variables. Grâce à une meilleure définition de l'hydraulique, le modèle ProSe permet de simuler les effets de courte durée dans un bief de la Seine, notamment

l'impact des rejets urbains par temps de pluie en région parisienne (Even 1995, Even et al 1997).

La plupart des modèles présentés jusqu'à maintenant, étaient des adaptations plus ou moins affinées du modèle fondamental de Streeter et Phelps (1925) dans lequel la vitesse de dégradation de la matière organique est supposé de premier ordre par rapport à la charge. Du point de vue microbiologique ce type d'approche est insatisfaisant, puisque la biodégradation est traitée comme un processus purement chimique, sans prendre en compte l'aspect biologique des transformations. Pour bien simuler les rejets une description correcte de la biodégradation et de la dynamique des bactéries hétérotrophes est indispensable. Le modèle ProSe contient ainsi une nouvelle formulation de la dégradation de la matière organique: le modèle HSB (Servais 1987, Billen et al 1989). Les matières organiques de rivières anthropisées peuvent être classées selon leurs origines: les matières organiques de type humique, provenant du lessivage des sols, les rejets domestiques, industriels ou agricoles et la production primaire. La plupart des matières organiques, quelle que soit leur origine, ne peuvent pas être utilisées directement pour la croissance bactérienne. Ce n'est qu'après l'hydrolyse exoenzymatique de macromolécules qu'une partie devient disponible sous forme de substrat direct pour les bactéries hétérotrophes. Le modèle HSB considère que la matière organique existe sous forme de trois fractions de poids moléculaire élevé: deux fractions biodégradable avec deux vitesses d'hydrolyse différentes et un stock de matière réfractaire. Les produits de l'hydrolyse sont rapidement consommés par les bactéries. Ils sont en partie transformés en CO<sub>2</sub> et en partie en biomasse. La biomasse bactérienne est sujette aux processus de broutage, lyse et sédimentation.

## Organisation du document

Ce document est composé de plusieurs articles de l'auteur ou d'articles faits en collaboration avec plusieurs équipes, concernées par le travail sur les rejets urbains par temps de pluie. Le document est structuré de l'amont vers l'aval, débute par le réseau d'assainissement, passe par le milieu récepteur et par quelques uns de ses composants pour finir par une description "modéliste" d'un rejet urbain par temps de pluie. Cependant ce travail ne prétend en aucun cas donner une vue exhaustive de cette problématique, mais tente d'apporter des pièces manquantes dans la mosaïque des processus constituant l'impact d'un rejet urbain par temps de pluie.

Pour une meilleure compréhension, les titres et les résumés des articles en anglais ont été traduits en français, en essayant de représenter au mieux leur contenu et de donner des informations complémentaires aux textes anglais.

Après un bref survol de la problématique du rejet urbain par temps de pluie, 3 chapitres se penchent sur des aspects différents influençant le bilan d'oxygène. Le premier chapitre est ainsi consacré d'une part à la caractérisation des eaux usées susceptibles d'être déversées et d'autre part aux évolutions des rejets in situ.

Les paramètres de qualité des eaux usées d'un réseau unitaire ont été évalués par temps de pluie avec l'accent sur leur modification au cours du passage dans le réseau. Cette étude

a été menée en parallèle avec SAFEGE sur un bassin expérimental à Boulogne -Billancourt limitrophe et en aval de Paris. Des mesures respirométriques en continu ont aidé à évaluer les cinétiques de la dégradation des matières organiques. La méthodologie développée pour la caractérisation de la biodégradabilité forme une partie explicite de ce chapitre.

La désoxygénation du milieu récepteur suite aux surverses unitaires, forme l'élément clef du deuxième paragraphe. Il s'agit d'établir une relation entre les quantités des matières organiques rejetées et les quantités d'oxygène manquant dans la Seine après un temps de séjour défini. La consommation d'oxygène est contrôlée par l'action de la biomasse bactérienne sur les différentes fractions du carbone organique. Les rejets ont été étudiés dans le bief situé entre Clichy et Chatou en aval de Paris, pour plusieurs raisons. D'une part parce qu'il reçoit les principaux rejets pluviaux de l'agglomération parisienne, et relativement peu de rejets diffus et d'autre part cette section est partiellement équipée des stations de mesures de SIAAP. L'impact a été étudié par i) la comparaison des données de qualité de temps sec et de temps de pluie, ii) le suivi des masses d'eau polluée depuis leur sortie aux déversoirs de Clichy jusqu'au barrage de Chatou et iii) la réalisation de bilans des polluants.

En analysant le bilan d'oxygène dans la Seine, on s'aperçoit de l'importance du phytoplancton. La désoxygénation hétérotrophe peut être accentuée par la diminution de la production primaire. Les teneurs de micro polluants observées dans les déversements sont susceptibles d'affecter la physiologie du phytoplancton dans le milieu récepteur. Le deuxième chapitre propose ainsi une analyse de la phytotoxicité des rejets urbains, et notamment de la présence d'inhibiteurs de la production primaire comme les métaux lourds. La complexité des mécanismes toxiques est développée plus en profondeur pour le zinc et le cadmium en présence de complexants organiques tel que le citrate.

La partie modélisation peut être vue comme un résumé des efforts dans la définition des paramètres écologiques d'un système fluvial anthropisé, la Seine. La modélisation nous permet d'évaluer des modifications du milieu telles que i) l'effet des conditions météorologiques avant le déversement ii) l'impact des effluents toxiques sur le phytoplancton ou iii) diminution de la biomasse ou COP déversé par prétraitement. Le troisième chapitre ne se substitue pas à la conclusion ni à la discussion générale, mais en fait partie intégrale.

Le chapitre "Discussion générale" est un chapitre de synthèse des résultats obtenus. Il contient les résultats les plus importants et leurs interprétations. Ce chapitre montre la démarche et les liens entre les paragraphes différents, écrits sous forme d'articles anglais ou français. Ce texte aurait pu être situé après l'introduction, mais la valeur du travail mentionné dans les articles perdrait ainsi son importance. Pour inciter les lecteurs à parcourir tous les chapitres, la synthèse a été placée à la fin du document.

"Conclusions et Perspectives" terminent le document, mais donnent en même temps des pistes pour de futures recherches.

## Bibliographie

- Bachoc A. (1992) Le transfert des solides dans les réseaux d'assainissement unitaires. *Thèse de doctorat, INP Toulouse*, 281p.
- Barillier A, J.Garnier, P.servais & G.Billen (1992) Apports et devenir de la matière organique dans la seine: Rôle des bactéries hétérotrophes. *Rapport CNRS PIREN Seine 1/92/01*, 20p.
- Billen G., P.Dégardin, S.Even et W.Thomas (1995) Inter comparaison des modèles Kalito, Monet et ProSe. *PIREN Seine Paris, AESN Nanterre*. 60p.
- Billen G. & J.Allardi (1993) Le fonctionnement de l'écosystème: analyses des processus et modélisation. *CNRS PIREN Seine rapport de synthèse 1989-1992 Vol.1 Université ParisVI* 160p.
- Brouwers C. (1984) Les algues et la pollution par les métaux lourds. *Revue des questions scientifiques* **155**(3):301-323
- CCI (1980) Au fil de l'eau . *Centre de Création Industrielle Centre George Pompidou & Ministère de l'environnement Paris* 94p.
- Chebbo G., J.M.Mouchel, A.Saget & M.Gousailles (1995) La pollution des rejets urbains par temps de pluie: flux, nature et impacts. *TSM* **90**(11):796-806
- Chebbo G. (1992) Solides des rejets pluviaux urbains, caractérisation et traitabilité. *Thèse de doctorat, ENPC Paris* 600p.
- Chesterikoff B., B.Garban and D. Ollivon (1991). Daily rhythms in the river Seine. relative impacts of natural and anthropogenic factors. *Water.Res.* **25**:1523-1528
- Deibec M., Mouchel J.M. and Paffoni C. (1997). Statistical analysis of oxygen depletion after rain events in the urbanized river Seine. *In preparation*.
- Ellis, J.B. Ed. (1988) Urban discharges and receiving water quality impacts. *Proceedings of 14<sup>th</sup> IAWPRC Conference Advance in Water Pollution Control July 1988 Brighton UK*
- Estèbe A. (1996) Impact de l'agglomération parisienne et de ses rejets de temps de pluie sur les concentrations en métaux des matières en suspension et des sédiments en seine en période estival. *Thèse de doctorat, Université Paris XII, Val de Marne* 300p.
- Even S., M.Poulin, J.M.Mouchel & G.Billen (1996) Simulating the impact of CSO's from greater Paris on the Seine river using the model ProSe.*Proceedings of 7th IUCSD September 1996 Hannover (I)*:581-586
- Even S. (1995) Modélisation d'un écosystème fluvial: la Seine. Le modèle ProSe. *Thèse de doctorat, Ecole de Mines Paris* 300p.
- Flores Rodriguez (1992) Les métaux toxiques dans les eaux pluviales en milieu urbain: caractéristiques physico-chimiques. *Thèse de doctorat Université Paris XII, Val de Marne* 500p.
- Garnier, J., Servais, P. & Billen, G., (1992). Dynamics of bacterio plankton in the river Seine (France): impact of Parisian effluents. *Can.J. Microbiol.*, **38** : 56-64. (Annexe 3.5)
- Harremoes P. (1988) Overflow quantity, quality and receiving water impact. *IN Ellis*(1988):9-16
- Lebreton L. (1996) Impact de la mise en suspension de sédiments urbains: évaluation expérimentale de la mobilité des métaux (Zn, Pb,Cu,Cd, Fe,Mn). *Thèse doctorat Université Paris XII, Val de Marne* 400p.
- Lesouef A. & A.André (1982) Mise au point d'un modèle de qualité de la Seine de Montereau à Poses. *rapport SHF 15<sup>ème</sup> journées de l'Hydraulique Nantes*, 80p.
- Marino R.P., J.J.Gannon (1991) Survival of fecal coliforms and fecal streptococci in storm drain sediment. *Wat.Res.* **25**(9):1089-1098

- Metcalf & Eddy Inc. (1984) Wastewater engineering. Treatment, Disposal & Reuse TATA McGraw-Hill New Delhi 920p.
- Morinigo M.A., R.Cornax, M.A.Munoz, P.Romero & J.Borrego (1992) Relationships between salmonella spp and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Wat.Res.* **24**(1):117-120
- NWRW (1989) Effecten van emissies op oppervlaktewater. *Hoofdrapport 9.1 VROM & STORA Den Haag, Nederland* 60p.
- NWRW (1991) Final report of the 1982-1989 NWRW research programme: conclusions and recommendations. *Ministry of Housing, Physical Planning and environment (VROM) & STORA Den Haag, Netherlands* 30p.
- Paffoni C. (1984) Caractérisation des eaux déversées par temps de pluie à l'usine de Clichy. *La Houille Blanche* **1/2**:33-38
- Ponge,F. (1989) Le parti pris des choses. *Gallimard poesie* 221p.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980). Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25** : 943-948.
- Raunkjaer, K. T.Hvitved-Jacobsen & P.H.Nielsen (1994) Measurements of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Wat.Res.* **28**(2):251-262
- Saget A. (1994) Base de données sur la qualité des rejets urbains de temps de pluie: distribution de la pollution rejetée. dimensions des ouvrages d'interception. *Thèse de doctorat ENPC Paris* 300p.
- Schecher W.D. and McAvoy D.C. (1992) MINEQL<sup>+</sup> : a Software Environment for Chemical Equilibrium Modeling. *Comput., Environ. Urban Systems* **16**, 65-76.
- Servais, P., (1990) Estimation de la production bactérienne en milieu marin par mesure du taux de synthèse protéique. *Oceanologica Acta*, **13**: 229-235. (Annexe 1.7)
- Servais P. (1987) Etude de la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes en rivière: Développement d'une démarche méthodologique et application à la Meuse belge. *Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles*, 270p.
- Servais P.and Garnier J., (1993) Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microb. Ecol* **25**:19-23
- Sogreah, Safège (1993) Etude de diagnostic du fonctionnement du réseau d'assainissement de Paris. *Marie de Paris, Direction de la protection de l'environnement section de l'assainissement de Paris* 40p.
- Tessier A. & Turner D.R. eds (1995) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *Wiley & Sons, New York*. 900p.
- Williams, P.B., R.C.T. Raine & J.R.Bryan (1979) Agreement between the C14 and oxygen methods of measuring phytoplankton production. *Oceanol Acta* **2** (4):411-416





# **1. CARACTERISATION de la MATIERE ORGANIQUE et de la BIOMASSE REJETEE par TEMPS de PLUIE par le RESEAU UNITAIRE**

*Première partie:*

**Le RESEAU**



## **Caractérisation initiale des matières organiques dans le réseau de Boulogne-Billancourt par temps de pluie**

**Biodegradable organic carbon and heterotrophic bacteria in combined sewer during rain events.**

Seidl M., G.Belhomme, P.Servais, J.M.Mouchel & G. Demortier

*proceedings of 7<sup>th</sup> International Conference on "Urban Storm Drainage"  
Hannover Germany, September 1996 p:229-224*

### **résumé**

Un petit bassin versant de la proche banlieue parisienne a été choisi pour évaluer les caractéristiques des eaux usées, qui transitent en réseaux unitaire en temps de pluie et en temps sec. Les premiers résultats montrent une forte différence entre les pluies. Les pluies de faible intensité au cours de la journée ne diminuent pas la conductivité, ni la turbidité des eaux collectées. Au contraire les pluies du soir font baisser les deux paramètres, en raison de la plus forte intensité des précipitations observées et de plus faible débit dans le réseau. Dans ce réseau aux faibles pentes, la majorité des pluies a provoqué une augmentation initiale de la turbidité, probablement liée à une resuspension des dépôts de temps sec.



*Proceedings of the 7th Int. Conference on Urban Storm Drainage Hannover, Germany (1996):229-234*

## **BIODEGRADABLE ORGANIC CARBON and HETEROTROPHIC BACTERIA in COMBINED SEWER during RAIN EVENTS**

M. Seidl<sup>(1)</sup>, G. Belhomme<sup>(1)</sup>, P. Servais<sup>(2)</sup>, J.M. Mouchel<sup>(1)</sup> and G. Demortier<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> CERGRENE, ENPC-ENGREF 93167 Noisy-le-Grand Cedex, France

<sup>(2)</sup> GMMA Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 221, B-1050  
BRUXELLES, BELGIQUE

<sup>(3)</sup> Agence de l'Eau Rhin-Meuse, BP 19 5716 MOULINS-LES-METZ, FRANCE

**KEYWORDS:** organic carbon, sewer, bacteria

### **INTRODUCTION**

The main impact of a combined sewer overflow (CSO) is generally an increased consumption of oxygen in the receiving waters due to an input of organic matter and bacteria. To understand and to model the impact it's necessary to know the quality of waste waters susceptible to cause a overflow. In particular, it must be stressed that the oxygen consumption process is not a chemical process, and therefore it is likely that first order kinetics are not relevant for such biological process. If, after calibration, a first order model may be acceptable for steady state situations, it will most likely not be good enough for highly transient situations such as CSO events where several processes with time scales of the order of few hours occur simultaneously (sedimentation of particulate organic carbon, bacterial growth and/or adaptation to new environmental conditions....).

At least, it is necessary to know the amount of particulate and dissolved organic matter, biodegradable or non-biodegradable, as well as the number of bacteria brought to the receiving system by CSO's. This information is necessary to run the model PROSE (Even et al., 1996), based for organic matter degradation description on the HSB model proposed by Billen and Servais (1989). Up to now, it was only available for dry weather conditions at the input or output of waste water treatment plants. Therefore, a sampling campaign was designed in Paris suburb to measure bacteria and organic carbon under wet and dry weather conditions in a combined sewer.

### **MATERIAL AND METHODS**

The studied catchment is in Boulogne, a 100000 inhabitants city just south-west from Paris, on the right bank of the river Seine, in the inner part of a meander, which explains rather low slopes. The catchment composed of essentially urban area was drained by a main ovoid collector, 130 cm width and 190 to 230 cm heigh, 1500 metres long, with a mean slope of 0.5%. Two

refrigerated sampling devices have been implemented at the street level with a support from SAFEGE concerning water level recording and sampling startup during rain events. The upstream station collects water from an 37.4 ha sub-catchment, while the total catchment, corresponding to the downstream sampling point was 47.6 ha. Special care was taken to keep the samples at 5°C during sampling and transport in order to avoid further bacterial growth. During a rain event sampling was activated by a rise of water level in the collector and set to take 24 samples in about 5 hours.

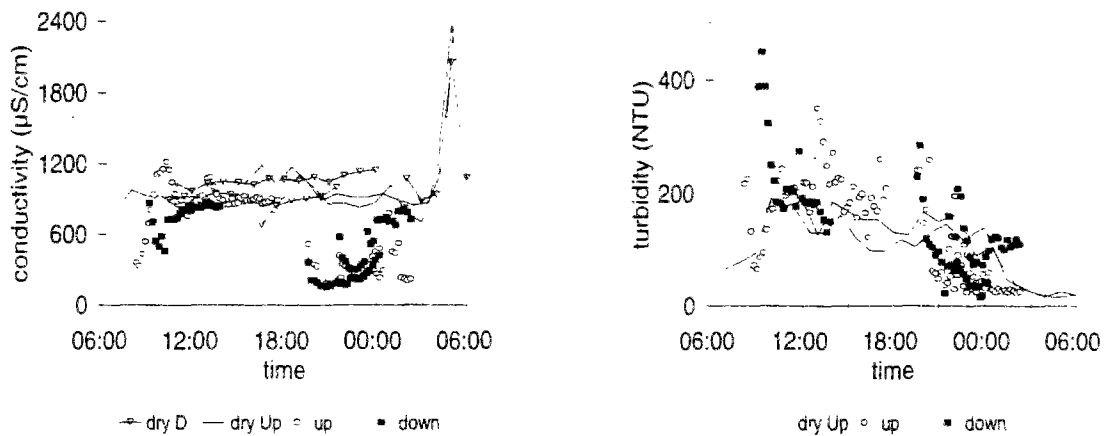
The usual quality parameters like conductivity, turbidity, suspended solids, COD, NH<sub>4</sub> and BOD<sub>5</sub> were measured following the AFNOR(1986) or APHA (1989) standards. The measurement of dissolved organic carbon (DOC), particulate organic carbon (COP) and their biodegradable fractions (BDOC and BPOC) and the counting of bacteria was done as described by Garnier et al. (1992). Dissolved and particulate organic carbon are measured after sampling and after 40 days of incubation under constant aeration. The dissolved or particulate biodegradable carbon fractions (BDOC or BPOC) are calculated as the difference between initial and final concentrations. Bacterial biomass is given in carbon units and is computed from the numbers and sizes of counted bacteria (Garnier et al., 1992). Time consuming parameters (BOD<sub>5</sub> and biodegradable organic carbon) were only quantified on 6 mixed subsamples per event.

## RESULTS AND DISCUSSION

We have treated about 6 rain events in the first half of 1995 : half of them upstream and half of them downstream the studied catchment plus characterization of dry weather at both sampling stations. As shown in figure 1, events collected during the day have a only a slight influence on the water quality of the waste water due to (i) the short period of the events and (ii) the high flow during the day period. The rain fallen in the evening was generally longer and more intense and induced a decrease of conductivity and turbidity. Turbidity data above the dry weather line may be caused by resuspension of deposits either from urban surfaces or inside sewer sediments. The relations between ammonium and conductivity shows the usual positive correlation, most data points fall inside a triangle due to the mixing of three sources : rain water with low conductivity and low ammonium content, drinking water with high conductivity and low ammonium content and mostly polluted waste waters with a higher conductivity and a high content of ammonium.

We have observed only a slight difference between the stations upstream and downstream. All the general parameters were only about 10% higher downstream, which suggest than the rain events collected at the downstream station were not significantly different from the events collected at the upstream station.

Despite the decrease of conductivity and ammonium content recorded during the rain events and due to mixing with urban runoff, the decrease of dissolved organic carbon (DOC) was much less pronounced. During rain events, the ratio DOC over N-NH<sub>4</sub> increases from 1-2 to 2-6 during rain events. This means that another source than dry weather wastewater significantly contributes to DOC. Since there are no other water sources than wastewater and rain water, and since the DOC content of rain water is very low compared to waste water, the DOC source must be a particulate source. The apparent excess of DOC may be due to colloidal particles measured as dissolved matter, either from urban surface deposits (very fine dust) or sewer deposits (remobilization of partly degraded organic matter).



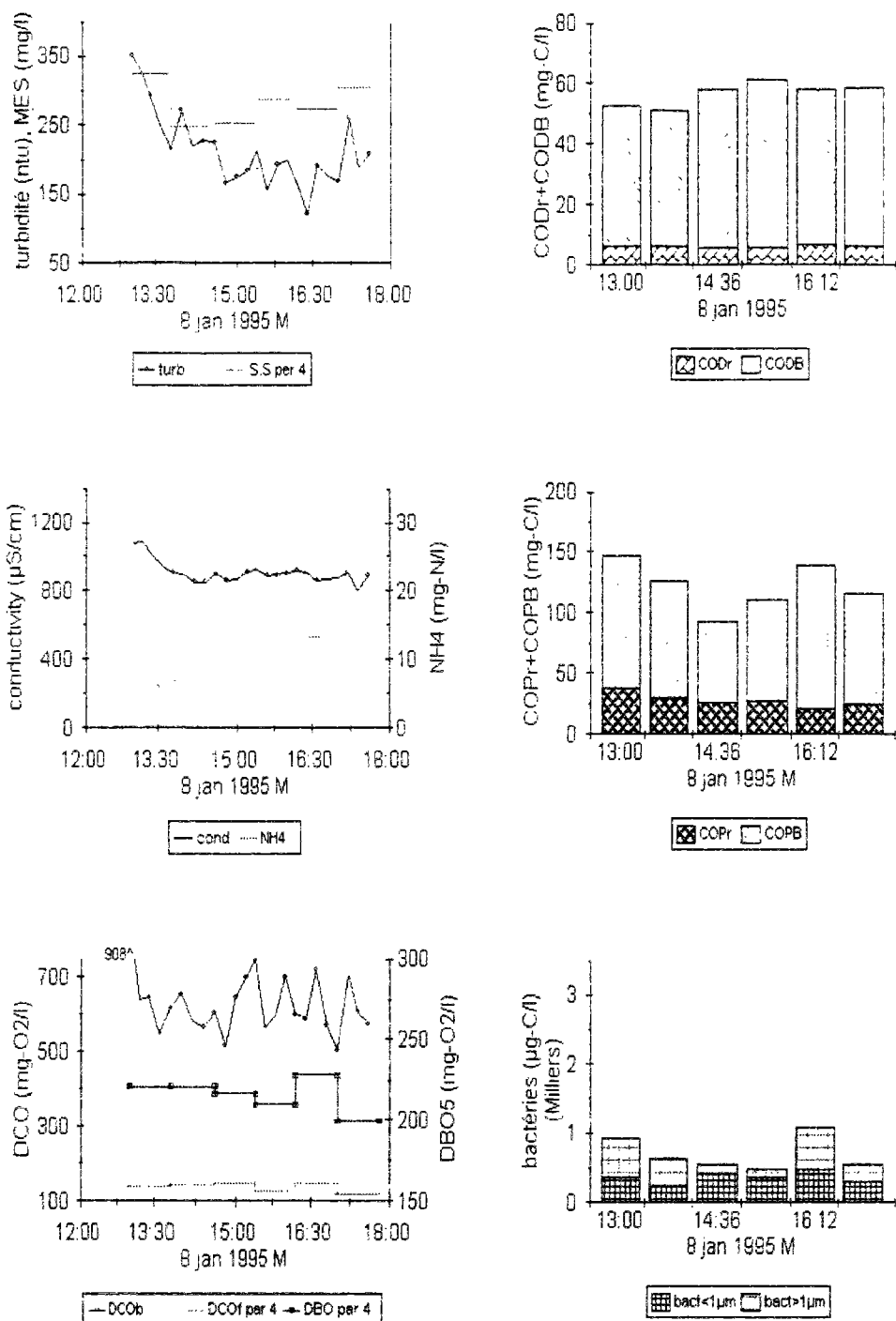
**Figure 1:** conductivity and turbidity in the Boulogne catchment during rain events , compared to dry weather data

Figure 2 and 3 show a typical example of the concentrations measured during rain events. In the smaller rain event DOC is very similar to dry weather DOC while POC can be somehow higher (0-20%). However, bacterial biomass is significantly lower (by a factor of 2). Because the conductivity decreased only very slightly during this event, the dilution by rain water was probably very low, which explains the non-decrease of DOC. However, the decrease of bacterial biomass is hardly explainable and might be due to unexpected fluctuations of the bacterial content of dry weather waste waters. During the stronger rain event of 24.01.95, conductivity as well as DOC, POC and bacteria drastically decreased mainly because of dilution. Higher POC values at the beginning of the event correspond to higher turbidity and suspended matter levels.

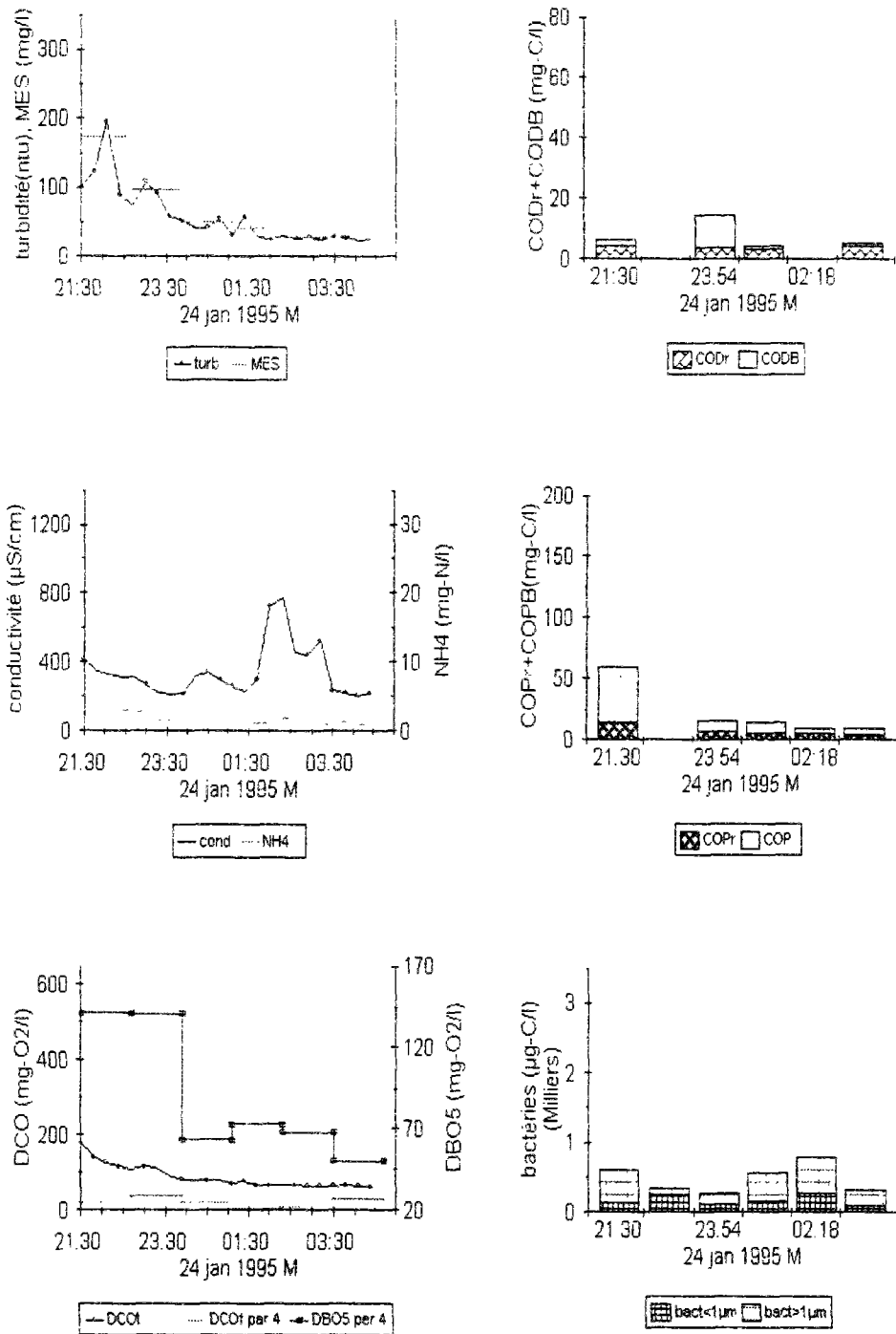
The ultimate (40 days) biodegradability of most collected samples during wet and dry weather was about 80%. DOC is more biodegradable than POC, up to 95% in general. However, during strong rain events (see figure 3), the residual fraction of dissolved organic carbon increases with respect to total dissolved organic carbon, the same is true but much less pronounced for POC when the lower values are reached. On the whole, significant correlations are found between BDOC and DOC and BPOC and POC with slopes of 95% and 80% respectively, but the residual contribution becomes more important for stronger rain events. This does not significantly modify the mean slope computed on a concentration basis. But, since CSO's mostly occur during the most important rain events, it may become extremely important when fluxes or impacts are considered.

The mean ratio of bacteria against TOC is a little more than 1% (which is significantly more than in the receiving medium, Garnier et al., 1992, Barillier 1992) but strong variations of this ratio can be observed. In particular, for both small rains collected in the morning at the upper sampling station, the ratio drops to 0.3%. In case of overflow such a difference would decrease the initial oxygen uptake by a factor of three since, after the overflow (before dilution and/or sedimentation) allochthonous bacteria growth dominates native bacteria.





**Figure 2 :** Evolution of water quality characteristics during the 8.1.95 small rain event at the upstream sampling station. Points figure measurements done on basic samples collected during 12 minutes. Bars corresponds to data measured on mixed samples composed of 4 basic samples.



**Figure 3 :** Evolution of water quality characteristics during the 24.1.95 strong rain event at the upstream sampling station. Points figure measurements done on basic samples collected during 12 minutes. Bars corresponds to data measured on mixed samples composed of 4 basic samples.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Agence de l'Eau Rhin-Meuse, representing the other french Agences de l'Eau in an Inter-Agences research program.

## REFERENCES:

AFNOR (1986). Eaux, méthodes d'essai. AFNOR, Paris.

APHA (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition. APHA, Washington. Clesceri L.S. Ed.

Barillier A. (1992). Caractérisation et dynamique de la matière organique d'un milieu fluvial anthropisé, la Seine. Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris. 103 p.

Billen G. et Servais P. 1991. Modélisation des processus de dégradation de la matière organique en milieu aquatique. in "Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques", Masson pub., 219-245.

Even S., Billen G., Mouchel J.M. and Poulin M. (1996). Simulating the impact of CSO's from greater Paris on the river Seine using the model PROSE. These proceedings.

Garnier J., Servais P. and Billen G. (1992). Bacterioplankton in the Seine river (France) : impact of the parisian urban effluent. Canadian Journal of Microbiology, 38:56-64.

Servais P., Barillier A. and Garnier J., 1995. Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. Annls. Limnol. 31:75-80

## **Composition et flux du carbone organique et de la biomasse bactérienne par temps de pluie, sur un bassin versant expérimental**

**Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events**

Seidl M., P.Servais, M.Martaud C.Gandouin and J.M.Mouchel  
- *proceedings of 2<sup>nd</sup> Int. Conf. Aalborg, Denmark May 1997 on  
"The sewer as physical, chemical and biological reactor"*  
- *Water Science Technology 1998-1 (37):25-33*

### **résumé**

Les flux des différentes fractions du carbone organique, (fraction dissoute et particulaire, biodégradable et réfractaire aussi bien que la biomasse bactérienne) ont été étudiés dans un ensemble de bassins expérimentaux. Cinq bassins unitaires de 2 à 400 hectares ont été échantillonnés pendant 6 événements pluvieux et 2 périodes de temps sec. En plus des paramètres classiques de qualité, tel que la DBO et le NH<sub>4</sub>, les différentes formes du carbone dissous et particulaire dont la biomasse hétérotrophe ont été mesurées. Les indices de biodégradation montrent une plus faible biodégradabilité des matières organiques par temps de pluie, en raison d'apport de carbone réfractaire par le ruissellement. La dégradabilité diminue avec l'intensité de la pluie. Les flux solides, de l'ordre de plusieurs kg/ha/h sont supérieurs en temps de pluie qu'en temps sec.



## ORGANIC CARBON BIODEGRADABILITY and HETEROTROPHIC BACTERIA along a COMBINED SEWER CATCHMENT during RAIN EVENTS

M. Seidl<sup>(1)</sup>, P.Servais<sup>(2)</sup>, M.Martaud<sup>(3)</sup>, C.Gandouin<sup>(3)</sup> and J.M.Mouchel<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> *CERGRENE, ENPC Cité Descartes, Champs/Marne, 77455 Marne-la-Vallée, France*

<sup>(2)</sup> *GMMA, ULB Campus de la Plaine, CP 221, B-1050 Bruxelles, Belgium*

<sup>(3)</sup> *SAFEGE, Parc de l'Île, BP 727, 92007 Nanterre, France*

### ABSTRACT

The aim of this study was the evaluation of fluxes of organic carbon and biodegradability of waste waters during rain events in order to better predict the impacts of combined sewer overflows (CSO). The combined sewer system studied was located in a densely populated urban catchment adjacent to Paris. Five subcatchments of different size have been monitored during several rain events for suspended solids, conductivity, ammonium, chemical and biological oxygen demand. In addition, two of these subcatchments have been evaluated for dissolved and particulate organic carbon, their biodegradable fractions, and the total bacterial biomass. Several indexes indicate a lower degradability of waste water during dry weather at the downstream stations, accompanied by an increase of bacterial size and bacterial biomass. A further decrease of biodegradable organic carbon related to rain intensity can be seen at all stations. Our results show a higher proportion of refractory organic carbon during rain events than during dry weather with a possible contribution of the in-sewer sediments to the bacterial wet weather flux.

### KEYWORDS

Bacteria, combined sewer, organic carbon, urban runoff, waste waters

### INTRODUCTION

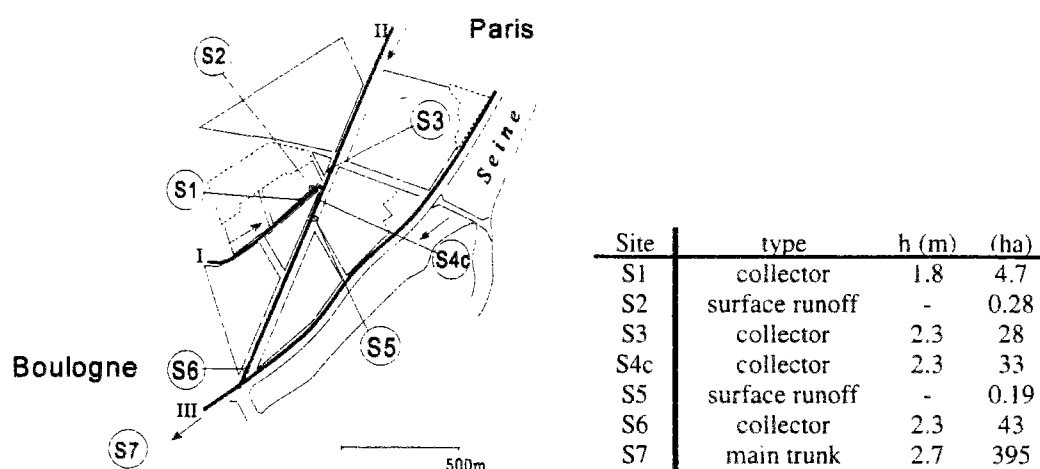
The main impact of a CSO is generally a depletion of oxygen in the receiving waters due to an input of organic matter and bacteria. The degree of impact will be dependent on the sewer type, the rain intensity and the sewage characteristics as well as the properties of receiving waters (Harremoes, 1988). In order to understand better and model accurately the CSO impacts, it is essential to characterize all aspects of the wet weather discharge. In particular, special attention should be paid to the heterotrophic biomass and the biodegradable organic carbon, which may control the in situ degradation kinetics (Even et al. 1996). In addition to complex solid transport patterns, the sewer acts as a biological reactor with bacterial growth and decay, substrate consumption and mineralization. The waste waters are depleted of oxygen as a result of aerobic degradation, rapidly replaced by facultative aerobiosis and anaerobiosis. Therefore one can expect that in addition to the organic matter, the heterotrophic populations will vary between dry and wet periods as well as with increasing residence time in the sewer system (Kaijun et al 1994).

The research program Piren-Seine brought out encouraging results regarding the characterization of biodegradable organic carbon of influents and effluents of the main waste water treatment plant of Paris, at Achères (Servais et al., 1995). This paper reports a detailed study on bacteria and carbon speciation during wet weather, conducted on behalf of Water Authorities in a Paris suburb (Seidl et al 1996a) in association with an important flux study of SAFEGE

Consulting Engineers (1996). Preliminary water quality data of a small subcatchment have been reported in Seidl et al (1996b).

## MATERIAL AND METHODS

The study area of the city of Boulogne, is situated on the right bank of the river Seine, adjacent to Paris. The sewer network is located upstream of the main WWTP Achères. The catchment is a densely populated urban area, drained by one main collector with a low slope. The sampling stations located at street level drained between 5 hectares for the smallest catchment upstream, and 395 hectares at the outlet of the Boulogne catchment (figure 1). The study contained two parts : (i) A first campaign started at the end of 1994, designed to evaluate the degradability of organic matter, during dry weather period and 6 rain events, four of them at site S4c, just after mixing of S1 and S3, and two of them at site S6. (ii) A second campaign lasted until February 1996, for quantification of fluxes at all sites during a second dry weather period and a series of another six rain events. Sites S2 and S5 are the outlets of very small catchments and collect only urban runoff from the street surface. Site S7 is situated much further downstream and gathers most of the waste and runoff waters from the whole city of Boulogne.



**Figure 1.** Sketch of the catchment area of Boulogne-Billancourt. Collector height and catchment areas are given in the table.

During the first sampling campaign, special care was taken to keep the samples at 5°C during collection (PBMOS Buhler samplers) and transport. During a rain event, the sampling was activated by rise of the water level in the collector and 24 samples were taken in about 5 hours. For the second campaign, the sites were equipped with Calypso samplers working at the rate of 10 samples per hour for the duration of water level rise. The flow and the water level were measured by acoustic sensors with on-line control of the sampling threshold. Classical water quality parameters including conductivity, turbidity, suspended and volatile solids (SS and SVS), chemical oxygen demand (COD), NH<sub>4</sub>, total Kjeldhal nitrogen (TKN) and biological oxygen demand (BOD<sub>5</sub>) were measured following the AFNOR (1986) or APHA (1989) standards. The separation between total and dissolved fractions was made by filtration under vacuum on glass fibre filters (Whatman GF/F or Schleicher & Schull equivalent). The measure of dissolved, particulate and total organic carbon (DOC, POC and TOC) and their biodegradable fractions, using a 40 days incubation period (BDOC, BPOC and BTOC) as well as the estimation of bacterial biomass by epifluorescence, were conducted as described by Servais et al. (1995). Several integrated samples from the first campaign were used for determination of degradation kinetics (Mouchel et al. 1997). A summary of the samples taken for analysis is given in table 1. A rain event consists of 24 samples, which were equally mixed (for biodegradation experiments) or mixed proportionally to the flow (for flux evaluation) to give 6 or 8 subsamples.

**Table 1.** Number of samples taken during each event for the 2 campaigns of the Boulogne study.

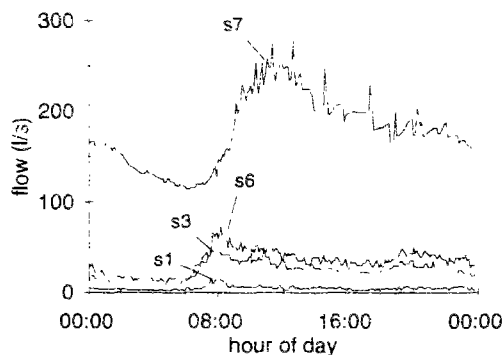
\*: Conductivity was not measured for winter rain events.

parameter	turbidity	conduct.	S.V.S	S.S.	COD total	COD soluble	BOD <sub>5</sub> total	BOD <sub>5</sub> soluble	Organic Carbon	biomass	TKN
1 <sup>st</sup> campaign	24	24	-	6	24	-	6		6	6	-
2 <sup>nd</sup> campaign	-	8*	8	8	8	8	8	8	-	-	8

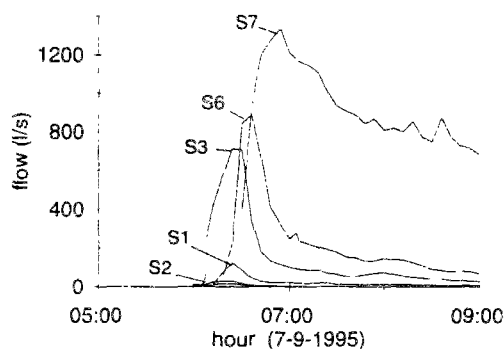
## RESULTS

### Hydrology

During the dry weather periods we observed at all sites the usual hydraulic diurnal cycle (figure 2). The daily flow maximum was slightly delayed with increasing surface area of the drained catchment. The hydraulic load decreased with increasing watershed and was about 70 m<sup>3</sup>/d/ha for S3 and S6, 25% higher for S1 and 40% lower for S7. A typical flow chart during a rain event is given for all sites in figure 3. The propagation of the peak flow appears faster during wet weather than during dry weather.



**Figure 2:** Hydro graphs for the 4 sites during dry weather (flow increases in order S1<S3<S6<S7).

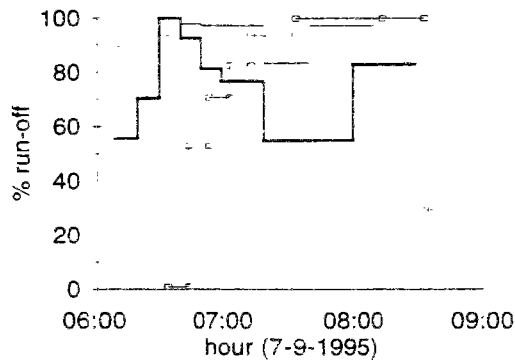


**Figure 3:** An example of hydro graphs for the rain event of 7<sup>th</sup> Sept. 1995, including street runoff. The total precipitation was 9.4 mm (flow increases in order S5<S2<S1<S3<S6<S7).

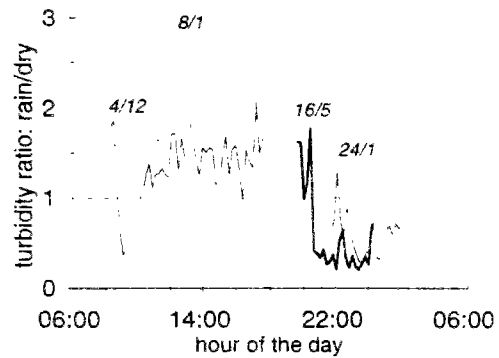
Because ammonium concentrations in urban runoff are usually very low compared to waste water concentrations, this cation can be used to estimate the proportion of rain and wastewater in collected samples. We decided to use NH<sub>4</sub> as a tracer of waste waters because of uncontrolled variations of chloride and conductivity data due to industrial activities and street de-icing. With regard to the important variations of ammonium concentrations during the day and night, special care was taken to select dry weather ammonium reference at the right hour of the day. Figure 4 shows that, during the event of 7<sup>th</sup> September 1995 (7-9-95), the smaller collector (S1) contained mainly runoff water, the larger collector at S3 contained different masses of rainwater, and further downstream at S7, only one mass of diluted water could be perceived.

The rain events of the first campaign, occurring during the day, modified only very slightly the sewer water quality because of (i) the short duration and low intensity of these events and (ii) the higher dry weather flow during the day. Rain events observed in the evening, or very early in the morning were longer, more intense and provoked a decrease of conductivity and turbidity. Figure 5 illustrates the evolution of turbidity at site S4c. A turbidity peak is observed at the beginning of all rain events, whereby for heavier rains (24-1-95 and 16-5-95) the turbidity may become even much lower than the corresponding dry weather value. 90% of all events collected during the second campaign at sites S1, S3 and S6 also showed a peak of suspended solids. A concentration of at least 450 mg-SS/l could be observed immediately at the start or just a few minutes after the activation of sampling, which means almost a doubling of the maximum daily dry weather concentration. These rapid fluctuations decrease along the sewer network (initial peaks observed at station S7 were lower) due to hydraulic damping inside the sewer and to the varying transit times of pollution peaks issued from different small sub-basins.





**Figure 4:** Variation of sewage composition in different collectors during the rain event 7-9-1995.



**Figure 5:** Evolution of turbidity during rain events, compared to the dry weather cycle. Results are given as a ratio of wet weather to dry weather (DW) concentrations.

#### Dry weather characteristics at different catchment scales.

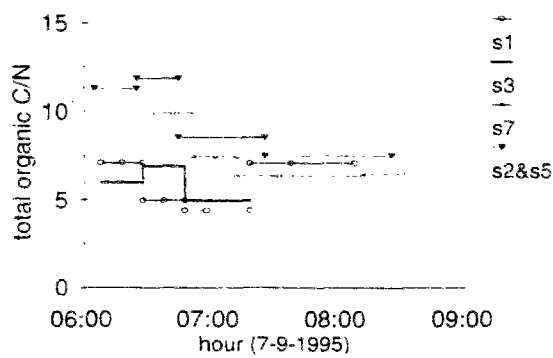
Daily mean, dry weather concentrations (table 2) have been calculated as ratio of the total mass of pollutant to the total water volume. The concentrations are in the same range as found elsewhere in greater Paris (Gromaire-Mertz et al 1997). The C/N ratios only refer to the organic matter. The first campaign allowed the determination of a significant regression between COD and TOC at sites S4c and S6, which was then used to compute TOC from the COD data obtained during the second campaign. Organic nitrogen was evaluated by difference between Kjeldhal nitrogen and ammonium nitrogen. We can observe a decrease of most parameters at station S7, which is most probably due to a dilution effect, but the increase of the C/N ratio at this station indicates a change in organic matter composition.

**Table 2.** Daily flows and flow mean concentrations for all sites during dry weather, average of data obtained in June and in October. *b*: biodegradability calculated as  $BOD_5 / COD_t$ . The flow error is < 10%.

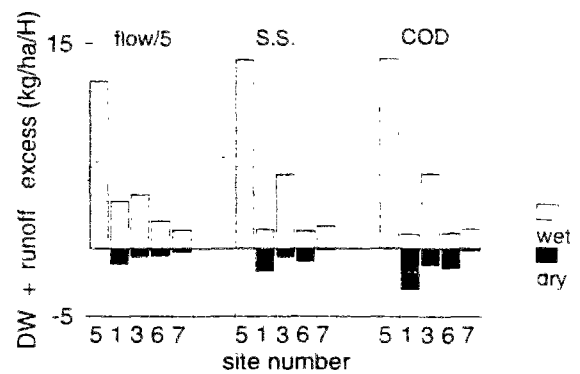
site	flow m <sup>3</sup> /day	S.S. mg/l	SVS mg/l	COD <sub>t</sub> mg-O <sub>2</sub> /l	COD <sub>s</sub> mg-O <sub>2</sub> /l	BOD <sub>5</sub> mg-O <sub>2</sub> /l	NH <sub>4</sub> mg-N/l	Cl mg/l	TKN mg-N/l	C/N	<i>b</i> %
S1	441	194	159	442	161	216	35	67	59	5,5	49
S3	1988	146	116	348	122	135	27	72	43	6,6	39
S4c	-	186	-	396	115	152	-	-	-	-	38
S6	3142	236	195	447	165	217	23	64	45	6,1	49
S7	15408	140	107	251	65	112	19	68	28	8,6	45

#### Water quality and biodegradability during wet weather.

Figure 6 demonstrates the fluctuation of the C/N ratio during the rain event of 7<sup>th</sup> September 1995. The initial C/N ratio of runoff material (sites S2 and S5) is very high compared to that of dry weather, due to the low concentration of total nitrogen in street deposits. By the end of the rain event, the C/N ratio of runoff water decreases simultaneously with that of its SS content, while the soluble COD remains almost constant. It seems that the C/N ratio of dissolved matter in urban runoff is much lower than that of its SS. At sites S1 and S3, the C/N ratio is similar or only slightly higher than what was found during dry weather despite an increase of the COD and SS fluxes by a factor of four or more at site S3 (figure 7). This would suggest that the source of excess organic matter flux does not originate principally from street runoff. At the site S7, the C/N ratios are higher, than what they were during dry weather. This is in contrast to site S3, where a contribution of an organic source is needed to explain the low C/N ratio.

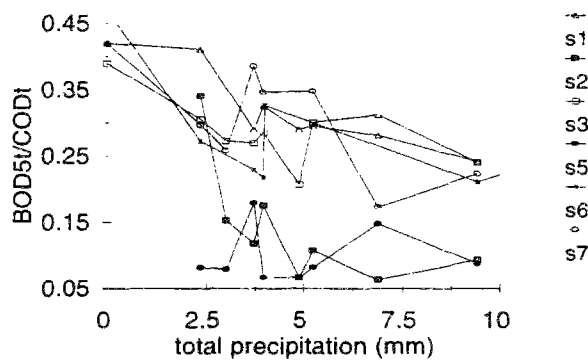


**Figure 6:** Evolution of organic C/N ratio during the rain event of 7<sup>th</sup> September, 1995. The dry weather average fall between 7 and 8 for all sites (not showed).



**Figure 7:** Comparison of dry weather fluxes (under the horizontal line) with excess wet weather fluxes (over the horizontal line) at all sites for the 7-9-95 event. The total transport during wet weather is equal to the sum of both bars. S.S. and COD<sub>t</sub> are expressed in kg/ha/h. flow<sub>t</sub> flows are expressed in m<sup>3</sup>/ha/h but have been divided by 5 in order to fit.

A significant difference in biodegradation, calculated by the BOD<sub>5</sub> to COD ratio, can be observed between autochthonous and allochthonous organic matter. The ratio for street runoff varies from 10% to 15%, is much higher for all other sites (figure 8), but still lower than the dry weather ratio. As in the case of the C/N ratio, the strong flux increase during wet weather cannot be ascribed solely to street runoff which BOD<sub>5</sub> to COD ratio is much too low. It must be noted that despite a higher C/N ratio, organic matter at site S7 does not appear less degradable compared to upper sites as revealed by the BOD<sub>5</sub> over COD ratio.



**Figure 8.** Biodegradability of organic matter during dry and wet weather, expressed as BOD<sub>5</sub> to COD ratio, as a function of the total precipitation.

The data concerning solids alone (figure 9), are in agreement with previous conclusions obtained for the total pollution. SVS data allow us to distinguish between the mineral and the organic fractions of suspended solids, while particulate COD and BOD<sub>5</sub> data (evaluated by difference between the total and the dissolved fraction) can be used to define operationally a degradable fraction of particulate organic matter within five days. The slight increase of mineral solids fraction during wet weather at sites S1 and S3 suggests that only a small amount of the less organic solids issued from street surface runoff can be mixed in SS loads observed at sites S1 and S3, which are not compatible with the large excess of SS flux. Indeed, the contribution of other sources of solids (runoff from roofs or yards as well as in sewer sediments) is required in order to explain the excess wet weather fluxes due to a pool of particles for which the characteristics are close to those of wet weather SS. At site S7 during wet weather, SS have a higher mineral content than they had at upstream sites S1 and S3.

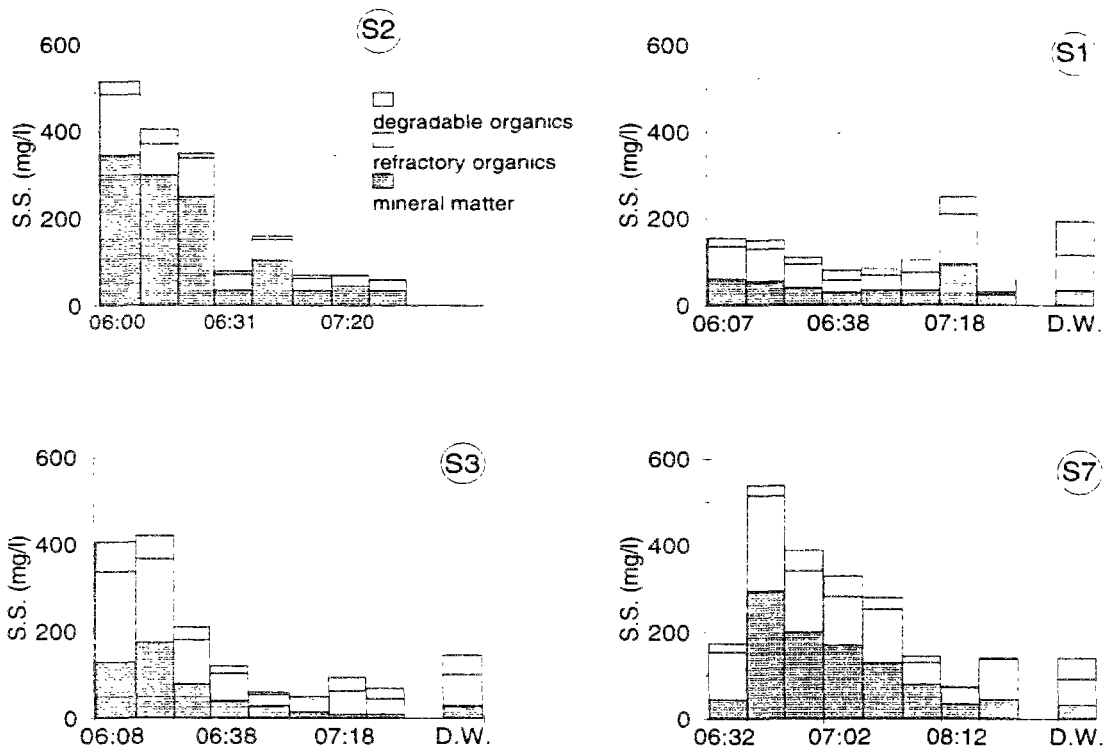


Figure 9. Characteristics of particulate matter collected at main sites during the rain event of 7<sup>th</sup> September 1995. A dry weather reference is given for the collectors S1, S3 and S7.

Degradation kinetics experiments (Mouchel et al, 1997) showed that the degradability of organic carbon was not the same at site S4c during dry weather and during a strong rain event (figure 10). During wet weather, both DOC and POC are less degradable than during dry weather, roughly 65% of organic carbon was degradable during the strongest rain event (16<sup>th</sup> May 1995), contrary to 78% during the dry weather. However, when all rain events are considered, including events of lower intensity, the BTOC to TOC ratio of 74%, is no more significantly different between dry and wet weather. The five days biodegradability, computed as BOD<sub>5</sub> to COD ratio, decreased slightly during wet weather according to data obtained from the second campaign.

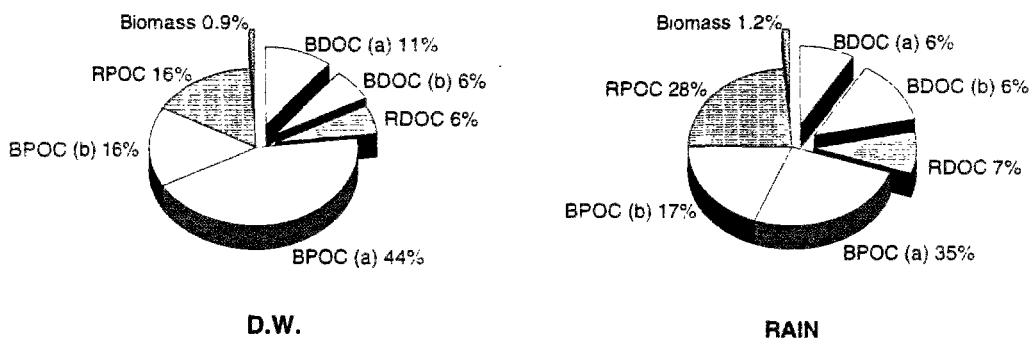
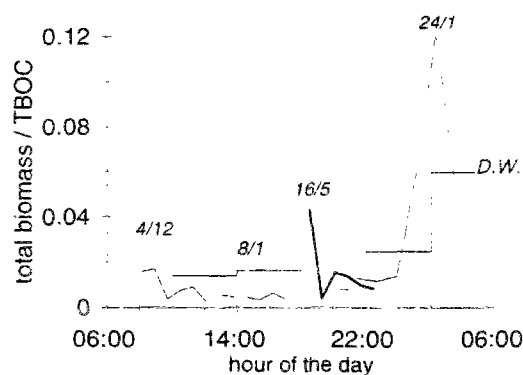


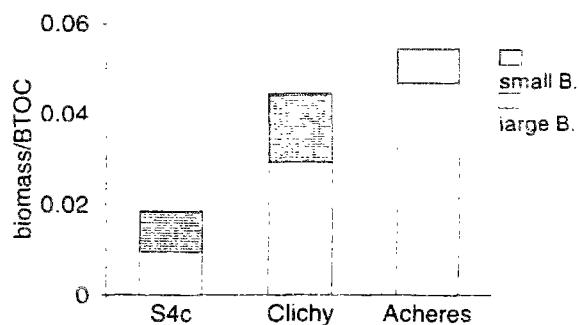
Figure 10. Mean composition of organic carbon at site S6/S4c during dry and wet period (16-5-95). BDOC(a): DOC biodegraded during the first 5 days of incubation, BDOC(b): DOC biodegraded between the 5<sup>th</sup> and 40<sup>th</sup> day of the incubation, RDOC : refractory DOC after 40 days. Same coding was used for POC.

## Bacterial biomass

Bacterial biomass is basically linked to BTOC, firstly because they have a common origin (waste waters or organic deposits) and secondly because high concentrations of degradable organic carbon favour the development of microbial biomass. To demonstrate the differences in bacterial development we present bacterial biomass data normalized to BTOC (figure 11). A bacteria peak is observed for both heavy rains sampled at site S4c during the first campaign. During the 16<sup>th</sup> May event, the bacteria peak is coincident with the SS peak just at the beginning of sampling. During the 24<sup>th</sup> January event, the peak is no longer simultaneous with the SS peak, but still with the maximum flow. We argue that the source of bacterial biomass, with high biomass to BTOC ratio, which was activated during both strong rain events should be rather old, favouring BTOC decrease and bacterial biomass increase compared to dry weather waste waters. Since its contribution is more dependant on flow than on rain intensity we consider that the deposits and biofilms in sewers are more serious candidates than dry weather deposits on urban surface.



**Figure 11:** Evolution of total biomass (expressed as a fraction of BTOC) during rain events at S4c.



**Figure 12:** Evolution of bacterial composition along the sewer trunks in greater Paris. (S4c: Boulogne < Cl: Clichy < As: Achères).

The bacterial biomass measured at site S4c during dry weather represents 1.2 % of BTOC and consists, calculated as carbon, of half small bacteria (<1 $\mu$ m) and half large bacteria (>1 $\mu$ m). The relationship between small and large bacteria is practically the same in all samples collected. The biomass of large bacteria is better correlated to particulate matter content, than that of small bacteria and particularly to BPOC than to the SS content. A part of these results differ significantly from data obtained downstream, at the outlet of the Paris sewer network, where the bacterial abundance was much higher (Servais et al. 1994). If we compare the relative composition of the biomass during dry weather along the sewer network, we can observe a rise in the total biomass and in large bacteria (Figure 11). Bacterial growth (in size and biomass) is probably a function of residence time and abundance of appropriate substrate. The residence time of waste waters in the Clichy catchment is about 8 hours, whereby 4 more hours are needed to reach Achères.

## CONCLUSIONS

Biodegradability of organic matter appears to decrease along the sewer system studied, as well as during the wet weather. Several biodegradability indexes have been used (organic C/N ratio, BOD<sub>5</sub>/COD ratio, BTOC/TOC ratio and SVS/SS ratio). The C/N and SVS/SS ratios show a lower degradability of dry weather waste water and waste solids at the downstream station S7. C/N ratio, BOD<sub>5</sub>/COD and SVS/SS ratios indicate that the degradability of waste water and waste solids decrease during wet weather in relation with the rain intensity. The BTOC/TOC ratio did not reveal such significant modifications during wet weather. The degradability of street runoff water and solids is much lower compared to dry weather waste waters. However flux estimations reveal that another pollution source with high degradability characteristics is necessary to explain water and SS characteristics observed during wet weather in this combined sewer network. This source could be in sewer deposits and biofilms.

Bacterial biomass and also bacteria size, increase inside the sewer network from upstream (Boulogne) to the downstream WWTP (Achères). This demonstrates the intensity of in sewer microbial processes and has to be related to the observed changes in degradability. During the stronger rain events, bacterial peaks can be observed, revealing

the contribution of a pollution source with a high bacterial biomass to BTOC ratio. Here again, in sewer deposits and biofilms should be suspected.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study was funded by the Inter-Agence program and coordinated by Agence de l'Eau Rhin-Meuse, and Agence de l'Eau Seine Normandie. Hauts-de-Seine Council and AESN also contributed to the study conducted by SAFEGE Consulting Engineers.

#### REFERENCES

AFNOR (1986). Eaux, méthodes d'essai. AFNOR, Paris.

APHA (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition. APHA, Washington. Clesceri L.S. Ed.

Even S., Billen G., Mouchel J.M. & Poulin M. (1996). Simulating the impact of CSO's from greater Paris on the river Seine using the model PROSE. Proceedings of 7th IUCSD September 1996 Hanover

Gromaire -Mertz, C.Chebbo & M.Saad (1997) Origins and characteristics of urban wet weather pollution in combined sewer systems Proceedings of 2nd Int.Conf. on Sewer , Aalborg Denmark, May 1997

Harremoës, P. (1988). Overflow quantity, quality and receiving water impact. Proceedings of 14th IAWPRC Conf. On Urban discharges July 1988 Brighton, Great Britain, Adv. in Wat. Pol. Control Pergamon

Kaijun W., G. Zeeman & G. Lettinga (1994). Alternation in sewage characteristics upon aging. Proceedings of Proceedings of 1st Int.Conf. on Sewer , Aalborg Denmark, May 1994

Mouchel J.M., M. Seidl & P. Servais (1997) Measure of biodegradation of waste waters during rain events by means of micro respirometry; *in preparation*

SAFEGE (1996) Etude des flux de pollution par temps de pluie sur un bassin versant test du département des Hauts-de-Seine: 1, 2 & 3. SAFEGE, Conseil Général des Hauts-de-Seine & AESN, Nanterre

Seidl M., P.Servais, A.Anzil & J.M.Mouchel (1996a). Dégradation des matières organiques dans le milieu naturel après les rejets urbains - Etude et quantification des processus. Cergrene ENPC Paris, Gmma ULB Bruxelles & Agence de l'Eau Rhin-Meuse.

Seidl M., G.Belhomme, P.Servais, J.M.Mouchel & G. Demortier (1996b). Biodegradable organic carbon and heterotrophic bacteria in combined sewer during rain events. Proceedings of 7th IUCSD Hanover, Germany September 1996

Servais P., Barillier A. & Garnier J., (1995). Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Annls. Limnol.* 31:75-80

Servais, P., Garnier, J., Demarteaue, N., Brion, N. & Billen, G. (1994) Caractérisation des apports de matières organiques, nutriments et micro-organismes par les rejets d'eau usées. IN: Rapport CNRS PIREN Seine 1994/III - Bassins versants urbains" GDR Analyse et modélisation des systèmes fluviaux anthropisés. LGA Univ Paris VI - Jussieu, Paris

## **Spéciation des matières organiques du réseau unitaire par temps de pluie et par temps sec**

**Comparison of parameters characterising organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather**

Pierre Servais, Martin Seidl & Jean-Marie Mouchel  
*submitted to Water Environment Research June 1997*

### **résumé**

Une meilleure caractérisation des matières organiques rejetées par temps de pluie, permet de mieux évaluer la désoxygénation in situ. Les paramètres classiques tels que les matières volatiles, la demande biologique en oxygène (DCO) ou la demande biologique en oxygène (DBO) peuvent être remplacés par des mesures adaptées du carbone organique. Ces mesures portent sur la phase dissoute (COD) ou particulaire (COP). Les deux fractions peuvent être divisées en carbone dégradable et réfractaire. Les relations reliant ces différents paramètres ont été déterminées dans un bassin versant expérimental d'environ 40 hectare en proche banlieue de Paris, par temps sec et par temps de pluie. Les résultats obtenus permettent d'extrapoler les valeurs des différentes variables à partir de mesures comme la turbidité, les MES ou la DCO. Les variables obtenues peuvent être utilisées dans les modèles écologiques récemment développés pour l'estimation des impacts des rejets urbains par temps de pluie.



Submitted to Water Environment Research July 1997

## COMPARISON of PARAMETERS CHARACTERISING ORGANIC MATTER in a COMBINED SEWER during RAIN EVENTS and DRY WEATHER

Pierre SERVAIS <sup>(1)</sup>, Martin SEIDL <sup>(2)</sup> and Jean-Marie MOUCHEL <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Groupe de Microbiologie des Milieux Aquatiques, UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES, Campus de la Plaine, CP 221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles.

<sup>(2)</sup> CERGRENE, ENPC-ENGREF, 6-8, rue Blaise Pascal, Cité Descartes, 77455 Marne-la-Vallée, France

### Abstract

In order to understand the impact of the combined sewer overflows on the river Seine (France), a fine characterisation of effluents in terms of organic matter and bacterial biomass has been carried out. Several sampling campaigns have been performed in a combined sewer located in Parisian suburbs under wet and dry weather conditions. Measurements classically used to study wastewater (suspended matter, chemical oxygen demand and biological oxygen demand) were compared with the estimate of biodegradable and refractory fractions of particulate and dissolved organic carbon. Relationships between these different parameters used to describe organic material in the effluents were established. With help of obtained relationships and values of classical variables for a given effluent, it is possible to estimate its composition in terms of biodegradable and refractory fractions of particulate and dissolved organic carbon and bacterial biomass. The latter parameters are essential for accurate modelling the impact a combined sewer overflow on a river using recently developed ecological models.

**Keywords:** Combined sewer, wastewater, organic matter, biodegradability, heterotrophic bacteria

### 1. Introduction

Degradation of organic matter by heterotrophic bacteria is one of the major processes controlling the oxygenation level of aquatic ecosystems and so their quality. In most aquatic ecosystems, organic matter is mainly from autochthonous origin but, for rivers flowing through urbanised areas, the waste water effluents can be the major source of organic matter. During rain events, combined sewer overflow can bring to the receiving natural waters



important quantity of organic matter leading to an increased consumption of oxygen. The case of the impact of the summer storms in Paris is well known. The storms leads to combined sewer overflows in the river Seine as, during the periods of intense rain fall, whole the water can not be transported by gravitary collectors to the Achères treatment plant, that is treating roughly 75 % of the Parisian area wastewater during dry weather. These overflows are sometimes responsible for complete desoxygenation of the Seine river downstream Paris (Seidl et al., 1997b) which leads to dramatic consequences for aquatic fauna as important fishes mortality. In these conditions, understanding and modelling the impact of combined sewer overflows on the river water quality has been considered as a priority.

As a part of the multidisciplinary study of the Seine river (the PIREN-Seine program), ecological models have been elaborated to understand the river functioning and to test scenarios of rehabilitation (Billen et al., 1993; Even et Poulin, 1993; Even et al., 1997). These models, contrary to most models describing organic matter degradation, takes explicitly into account the compartment of the bacteria responsible for the degradation of organic matter in the river and considers distinctly the biodegradable and refractory fractions of dissolved and particulate organic matter. It must be stressed that these models are more adapted, than the models based on first order kinetics for characterising organic matter degradation, to describe transient situations such as combined sewers overflows where several processes with time scale of the order of few hours can occur simultaneously. Moreover, recent works in microbial ecology have clearly shown that domestic effluents also constitute an important source of bacteria which can play a considerable role in the degradation of organic matter in the rivers (Garnier et al., 1992a,b; Servais and Garnier, 1993). Therefore, it is important to take into account the input of bacteria to the rivers due to combined sewer overflows

The application of these models to situations of combined sewer overflows requires as input data a characteristics of the organic matter brought by the overflows in terms of the variables of the model (biodegradable and refractory parts of the dissolved and particulate organic carbon) rather than in the units classically used to describe wastewater and the functioning of treatment plants as biological oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD). It is also required to estimate the input of bacteria through combined sewer overflows.

In order to determine and model the impact of the combined sewer overflows on the river, a fine characterisation of effluents in terms of organic matter (particulate versus dissolved, biodegradable versus refractory fractions) and bacterial biomass has been carried out during several sampling campaigns performed in a combined sewer located in Parisian suburbs under wet and dry weather conditions. The data of this characterisation, including the fluctuations of the water quality during rain events and the relationship between the water quality and the kind of rain event have been discussed by Seidl et al. (1997a). The objective of this paper is to investigate the relationships between different parameters used to describe the particulate and dissolved organic material in the effluents. These relationships are of significant importance in order to extrapolate from classical suspended matter (SM), BOD and COD measurements the variables characterising the wastewater used in the models quoted here above.

## 2. Material and methods

### 2.1 Sampling stations

The studied catchment is in Boulogne, a 100000 inhabitants city located just south-west from Paris (France), on the right bank of the river Seine, in the inner part of a meander. This situation explains the rather low average slope in the catchment: 0.5 ‰. The catchment, essentially composed of urban area, was drained by a main ovoid collector, 130 cm width, 190 to 230 cm height and 1500 meters long. An upstream station which collected water from an 37.6 ha sub-catchment was investigated in addition to an downstream station located at the outlet of the total catchment (47.6 ha).

### 2.2 Sampling strategy

Two refrigerated sampling devices have been implemented at the street level with a support of the SAFEGE Company concerning the water level recording. Eight rain events and four dry weather periods were sampled between August 1994 and January 1996. The sampled rainfalls ranged from 0.8 to 10 mm. The complete hydrology of the rain events investigated are precisely described in Seidl et al. (1997a). The sampling startup during rain events was given automatically when the water level reached a given threshold. This threshold was established immediately above the maximum water level observed during dry weather. During rain events, the sampling period was about 5 hours which is long enough to cover most the rain event on such a small catchment. Twenty four bottles were filled up during the sampling period. During dry weather, the sampling periods were 24 hours, with 24 bottles filled up by the collection of 6 samples each hour. During both dry weather and rain event, the 24 samples were mixed by group of 4 to obtain finally 6 samples for carbon and bacterial analysis. Special care was taken to keep the samples at 4 to 6 °C during sampling and transport in order to avoid biodegradation during this period.

### 2.3 Suspended matter

Suspended matter (SM) was estimated as the weight of material retained on a precombusted (550 °C) Whatman GF/F membrane (diameter 4.7 cm) per volume unit after drying the filter at 60 °C. The volume filtered was in general 50 ml. Replicates were performed for each measurement and the standard deviation on the average value ranged between 2 and 8 ‰.

### 2.4 Organic matter analysis

The following pools of carbon were analysed on the wastewater samples: the chemical oxygen demand (COD), the biological oxygen demand over a five day period (BOD), the dissolved organic carbon (DOC), the particulate organic carbon (POC), the biodegradable fractions of DOC (BDOC) and of POC (BPOC). Total organic carbon (TOC) was obtained as the sum of DOC and POC and the biodegradable fraction of TOC (BTOC) as the sum of BDOC and BPOC.

### *Chemical oxygen demand (COD)*

The chemical oxygen demand was determined following the micro method HACH on 2 ml samples. The oxidation of the sample by potassium dichromate in acid conditions was performed during 1.5 hour at 150 °C in close pressure tubes. The lecture of the result was made by colorimetry; the potassium hydrogénéphthalate was used as organic matter reference for the calibration ranges. Two calibration ranges were used: 15 to 150 mg/l and 150 to 1500 mg/l. The reproducibility error was lower than 5 % when the right calibration range was used. The COD was also measured after filtration on a precombusted (550 °C) Whatman GF/F membrane so that we could estimated the dissolved fraction of COD (COD filt.). The particulate fraction of COD (COD part.) was obtained by difference between total and filtered fraction.

### *Biological oxygen demand (BOD)*

The biological oxygen demand (BOD) was determined by measuring oxygen consumption in diluted samples (40, 60 and 160 times with a commercialised mineral water with stable composition and low carbon content water) incubated over 5 days at 20 °C following the French normalisation (AFNOR, 1994). For the calculation of the BOD, samples in which the oxygen level ranged between 15 and 75 % of the initial level were taken into account. The accuracy of the method when two different dilution can be considered is around 10 %.

### *Dissolved organic carbon (DOC)*

For DOC analysis, the samples were filtered through pre-combusted (4 hours at 550 °C) fibreglass Whatman GF/F filters. DOC concentration was determined with a Dorhman DC180 Total Carbon Analyser using ultra-violet persulfate oxidation of organic carbon, followed by infra-red spectrophotometric detection of the CO<sub>2</sub> produced. The accuracy of the DOC determinations was about 0.05 mgC/l.

### *Particulate organic carbon (POC)*

For POC analysis, water samples (1 to 5 ml) were filtered through a 1 cm diameter pre-combusted fibreglass filter (Whatman GF/F) using a syringe. But, usually, several pieces (1/10 in surface) of the filter previously utilised for the SM determination were used for POC estimations. Both techniques were compared on 10 samples and no significant difference was found. Organic matter retained on the filters was oxidised by catalytic combustion; the CO<sub>2</sub> produced was determined using the same detector as for DOC measurement. The accuracy of the POC determinations were about 0.05 mgC/l.

### *Biodegradable fractions of DOC (BDOC) and POC (BPOC)*

The experimental procedure used to determine in parallel the biodegradable fraction of DOC (BDOC) and of POC (BPOC) was as follows (Servais et al., 1995): just after collection, the water sample to be analysed was incubated at 20 +/- 0.5 °C; during the incubation the sample was intermittently oxygenated by air bubbling in order to maintain aerobic conditions. In order to avoid carbon contamination by the aeration of the batch system, the air was previously bubbled in two successive bathes of sulfochromic mixture and one bath of distilled

water before injection in the batch system. Subsamples for DOC and POC determinations were collected in the batch at the beginning of the incubation and after 45 days of incubation. Previous experiments have shown that a period of 45 days was long enough to reach stable values of DOC and POC: the remaining organic carbon at this moment was considered as the refractory part of the organic matter. BDOC and BPOC were calculated as the difference between concentrations, in DOC and POC respectively, at the beginning of the batch experiment and the stable values reached at the end of the incubation. The biodegradable fraction of TOC (BTOC) was calculated as the sum of BDOC and BPOC.

## 2.5 Total bacterial biomass

Total bacterial numbers were determined by epifluorescence microscopy at  $1000 \times$  magnification after DAPI (4-6 Diamino 2 phenylindole) staining, following the procedure of Porter and Feig (1980). In order to apply this technique which is now classical in microbial ecology to waste waters it was necessary to break large bacterial aggregates which prevent correct enumeration by microscopy. The samples were thus sonicated during 20 seconds using a Braun Labsonic at a power of 30 W before preparation of the sample for microscopy. A comparison of the biomass estimated with and without sonication of the sample before preparing the microscopic slide has shown that the biomass estimated using the procedure without sonication was in average 2.1 times underestimated with respect to the biomass determined in the procedure including sonication. The bacteria were counted and classified into 24 size classes by comparison to an eye piece graticule and the biovolume in each class was calculated. Biomass was estimated from the abundance and biovolume distribution using the carbon/biovolume conversion factor proposed by Simon and Azam (1989) which varies in relation to cell volume, from  $4 \times 10^{-13}$  gC. $\mu\text{m}^{-3}$  for smaller bacteria ( $0.026 \mu\text{m}^3$ ) to  $1.3 \times 10^{-13}$  gC. $\mu\text{m}^{-3}$  for larger ones ( $> 0.4 \mu\text{m}^3$ ). As a bimodal size distribution has been observed in the Seine river and in treated effluents (Garnier et al., 1992a,b; Servais and Garnier, 1993) biomass have been calculated for two size classes, namely small bacteria (greatest dimension less than  $1 \mu\text{m}$ ) and large bacteria ( $1 \mu\text{m}$  and more).

## 3. Results and Discussion

Table 1a and 1b presents the data (minimum, maximum values, average and standard deviation) of the analysis performed during the present study respectively during rain events and during dry weather. The fluctuations for each parameters are very large in both data sets as indicated by the high values of the standard deviations. The average concentrations of both the particulate and the dissolved fractions are always higher for the dry weather than for the rain events. The most important difference is observed for the suspended matter with an average value more than 5 times higher during dry weather than during rain events. Concerning the organic matter the average value of POC is 3.2 times higher while the average value of DOC is 2.3 times higher for the dry weather with respect to rain events. High dry weather values occurred at the downstream station where resuspension is suspected. The very low slope enhances deposition, while the moving downstream gates inside the sewerage system could have locally modified hydraulic conditions. Once excluded a set of high values obtained during one particular dry weather survey, the maximum values of all the data parameters partly supported by suspended solids (SM, POC, BOD, COD) are divided by a factor about 2.

**Table 1a & 1b.** Range of the values measured for the main parameters investigated in this study during rain events and during dry weather

<i>RAIN events</i>		<i>n</i>	<i>Range</i>		<i>Average</i>	<i>STDEV</i>
			<i>Min.</i>	<i>Max.</i>		
SM	mg/l	36	28.6	325	78.5	49.1
COD	mg/l	36	65.8	686	283	227
BOD	mg/l	30	39.9	221	126	59.9
TOC	mgC/l	35	11.7	198	78.5	49.1
POC	mgC/l	36	8.6	146	58.1	37.6
DOC	mgC/l	35	3.1	52.3	20.8	13.6
BB	mgC/l	36	0.17	3.11	0.87	0.68

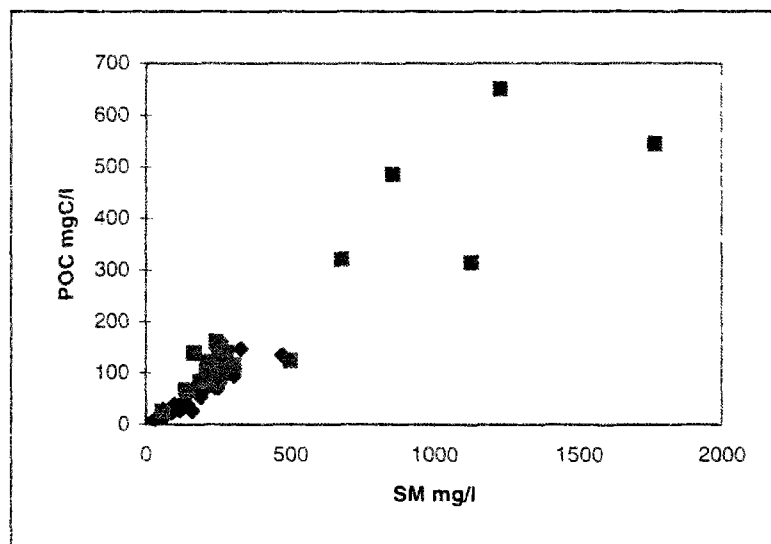
  

<i>DRY weather</i>		<i>n</i>	<i>Range</i>		<i>Average</i>	<i>STDEV</i>
			<i>Min.</i>	<i>Max.</i>		
SM	mg/l	24	56.1	1764	425	416
COD	mg/l	24	111	2060	746	499
BOD	mg/l	24	52.4	680	267	168
TOC	mgC/l	24	35.9	696	235	159
POC	mgC/l	24	24.7	650	187	160
DOC	mgC/l	24	11.2	63.1	48.3	12.9
BB	mgC/l	24	0.43	6.45	2.19	1.85

### *Suspended matter (SM)*

In routine measurements, the suspended matter content of a wastewater is sometimes estimated by turbidity measurements (expressed in NTU units) as it can be easily determine by "on line" systems. In this study, we have verified that a excellent correlation ( $r^2 = 0.97$ ,  $n = 60$ ) existed between both variables (data not shown). The average ratio SM/NTU for all our samples was equal to 1.41, this ratio was not significantly different for the rain events ( $1.38 \pm 0.30$ ) and for the dry weather ( $1.45 \pm 0.36$ ).

In figure 1, POC data were plotted against the SM data for all the analysed samples. A significant correlation was found ( $r^2 = 0.85$ ). The average ratio POC/SM for the complete set of data was  $0.4 \pm 0.12$ . If we consider an average percentage of carbon in the organic matter of 50 % (this percentage varies depending on the organic matter composition between 40 % for the carbohydrates, 45 % for the proteins and 75 % for the lipids), we can calculate that, in average, the organic matter represents roughly 80 % of the suspended matter. In our samples, the ratio POC/SM was higher for the dry weather ( $0.48 \pm 0.14$ ) than for the rain events ( $0.35 \pm 0.08$ ). This indicates a little more important contribution of the mineral material to the suspended matter during wet weather. The average value of the ratio POC/SM during dry weather indicates that, under these conditions, almost all the suspended matter were from organic origin. During wet weather, organic matter was still the major part of suspended solids.



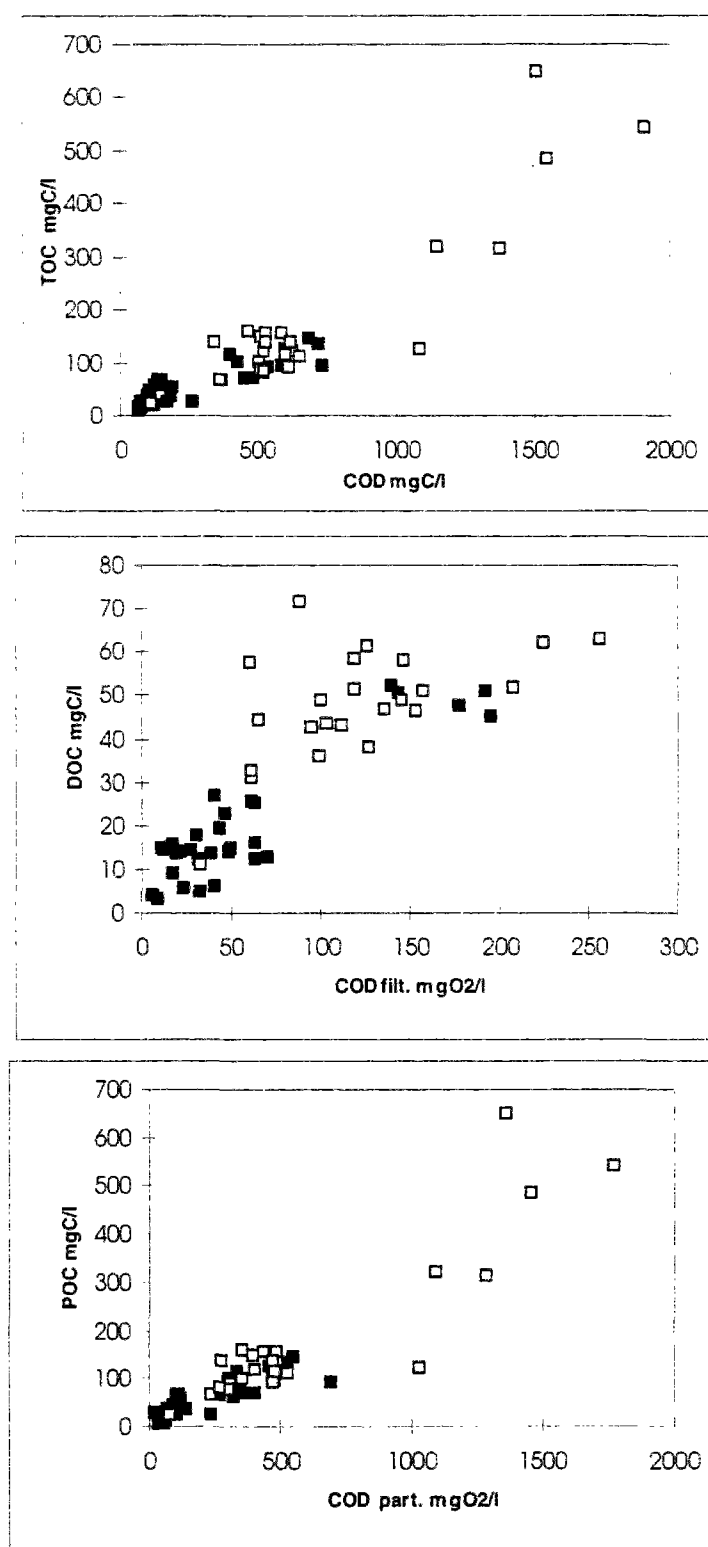
**Figure 1:** POC data plotted against SM data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (○). Regression straight line:  $POC = 0.38 SM + 8.77$  ( $r^2 = 0.85$ ,  $n = 60$ ).

The data of the particulate fraction of chemical oxygen demand (COD part.) were compared with the SM levels for the complete set of data. A significant correlation ( $r^2 = 0.88$ ,  $n = 60$ ) was found (data not shown). The average ratio COD part./SM was equal to  $1.36 \pm 0.46$ . This ratio was lower for the rain events ( $1.19 \pm 0.49$ ) than for the dry weather situations ( $1.61 \pm 0.29$ ). This confirms the more important contribution of the organic material to the SM during dry weather situations.

### *Organic matter estimation*

During the present study organic matter was estimated using classical methods usually applied for the study of wastewater as the COD and the BOD but also by measurements of the concentrations of dissolved (DOC) and particulate organic carbon (POC). In this section, the data gained with both approaches are compared. In figure 2, TOC carbon data were plotted against COD and the same figures were also built for the dissolved (DOC plotted against COD filt.) and the particulate fractions (POC plotted against COD part.). The COD/TOC was in average for all the collected samples  $3.34 \pm 1.20$  which means an oxygen consumption of 3.34 g of oxygen required to oxidise 1 g of organic carbon. The average ratio COD/TOC were not very different for the rain events and the dry weather samples, respectively  $3.37 \pm 1.35$  and  $3.30 \pm 0.98$ . Concerning the dissolved fraction, the average ratio COD filt./DOC was  $2.84 \pm 1.26$  while, for the particulate fraction, the ratio COD part./POC was in average  $3.58 \pm 1.52$ . The values of the ratios COD filt./DOC and COD part./POC which correspond respectively to oxygen consumption of 2.84 and 3.58  $gO_2/gC$  indicate that the particulate organic material seems to be more reduced than the dissolved material.

Usually a molar ratio of 1 mole of carbon oxidised per mole of oxygen, i.e. 2.67 g of oxygen per g of carbon: a stoichiometric value when glucose is used as representative from the organic matter. However depending on their oxidation state, other organic compounds can have a different oxygen demand. Based on the composition of the raw waters of the Achères



**Figure 2:**

a) TOC data plotted against COD data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).

Regression straight line:  $TOC = 0.29 COD + 4.45$  ( $r^2 = 0.90$ ,  $n = 59$ )

b) DOC data plotted against COD filt. data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).

Regression straight line:  $DOC = 0.26 COD_{filt.} + 9.76$  ( $r^2 = 0.66$ ,  $n = 59$ )

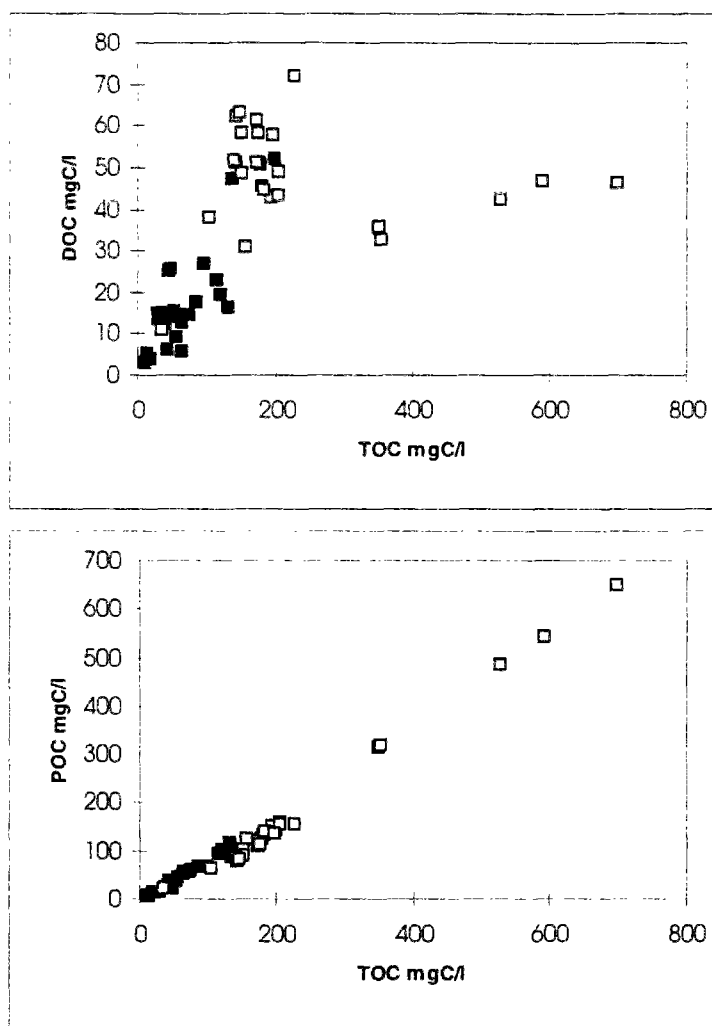
c) POC data plotted against COD part. data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).

Regression straight line:  $POC = 0.30 COD_{part.} - 2.53$  ( $r^2 = 0.84$ ,  $n = 60$ )

treatment plant in terms of proteins, carbohydrates and lipids estimated by Barillier (1992), we have calculated a theoretical oxygen demand of 3.2 g of oxygen per g of carbon for the raw water organic matter using respectively an oxygen demand of 2.67 for carbohydrates, 2.7  $\text{gO}_2/\text{gC}$  for proteins and 3.83  $\text{gO}_2/\text{gC}$  for lipids (Pitter and Chuboda, 1990). The values of oxygen consumption found for the particulate and the dissolved organic matter of the dry weather and rain events sampled in this study were completely in the range of this theoretical calculation

### *Dissolved and particulate fractions of the organic matter*

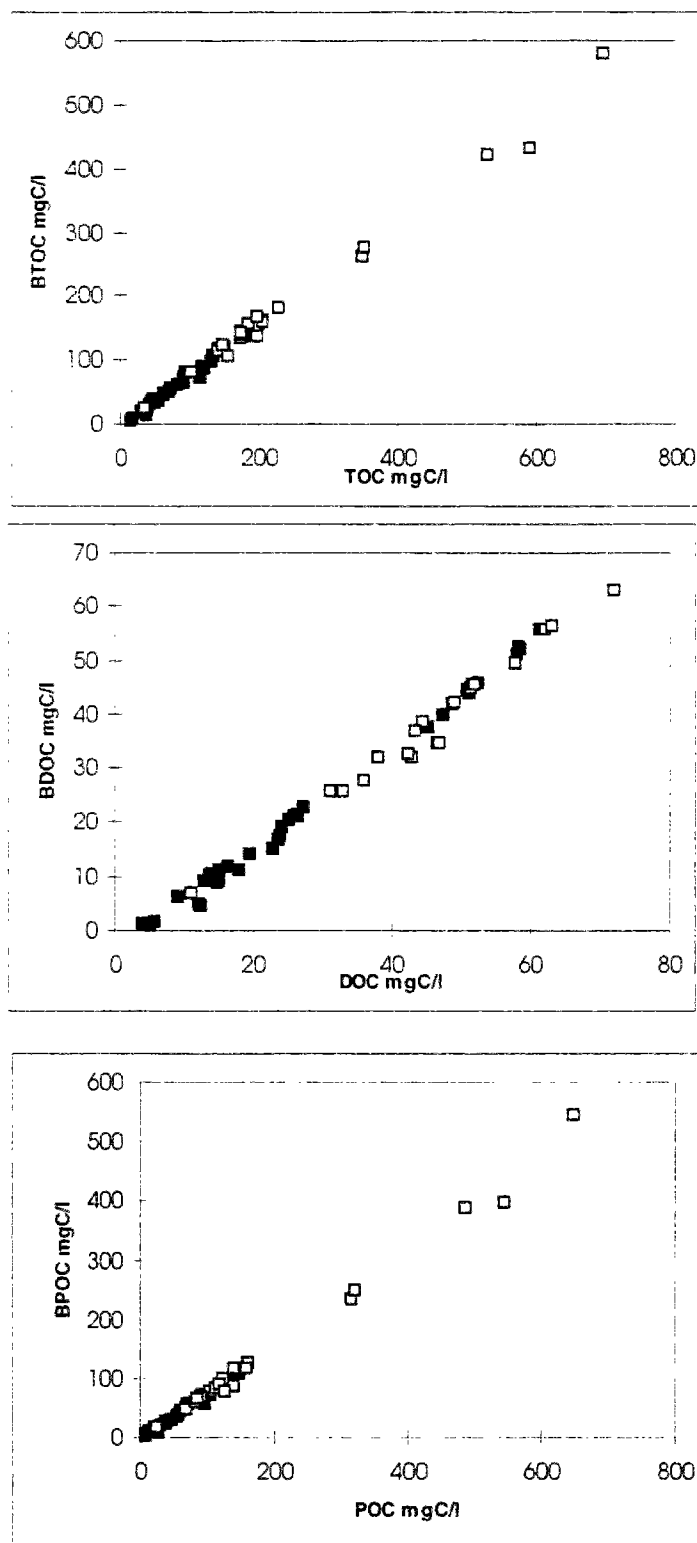
In figure 3, the data of DOC and POC were plotted against the data of TOC. If we except the samples collected during dry weather conditions in June 1995 which had extremely high level of SM and POC (POC higher than 300  $\text{mgC/l}$ ), very significant correlations were observed indicating a constant contribution of the POC and the DOC to the organic matter.



**Figure 3:**

- a) DOC data plotted against TOC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).  
Regression straight line:  $\text{DOC} = 0.07 \text{ TOC} + 20.9$  ( $r^2 = 0.29$ ,  $n = 59$ )
- b) POC data plotted against TOC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).  
Regression straight line:  $\text{POC} = 0.92 \text{ TOC} - 20.9$  ( $r^2 = 0.98$ ,  $n = 59$ )





**Figure 4:**

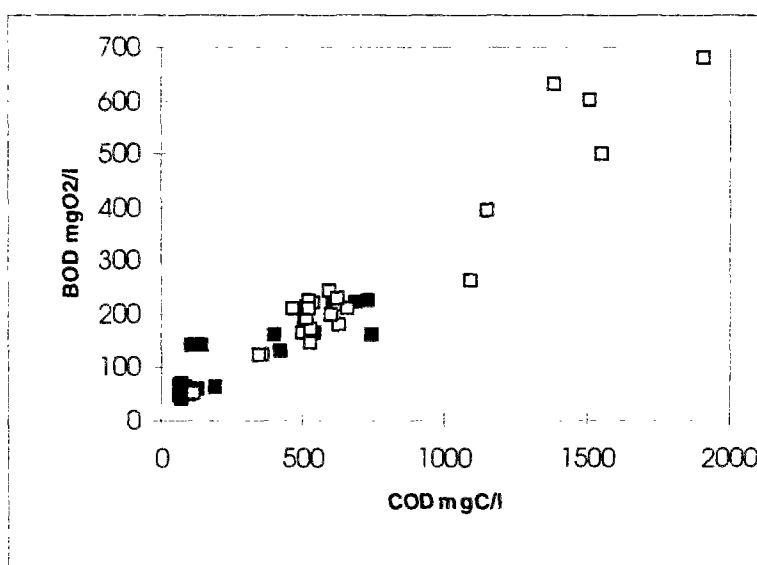
- a) BTOC data plotted against TOC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).  
Regression straight line:  $BTOC = 0.80 TOC - 5.02$  ( $r^2 = 0.99$ ,  $n = 56$ )
- b) BDOC data plotted against DOC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).  
Regression straight line:  $BDOC = 0.93 DOC - 4.11$  ( $r^2 = 0.99$ ,  $n = 56$ )
- c) BPOC data plotted against POC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□).  
Regression straight line:  $BPOC = 0.80 POC - 4.74$  ( $r^2 = 0.99$ ,  $n = 56$ )

On the basis of the average ratios POC/TOC ( $0.72 \pm 0.11$ ) and DOC/TOC ( $0.28 \pm 0.11$ ) for all our samples, we see that, in average the particulate organic matter represented 72 % and the dissolved material 28 %. These percentages were not significantly different for the dry ( $26 \pm 11$  % for the dissolved fraction and  $74 \pm 11$  % for the particulate fraction) and wet weather ( $29 \pm 11$  % for the dissolved fraction and  $71 \pm 11$  % for the particulate fraction). In a previous study on the raw waters of the three main wastewater treatment plants in the Parisian area (Achères, Valenton and Noisy-le-Grand) the proportion of organic matter under the form of particulate material was quite similar (73 %)( Servais et al. 1995)

### *Biodegradable and refractory fractions of organic matter*

Figure 4 presents the data of the biodegradable fractions of TOC (BTOC), DOC BDOC) and POC (BPOC) plotted against respectively TOC, DOC and POC. In all cases the correlations were extremely significant ( $r^2$  always higher than 0.98). In these relationships, the samples from dry and wet conditions can not be distinguished. The average ratio of BTOC to TOC ( $0.74 \pm 0.10$ ) indicates that globally 74 % of the organic matter present in our samples were biodegradable under the experimental conditions used. The percentage of biodegradability was not statistically different for the dissolved ( $0.75 \pm 0.16$ ) and the particulate ( $0.72 \pm 0.10$ ) organic material. The average ratios BTOC/TOC, BDOC/DOC and POC/BPOC were always a little higher for the dry weather samples compared to the rain event samples but these differences were not statistically significant.

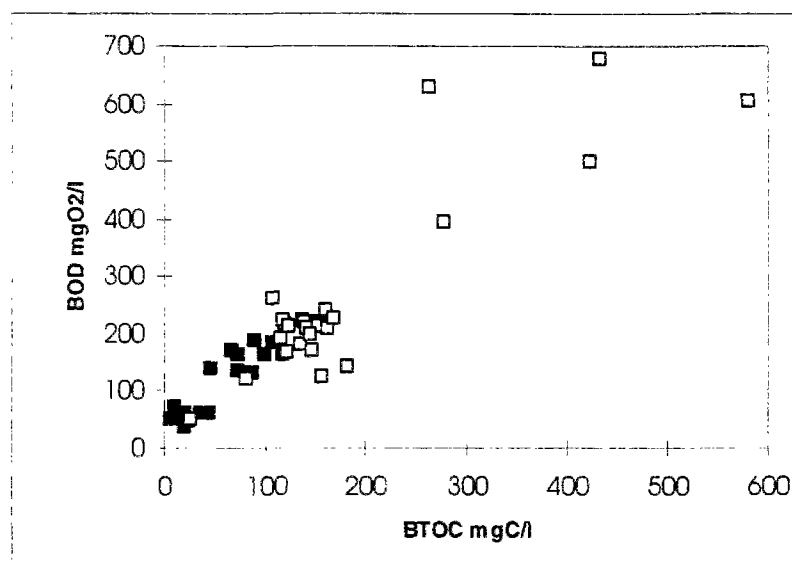
A more usual way to estimate the biodegradability of the organic matter contained in a wastewater is to compare the data of COD and BOD. In figure 5, BOD data were plotted against COD data for all the samples collected in this study. The correlation obtained was significant ( $r^2 = 0.88$ ). The average ratio COD/BOD was equal to  $2.57 \pm 0.85$ , this value is completely in the usual range of ratio COD/BOD found for untreated urban wastewater.



**Figure 5:** BOD data plotted against COD data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□). Regression line:  $BOD = 0.31 \text{ COD} + 29.5$  ( $r^2 = 0.90$ ,  $n = 48$ )

In fact, it seems that the biodegradability of DOC and POC during wet weather decreased with increasing rain intensity. For example, Seidl et al. (1997a) have shown a decreasing BOD/COD ratio with increasing total precipitation. This effect was due to a more important contribution of street runoff water and of sewer deposits both with a low BOD/COD ratio (0.1 to 0.15) during intense rain events and also. In addition, degradation kinetics experiments (Mouchel et al., 1997) have allowed us to show differences in the lability of organic matter between dry weather and strong rain events situations. For example, 55 % of the TOC was biodegraded in five days during dry weather while only 41 % of the TOC was consumed during the same period of time for the strongest studied rain event.

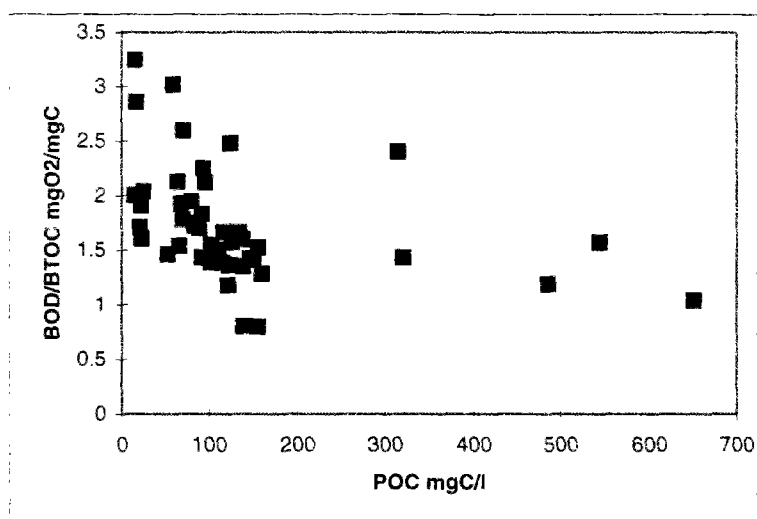
Both kinds of estimation of the biodegradable organic matter were compared in figure 6. This figure showed a more important scatter the preceding figures however the correlation coefficient was completely significant ( $r^2 = 0.78$ ). The average ratio BOD/BTOC was  $1.74 \pm 0.52$  if we exclude two abnormally high data ( $> 8$ ) which probably result from a technical problem in the BOD measurement. The value of this ratio results, on one hand, from the quantity of oxygen required to oxidise organic carbon (we have shown that the average ratio COD/TOC was equal to 3.34) and, on the other hand, from the fact that BTOC estimates the ultimate biodegradable fraction (after an incubation period of 45 days) while the BOD measures the biodegradable fraction after 5 days.



**Figure 6:** BOD data plotted against BTOC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□). Regression line:  $BOD = 1.18 BTOC + 49.1$  ( $r^2 = 0.83$ ,  $n = 45$ )

Generally, it is considered that, in wastewater, roughly 80 % of the ultimate biodegradable fraction can be consumed in five days (Hammer, 1986). This leads to expect a ratio BOD/BTOC equal to 2.68. In a previous study on the raw waters of the three main wastewater treatment plants in the Parisian area (Achères, Valenton and Noisy-le-Grand), a ratio between BOD and BTOC of 2.86 was found by Servais et al. (1985). The average ratio BOD/BTOC estimated in the present study seems to be very low by comparison with the expected value and the previous data mentioned here above. In fact, it seems that the ratio BOD/BTOC in our data decreased for the high values of BTOC which also correspond to the

samples with a high content in POC. This is clearly shown in figure 7. Three explanations may be considered for this result: the first is relevant regarding organic matter characterisation, the two other refer to methodological bias. First, the biodegradable fraction of the POC biodegradable in five days is low so that more the POC content is high more the BOD measured in 5 days is low with regard to the BTOC measured in 45 days. Secondly, it is possible that, in the BOD measurements, there is not a good biodegradability of POC when its concentration is high due to a sedimentation of the particulate material during the incubation (the measurements of BOD were performed without any agitation while for the measurement of the BTOC the samples were permanently shaken during the incubation). Finally, the BPOC may be overestimated in the procedure used for ultimate biodegradability estimation because, during the long incubation, part of the particulate material may be adsorbed on the internal surface of the incubation bottles so that the final POC was underestimated and the BPOC overestimated.



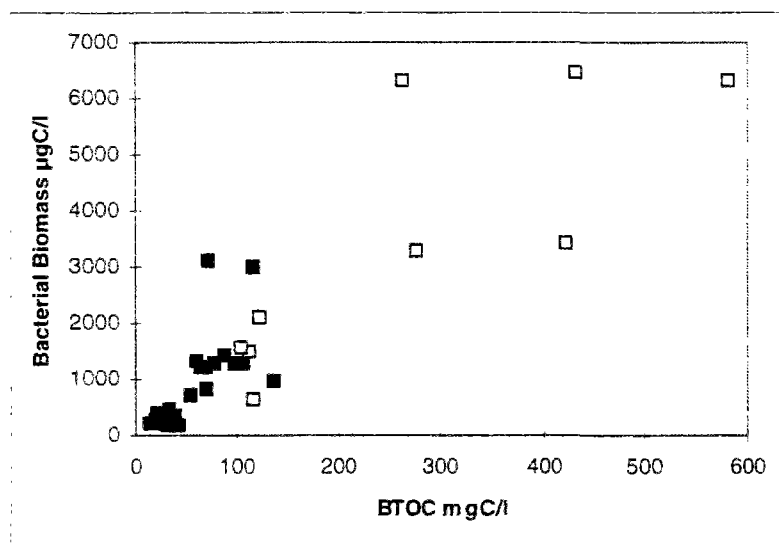
**Figure 7:** Ratio BOD/BTOC plotted against POC data for all the samples collected during rain events and dry weather. Regression straight line:  $BOD/BTOC = -0.0015 POC + 1.93$  ( $r^2 = 0.14$ ,  $n = 45$ )

The second hypothesis should also lead to lower BOD over COD ratio for higher POC contents. Since this was not the case, we keep confident into BOD data even for samples with a large POC content. The third hypothesis means a mistake in the evaluation of BPOC, but the BPOC/POC ratio are very similar to those which were obtained during former studies (Servais et al., 1995) where the low BOD/BTOC ratio was not observed. Accordingly, it is not realistic to explain to low BOD/BTOC we obtained by a poor assessment of BPOC. We conclude that the effect is real, and demonstrate significant changes in the degradability of POC as a function of hydrological conditions and also as a function of the sewer system size.

#### ***Relationship between bacterial biomass and organic matter content***

In the present study, we have tried to see if there was a relationship between bacterial biomass and the biodegradable organic matter as such a relationship have been shown by Servais et al. (1995) for the raw and treated water of the Achères treatment plant. In figure 8 data of

bacterial biomass estimated by epifluorescence microscopy were plotted against BTOC data. The observed correlation is significant for more than 99.9 % even if a larger scatter than in the previous figures was observed. The average ratio between bacterial biomass and BTOC for all our samples was 0.016 and indicates that, in average, bacterial biomass represented 1.6 % of the biodegradable organic matter. This value was not significantly different for rain events and dry weather.



**Figure 8:** Bacterial biomass data plotted against BTOC data for the samples collected during rain events (■) and dry weather (□). Regression straight line: Bact. Biom. (µgC/l) = 10.8 BTOC (mgC/l) + 202.92 ( $r^2 = 0.63$ ,  $n = 56$ )

Previous measurements of bacterial biomass and BTOC, made during dry weather, in raw wastewater of the Achères treatment plant showed a ratio bacterial biomass/BTOC equal to 0.08. This value is higher than the ratio we observed during the present study; this may be explained by different residence times in the sewer network. Seidl et al. (1997a) have shown increasing biomass with regard to organic matter with increasing residence time in the sewer.

The bacterial biomass present in studied wastewater was mainly composed (between 60 and 70 %) of large size bacteria (greater dimension larger than 1 µm). This result confirms previous observations performed on the Achères treatment plant effluents (Garnier et al., 1992a) showing the dominance of large bacteria in the plants effluents. Our observations in the sewers shows that the origin of these large bacteria is not the activated sludge but rather the sewers. The major role of these bacteria which have a higher growth rate than the allochthonous bacteria in the biodegradation process and the oxygen depletion in the river has already been demonstrated (Garnier et al., 1992b; Servais and Garnier, 1993).

In addition, the fraction of biomass in BTOC seems to depend on in-sewer temperature during dry weather. The ratio of biomass over BTOC (%) was  $0.68 \pm 0.45$  during cold dry weather conditions (December and January) and  $2.43 \pm 1.67$  during warm dry weather conditions (April to August). This significant seasonal variability may have consequences with regard to the functioning of treatment plants. This also suggested that most of the heterotrophic population measured in the sewers, even in the more upstream parts of sewerage systems, has

grown in the sewers. If the heterotrophic population was mainly brought into the system by domestic wastewater, there would be no reason for such low biomass in winter. At the opposite, the low biomass observed in winter is due to a lower growth at low temperature. The same difference between winter and summer situations was not observed during wet weather, we argue that the bacteria transported during wet weather mostly originate from the in-sewer deposits and had a much longer residence time in the system than bacteria transported during dry weather. This could explain the higher concentrations despite a similarly low growth rate due to cold temperature in winter.

#### 4. Conclusion

The impact of wastewater discharge on river water quality has been for a long time studied from a strictly chemical point of view, considering only the effect of the input of organic (usually expressed in BOD units) and inorganic compounds on the ecosystem. Recently however, it has been stressed that wastewater discharge has also significant direct biological effects on river microbial dynamics. Thus in this study, special attention has therefore been made to determine the dissolved versus particulate fractions and also of the biodegradable versus refractory parts in the wastewater potentially suspected to cause an overflow. Moreover, the input of heterotrophic bacteria to rivers through combined sewer overflows has also been investigated.

The measurements performed during the course of the present study on the organic matter composition in a combined sewer during rain events and dry weather have allowed us to establish relationships between different parameters used to characterise organic matter in wastewater. With help of obtained relationships and values of classical variables like turbidity, SM and COD for a given effluent, it is possible to estimate its composition in terms of BTOC, BDOC, BPOC and bacterial biomass. The variables defined during our study, are essential for accurate modelling of impacts of a waste water discharge in a river using the ecological model recently developed in the scope of the study on the Seine river (Billen et al., 1993; Even et al., 1997). The description of the anthropic input performed in this study will permitted to go further in the understanding of the bacterial dynamics in a river after combined sewer overflow.

#### Acknowledgements

This study is a part of a research program funded by the Agence de l'Eau Rhin-Meuse, representing the other French Agences de l'Eau. Some results presented in this paper were also obtained in the scope of the PIREN-Seine program of the Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors are indebted to A. Anzil for her excellent technical assistance. Field support as well as rain data have been provided by SAFEGE Company.

#### References

AFNOR (1994). Recueil de normes françaises de l'eau. Méthode d'essai, Vol. 1, Agence Française de Normalisation (Paris).

- Barillier, A. (1992). Caractérisation et dynamique de la matière organique: cas d'autoépuration d'un milieu fluvial, la Seine. Ph.D. Thesis (Université of Paris VI).
- Billen, G., Garnier, J., Poulin, M. and Servais, P. (1993). Evaluation de l'impact sur la qualité de l'eau du traitement de l'azote et du phosphore dans les effluents urbains. In : La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion. E. Fustec & G. de Marsily, ed, 319-347.
- DeCuyper, K. and Loutz, S. (1992). Les caractéristiques des eaux usées domestiques. *Tribune Cebedeau*. **560** (6): 7-19
- Even, S. and Poulin, M. (1993). Le modèle Prose: hydrodynamique, transport et qualité de l'eau. In : La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion, E. Fustec & G. de Marsily, ed, p 311-318.
- Even, S. Poulin, M., Garnier, J., Servais, P., Chesterikoff, A. and Coste, M. (1997). River Seine ecosystem modelling Prose : a multipurpose software for complex river system *Hydrobiologia*. In press
- Garnier, J., Servais, P. and Billen, G. (1992 a). Dynamics of bacterioplankton in the river Seine (France): impact of parisian effluents. *Can. J. Microbiol.*, **38** : 56-64.
- Garnier, J., Billen, G. and Servais, P. (1992 b). Physiological characteristics and ecological role of small and large sized bacteria in a polluted river (Seine River), *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **37** : 83-94.
- Mouchel, J.M., Seidl, M. and Servais P. (1997). Measurement of biodegradable wastewater during rain events by means of microrespirometry. In preparation.
- Pitter, P. and Chuboda, J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC PRESS. 306p.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980). Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.* **25** : 943-948.
- Seidl, M., Servais, P., Martaud, M., Gaudouin and Mouchel J.M. (1997a). Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events. *Wat. Sci. Technol.* In press
- Seidl, M., Servais, P., and Mouchel J.M. (1997b). Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a combined sewer overflows. *Wat. Res.* Submitted
- Servais, P. and Garnier, J. (1993). Contribution of Heterotrophic Bacterial Production to the Carbon Budget of the River Seine (France). *Microbial Ecology*, **25** : 19-33.
- Servais, P., Garnier, J., Demarteau, N., Brion, N. and Billen, G. (1995). Caractérisation des apports de matière organique, nutriments et micro-organismes par les rejets d'eaux usées. PIREN-Seine Report (CNRS) January 1995.
- Servais P., Barillier A. and Garnier J. (1995). Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon. *Annales de Limnologie* **31**(1): 75-80.
- Simon, M. and Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **51** : 201-213.

## MESURES DE LA RESPIRATION DANS LES EAUX USEES

Martin SEIDL

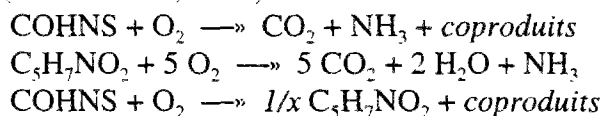
Cergrene - ENPC, 6 et 8 Avenue Blaise Pascal, Cité Descartes, Champs-sur-Marne  
77455 Marne la Vallée Cedex 2, France internet: <http://www.enpc.fr/cergrene/cergrene.html>  
[seidl@cergrene.enpc.fr](mailto:seidl@cergrene.enpc.fr)

### Résumé

La mesure de la respiration est illustrée à l'aide de deux méthodes appliquées au laboratoire, après examens du principe de fonctionnement des appareils commerciaux.

### 1. Biodégradation

La matière organique des eaux usées est composée majoritairement d'un mélange des polysaccharides, lipides et protéines. La biomasse vivante ne représente que quelques pour cents du carbone total (Garnier et al, 1992). La matière organique morte peut être globalement représentée par la formule COHNS et la biomasse par  $C_5H_7NO_2$ . Sous conditions aérobies, ces substrats sont dégradés en consommant de l'oxygène et en produisant du gaz carbonique (dissimilation), mais aussi partiellement utilisées pour la synthèse de nouvelle biomasse (assimilation) (Metcalf et al, 1981)



La stoechiométrie de ces réactions peut différer selon les milieux. Le rapport de masse d'oxygène et de substrat varie entre 0,2 et 4 g/g et il est de 1 g/g pour le glucose. La (bio)dégradation de la matière organique dans un milieu aérobie, peut donc être déterminée à l'aide de la consommation d'oxygène. La consommation ou la respiration se définit comme la diminution d'oxygène par unité de volume liquide et par unité de temps. Une population de microorganismes ayant utilisé toute la matière organique, facilement oxydable, ne consomme de l'oxygène que pour le maintien de son métabolisme basal. La valeur de la respiration, dite *endogène*, dépend de la quantité et de la qualité de la biomasse. Une meilleure caractérisation de la biomasse peut être obtenue avec un ajout d'un substrat facilement dégradable comme l'acétate ou le glucose. Les microorganismes se mettent alors à consommer l'oxygène au taux maximal durant un temps relativement court, ce qui permet de mesurer le potentiel de la biomasse. La valeur de saturation, obtenue après l'addition de substrat est la respiration *maximale*. La consommation *réelle* d'un échantillon se situe donc entre ces deux limites : respiration endogène et respiration maximale.

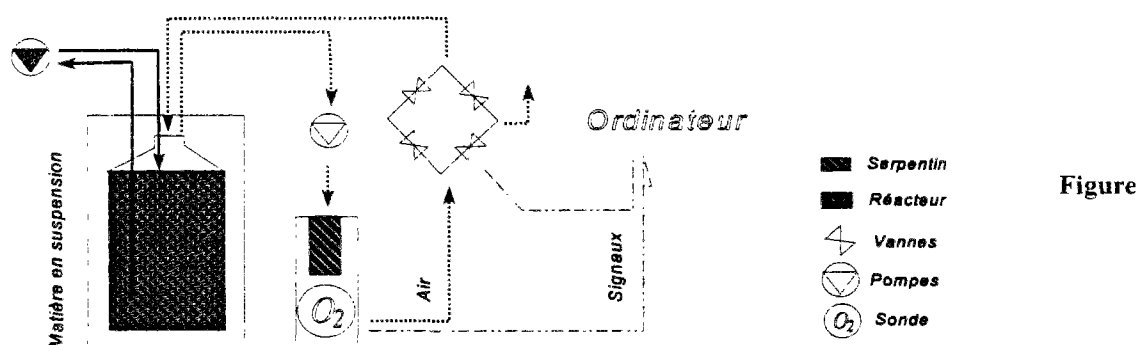
### 2. MESURE DE LA RESPIRATION

La mesure de la consommation d'oxygène peut s'effectuer dans la phase liquide ou dans la phase gazeuse d'un système clos. La mesure peut être statique, semi-continue ou continue. Le système



le plus simple est le système statique, composé d'un récipient fermé, pourvu d'une sonde à oxygène, entièrement homogénéisé et contenant, soit du liquide, soit du liquide et une faible quantité de gaz. Le système semi-continu ressemble au système précédent, composé également d'un récipient contenant une électrode d'oxygène, mais présentant en plus un mécanisme de réaération pour un réapprovisionnement temporaire du stock d'oxygène. Le système continu possède deux récipients, un récipient de réaération et un de respiration, alimentés par une pompe en circuit fermé. La teneur en oxygène des eaux sortant du réacteur aéré, est proche de la saturation. Après un séjour dans un récipient fermé, la concentration est réduite en raison de l'oxydation de la matière organique. Le quotient de la différence des teneurs en oxygène par le temps de séjour de l'eau dans le récipient fermé, donne la respiration réelle.

## 2.1. Mesure dans la phase gazeuse, système semi-continu destiné à mesurer la respiration des eaux usées



**Figure 1:** Le système semi- continu, la sonde et les vannes sont reliées à l'ordinateur, qui commande l'acquisition des données et éventuellement la mise à l'air du système. En pointillé le circuit de l'air, en continu le circuit d'eau. Les récipients et la sonde sont thermostatés.

Le système utilisé est composé d'un récipient étanche, équipé d'un circuit fermé de recirculation de l'eau usée, assurant la réaération de l'échantillon et un circuit d'air pour les mesures de teneur en oxygène. Pour éviter la formation de mousse, qui entraîne de l'eau dans le circuit de mesure, la réaération se fait par un jet d'eau et non pas par bullage. Le taux d'humidité dans le circuit de mesure est contrôlé par un serpentin de condensation. L'approvisionnement du stock d'oxygène est assuré par une mise à l'air régulière du système (typiquement allant de 0,5 à 2 par heure), grâce à un système d'électrovannes. Après l'ouverture du système la teneur en oxygène de l'air et de l'eau du réacteur sont proches de la saturation. Pendant la fermeture la concentration dans le récipient est progressivement réduite en raison de l'oxydation de la matière organique. En supposant que les gaz sont parfaits et que la solubilité est décrit par la loi de Henry on peut établir le bilan pour la phase gazeuse et liquide:

$$\frac{dM_g}{dt} = \frac{dp_g \cdot V_g}{RT dt} = \text{reaération} + \text{fuites} - \text{électrode}$$

M : mol oxygène  
 t : temps  
 p : pression  
 V : volume  
 T : température  
 R : gaz constante

$$\frac{dp_g \cdot V_g}{RT dt} = k_a(p_w - p_g) + k_f(p_s - p_g) - k_{el}(p_g)$$

g : gaz  
w : eau  
a : aération  
s : saturation  
f : fuites  
le : électrode

L'évolution d'oxygène dans l'eau est donnée par

$$\frac{dM_w}{dt} = \frac{dp_w \cdot V_w}{K_H \cdot dt} = -a\text{ération} - \text{respiration}$$

$K_H$  : constante de Henry  
r : respiration (mol/l.s)

$$\frac{dM_w}{dt} = \frac{dp_w \cdot V_w}{K_H \cdot dt} = -k_o(dp_w - p_g) - V_w \cdot r$$

Admettant que la respiration reste constante pendant l'intervalle de mesures et que les fuites ( $k_f \approx 1,7 \cdot 10^{-7}$  mol/atm.s) comme la consommation à l'électrode ( $k_{el} \approx 5 \cdot 10^{-11}$  mol/atm.s) soient négligeables, la quantité d'oxygène dans le système varie simplement en fonction de r :

$$r = \frac{dM}{dt} = C_w \cdot V_w + \frac{V_g}{RT} \cdot p_g$$

Globalement, le quotient de la différence des teneurs en oxygène et du temps de fermeture du récipient, donne la respiration, lorsque le pas de temps de mesure est suffisamment long pour compenser la lenteur de la sonde ( $k \approx 6 \cdot 10^{-2}$  /s) et les échanges gazeux ( $k_a \approx 6 \cdot 10^{-6}$  mol/atm.s). En réalité la concentration évolue vers cette asymptote sans l'atteindre effectivement.

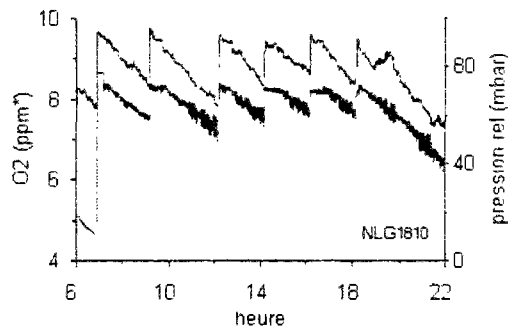
$$r' = \frac{(dC)_w}{dt} (1 + 30\alpha)$$

r' : respiration (mg-O<sub>2</sub>/l.h)  
à 20°C  
dt : temps de séjour  
C<sub>w</sub> : concentration O<sub>2</sub>  
mesuré par la sonde  
 $\alpha$  : quotient de volumes  
gaz/ eau

$$\alpha = \frac{V_g}{V_w}$$

Alpha est le rapport des volumes d'air et de l'eau dans le système. Le nombre 30 est le rapport des concentrations d'oxygène en (mol/l), dans l'air et dans l'eau à 20°C sous pression atmosphérique et conditions d'équilibre. Si  $\alpha$  est égal à 1/30, il y a autant d'oxygène dans la phase gazeuse que an phase aqueuse.

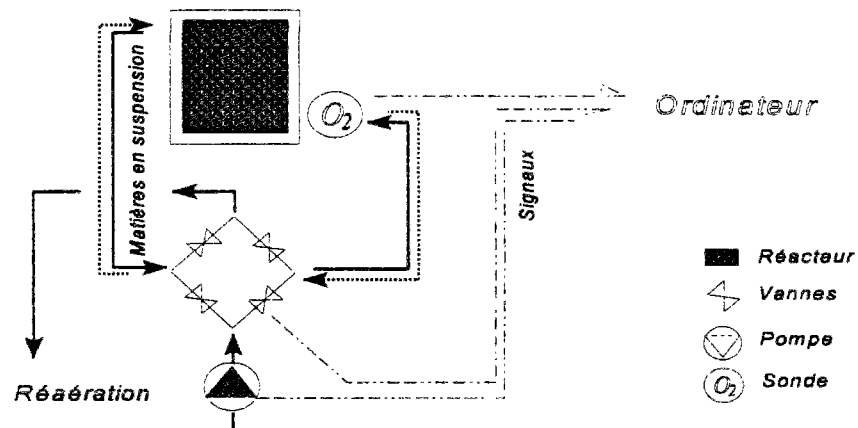
Dans le système utilisé le volume de liquide variait de 4000 à 2000 ml avec un volume d'air constant de l'ordre de 110 ml. La sonde utilisée (Orbisphere) délivrait un signal analogique de 4 à 20 mA pour la gamme de 0 - 20 ppm. La concentration de O<sub>2</sub> en phase liquide peut être aussi bien exprimée en pourcentage de saturation ou en pression partielle. La pression partielle dans les deux phases est identique en conditions d'équilibre. Dans notre cas C<sub>w</sub> représente ainsi la pression partielle, mesuré par la sonde dans la phase gazeuse, mais *exprimée* en milligramme de O<sub>2</sub> par litre de l'eau.



**Figure 2:** Variation de l'oxygène en fonction du temps pour l'effluent de Noisy le Grand de 200 (mg MES/l) avec  $r \approx 1$  (mg O<sub>2</sub>/l.h).

Les variations des teneurs en oxygène peuvent aussi être mesurées avec un capteur de pression électronique (*figure 2*) monté dans le circuit d'air. Les variations de pression sont traduites en variations de potentiel, qui après calibration peuvent être converties en millibar ou hectopascal.

## 2. Mesure dans la phase liquide, système continu destiné à la mesure de la respiration des boues



**Figure 3:** Le système classique en continu, les vannes et la sonde sont liées à l'ordinateur, qui commande le changement de sens de la circulation aussi bien que l'acquisition des données et éventuellement la valeur du débit (temps de séjour).

La teneur en oxygène des eaux sortant du réacteur aéré, est proche de la saturation ( $C_{\max}$ ). Après un séjour dans un récipient fermé alimenté par une pompe, la concentration est réduite en raison de l'oxydation de la matière organique ( $C_{\min}$ ). Le quotient de la différence des teneurs en oxygène par le temps de séjour du récipient, donne la respiration réelle :

$$r = \frac{C_{\max} - C_{\min}}{t}$$

$r$  : respiration

$C_{\max}$  : concentration d'O<sub>2</sub> à la sortie du réacteur aéré

$C_{\min}$  : O<sub>2</sub> à l'entrée du réacteur

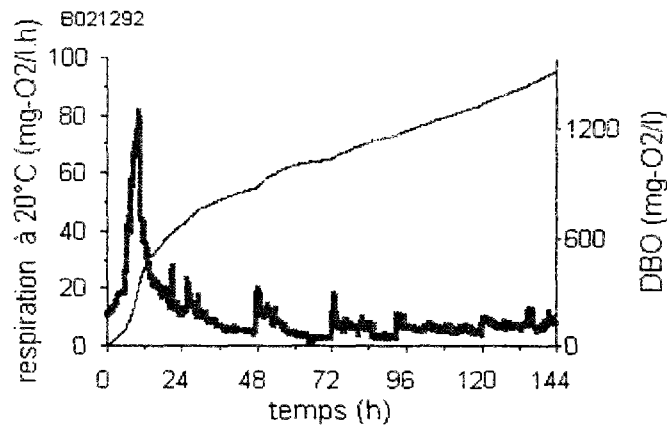
$$t = \frac{Q}{V}$$

t: temps de séjour  
V: volume du récipient  
Q: débit de circulation dans le récipient

La respiration globale pourrait aussi être calculée à partir de des concentrations d'oxygène mesurées pour deux débits différents et du volume du respiromètre (V), selon l'équation suivante:

$$r = \frac{Q_1 \cdot Q_{O_2} (C_1 - C_{O_2})}{V(Q_1 - Q_2)}$$

Pour pouvoir mesurer la différence de teneurs avec *une* seule sonde, le sens de circulation dans le récipient est inversé. L'utilisation d'*une* seule sonde est plus économique et, ce qui est plus important, les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions électrochimiques. L'inversion du sens de circulation peut avoir lieu soit avec une pompe soit à l'aide d'une combinaison de vannes.



**Figure 4:** Résultats des mesures de la respiration des boues (1,50 g<sub>MES</sub>/l), interceptée à La Briche, avec  $r_{1m} \approx 5$  (mg-O<sub>2</sub>/l.h).

Pendant l'expérience avec de l'eau usée, déversée à La Briche en décembre 1992 (*figure 4*), les mesures de la respiration étaient entièrement automatisés. Le système thermostaté, était composé d'un récipient fermé et un récipient ouvert, une cellule de mesures avec vitesse d'écoulement de plus de 0.06 m.s<sup>-1</sup> et *une* seule sonde à oxygène (Ponselle). L'ensemble était géré grâce à une carte d'acquisition et deux électrovannes permettant d'afficher la respiration en temps réel. La demande biologique d'oxygène à temps  $t$  (DBO <sub>$t$</sub> ) est calculé comme la somme des respirations dans le temps :

$$DBO_t = \sum_{i=0}^{i=t} r_i \Delta t$$

L'effet de la température est corrigé selon la loi de van 't Hoff-Arrhenius en rapportant les respirations à 20°C. Pour valeur du coefficient de température  $\epsilon$  nous avons pris 1.06 (Metcalf et al. 1984).

$$r_{20} = r_T \epsilon^{(20-T)}$$

T: température °C

### 3. Applications pratiques

Le deux systèmes décrits sont actuellement disponibles sur le marché ( tableau 1), mais pour des applications différentes. Le système classique, continu est appliqué dans des stations d'épuration des industries chimiques et agro-alimentaires. Les grandes complexes industriels possèdent souvent leur propre station de traitement. La boue activée reste cependant relativement sensible aux herbicides et aux métaux lourds. Le système de respirométrie sert ici de moniteur pour la protéger contre des pollutions accidentelles. Une intoxication de boues peut provoquer un arrêt complet de la station pendant plusieurs jours et peut nécessiter un achat d'inoculum. Dans l'industrie agro-alimentaire la respirométrie peut être appliquée pour la détection des fuites dans le circuit de production. Une augmentation de la respiration indique une présence de sources de carbone supplémentaire, provenant des denrées alimentaires.

Le système de mesure dans la phase gazeuse est utilisé en combinaison avec les mesures de  $\text{CO}_2$  pour suivre la respiration des animaux ou des végétaux. Les expériences menées sur les animaux domestiques permettent une optimisation de leur nutrition. L'application pour les mesures de DBO des eaux usées est en cours de développement.

**Tableau 1:** Comparaison de systèmes commercialisés équivalents aux systèmes de mesures utilisés dans les travaux cités.

	Mesures EAU	Mesures AIR
Utilisation	monitoring des boues activées	mesures des métabolisme animal
Commercialisation	respiromètre RA1000 Manotherm (Martec)	micro Oxy-Max, Columbus Instruments (Eurosep)
Sensibilité	0,2 mg- $\text{O}_2$ /l.h	0,3 $\mu\text{g-}\text{O}_2$ /h (!)
Fréquence de mesures	< 35 /h	0.2/h
Prix	200 kF	250 kF
<b>NOTRE SYSTEME</b>		
Fréquence de mesures	< 12 /h	< 1/h
Limite de détection	2 mg- $\text{O}_2$ /l.h	0.15 mg- $\text{O}_2$ /l.h
Prix (recherche & développement)	85 kF	75 kF

### 4. Conclusion

Les systèmes utilisés tant pour la recherche que pour la maîtrise de qualité ont leurs avantages et inconvénients. Les systèmes de recherche sont relativement peu coûteux (40% du prix de l'appareil commercial), mais nécessitent souvent un traitement de signaux spécifiques et une maintenance importante. Les systèmes commerciaux sont robustes du côté instrumentation, livrés parfois avec des logiciels adaptés, mais ne conviennent pas toujours aux besoins du terrain. Dans les deux cas la fréquence de mesures dépend surtout de la vitesse de réponse de la sonde et du

volume échantillonné. Le système de mesure dans la phase liquide est relativement simple et peut être reconstruit au laboratoire avec quasiment les mêmes performances que le produit commercial. Le système type Oxy-Max pour mesure dans l'air est plus complexe et demande beaucoup plus de développement avec un fort accent sur l'instrumentation. Cependant c'est le type d'instrument prometteur pour les mesures de la  $DBO_5$  en continu.

## Références bibliographie

- Garnier J., Servais P. et Billen G. (1992). Bacterioplankton in the Seine river (France) : impact of the parisian urban effluent. *Canadian Journal of Microbiology*, 38:56-64.
- Ford, T.E. editeur (1993) *Aquatic Microbiology. An ecological Approach* Blackwell Publ. Oxford 520p.
- Metcalf & Eddy Inc. (1984) *Wastewater engineering. Treatment, Disposal & Reuse* TATA McGraw-Hill New Delhi 920p.
- Seidl, M., P.Servais, A. Anzil & J.M. Mouchel (1996) *Dégradation des matières organiques dans le milieu naturel après les rejets urbains*. Agence de l'Eau Rhin-Meuse programme Inter-Agences 120p.



**1. CARACTÉRISATION de la MATIÈRE ORGANIQUE  
et de la BIOMASSE REJETÉE par TEMPS de PLUIE  
par le RESEAU UNITAIRE**

*Deuxième partie:*

**La SEINE**





## **Transport et dégradation de la matière organique en Seine après un rejet urbain par temps de pluie.**

**Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a Combined Sewer Overflow.**

M. Seidl, P.Servais and J.M.Mouchel  
*accepté WATER RESEARCH février 1998*

### **résumé**

L'impact des rejets urbains par temps de pluie sur le milieu récepteur a été étudié en région parisienne pour la rivière Seine. Pendant la période d'étiage de 1995 et 1996, trois rejets majeurs ont été suivis in situ. Le panache d'eau usée a pu être localisé et suivi sur plus de 20 kilomètres, grâce aux mesures de conductivité et d'oxygène. L'ammonium, contrairement aux matières en suspension a montré un comportement sensiblement conservatif. Les profils longitudinaux d'O<sub>2</sub> ont permis d'établir un bilan d'oxygène et d'évaluer la contribution de la matière organique rejetée. La dégradation de la matière organique a été déterminée par estimation des fractions dissoutes et particulières du carbone organique et par mesures de l'activité bactérienne. Le déficit d'oxygène observé 20 kilomètres en aval du rejet pourrait être attribué à la dégradation du carbone organique dissous biodégradable. Cependant d'autres sources du carbone sont nécessaires pour équilibrer le bilan.



# Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a Combined Sewer Overflow.

M. Seidl<sup>(1)</sup>, P.Servais<sup>(2)</sup> and J.M.Mouchel<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> CERGRENE, ENPC Cité Descartes, Champs/Marne, 77455 Marne-la-Vallée France

<sup>(2)</sup> GMMA, ULB Campus de la Plaine, CP 221, B-1050 Bruxelles, BELGIQUE

## ABSTRACT

The impact of a combined sewer overflow (CSO) upon receiving waters has been studied in the river Seine during summers 1995 and 1996. Three main events have been monitored with special attention paid to the computation of oxygen, carbon and suspended solids budgets. Bacterial biomass and bacterial production rates have been measured to provide a more accurate understanding of the carbon cycle of the river Seine. Oxygen consumption inside the polluted water masses was totally due to the activity of large bacteria discharged into the river by the CSO, the activity of native small bacteria did not significantly increase after CSOs. Suspended solids issued from the CSO very quickly settles in this deep, slowly flowing river. However, discharged Dissolved Organic Carbon (DOC) cannot account for the observed oxygen depletions, the additional carbon source could be phytoplankton or deflocculated/degraded particulate organic matter.

**Key words** - combined sewer overflow, heterotrophic bacteria, organic carbon, river Seine, water quality, oxygen depletion

## INTRODUCTION

Pollution issued from Combined Sewer Overflows (CSO) is extremely diverse in composition, basically including typical waste water pollution (organic carbon and nitrogen, phosphorus, heterotrophic bacteria, pathogenic micro-organisms ...) as well as typical urban runoff pollution (metals, poly aromatic hydrocarbons ...). In urban areas equipped with combined sewers and well working waste water treatment plants, CSO's may be major source of pollution whenever no specific wet weather treatment facilities have been implemented. CSO impacts on the receiving aquatic systems are multiple in terms of pollution type, time or space scales: oxygen depletion, over-concentrations of micro pollutants, presence of pathogenic bacteria as well as modification of living species behaviour in receiving aquatic ecosystem have been reported (Chocat et al. 1994, Chebbo et al., 1995). But still there is a lack of analysis of CSO impacts on oxygen levels from statistical point of view as well as from a process study point of view. Oxygen concentrations down to 0 mg.l<sup>-1</sup> may be reached in greater Paris and

several tens of tons of fishes can be killed after large storm events.

Although monitoring of oxygen concentration rivers is not a new subject (Boudet, 1877), the biological, chemical and physical processes involved in the fate of oxygen in rivers are so numerous and complex, that no model can be used without a careful analysis of local characteristics. The widely used Streeter and Phelps (1925) model provide wide answers, which are often not detailed enough when sharp decisions have to be made. Harremoes (1982) and Hvitved-Jacobsen (1982) in particular, pointed out the idea of delayed oxygen depletion after CSOs due to sedimentation and/or adsorption of organic matter. In the case of the small river they studied (0.25 m deep), adsorption was the main cause of retardation of the transport and degradation of organic matter. A different process may dominate in another stream configuration. In particular, in deeper rivers such as the river Seine, we expect that sedimentation will be the major cause of delay of oxygen depletion, rather than adsorption.

Recent attempts to rely oxygen models for rivers on a better description of degradation processes (Stehfest 1977, Edeline 1981, Billen et al., 1988) demonstrated the need to account for bacterial biomass. Indeed, the observed variability of first order degradation rates of organic matter in Streeter and Phelps type models (Loucks 1981, Bowie et al., 1985) is not only due to changes in degradability of organic matter, but most likely to the activity of discharged biomass and to the ability of the ecosystem to support bacterial development. As part of the PIREN-Seine research programme (Marsily and Fustec, 1993), an extensive evaluation of bacterial and phytoplanktonic dynamics was performed in the basin of river Seine. It provides a relevant foundation to revise the description of CSO impacts on the ecosystem, since the growth of heterotrophic bacteria combined with possible disfunctioning of the phytoplankton community are expected to play a major role in the development of oxygen minima after CSO's. The use of unified microbiological concepts in the study of CSO's impact is also a significant step towards integrated river basin management, one single coherent modelling concept becoming available from the local urban scale to the whole basin scale. This article reports on a set of three campaigns devoted to the study of oxygen consumption and bacterial biomass development after discharges issued from the combined sewer overflow.

## STUDY SITE, MATERIAL AND METHODS

The river Seine has been canalized for more than a century and is nowadays equipped with navigation dams in order to maintain a constant water level between 4 and 5 metres. Summer flows are regulated by upstream reservoirs constructed in 1966, 1974 and 1990. The average summer flow in Paris was higher or equal to 100 m<sup>3</sup>/s during the last 8 years. Most waste waters from Parisian conurbation (about 800 km<sup>2</sup>) are transported by gravitation to a major treatment plant situated at Achères, 30 km downstream Paris (figure 1). Four main collectors are crossing the river meanders by means of siphons. During storm events their transport capacity may be exceeded and the water overload is evacuated to the river. The major wet weather outlet of the Parisian sewer system is situated at the pre-treatment plant of Clichy (screenings and grit chambers) on the right bank of the river. Dry weather flow at Clichy is about 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> a day, while wet weather discharge may reach 50 m<sup>3</sup>/s. Another important CSO is located further downstream at La Briche in the right arm of St Denis island.

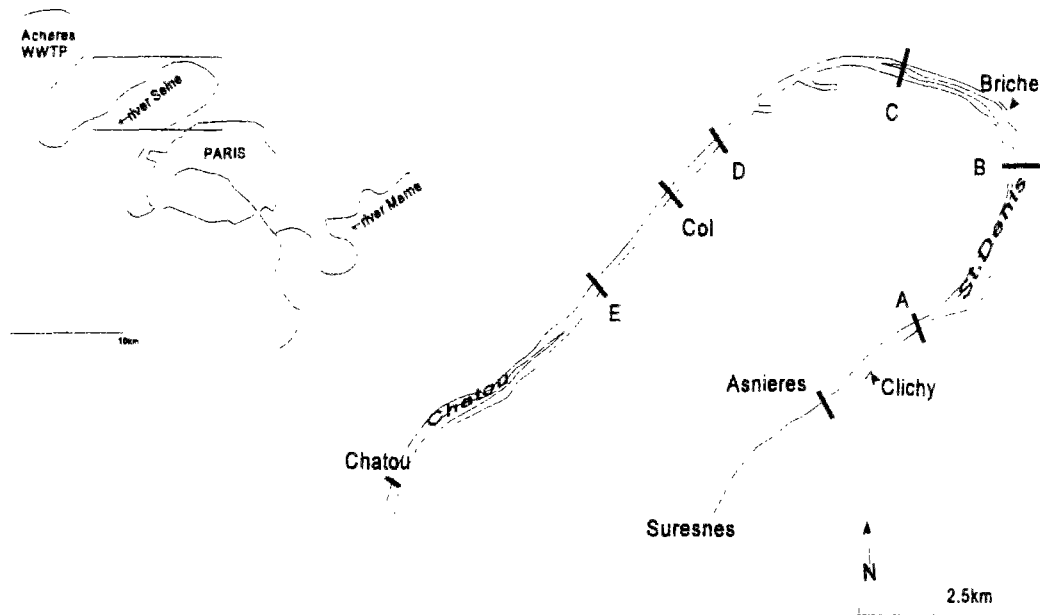


Figure 1. Sketch of the area.

Our study area is located downstream of Paris city, between Clichy CSO and the dam of Chatou (figure 1). Distances between sampling stations are given in table I. The left arm of St Denis island, at about 1 km downstream of Clichy outlet, gets about 40% of the flow, but almost no pollution from Clichy because of limited transversal mixing at this point. Our most downstream sampling station Chatou is situated in the right arm of Chatou island, beginning about 7 km downstream of the St Denis island.

Table I: Reference, names and position of fixed sampling stations used during surveys. pK are kilometric points starting at Paris-Austerlitz and mentioned on navigation maps referenced by the Service de Navigation de la Seine.

Station	CSO	A	B	C	D	Col	E	F
Name	Clichy	Gennevilliers	St Denis	Epinay	Argenteuil	Colombes	Bezons	Chatou
pK	23.4	24.6	28.3	31.8	36.1	37.3	39.4	44.6

In 1995 the contaminated water mass had been followed in situ with a small motorized rubber boat. Every 3 hours the polluted water mass was located by in situ oxygen, turbidity and conductivity measurements. 6 sub-surface samples, covering the whole polluted water mass, were taken for full laboratory examination. In 1996, to reduce risks of accidents and positioning errors during night sampling, the campaigns have been organized from bridges crossing the river. 5 bridges had been selected for monitoring at least every 2 hours. One main sample was taken near the right bank and two small samples were taken respectively in the middle and near the left bank to evaluate the transversal mixing.

Conductivity, turbidity, suspended solids (SS),  $\text{NH}_4$  and Chlorophyll-A were measured following the french AFNOR or american APHA standards. The separation between total and dissolved fractions was made by filtration under vacuum on glass fibre filters (Whatman GF/F)

precombusted at 550°C for 2 hours. SS were measured by weighting of retained mass after 24 hours of drying at 60°C. The same filters were further used for Particulate Organic Carbon (POC) measurements. Turbidity data were obtained in NTU unit by a HACH P2100 field turbidity system. Three replicates were made for each sample, and manufacturer gelified standards were used before each set of measurements to check the systems stability ( $6.10 \pm 0.07$  NTU over the complete study period). Conductivity were measured in situ by a WTW conductimeter LF196, the deviation from manufacturer calibration was less than 0.3%. Conductivity values given were automatically recalculated at 25°C.

DOC concentration was determined with a Dohman DC180 Total Carbon Analyser using ultra-violet persulfate oxidation of organic carbon, followed by infra-red spectrophotometric detection of the CO<sub>2</sub> produced. POC was measured by the same apparatus after catalytic combustion of suspended solids retained on the glass fibre filters. The experimental procedure used to determine the biodegradable fraction of DOC (BDOC) and of POC (BPOC) using a 40 days incubation periods were done as described by Servais et al., (1995).

Total bacterial numbers were determined by epifluorescence microscopy at 1000 × magnification after DAPI (4-6 Diamino 2 phenylindole) staining, following the procedure of Porter and Feig (1980). The bacteria were counted and classified into 24 size classes by comparison to an eye piece graticule; biovolume in each class was calculated. Biomass was estimated from the abundance and biovolume distribution using the carbon/biovolume conversion factor proposed by Simon and Azam (1989). As a bimodal size distribution has been observed in the river Seine (Garnier et al 1992a,b; Servais et al 1993) biomass have been calculated for two size classes, namely small bacteria (greatest dimension less than 1 μm) and large bacteria (1 μm and more).

Bacterial production was estimated from the incorporation of tritiated leucine. Incorporation of <sup>3</sup>H-leucine (Amersham 151 Ci/mmol) was measured at four leucine concentrations which ranged from 2 to 77 nM (2 nM of tritiated leucine in each case with 0-75 nM non-radioactive leucine) (Servais, 1990). Four 10-ml subsamples were incubated in the presence of the four different concentrations of leucine for 30 minutes the dark at *in situ* temperature. After incubation, each subsample was divided in two 5 ml fractions. The first one was filtered through a 1 μm porosity membrane (Nuclepore membrane), the other one was not filtered. Immediately, cold trichloroacetic acid was added to both fractions (final concentration 5 %) and the samples were filtered through 0.2 μm pore size cellulose acetate membrane. Radioactivity associated with the filters was estimated by liquid scintillation. The maximum incorporation rates in each fraction were estimated by best fitting a hyperbolic function to the experimental data using a software based on the least squares criterion (Servais, 1995). The incorporation in the fraction > 1 μm was estimated by difference between the incorporation in both other fractions. Bacterial production was calculated from the maximum incorporation rates considering a ratio between the incorporation into proteins and the incorporation into macromolecules and a conversion factor of 900 gC per mole of leucine incorporated into proteins (Servais et al 1993).

In 1995 a longitudinal profile during dry weather was made 3 days before the CSO event. In 1996, water quality in the river was screened during the whole summer at points A, Col and F. In addition, we could benefit of results obtained by a set of oxygen monitoring stations maintained by SLAAP. The stations of Colombes and Chatou are situated inside the

studied section, while Asnières station gives a relevant upstream reference. The river flows of Seine through Paris is calculated by Water Authorities from daily flows of the Marne and the Seine, measured upstream their confluence.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Dry weather characterization of the studied area*

As can be expected for a dynamic river system, water quality in the river Seine varied with distance in the monitored section, but varied even more with time during the summer period. Mean dry weather values reported in table II will be used as references to evaluate the impacts of wet weather overflows. Dissolved and particulate organic carbon levels are in the upper range of values reported for major polluted rivers of the world (Meybeck, 1982) while ammonium concentrations are more than ten times higher than what they could be in a non-polluted river. Abundance and biomass of heterotrophic bacteria observed during dry weather are in agreement with values previously reported by Garnier et al (1992) and Servais et al (1993), for the same river area during summer period. These values are in the upper range of values usually observed in river ecosystems (Servais, 1989).

**Table II** : Mean values and deviations found in the studied section (A to F), from end of June till end of August, except carbon and bacteria, which were measured only from half of July till end of August, B.B.: bacterial biomass. Standard deviations in italics.

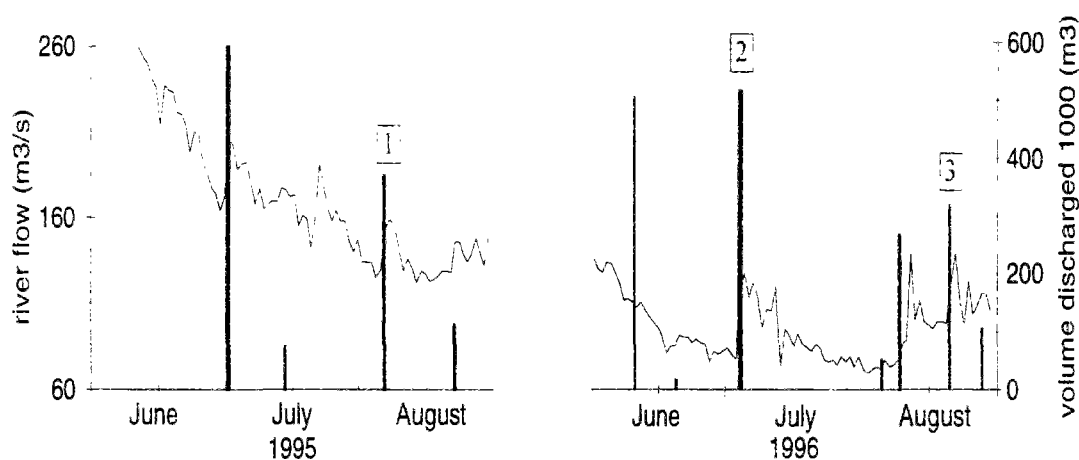
conduct.	O <sub>2</sub>	t	SS	NH <sub>4</sub>	DOC	POC	B.B.	N°	S/L	POC/	B.B./
μS/cm	mg/l	°C	mg/l	mgN/l	mgC/l	mgC/l	μgC/l	10 <sup>9</sup> /l	-	SS	POC
543	5.4	22.3	10.5	0.5	6.9	1.5	71	7.6	7.5	0.13	0.05
36	<i>1</i>	<i>1.3</i>	<i>2.9</i>	<i>0.2</i>	<i>1.6</i>	<i>0.6</i>	<i>31</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>0.06</i>	<i>0.02</i>

Theoretical dry weather transit times from Clichy to Chatou based on cross section vary typically from 30 to 60 hours for river flows ranging from 80 to 150 m<sup>3</sup>/s in Paris. Chlorophyll-a concentration increases in the studied reach: using a constant planktonic biomass to chlorophyll ratio, net growth rates of 0.016 and 0.02 h<sup>-1</sup> have been measured in summer 1996. The higher phytoplankton content results in higher amplitudes of the daily oxygen fluctuations regularly reaching 2 ppm at Chatou. Despite this photosynthetic activity, oxygen concentrations are up to 2 ppm lower at Chatou compared to Asnières during more than 95% of time. In this river reach, heterotrophic degradation of allochthonous organic matter compensates the net oxygen production. Vertical oxygen profiles usually show less than 0.5 mg.l<sup>-1</sup> difference between surface and bottom. Significant oxygen gradients can be found only during sunny days at low river flow just upstream Chatou dam, where daily thermal stratification prevents the vertical mixing of oxygen produced in the upper layers of the water column. The concentration factor for suspended solids between bottom and surface samples is about 1.5, except when a heavily loaded ship erodes the deposits. Mean conductivity changed during the studied period, mainly because of changes in river flow. In addition, a significant raise in conductivity was often observed between stations C and D, most likely due to a non-continuous industrial discharge located in the vicinity of Paris harbour.



### The sewer overflows

Three events have been studied during summers 1995 and 1996. Their return periods based on recent discharge data at Clichy range from 1.5 to 2.5 months. New equipments and management strategies of the Parisian sewerage system are about to significantly increase the return periods of such events in the next years. Overflow volumes and the river flows are compared for both summers in figure 2. It must be noted that the rainy period leading to overflows always increased the river flow measured upstream Paris. Variations of river flow, enhanced by local overflows make the follow up of polluted water masses particularly difficult. As shown in table III the maximal overflow represented 20 to 25% of the river flow for all events. The mean overflow rate was hereby only 8 to 12% of the river flow.



**Figure 2.** River flows (solid lines) and discharged volumes (bars) during summer of 1995 (left) and 1996 (right). Numbers indicate the CSO's followed.

**Table III :** Basic physico-chemical parameters, describing our campaigns: Flow-means for the waste water i.e. concentrations averages weighted by instantaneous discharges, and the river parameters at the beginning of the overflow. ( $Q_{max}$ : maximum overflow rate,  $V$ : total volume discharged and equivalent volume passed in the river,  $\Delta t$ : time span of the CSO).

Event N°		$Q_{max}$ ( $m^3/s$ )	$V$ ( $10^3 m^3$ )	$\Delta t$ (h)	cond. ( $\mu S/cm$ )	turbidity (ntu)	$NH_4$ (mg/l)
1	Seine	152	4925	-	535	8.3	0.25
	CSO	34	375	9	321	207	3
2	Seine	127	5715	-	571	8	1.36
	CSO	27	525	12.5	407	156	7.2
3	Seine	138	2732	-	506	8.5	0.3
	CSO	27.4	317	5.5	350	57.5	4.1

The overflows we have studied did not occur at the same hour of the day (figure 3). The nocturnal overflows will be less polluted than the daily CSO's because of diurnal fluctuations of water quality and water level in sewers. Conductivity can be used as an index to estimate

the proportion of runoff waters. Compared to previous results obtained for overflows at Clichy (Paffoni 1994), the nocturnal events we studied are situated at the lower end of the area representing all  $\text{NH}_4$  and conductivity data (figure 4) while the more polluted daily event is situated nearer to the centre of the data set. The relation obtained by Paffoni (1994) for more than 40 overflows, was used to estimate the ammonium data for event #1. Despite similar dilutions of the waste waters with river water during the three events, the different pollution loads will induce distinct impacts on the river water quality.

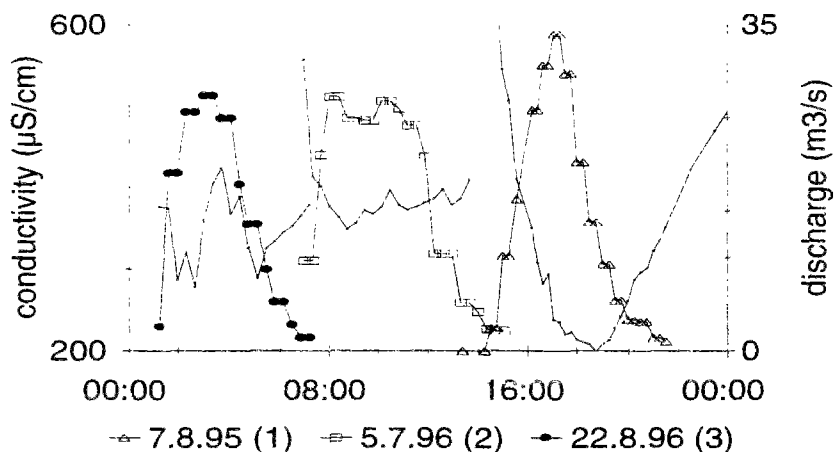


Figure 3 . Evolution of discharged flow and conductivity at Clichy during the three events.

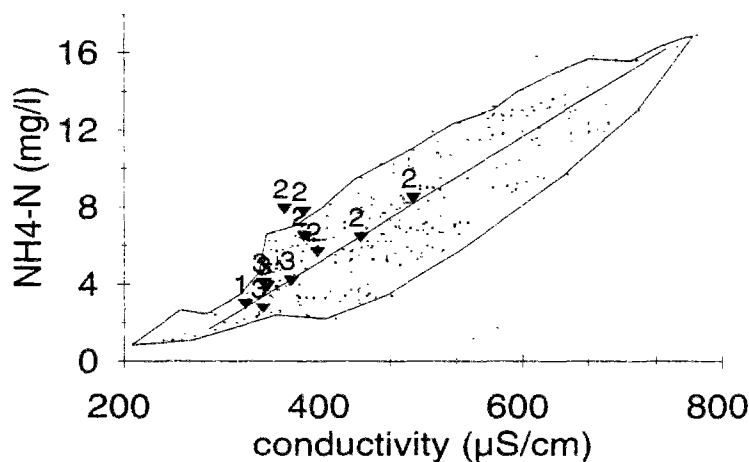
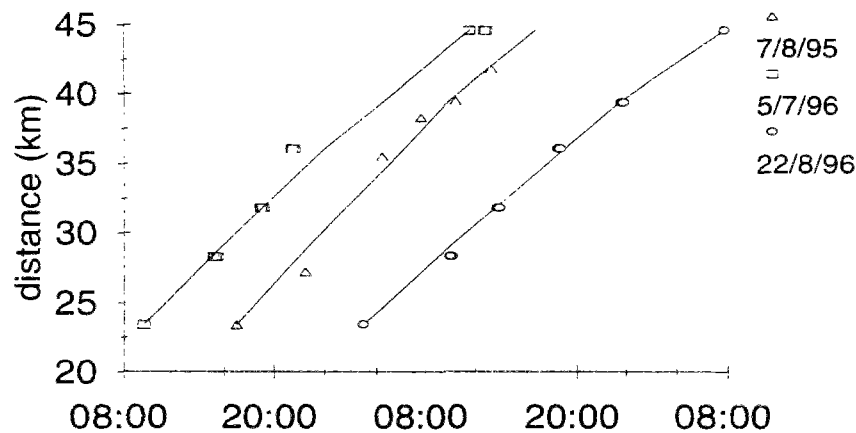


Figure 4.  $\text{N-NH}_4$  versus conductivity relation for a large set of samples of Clichy CSO, collected by Paffoni (1994) in 1990-1991. Our samples appear as black triangles with numbers indicating the event followed.

### Transport and dilution of polluted waters

As previously mentioned, a practical difficulty was to follow the right mass of polluted water, and to obtain a sufficiently complete set of data for the calculation of precise mass balances. In order to be able to derive relevant budgets, we attempted as much as possible to cross-check conclusions resulting from transit-time and dispersion analysis, from fixed point continuous oxygen measurements, and from the concentrations of various tracers.

The position of the oxygen minimum moved downstream at a rather constant velocity (figure 5). Mean water velocities were 0.252, 0.226 and 0.205 m.s<sup>-1</sup> respectively for events #1, #2 and #3. The transit times from Clichy to Chatou were about one day for all events (table III). Using outputs from the model ProSe (Even et al. 1996), we could estimate that the observed velocities correspond to river flows of 214, 192 and 173 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>, which are much higher than the measured river flow upstream Paris. The excess water volume passing at Chatou is likely due to the numerous discharges from unitary and separate sewer systems in Paris conurbation. It is about 10 times higher than the volume discharged at Clichy, which is in reasonable agreement with results of detailed hydraulic simulations of the global Parisian sewer system recently performed under uniform rain hypothesis (BPR-SOGREAH-HYDRATEC, 1997).

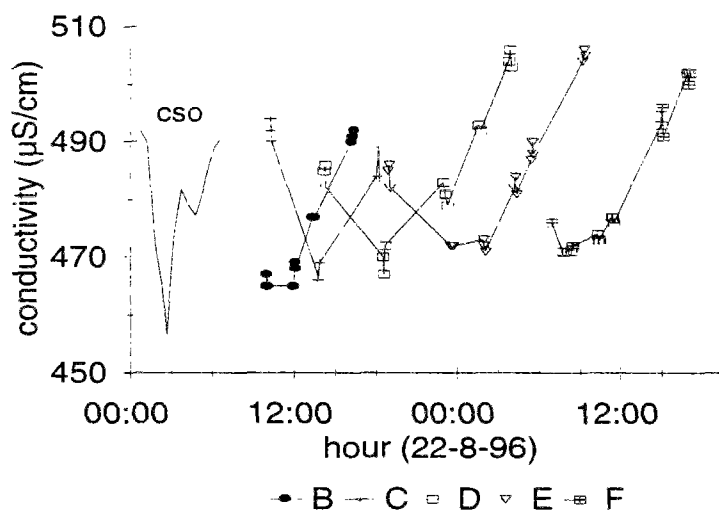


**Figure 5.** Position of the oxygen minimum during the 3 campaigns. The line gives the theoretical position based on the mean river flow and the known river bed geometry.

Using the on-line oxygen data collected by SIAAP (Syndicat Interdépartemental d'Assainissement de l'Agglomération Parisienne) at Chatou, we could verify the origin of the sampled water mass with reference to other known wet weather discharges. During event #1, a first oxygen minimum appeared at Chatou 14 hours after the occurrence of overflows in greater Paris, followed 10 hours later by a second more pronounced minimum. Given the computed mean water velocity, the first minimum is ascribed to La Brèche CSO while the second minimum is due to the Clichy discharge. For both events in 1996, the oxygen minimum attributed to Clichy overflow was preceded by a smaller step decrease due to a smaller overflows at La Brèche. Comparison of our results with the continuous oxygen monitoring

system show identic positions of oxygen minima and confirms that the followed water masses were issued from Clichy CSO's.

Oxygen allows a good definition of the position of water masses and is a major parameter defining water quality standards. However, since it is reactive, it cannot be used for validating or correcting budgets for other variables. Previous investigations of anthropogenic impacts on river Seine during dry weather, revealed that conductivity was a good tracer for identifying waste water discharges (Chesterikoff et al. 1991). Conductivity is only slightly affected by biogeochemical processes occurring in the water column, and can be considered as conservative at first order during mixing of urban waste waters and river water. During wet weather, the conductivity of discharged water is lower than river water conductivity since runoff water is mixed with waste water (table III). Typical value of urban runoff conductivity is about  $165 \pm 100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Seidi et al 1997) while dry weather waste waters at Clichy reach  $960 \pm 25 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .



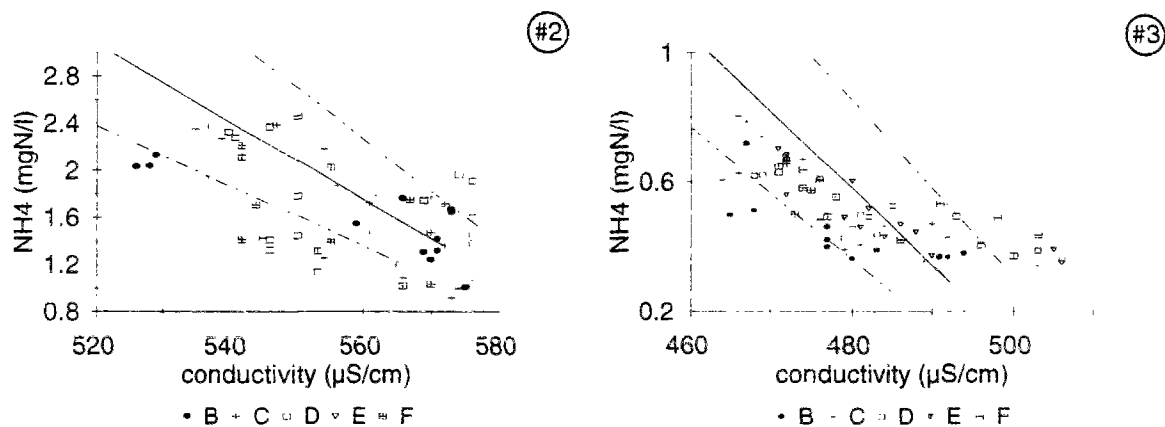
**Figure 6.** Conductivities measured at all sampling stations during event #3. Longitudinal dispersion is illustrated by gradual increase of the conductivity minimum, transversal homogeneity is illustrated by the length of the small vertical bars.

Low conductivity areas indicate clearly the position of CSO waters (see figure 6 for event #3), and the agreement between plug positions obtained from oxygen and conductivity data is almost perfect. The slight increase of the conductivity minimum with time, is due to dispersion. The standard deviations of the plug, observed in Chatou ranged from 2.5 to 4.5 hours for the three events. The apparent longitudinal dispersion coefficient of about  $50 \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  seems very low with reference to formulas proposed by Fisher et al (1977). The discrepancy between both estimates is due to incomplete lateral mixing of the plug at short distance from the discharge point and also to the highly artificial shape of river sections which equalizes the transverse velocity profile.

**Table IV:** Excess ratio of major water quality parameters measured between Clichy and Chatou.

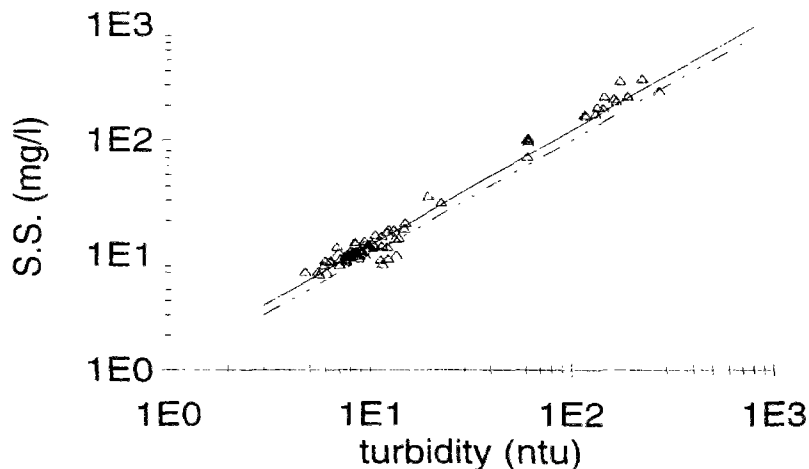
event N°	date	Conduct.	SS	DOC	POC	NH <sub>4</sub>
#1	7/8/95	1.20	-0.02	-	-0.07	1.14
#2	5/7/96	1.38	0.05	2.41	-	0.87
#3	22/8/96	1.29	-0.09	4.38	-0.4	1.24

Pollution budgets can now be established using conductivity to check sampling representativity. To provide homogenous budgets computations for all measured variables, we used excess concentrations with reference to dry weather concentrations defined for each event. Budgets given in table IV are the ratio of excess-mass passing at Chatou over total mass due to the discharge. A ratio of 1 means conservation, 0 means a total disappearance of the discharged contaminant and 2 means that the in-stream production is equivalent to the discharged quantity. Table IV reveals important features of the impact of Clichy CSO's: i) conductivity and ammonium appear almost conservative, ii) the SS load and POC loads from Clichy disappear completely before reaching Chatou and iii) the DOC increases strongly. The complete loss of particulate matter as well as the production of DOC are significant features of a CSO. The conservation of conductivity is an expected result, which confirms the right sampling of polluted waters. Conductivity will be used as reference component in mixing graphs, identifying source or sinks of reactive elements.

**Figure 7.** Mixing graph of ammonium versus conductivity for event #2 (left) and event #3 (right).

It must be pointed out, that some of these estimates are fairly sensitive to the choice of the dry weather reference which may be poorly defined. The importance of dry weather references is illustrated by mixing graphs obtained for ammonium versus conductivity for both 1996 events (figure 7). The mixing line connects two points representing the average concentrations of discharged waste water and river Seine water before the CSO. In case of a perfect mixing of two homogenous sources, all points would follow the solid line. Dashed lines figure out the standard deviation of both sources, due to their time variations before (for the dry weather reference) and during (for the discharged waters) the events. Given the unresolved variability of source terms, ammonium behaviour can be explained by a simple dilution, most data points

being situated inside the area limited by both dashed lines. However, for event #3, few data points have excessive conductivities, they have been measured at the more downstream stations and in the later part of the waste water plug. This local increase of conductivity is due to the previously mentioned industrial discharge. Mass balance consideration, as well as regular evolution of the conductivity minimum during the transfer of the plug, suggest that this discharge only occurred after the passage of the plug.

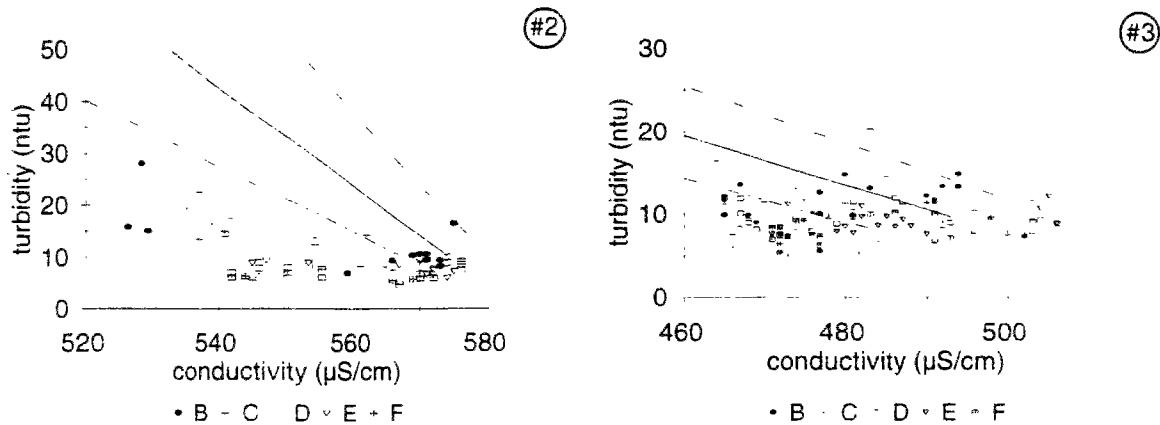


**Figure 8.** Relation between turbidity (NTU) and SS (mg/l) in the studied river area for all events and Clichy overflows, described by :  $SS=1.37*NTU+0.38$  ( $r^2>0.95$ ,  $n=80$ ).

### *Suspended solids settling*

We used turbidity measurements in order to complete the SS data set. Figure 8 shows a very good correlation between both variables on a log scale. The average SS over turbidity ratio is  $1.29 \pm 0.22$ , and is shown by a solid line. The dashed line represents the 1:1 relation which would indicate a perfect quantitative agreement. Turbidity data were thus acceptable estimates of SS in the situations we studied.

The non conservation of suspended solids, observed for all events (table IV) suggests a strong settling. For all events studied, SS levels inside the polluted plugs were not much higher or even lower than dry weather SS levels. Conductivity versus turbidity mixing graphs are shown for both 1996 events in figure 9. For all studied events, most of settling already occurred at station B at 5 km and 8 hours transit time downstream of Clichy. This rapid settling of SS in the river Seine after a CSO, had already been demonstrated by Estebe et al. (1997) who used particulate metal concentrations as tracers of SS issued, from urban wet weather discharges. Chebbo and Bachoc (1992) studied many samples collected in several french sewage networks and concluded that the median settling velocities should be  $8.1 \text{ m.h}^{-1}$  for unitary sewers. Given the mean depth of 4 to 5 metres in the river Seine and these settling velocities, more than half of such sewer solids could be expected to settle within one hour.



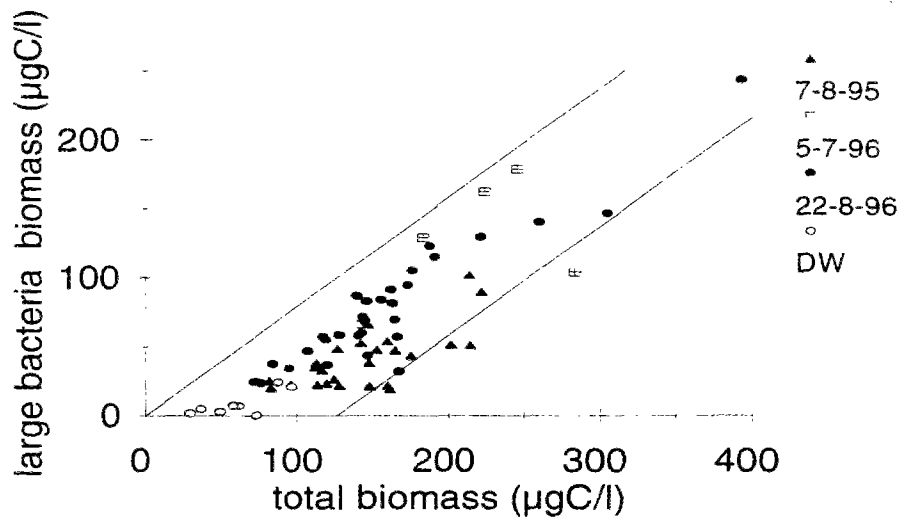
**Figure 9.** Mixing graph of turbidity versus conductivity for event #2 (left) and event #3 (right).

However, this is only part of the story. Natural suspended solids from the river Seine have also high median settling velocities, about  $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$  according to Tangerino et al. (1994) and can still be sampled inside the water column despite days of transit. Accordingly, high settling velocities are not sufficient to explain the rapid disappearance of SS from the water column. Moreover, Chebbo and Bachoc (1992) showed that a significant fraction of wet weather suspended solids in unitary sewers had low settling velocities, 35% of solids having settling velocities lower than  $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ . A very important fraction of the discharged solids have settling properties equivalent to those of particles from the river Seine and could be expected to remain suspended. POC was about 26% of the SS discharged during event #3, while the mean dry weather POC content of the river solids was only  $13\pm 3.6\%$ . The observed POC content in the polluted water mass was  $11.7\pm 2\%$ , whilst the theoretical mixing would lead to values ranging from 15% to 17% depending on size of the sampled water mass at a given station. During event #1, the SS load from Clichy was four times higher. Using the same POC reference as in case # 3, we would expect 20% POC inside the pollution plug, while the observed values were only  $16.5\pm 2\%$ . The apparent oversettling of SS issued from the CSO, suggested by the analysis of POC data, could be due to the mixing of solids issued from Clichy into an extended pool of riverine solids including continuously resuspended river deposits. This interpretation is coherent with the conclusion of Estebe et al. (1997).

### ***Heterotrophic activity and oxygen depletion in the river during wet weather***

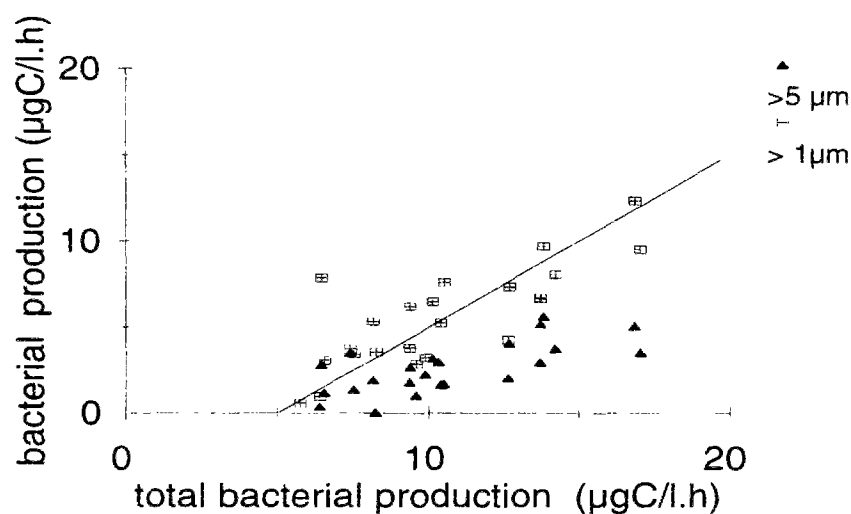
During dry weather periods, the average bacterial biomass in the river was about  $70 \mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$  (table II). Much higher bacterial biomass were found in Clichy overflows. For example the average biomass during event #3 was  $980\pm 130 \mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$  and mean values of  $1500 \mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$  had been found during previous dry weather investigations at Clichy, but quite similar values of  $1200\pm 200 \mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$  had been measured during another overflow in September 1995 (Seidl et al., 1998). A very important fraction of the total biomass at Clichy consists of large bacteria: more than 90% during event #3 and about 60% in September 1995. After CSO #1 and #3, the bacterial biomass in the polluted river water, was  $140\pm 40$  and  $160\pm 80 \mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$  respectively. During dry weather large bacteria represent only few percents of the total biomass in the river,

while during wet weather a large proportion of the excess biomass in the contaminated river waters, is due to large bacteria (figure 10). Garnier et al. (1992a) had also demonstrated a similar increase of bacterial biomass, and particularly of large bacteria brought into the river Seine by the effluent. of the WWTP Achères



**Figure 10.** Relation between total bacterial biomass and the large bacteria biomass in the river Seine during all events and dry weather period of summer 1996.

As shown by Servais and Garnier (1993), large bacteria have 2 to 3 times higher specific activities and growth rates, than small bacteria. The contribution of large bacteria to the excess bacterial activity is hereby higher than suggested by biomass comparison. The total bacterial activity appears to be the sum of a constant activity (about  $5 \mu\text{gC.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) due to small bacteria ( $<1 \mu\text{m}$ ) and an increasing activity due to large bacteria or bacteria attached to particles (fig. 11)



**Figure 11.** Relation between total bacterial production and activities retained by  $1 \mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$  pore size membranes for event #1.



This suggests that the additional bacterial activity after CSO's is solely due to large bacteria brought into the system by the discharge. The basic dry weather activity due to small bacteria is not much enhanced by the input of degradable organic matter due to overflows. Moreover, figure 11 shows that an important fraction of the activity retained by 1  $\mu\text{m}$  pore size membranes was also retained on 5  $\mu\text{m}$  pore size membranes. A significant association of bacteria to particles may favour settling of bacteria.

The ratio of large bacteria biomass to total bacterial biomass gradually varies from 90% in discharged waste waters, 55% at station B to slightly more than 30% at station F. Similarly, the overall bacterial growth rate decreases as the contaminated water mass moves along: initial growth rates in the discharged waters were about  $0.25 \text{ h}^{-1}$  and only  $0.06 \text{ h}^{-1}$  at the last sampling station. They are in good agreement with previously determined growth rates for large and small bacteria (Servais & Garnier, 1993). This decrease in large bacteria biomass and growth rates results from the progressive mixing of discharged waters with uncontaminated Seine river water but also from a significant loss of large bacteria. Mixing graphs for conductivity versus large bacteria biomass (not shown) indeed demonstrate a loss process, while small bacteria appear to be conservative for the events studied. Higher losses of large bacteria are due on one hand to settling of large (or attached) bacteria and on the other hand to a more effective grazing of large cells by protozoa. Melon et al (1996) have shown in previous works on river Seine, that protozoa grazing was more effective on large bacteria than on small bacteria.

Oxygen consumption is controlled by bacterial growth. To convert bacterial production to bacterial consumption a value of growth yield is required. A bacterial growth yield of 0.3 was determined by Servais (1989) for bacteria from river waters. Later on, Barillier et al (1993) confirmed a growth yield of 0.3 for river Seine bacteria. This means that 2.33 grams carbon are oxidized into  $\text{CO}_2$  for each gram of carbon of produced biomass. Furthermore, using an O/C ratio of 2.67, we obtain a ratio of 7 grams of  $\text{O}_2$  consumed per gram of produced bacterial carbon. When no net increase in bacterial biomass is observed, as was the case during the transit of the studied water masses between Clichy and Chatou, bacteria may be considered as grazed and respired by their predators. This leads to a maximum estimate of 10 grams of  $\text{O}_2$  consumed per gram of produced bacterial carbon.

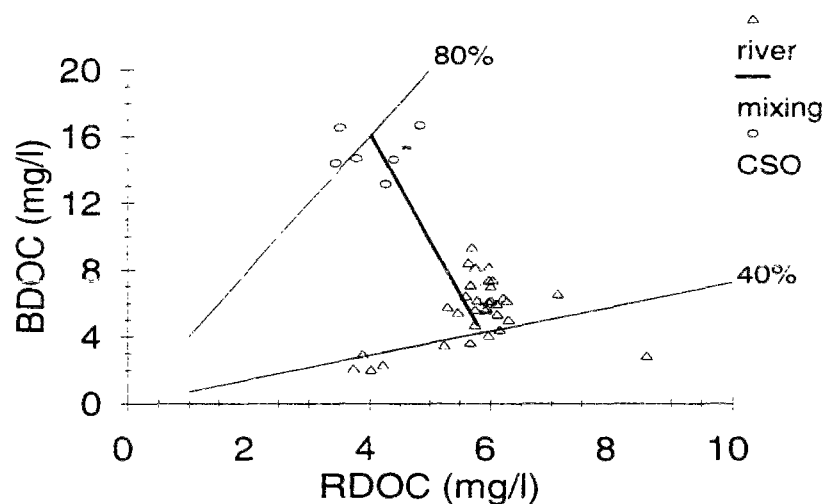
Table V gives carbon and oxygen balances for the studied events. Oxygen deficits measured at Chatou were corrected for reaeration and for initial deficit to obtain oxygen consumption. A reaeration coefficient of  $0.008 \text{ h}^{-1}$  was used (O'Connor et Dobbins, 1958), and an initial concentration of  $0 \text{ mg.l}^{-1}$  in the discharged waters was assumed. Excess bacterial production was computed from data collected in the followed water masses and corrected by a base dry weather activity. Dry weather bacterial production was computed from the average bacterial biomass of  $70 \mu\text{g-C.l}^{-1}$ , and supposing a dry weather growth rate of  $0.06 \text{ h}^{-1}$ . The obtained value ( $4.2 \mu\text{g-C.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) is in concordance with the intercept of figure 11 and corresponds to the background activity of small bacteria during dry weather.

The ratios of excess microbial growth to excess oxygen consumption in contaminated waters are about 9.5 and 6.1 for events #1 and #3 respectively. The second ratio is outside the theoretical range of 7 to 10 gram oxygen consumed per gram carbon produced, but both are within the right order of magnitude. Given the uncertainties of dry weather reference a better agreement between excess oxygen consumption and excess bacterial growth can not be expected. The total biomass, discharged during event #3 was only 0.3 tons of carbon, compared with the total in stream production of 2.0 tons of carbon, mainly due to allochthonous bacteria.

As the bacterial production was 7 times higher than the discharged biomass, the loss process should be much more intense than previously estimated by the mixing graphs. More than 2 ton carbon of large bacteria have been eliminated from the water column by settling or grazing, during event #3. Similar conclusions can be derived for event #1.

### *Origin of biodegraded organic matter*

Because of the fast settling of discharged solids, the contribution of discharged POC to oxygen consumption should be limited. It is important to verify whether the discharged DOC is high enough to support the observed oxygen consumption. Previous investigations in sewers during dry and wet weather (Servais et al., 1997) have shown an average BDOC to DOC ratio of 75%. This value was confirmed by the present study (figure 12, event#3), BDOC to DOC ratio



**Figure 12.** Relation between RDOC and BDOC for all samples collected during event #3.

vary from 40% for the river Seine to 80% for the discharged waste waters. Polluted waters inside the river have intermediate DOC values as well as intermediate BDOC over DOC ratios. The maximum oxygen consumption due to a complete BDOC degradation may be computed from the formerly described oxygen to carbon conversion factor. 15.0, 18.0 and 12.4 tons of oxygen would be consumed by a complete oxidation of BDOC for events #1, #2 and #3 respectively. Both values obtained for events #2 and #3 are in excellent agreement with the observed oxygen consumptions (table V). In the case of event #1, the discrepancy may be due to the fact that the DOC discharge was not measured but simply estimated.

This excellent agreement probably hides a more complex reality. Indeed, the expected oxygen consumption, computed from BDOC data is an overestimate. Firstly, a small fraction of the organic carbon involved in the bacterial growth process may end in the settled, non-grazed biomass, and not contribute to oxygen consumption. Secondly, the implicit hypothesis that all BDOC was degraded within the first day of transit does not hold. Reactor experiments (Mouchel et al., in prep) demonstrated that only 60 to 80% of BDOC could be degraded within 24 hours. Accordingly, the observed oxygen consumption exceeds the amount DOC potentially

degradable within 24 hours. Additional sources of degradable carbon have to be involved to balance 20 to 40% of the observed oxygen consumption. Given, the phytoplankton levels in the river Seine before the events (20-40  $\mu\text{g}$  chlorophyll-a), cell lysis due to poor light conditions or increased predation during rain events could significantly account for the needed carbon. However, we also have to acknowledge a contribution of discharged POC degradation to the oxygen budget, which could occur before the complete settling of discharged suspended solids.

**Table V :** Budgets for oxygen, carbon and biomass at Chatou. \*for event #1, DOC value is uncertain and was estimated using a mean concentration of 20 mg-C/l in the discharged waters.

event N°	transit time	initial O <sub>2</sub> deficit	Excess O <sub>2</sub> consumption at Chatou	Excess bacterial production	Discharged DOC	Discharged SS
	(h)	tons-O <sub>2</sub>	tons-O <sub>2</sub>	tons-C	tons-C	tons
#1	23.5	2.0	10.5	1.1	7.5*	113
#2	26	3.0	17.6	-	9	142
#3	28.8	1.7	12.3	2.0	6.2	30

The strong DOC excess, observed after events #2 and #3 (tableIV), despite the DOC degradation by heterotrophs, confirms the occurrence of a very significant DOC producing process after rain events in the river Seine. During event #3, more extensively studied, residual DOC (RDOC) was  $4.0 \pm 0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  in discharged waste waters, while a very consistent value of about  $5.8 \text{ mg.l}^{-1}$  was observed in river water, except some points with a lower RDOC (figure 12). We have to consider a river RDOC reference of  $5.8 \text{ mg.l}^{-1}$  for this event, which is higher than the mean dry weather level of  $4.5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Using the typical riverine RDOC/DOC ratio, the new river DOC reference becomes  $8.9 \text{ mg.l}^{-1}$ . Even with such a significantly upgraded reference, the DOC balance is still positive. The required source of additional DOC, should more than compensate the DOC degradation.

The mixing line in figure 12 joins the Clichy reference and the upgraded river Seine reference. Due to DOC degradation which tends to decrease BDOC without modifying RDOC, most data points should lay below the mixing line, but we observe that most of them are situated over the line. This confirms the need for an additional DOC source, and shows that it has to be more degradable than the river-type DOC. Both previously suggested sources, phytoplankton and discharged POC (after deflocculation or partial lysis) would fit to this definition.

## CONCLUSIONS.

The impact of a CSO with a maximum discharge of 20% of the river flow, can be followed in situ with help of conductivity and oxygen. The complexity of organic matter transport has been confirmed. It involves completely different fates of dissolved and particulate discharged organic fractions, whereby significant exchanges between both compartments probably take place. A strong sedimentation of suspended solids occurred during the first hours of transit. The solids

discharged by the overflows are mixed with a pool of riverine solids containing a suspended part but also large stock easily erodable, settled solids.

The discharged BDOC could be high enough to explain most of the observed excess of oxygen consumption if totally and rapidly degraded. However, BDOC degradation is incomplete within one day and an additional source of carbon has to contribute to the oxygen budget. Its importance is confirmed by a careful study of RDOC and BDOC patterns in the river after overflows. Potential sources are exudation or lysis from phytoplankton and partial degradation or deflocculation of initially particulate organic macromolecules.

The excess of heterotrophic activity in the contaminated water mass results from an input of large bacteria, with high specific growth rates. The population of small river bacteria is thereby only slightly affected by the input of highly degradable organic matter. The strong growth of large allochthonous bacteria is compensated by stronger loss process probably due to both settling and grazing. The measured excess bacterial activity accounted for the measured excess oxygen consumption.

The results of our study on CSO impact's provide new elements for the strategy and design of CSO treatment. Storage or settling in ponds or lamellar separators, with or without coagulation, activated sludge or fluidized bed treatments certainly do not have the same efficiency with regards to bacteria or the various (dissolved, colloidal and particulate) forms of organic matter, and consequently not the same effectiveness with regard to oxygen depletion in the receiving ecosystem.

#### ACKNOWLEDGEMENTS.

This study was funded by the PIREN-Seine programme. Strong support from SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne) is gratefully acknowledged. Mrs Adriana Anzil provided an excellent technical assistance. Valuable help was also provided by colleagues from CERGRENE and GMMA during the long and difficult field surveys.

#### REFERENCES.

- Bariller A., & Garnier J. (1993) Influence of temperature and substrate concentration on bacterial growth yield in Seine river water batch cultures. *Abp. End. Microbiology* **59**:1678-1682
- Billen, G, Servais P. & A. Fontigny (1988) Growth and mortality in bacterial population dynamics of aquatic environments. *Arch.Hydrob.Beih* **31**:173-183
- Boudet F., (1877) Rapport à M. le Prefet de Police sur l'Altération des Eaux de la Seine par les Egouts Collecteurs d'Asnières et du Nord, mesures d'Assainissement. IN: Rapport Général sur les Travaux d'Hygiène Publique et de Salubrité de 1872 à 1877, premièrepartie, chapitre 5.
- Bowie G.L., Mills W.B., Porcella D.B.& Chamberlin C.E. (1985) Rates, constants and kinetics formulations in surface water quality modeling. EPA Athens Georgia USEPA/600/3-85/40 55p.
- BPR-SOGREAH-HYDRATEC (1997). Etude d'assainissement en zone centrale d'Ile de France. Technical Report edited for SIAAP, AESN & Ministère de l'Environnement 250p.
- Chebbo G. and Bachoc A., (1992) Characterization of suspended solids in urban wet weather discharges. *Water Science and Technolohy*, **25**:171-179.
- Chebbo G., J.M.Mouchel, A.Saget & M.Gousailles (1995) La pollution des rejets urbains par temps de pluie: flux, nature et impacts. *TSM* **90**(11):796-806
- Chesterikoff B., B.Garban and D. Ollivon (1991). Daily rhythms in the river Seine: relative impacts of natural and anthropogenic factors. *Water.Res.* **25**:1523-1528

- Chocat B., Cathelain M., Mares A. & Mouchel J.M. (1994) La pollution due aux rejets urbains par temps de pluie : impacts sur les milieux récepteurs. *La Houille Blanche*, **1/2**:97-105.
- Edeline F., (1981) Model of the river Sambre, Belgium. *IN: Models for Water Quality Management* (Biswas A.K. ed. Mc Graw Hill London): 128-157
- Estebe A., J.M.Mouchel and D.Thevenot (1997) Urban runoff impacts on particulate metal concentration in river Seine. *submitted Water Air Soil Pol.*
- Even S., Billen G., Mouchel J.M. and Poulin M. (1996). Simulating the impact of CSO's from greater Paris on the river Seine using the model PROSE. *Proceedings of 7th IUCSD September 1996 Hannover (I)*:581-586
- Fischer H.B., List E.J., R.C.Koh, J.Imberger & N.H.Brooks (1979) Mixing in inland and coastal waters academic press inc Orlando USA 490P.
- Garnier, J., Servais, P. & Billen, G. (1992a) Dynamics of bacterio plankton in the river Seine (France): impact of Parisian effluents. *Can.J. Microbiol.*, **38** : 56-64. (Annexe 3.5)
- Garnier J., Billen G. and Servais P. (1992b) Physiological characteristics and ecological role of small and large size bacteria in a polluted river (Seine river). *Arch.Hydrobiol.Beih* **37**:83-94
- Harremoes P. (1982) Immediate and delayed oxygen depletion in rivers. *Water Research*, **16**:1093-1098.
- Hvitved-Jacobsen T.(1982)The impact of combined sewer overflows on the dissolved oxygen concentration of a river. *Water Research*, **16**:1099-1105.
- Loucks D.P. (1981) Water Quality models for river systems. *IN: Models for Water Quality Management* (Biswas A.K. ed. Mc Graw Hill London): 1-33
- Marsily G. and Fustec E. (1993) La Seine en son Bassin, De la Recherche à la Gestion. Actes du colloque PIREN-Seine. Paris 29-30 march .eds. CNRS 150pp.
- Melon P., Bequevorts., Billen G. & Servais P. (1996) Kinetics of flagellate grazing i the presence of two types of bacterial prey. *Microb.ecol* **31**:89-101
- Meybeck M. (1982)Carbon, Nitrogen and Phosphorus transport by world rivers. *American Journal of Science*, **282**:401-450
- Mouchel J.M., Seidl M. and Servais P. (1997). Measurement of biodegradable wastewater during rain events by means of respirometry. *In preparation.*
- O'Connor D.J. and Dobbins W.E. (1958). Mechanisms of reaeration in natural streams. *ASCE Transactions*, **123**:641-666.
- Paffoni C. (1994) Caractérisation des eaux déversées par temps de pluie à l'usine de Clichy *La Houille Blanche* **1/2**:33-38
- Porter K.G. & Feig, Y.S. (1980). Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. & Oceanogr.* **25** : 943-948.
- Seidl M., P.Servais, M.Martaud C.Gandouin and J.M.Mouchel (1998) Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events *Water.Sci.Tech.* **37**:25-33
- Servais P., (1995) Measurement of the incorporation rates of four amino-acids into proteins for estimating bacterial production. *Microbial Ecology*, **29**: 115-128.
- Servais, P., (1990) Estimation de la production bactérienne en milieu marin par mesure du taux de synthèse protéique. *Oceanologica Acta*, **13**: 229-235. (Annexe 1.7)
- Servais P. (1989) Bacterio plankton biomass and production in the river Meuse (Belgium) *Hydrobiologia* **174**:99-110
- Servais P. and Garnier J., (1993) Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microb. Ecol* **25**:19-23
- Servais P., Barillier A. and Garnier J., (1995) Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Annls. Limnol.* **31**:75-80
- Servais P., Seidl M. and Mouchel (1997) Comparison of parameters characterising organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather. *Submitted Water Env. Research*
- Stehfest H., (1977) Mathematical modeling of self-purification in rivers. Professional Paper PP-77-11. IIASA, Laxenburg, Austria.
- Simon, M. & Azam, F., (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **51** : 201-213.
- Tangerino, C (1994) Mesure de vitesses de chute des matières en suspension, du carbone organique total et des bactéries en Seine. Rapport DEA Univ Paris XII, ENPC Cergrene

## **2. EFFETS TOXIQUES de REJETS URBAINS sur le PHYTOPLANCTON**



## **Evaluation de l'impact des rejets urbains par temps de pluie sur la production primaire du phytoplancton: la contribution des métaux lourds**

**Toxicity of combined sewer overflows on river phytoplankton: the role of heavy metals**

Seidl M., V. Huang & J.M. Mouchel

*accepté ENVIRONEMENTAL POLLUTION décembre 1997*

### **résumé**

L'effet toxique des rejets urbains de temps de pluie (RUTP) sur le milieu récepteur a été étudié sur le phytoplancton de la Seine. La toxicité de la fraction dissoute du rejet des eaux usées de Paris a été testée par le biais de la production primaire. Une population phytoplanctonique de la Seine additionnée de N, P et EDTA, a été testée après 48 heures de croissance in vivo, avec les métaux lourds de référence Zn, Cu et Pb. Les concentrations des ions libres ont été calculées par le modèle de spéciation MINEQL+. Les résultats montrent une toxicité ( $EC_{50}$ ) de quelques  $\mu\text{M/l}$  pour le zinc libre, et un peu plus pour le plomb, tandis que le cuivre est toxique à dose beaucoup plus faible. Les RUTP ont été testés avec ou sans addition de l'EDTA. La valeur de  $EC_{50}$  de 50% pour l'effluent filtré diminue d'environ de 30% après l'addition de  $5 \cdot 10^{-6}$  M EDTA, montrant que la toxicité de RUTP est partiellement due aux micro polluants métallique. Cependant, cette proportion varie sensiblement avec le rejet utilisé et la dilution appliquée.





Accepted ENVIRONMENTAL POLLUTION december 1997

## TOXICITY of COMBINED SEWER OVERFLOWS on RIVER PHYTOPLANKTON: the ROLE of HEAVY METALS

Martin Seidl<sup>(1)</sup>, Viviane Huang<sup>(2)</sup> & Jean Marie Mouchel<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> CERGRENE, ENPC & ENGREF, 6 et 8 avenue Blaise Pascal, Cité Descartes, Champs sur Marne, 77455 Marne-la-Vallée Cedex2, France

<sup>(2)</sup> IBM, URA CNRS 386, ENS Montrouge, 1 rue Maurice Arnoux, 92120 Montrouge, France

### Abstract

*The toxic effect of a combined sewer overflow (CSO) on the phytoplankton community of the river Seine has been studied by means of short term primary production measurements. As the discharged solid usually do not remain in the water column, only filtered or centrifugated fractions were tested. The collected phytoplankton was grown in the laboratory for 2 days, after addition of N, P and EDTA. Stock cultures in exponential growth were directly tested with heavy metals, but resuspended algal cells were used for effluent testing. The results show an increase of EC<sub>50</sub> value for the single metal species in the order Cu << Zn ≤ Pb. Free metal contents were calculated with the chemical speciation model Mineql+. The EC<sub>50</sub> dilution of the tested CSOs effluent was 50%. This value increased of 30% after addition of 5 10<sup>-6</sup> M EDTA, indicating that the effluent toxicity is only partially due to its metallic compounds.*

*Keywords:* phytoplankton, heavy metals, productivity, combined sewer overflow, oxygen deficit

### INTRODUCTION

Anoxic conditions combined with high NH<sub>3</sub> levels due to the degradation of organic matter issued from combined sewer overflows (CSO) are known to provoke fish kills (Magaud et al. 1997, Boet et al., 1994). This strong impact overshadows other possible toxic effects of CSOs. Beside these extreme situations, observed every year in the river Seine in Paris conurbation and where the ecosystem degradation becomes obvious to the public, less dramatic but nevertheless significant impacts of combined sewer overflows on biological communities can be expected. However, very few publications have been devoted to the evaluation of non-lethal effects of CSO's on biological communities. Borchardt and Statzner (1990) and Borchardt (1993) have

studied the complex effect of hydraulic stress and ammonia concentrations on the drift of benthic organisms. Several biological indexes have been tentatively used to demonstrate non lethal effects of urban runoff discharge onto natural biological communities. Seager and Abrahams (1989) for example proposed the use of fish ventilation rates in addition to benthic diversity indexes. Payne and Hedges (1989) revealed that significant upstream/downstream diversity scores could be observed as soon as the catchment area was higher than 50 ha. Willemsen et al. (1989) and Gast et al. (1989) also reported changes in planktonic populations (benthic diatoms) in stagnant waters in the vicinity of overflows, the effects were more intense for combined sewer systems than for separate sewer systems. However, such global indexes do not allow to determine the among the major factors which may affect the ecosystem (shock flow, input of suspended solid, of organic matter, toxicity effect...).

Because of the high concentration of metals in urban runoff waters (Chebbo et al., 1995), increases of metal concentrations in organisms is another sub-lethal index of biological impact. Payne and Hedges (1989) failed to show any significant difference in cadmium, lead and copper concentrations in algae (*Cladophora*) while zinc concentrations showed a significant increase downstream urban runoff outlets. Seidl et al. (1993) confirmed short term increases of zinc concentrations in *Cladophora* in the river Seine after CSO's. Fraboulet et al. (1993) experienced high difficulties to demonstrate any significant metal concentration increases in caged *Asellus Aquaticus*, due to strong changes in animal physiology in varying environmental conditions. However, while measurable, increases of micropollutant concentrations do not necessarily prove any significant change in the role of a given population in the ecosystem : the influence of toxic effects on the fate of major biogeochemical components of the ecosystems is far from demonstrated.

During summer wet weather periods, the CSOs in Paris conurbation may contribute up to 30% of the flow of the river Seine, and their high metal content has already been reported (Estebe et al 1997, Paffoni 1994). In severely eutrophicated streams, such as the river Seine, phytoplankton plays a key role in the oxygen balance of the Seine and compensates the heterotrophic consumption. A sudden breakdown of primary production due to a phytotoxic effect would enhance oxygen depletion after overflows, while the heterotrophic bacterial activity is expected to be much less sensitive to toxic effects. We have found very little data on the ecotoxicological impacts of raw waste waters on phytoplankton communities. The aim of this study was therefore to evaluate the possible toxicity of waste waters towards phytoplankton in the river Seine and to determine the contribution of heavy metal discharge by overflows to the overall toxic effect. These results will be further used to complete water quality models in order to simulate the impact of CSO's (Even et al., submitted).

## **MATERIAL and METHODS**

The sewage toxicity was tested under laboratory conditions on natural phytoplankton mixtures by means of dark and light bottle productivity measurements. Natural phytoplankton was collected in the river Seine and grown in the laboratory during 2 to 3 days to produce enough

biomass in the exponential phase. Subsequently, three types of experiments were conducted : (i) test of single metal species buffered by EDTA, (ii) test of CSO water and (iii) test of CSO water with added EDTA.

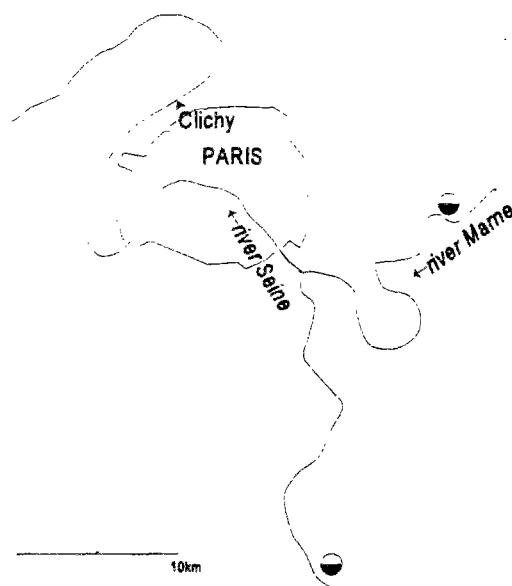


Figure 1: Sketch of the area (● sampling stations).

### Phytoplankton cultures

A phytoplankton community corresponding to a relatively unpolluted river Seine, was reconstituted by mixing Seine river water and Marne river water in the proportion of their flows at their confluence, usually 2:1. The sampling sites were situated in the moderately urbanised area at Noisy-le-Grand (river Marne) and at Ris Orangis (river Seine) about 25 km upstream of Paris (Figure 1). The samples were collected from bridges in the middle of the stream, 30 cm below the surface. The average nutrient content and the composition of the river Seine water are given in Table 1. The mean daily intensity of total solar radiation during summer was about  $60 \text{ W.m}^{-2}$ . The saturation value for phytoplankton of the Seine at  $21^\circ\text{C}$ , mentioned by Garnier et al (1992), is about  $400 \mu\text{E.m}^{-2}$  (in the PAR), equivalent of  $85 \text{ W.m}^{-2}$  total irradiation. This value is in the usual range given by Reynolds (1990) and far below the inhibitory level.

Table 1 : Typical mean values for physico-chemical data of the river Seine (Huang, 1994) during summer 1993 in Paris area and the Evian mineral water (IPL,1996), (\*) value measured in our laboratory.

	pH	NH <sub>4</sub> (mM)	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub> (μM)	Ca (mM)	Mg (mM)	Fe (μM)	HCO <sub>3</sub> (mM)	Cl (mM)	SO <sub>4</sub> (mM)
Seine	7.8	0.1	0.33	5	3	0.2	0.1	3.7	0.7	0.3
Evian	7.3	<0.003	0.05	<0.1 (*)	2	1	<0.1	5.8	0.14	0.12

The chlorophyll-a levels in the river Seine around Clichy were almost constant from June to the end of September 1996 around  $30 \mu\text{g.l}^{-1}$ , which corresponds to an algal density of  $7 \cdot 10^7$  cells.l<sup>-1</sup>.

**Table 2 : Work scheme for the different tests. Metals were added as  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  or  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Merck Pro Analysis). A stock solution of 0.15M metal + 1%  $\text{HNO}_3$  was diluted 50 times before use.**

Test	treatment of stock culture	dilution water	toxic substance
single metal species	clearing by $100\mu$	mineral water + $5 \cdot 10^{-6}$ M EDTA	metal
waste effluent	filtration $0.4\mu$ + resuspension of retained biomass in mineral water	mineral water	CSO effluent centrifuged and/or filtered at $0.2\mu$

In the laboratory, detritus and large zooplankton specimens were withdrawn by a  $100 \mu\text{m}$  nylon mesh.  $0.5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NH}_4\text{-N}$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) and  $0.05 \text{ mg.l}^{-1} \text{ PO}_4\text{-P}$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and  $5 \cdot 10^{-6}$  M EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) Pro-Analysis were added to the river water. The growth took place in 2 l polycarbonate Erlenmeyer flasks with untied caps (Nalgene) in a thermostated incubator ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under gyratory conditions (90 rpm) and continuous day light ( $40 \pm 5 \text{ W.m}^{-2}$  Sun-Glo®). Two days after the beginning of incubation, the culture was directly used for single metal testing or used after careful filtration and resuspension of biomass in mineral water (Evian) for effluent testing (Table 2). We have chosen this commercial mineral water as dilution water because of its very low micro pollutants level and its stable composition close to that of river Seine (Tab. 1).

## Experiments

Sublethal effects on primary production will not be necessarily accompanied by a reduction in cell number (De Filippis et al 1991). More sensitive techniques are needed. Determination of photosynthesis by means of oxygen production in light and dark bottles has been an approved method for a long time. Primary production determined as the rate of carbon uptake, measured by  $^{14}\text{C}$  incorporation, is another newer technique. Both methods are in good agreement, whereas the differences between in situ and in vitro measurements fall into the range of methodological errors (Williams et al 1979, Davies and Williams 1984). It should be noted that these methods measure different, although closely linked processes :  $^{14}\text{C}$  determines the carbon flux whereas the oxygen method is more associated with energy transfer. The  $^{14}\text{C}$  method was used to evaluate the effect of heavy metals on photosynthesis by different authors (Azeez and Banerjee, 1986, Thompson and Couture, 1993, Wallen 1990, Wong and Chau, 1990). Compared to growth measurements, productivity measurements are fast (several hours instead several days) and allow one to investigate a specific process rather than an overall effect. Because of its simplicity and close relation to the problem of oxygen depletion after CSOs, we have chosen the oxygen method.

The main criterium for the design of experiments was the choice of optimal oxygen difference. Measured concentration had to be higher than  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  and lower than the saturation value, with a high enough difference between the initial and final concentrations, in order to limit measurement errors.  $\text{CO}_2$  consumption during photosynthesis should not induce a rise in alkalinity higher than 0.5 pH, to avoid a strong modification of metal speciation. The optimum conditions were found by diluting the stock culture two or three times with mineral water to give a blank production between 0.5 and  $1 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Oxygen was measured with an accuracy of  $0.03 \text{ mg.l}^{-1}$  (Orbisphere 2607 oxygen metre), which led to an average error of 3.2% in the measured effect. The reproducibility of duplicates was always better than 7%.

The toxic mixtures were transferred in glass Biochemical Oxygen Demand (BOD) bottles with 1 or 2 small glass spheres for better mixing. Blanks were run with mineral water only. BOD bottles for light exposition were bubbled for a few minutes with nitrogen (Pro Analysis, filtered through  $0.2 \mu\text{m}$  PTFE membrane) in order to lower the initial oxygen content. The initial oxygen content was controlled and after an incubation period of generally 6 hours oxygen was measured again, pH and temperature were checked, and samples were eventually preserved for metal analysis. Incubation conditions were the same as mentioned for the stock culture.

### Metals and Effluent

The heavy metals used were added as slightly acidified (1 %  $\text{HNO}_3$ , Merck ultrapure) stock solutions of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu(II)SO}_4$  and  $\text{Pb(NO}_3)_2$  (Merck or Sigma Pro Analysis). The effluents were collected during two rain events at the most important CSO outlet of Paris at Clichy. The solid and liquid phases were separated in the laboratory immediately after collection, by means of centrifugation (4500 rpm, 15 min) followed by a double filtration for optimum elimination of native microorganisms and transparency of the sample (Whatman GF/F and Nuclepore polycarbonate  $0.2 \mu\text{m}$  porosity filters). Filtered solutions were used directly or kept frozen for further toxicity tests.

### Calculations

The results were converted to net production by adding gross production (measured in light bottles) and respiration (measured in dark bottles), expressed per unit of time ( $\text{mg O}_2.\text{l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Differences in temperature of more than  $0.5^\circ\text{C}$  between bottles of the same test, due to slight day and night variations in the incubator, were corrected with the Arrhenius equation. Temperature effects on photosynthesis of natural phytoplankton communities can be described by a  $Q_{10}$  of 2.2, whereas respiration is much less influenced by temperature (Reynolds 1990). The toxic effect was described as inhibition of the net production rate, compared to the blank. The concentration giving a 50% effect ( $\text{EC}_{50}$ ), was calculated by linear regression of log - logit plots as described by Litchfield and Wilcoxon (1949), using Sigma Plot® software.  $\text{EC}_{50}$  for trace metals are given in concentration units, while  $\text{EC}_{50}$  for effluents are expressed as dilutions.

## Metal analysis

All material used for culture handling or for mixture preparation, was made of polycarbonate, polysulfone or polyethylene, previously cleaned in 2% nitric acid and washed 6 times with ultrapure (18M $\Omega$ ) water. We verified that the BOD bottles did not release any significant metal during 24 hours of incubation periods, compared to the rather high metal levels used during the experiments. BOD bottles were cleaned separately following the same procedure as for the plasticware. Metals were analysed in 0.2 or 0.4  $\mu$ m syringe filtered fractions (Nuclepore) and kept frozen until analysis. The analysis of total dissolved trace metals was performed in a clean environment by Graphite Furnace Atomic Spectrometry (Varian 800-GTA100). The analysis was verified with a NRCC dissolved trace metal reference SLRS-3.

As stated by the free-ion model, the real toxic agent is the free metal ion and not the metal complex (Tessier and Turner, 1995). This model is generally accepted today, although several exceptions have been reported (Guy and Kean 1980, Campbell 1995, Errecalde et al 1997). What is not contested is that metals bound to strong ligands such as EDTA or NTA are no longer available nor toxic to phytoplankton. The concentration of antagonists to heavy metals, such as Ca and Mg can be an important factor as they modify the physiological action of metals. Interspecies differences in toxicity response to a given metal may be a factor 10 and the change of toxicity due to adaptation to the metal may be almost of the same order of magnitude (Niederlehner and Cairns, 1992, Loez et al, 1995).

The free metal ion concentration in river water, for the single metal species test, was calculated with Mineql+ program (Schescher and McAvoy, 1992) and NIST equilibrium constants (NIST, 1993) using mean river water composition. Such a model can only be used if the composition of the medium is well known and relatively stable during the exposition. In particular, the evaluation of relevant complexation constants for natural organic matter is extremely difficult. Due to progress in computer technology, calculations of metal speciation in toxicity testing are more frequent (Allen et al., 1980, Guy and Kean, 1980, Wolterbeek et al. 1995, Errecalde et al. 1997). The addition of a strong and stable metal complexant such as EDTA, to the culture medium optimises growth (Huebert and Shay, 1992), but also, as a powerful complexant with known characteristics, it enables one to calculate accurately the free ion concentrations. The slight difference between Seine water and mineral water did not give any significant divergence in speciation results.

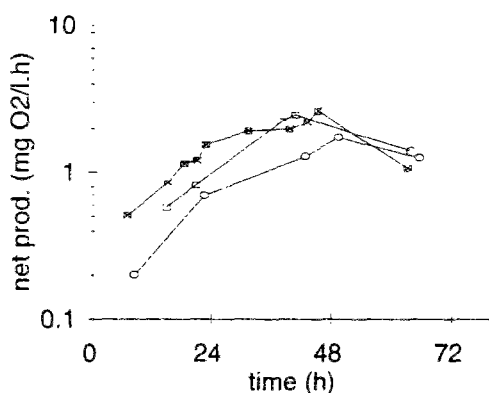
## RESULTS and DISCUSSION

### Growth

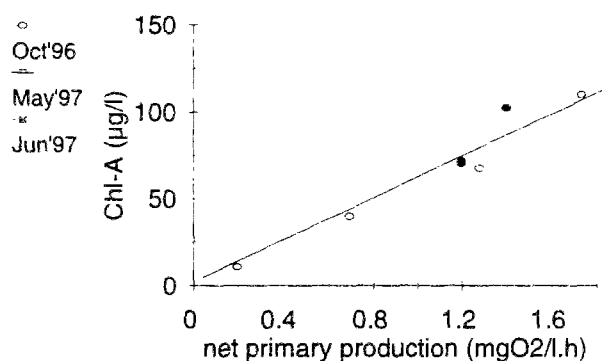
Laboratory cultures showed the usual exponential growth curve, with a productivity maximum after 2 days of incubation. Cultures issued from low phytoplankton concentrations (autumn) reached, half a day later, a lower maximum than the cultures started with high phytoplankton concentrations (spring). The mean growth rate was 1.4 d<sup>-1</sup>. This value is in the high range of

growth rates reported in the literature (Dauta, 1982). The gross production/respiration ratio reflects the physiological state of the population, it was about 5 during the exponential phase and decreased rapidly after the collapse of the culture. We have observed that the culture grown with added EDTA grew slightly faster, but collapsed also faster (Figure 2). A good correlation was found between net productivity and chlorophyll a concentration with an assimilation ratio of  $0.44 \mu\text{mol O}_2$  per  $\mu\text{g Chl a}$  and per hour (Figure 3). Since the same ratio was found for stock cultures and for blanks in mineral water, the low phosphorus content of mineral water did not influence the short term productivity measurements. Nutrient availability would rather modify long term processes like growth. The intra or extra cellular nutrient stocks, built up in the culture medium, proved to be more than sufficient for the very short incubation period we used. The maximum chlorophyll a concentration measured in stock cultures was about  $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ , similar to the maximum of algal blooms in spring downstream of Paris. The populations of stock cultures were mainly composed of Chlorophyceae species : *Chlorella* and *Scenedesmus* and in a lesser extend of *Selenastrum* and *Chlamydomonas*. The Diatoms, mostly *Tabellaria* and *Asterionella*, were never dominant and represented less than 10% of the total population. The different cultures used for assays showed surprisingly only slight variations of the composition. No daphnides and only sporadic flagellates have been observed. A bacterial density of  $9 \cdot 10^9 \text{ cells.l}^{-1}$ , comparable to that of river Seine during dry summer periods, was found in non filtered blanks. Despite a small bacterial biomass compared to the phytoplankton, the bacterial respiration may be in the same range as that of phytoplankton.

No metal contamination was revealed. The concentrations for stock culture and blanks, given in table 3, are representative for all tests. Concentrations were slightly elevated in flasks spiked with EDTA, due to extraction of adsorbed metals.



**Figure 2:** Growth curves for stock cultures of Seine phytoplankton.



**Figure 3:** Relation between net primary production and chlorophyll content for stock cultures (○) and blanks (●).



**Table 3 : Total dissolved metal content in blanks, cultures ( $5 \cdot 10^{-6}$  M EDTA) and CSO effluents. The analysis of blanks were performed on filtered samples at the end of incubation. (\*)Mean values for the Seine water  $<0.4 \mu\text{m}$ , in August downstream of Paris, Huang (1994).**

	Lead ( $\mu\text{M}$ )	Zinc ( $\mu\text{M}$ )	Copper ( $\mu\text{M}$ )
blanks in Evian water	0	0.011	$<0.003$
Cultures (EDTA)	0.0008	0.11	0.011
Seine river (*)	0.0022	0.082	0.019
CSO 200896	-	1.1	0.93
CSO 281096	0.0038	0.57	0.08

### Complexation

The proportion of free ions for the metals we tested were very different. The maximum concentration of lead effectively tested was  $24 \text{ mg.l}^{-1}$ . An increase of the total lead concentration caused the precipitation of lead carbonates and/or hydroxides and thus no free metal ion increase. Copper is by far more complexed by EDTA than by other organic chelators. The river Seine around Paris has a complexing capacity of about  $1.6 \cdot 10^{-7}$  M Cu-equivalents (Huang, 1994), probably originating from industrial and domestic sources of EDTA and NTA and is comparable to concentrations found in other European rivers (Xue et al 1995, Frimmel et al 1989). Assuming that half of this amount was EDTA (strong complexant) and a half was NTA (weak complexant), the dissolved copper of the Seine water would be complexed half by EDTA and half by hydroxides. Lead will be mostly bound to carbonates and zinc will be only slightly bound by chelators and will remain for more than 60% as free ions.

The fraction of metals bound to algal surfaces will be dependent on algal density. Hart et al (1992) describe the adsorption of copper and zinc to algal surfaces in artificially enriched lake water with a Langmuir equation. They determined a conditional stability constant of  $10^9 \text{ M}^{-1}$  for Cu and  $10^6 \text{ M}^{-1}$  for Zn, and a total concentration of algal binding sites between  $6$  and  $10 \cdot 10^{-8}$  M for an algal density of  $5^6 \cdot 10^9 \text{ cells.l}^{-1}$ . Bates et al (1982) used phytoplankton monocultures ( $3 \cdot 10^9 \text{ cells.l}^{-1}$ ) and showed that 28% of added zinc ( $15 \mu\text{M}$ ) would bind to algal surfaces within less than 4 hours. EDTA addition to a mixture of CSO and phytoplankton (about  $1 \mu\text{M}$  Zn and  $10^8 \text{ cells.l}^{-1}$ ) could desorb about the same amount of the initial dissolved zinc concentration. This distribution of zinc between algal surfaces and water phase is in good agreement with the constants measured by Hart et al (1992).

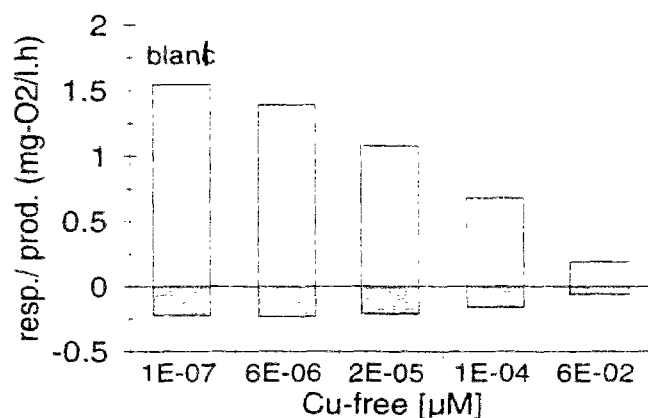


Figure 4: Example of productivity measurements with copper.

### Toxicity of single metal species

Figure 4 gives an example of oxygen production test results after copper addition. The ratio of gross production over respiration for the blank is about 6, slightly higher than in stock cultures, probably because of the removal of dead cells before testing. The ratio decreases as the inhibition effect increases. Variations in the composition of the phytoplankton inoculum, variations in the physiology of used culture (gross production to respiration ratio ranged from 3 to 7) as well as test durations varying from 4 to 20 hours do not seem to influence significantly the obtained toxicity results. Figure 5 gives the result of 3 separate tests (zinc testing) under different conditions with no significant (<99%) difference of EC<sub>50</sub> values.

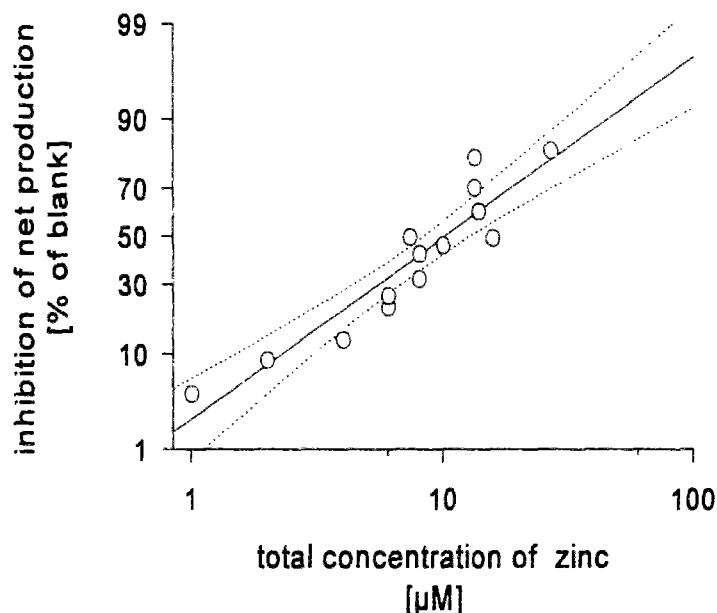


Figure 5: Inter-test variability for zinc assays. Result of 3 different zinc tests with regression line and 95% confidence limits.

For relevant comparisons, the total metal concentrations have been transformed to free ion concentration using Mineql+. The proportion of free ion and thus the  $EC_{50}$  (Figures 6 and 7) will be dependent on the physico chemical properties of each metal. The usual toxicity ranking is observed : lead  $\leq$  zinc  $\ll$  copper. The  $EC_{50}$  value of lead will only be reached after lowering the pH, for example to 6, or in solution containing less carbonates. Free ion  $EC_{50}$  computed from total metal  $EC_{50}$  are identical to  $E_{50}^C$  obtained directly from the plot of free ion concentrations.

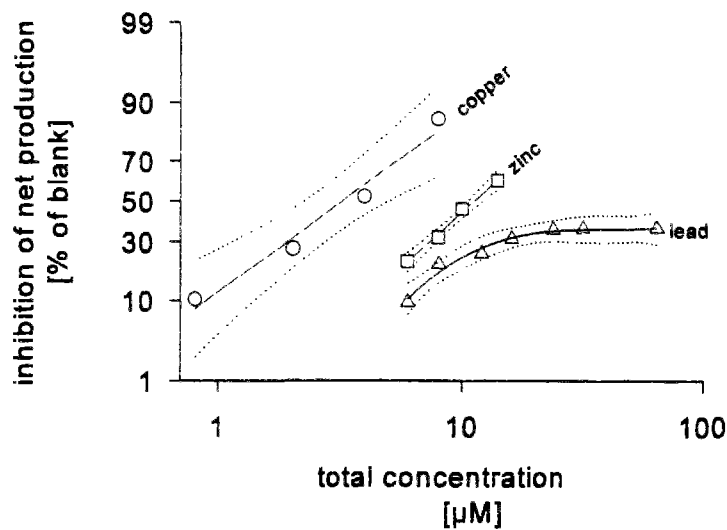


Figure 6: Probability - log plots for the heavy metals tested, concentration of total metal. Each line is the result of two different tests.

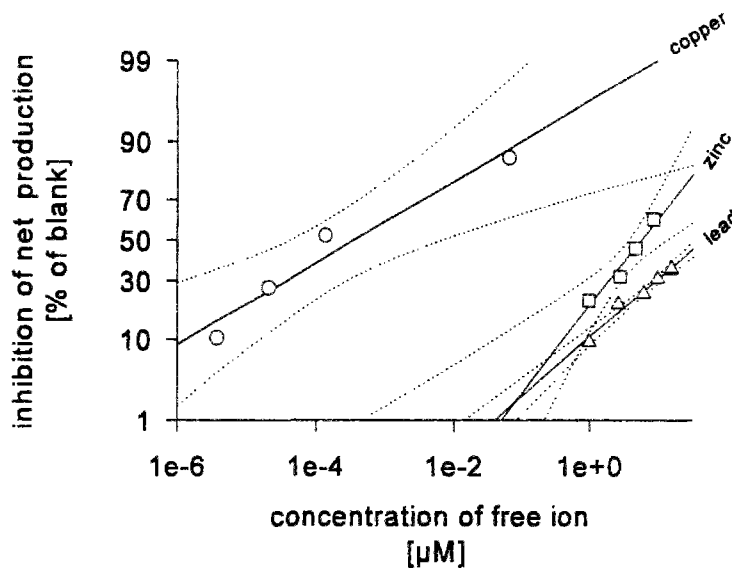


Figure 7: Probability - log plots of figure 5 recalculated for free ion concentrations.

Photosynthesis was much more affected than respiration for all substances tested (Figure 4). Photosynthesis is indeed a complex process based of some metal sensitive enzyme systems like NADP oxidoreductase (De Filippis et al 1981; Karez 1989)

The  $EC_{50}$  value of  $5.2 \mu\text{M}$  free zinc obtained during this study (Table 4) is in good agreement with values found for growth inhibition of *Selenastrum*,  $1.1 \mu\text{M}$  (Errecalde et al. 1997) and  $1.8 \mu\text{M}$  (Bartlett et al, 1974) or  $7.9 \mu\text{M}$  found for *Scenedesmus* (Petersen 1982). Wong and Chau (1990) gave an approximative  $EC_{50}$  value of  $0.4 \mu\text{M}$  free zinc for inhibition of primary productivity of a phytoplankton community of lake Ontario with no difference between green algae and diatoms. It has to be emphasized that these values were obtained under different laboratory conditions and estimated by chemical equilibrium calculations. As the  $EC_{50}$  decreases with increasing exposure, it may be expected that  $EC_{50}$  based on growth rate measurements would lead to lower values than tests based on short term production tests.

**Table 4 :  $EC_{50}$  values and their 95% confidence limits, for single metal species, in presence of  $5 \cdot 10^{-4}$  M EDTA.**

Metal	total metal ( $\mu\text{M}$ )			free metal ion ( $\mu\text{M}$ )		
	$EC_{50}$	95% <sub>low</sub>	95% <sub>up</sub>	$EC_{50}$	95% <sub>low</sub>	95% <sub>up</sub>
zinc	10.5	7.3	15	5.23	2.8	9.7
copper	3.15	2.4	4.2	$3.57 \cdot 10^{-4}$	$0.94 \cdot 10^{-4}$	$14 \cdot 10^{-4}$
lead	-	-	-	40.6	13	100

## Effluents and EDTA

### Tolerance to metals

We have observed only a small difference (5%) in  $EC_{50}$  obtained on phytoplankton populations grown in stock cultures grown with and without EDTA addition. The non metal-buffered cultures were less sensitive to waste effluent than the buffered cultures, which would suggest a slightly higher tolerance of species grown in a medium with higher free metal concentrations. However, the small difference we found, although systematic, is not significant as the mean error on inhibition data was about 4%. A 10 fold artificial rise of background concentration of zinc, manganese or copper in stock cultures caused modifications of the phytoplankton species but not of the total number of cells. These modifications were of the same amplitude as the in situ variations (Hart et al 1992). The adaptability of algae to high metal levels was demonstrated by Niederlehner and Cairns (1992). Most organisms possess a mechanism to regulate the intra cellular concentration of metals needed for growth. In the case of the Seine

river, the residence time and the metal content were probably not high enough to observe such an effect, nor in laboratory nor in situ (Huang, 1994).

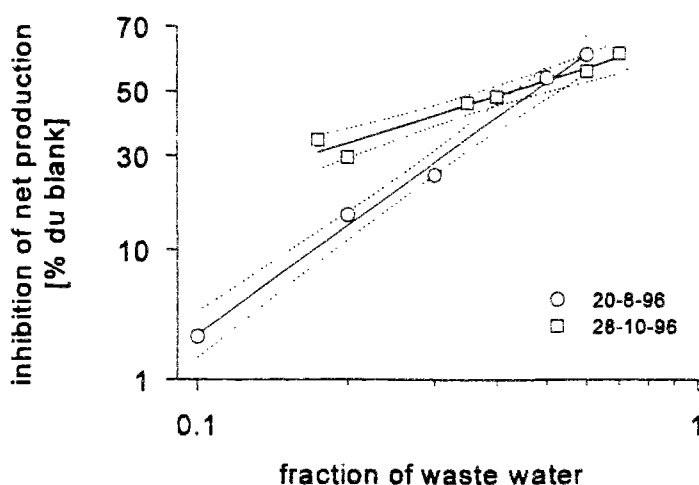


Figure 8: Probability concentration plots and their 95% confidence limits for the two effluents tested.

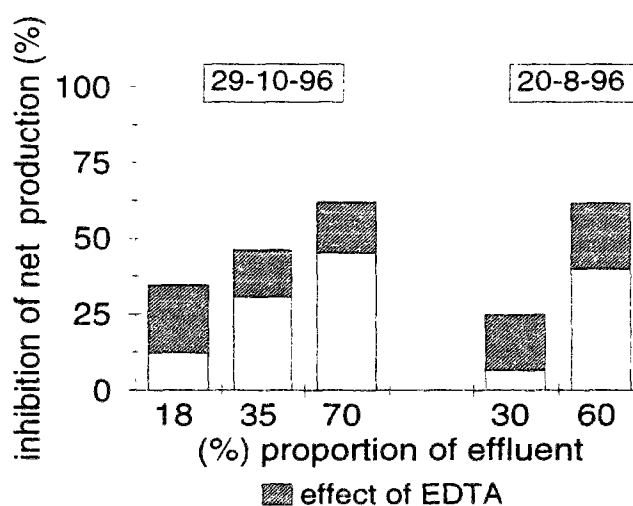
### CSO

Effluents issued from Clichy CSO during two different rain events have been tested against several samples of natural Seine river phytoplankton. For both events, the dissolved phase of the sewer effluent revealed to be toxic. Although both CSO samples did not contain the same amount of metals (Table 3) nor probably of organic micro pollutants, the difference between  $EC_{50}$  of both events was not significant (Table 5). However, the acuteness of the toxicity effect, represented by the slope of the line in figure 8, was significantly different. The confidence limits for the  $EC_{50}$  of the 20-8-96 sample are larger than those of 28-10-96 sample, because of the significantly lower slope of the former. After heavy rain storms in Paris, with one to two months return periods, we observed large patches of polluted waters, several kilometres long, with a low oxygen content (Seidl et al, 1997). The proportion of CSO effluent in these patches was in the range of 15% to 25%. Depending on the characteristics of the discharged water, we might expect a reduction in the primary production of 10 to 30% in such patches.

Table 5 : Evaluation of toxicity of 0.2  $\mu\text{m}$  filtered CSO effluent in absence and in presence of  $5 \cdot 10^{-6}$  M EDTA.  $EC_{50}$  and their confidence limits are given as effluent dilutions.

CSO Clichy	normal			EDTA added		
	$EC_{50}$	95% <sub>low</sub>	95% <sub>up</sub>	$EC_{50}$	95% <sub>low</sub>	95% <sub>up</sub>
20-8-1996	0.47	0.4	0.6	0.68	0.6	0.8
28-10-1996	0.43	0.3	0.7	0.88	0.6	>1

The addition of  $5 \cdot 10^{-6}$  M EDTA significantly decreased the effluent toxicity. As shown in table 5, 50% to 100% more effluent was needed in solutions where EDTA had been added to obtain the same inhibition effect (namely 50%). This suggests that a fraction of CSO toxicity, but not all, is due to heavy metals. The added EDTA was sufficient to complex all heavy metals in the solution and eventually extract metals bound to solid surfaces. With higher EDTA concentrations, Carlson and Morisson (1992) showed that  $EC_{50}$  value for raw wastewater sludge of Göteborg, measured with Microtox (600 mg SS/l), was almost 4 times higher after addition of  $10^{-2}$  M EDTA. The waste waters discharged during the events we sampled contained 0.6 to  $1.1 \mu\text{M}$  of total dissolved zinc with probably 80% in free ion form. At the  $EC_{50}$  dilutions, the concentrations of free Zn were about 0.2 to  $0.4 \mu\text{M}$  which can only explain a little less than 10% inhibition of photosynthesis (see figure 6). If the toxic effects can be considered as additive, inhibition due to zinc would explain more than half of the reduction in toxicity at  $EC_{50}$  after EDTA addition. Lead and copper will most probably not contribute to the toxicity due to their low concentration in the waste waters and the high amount of complexing agents. However, evaluating the contribution of specific pollutants in a global toxic effect is not an easy task. The additive model seems acceptable for the 20.08.96 event, since the inhibition due to 60% of CSO water is twice as high as the inhibition measured in the solution containing 30% CSO water, but it is clearly not acceptable for the effluent collected during the 29.10.96 event (Figure 9). Once toxic effects cannot be added, the concept of contribution should not be used. The absolute net production enhancement after EDTA addition seems almost constant for both events and whatever the dilution we used. If we assume that EDTA addition only prevents the interaction of toxic metals ions with biochemical processes in algal cells, the conclusion would be that the toxic effect of metals contained in CSO waters does not depend on their concentration. Once again, this invalidates the additive or linear model.



**Figure 9:** Summary of effluent tests with and without EDTA. Total bars figure the toxicity of mixtures of CSO and Evian water, empty bars figure the toxicity of the mixtures after EDTA addition ( $5 \cdot 10^{-6}$  M).

Many other types of toxics can be found in CSO waters. Marchand et al (1989) gives values of about  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  of chlorinated solvents and anionic surfactants and  $25 \text{ ng.l}^{-1}$  of Lindane in the dissolved fraction of urban sludges, Chevreuil et al (1990) report  $290 \text{ ng.l}^{-1}$  of PCB in Parisian sewage. Even if toxic effects of single compounds are known, the complexity of waste effluents makes it hardly possible to determine individual contributions or interactions. Since it is not possible to reconstitute CSO waters step by step to specifically study synergic or threshold effects, conclusions regarding contributions of specific pollutants should be kept as cautious as possible. In particular the presence of toxic metal complexes in polluted river water has already been reported (Tubbing et al 1992).

### *Suspended matter*

The metal load of a CSO consists of a particulate and a dissolved fraction. Recent investigations (Seidl et al, 1997) showed a fast deposition of the discharged solids in the river. The pollutants affecting the phytoplankton directly should therefore be mostly found in the dissolved fraction and possibly in the exchangeable or colloidal part of the solid fraction. The dissolved fraction, arbitrarily defined as  $< 0.4 \mu\text{m}$ , contains complexed and free metal ions as well as metals adsorbed onto colloidal matter.

Preliminary results obtained with centrifuged but not filtered CSO waters (Table 6) indicate that the suspended, not settleable, matter contains large amounts of weakly bound heavy metals, able to increase the toxicity. The  $\text{EC}_{50}$  of centrifuged effluent (0.21) was significantly different from the  $\text{EC}_{50}$  of centrifuged and filtered effluent (0.45). The change in light extinction due to suspended matter was less than 5%, and did not significantly modify oxygen production. Analysis of CSOs mentioned elsewhere (Chebbo and Bachoc 1992, Morisson et al 1989), confirm that the very fine particles in CSOs are extremely polluted and that they contain a large amount of extractible metals. The labile part is comparable to the total dissolved fraction and may be responsible in our tests for the increase in toxicity.

**Table 6 : Total dissolved metals in assays with centrifuged (C) and centrifuged plus filtered (CF) effluent collected on 28.10.96 at Clichy. Blanks contained 10 ppm of suspended solids (algae) and the 60% dilution about 32.**

	LEAD nM		ZINC $\mu\text{M}$		Inhibition %	
	CF	C	CF	C	CF	C
10% Clichy	0,53	0	0,03	0,05	7,6	21
20% Clichy	1,06	3,8	0,05	0,08	30	61
40% Clichy	1,3	7,8	0,11	0,19	48	67
60% Clichy	2,2		0,22		56	
CSO extractible	<b>3,8</b>	<b>27</b> 62%	<b>0,57</b>	<b>1,03</b> 84%		

## CONCLUSIONS

The set up for BOD measurements may be used after minimal adaptation as a simple, fast and low cost method for the evaluation of toxicity to phytoplankton.

The Parisian CSOs contain important quantities of loosely complexed zinc, able to inhibit primary production. If some lead is present it will probably be bound as a non toxic aqueous carbonate complex, subject to precipitation. Copper is potentially toxic, even if its concentrations in the CSO effluents are low. A 35 fold increase of the background level showed already an inhibitory effect. However, copper is also strongly complexed by natural or anthropogenic ligands. The way the copper is complexed will greatly determine its contribution to overall effluent toxicity. If EDTA significantly contributes to the total complexation capacity for copper measured in the river Seine, we would expect a very low toxicity due to copper.

The filtered fraction of CSO waters may still decrease the net productivity after 5 fold dilution in the river. In such conditions 10% to 30% inhibition of production is expected. However, we could also demonstrate that the non-settleable fraction of the particulate fraction for CSOs would strongly increase the inhibitory effect up to 60% for the CSO sample we studied. Given the importance of photosynthesis in the oxygen balance of anthropized, generally eutrophicated streams, such toxicity effects should be included in models describing CSO impacts.

We could demonstrate that EDTA addition significantly enhanced photosynthesis in solutions containing dilutions of CSO waters. Our results also show that free zinc ion contained in CSO waters would produce an inhibition effect of about half of the total reduction of inhibition due to EDTA addition at the  $EC_{50}$  CSO dilution. This suggests that zinc may contribute to CSO toxicity towards phytoplankton. Speciation computations suggest that lead and copper would not contribute to the effluent toxicity. But given the extreme complexity of real toxic actions in pollutants mixtures, contributions of individual species to the total toxic effect should not be quantified before a very complete set of experiments are performed to assess pollutant interactions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded in the frame of the PIREN-Seine program. Chlorophyll a data have been kindly provided by SIAAP. The contribution of one of the anonymous referees to the improvement of the english quality of the former manuscript is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- Allen H.E, R.H. Hall and T.D. Brisbin (1980). Metal speciation, effects on aquatic toxicity. *Environmental Science and Technology*.14(4):441-442



- Azeez P.A. and K.Banerjee (1986). Effect of copper and cadmium on carbon assimilation and uptake of metals by algae. *Toxicology and Environmental Chemistry* **12**:77-86
- Bartlett L., F.W. Rabe and W.H. Funk (1974) Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Research* **8**, 179-185.
- Bates.S.S., A.Tessier, P.C.G.Campbell and J.Buffle (1982) Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *Journal of Phycology* **18**:521-529
- Boet P., Duvoux B., Allardi J. and Belliard J. (1994) Impact des orages estivaux sur le peuplement piscicole de la Seine à l'aval de l'agglomération parisienne. *La Houille Blanche* **1/2**:141-147.
- Borchardt D. and Statzner B. (1990) Ecological impact of urban stormwater runoff studied in experimental flumes : population loss by drift and availability of refugial space. *Aquatic Sciences* **52**:299-314.
- Borchardt D. (1993) A framework for the evaluation of ecological impacts of sewer overflows discharges in running waters. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Conference on Urban Storm Drainage, Niagara Falls, Vol 1*: 42-47
- Campbell P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-ion Activity Model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R.), pp. 45-102. J. Wiley and Sons, New York, NY
- Carlson. C.E.A. and G.M.Morrison (1992). Fractionation and toxicity of metals in sewage sludge. *Environmental Technology* **13**:751-759
- Chebbo G. and A Bachoc (1992) Characterization of suspended solids in urban wet weather discharges. *Water Science and Technology*, **25**:171-179.
- Chebbo G., J.M Mouchel., A. Saget and M. Gousailles (1995) La pollution des rejets urbains par temps de pluie : flux, nature et impacts. *Techniques, Sciences et Méthodes*, novembre, n°11, 796-806.
- Chevreuil M., L.Granier, A.Chesterikoff and R.Letolle (1990) PCB partitioning in waters from river, filtration plant and wastewater plant: the case for Paris (France). *Water Research* **24**(11):1325-1333.
- Dauta A. (1982) Condition de développement du phytoplacton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. 2. Rôle des nutriments. *Annales de Limnologie*, **18**:263-292.
- Davies J.M and P.B. Williams (1984). Verification of <sup>14</sup>C derived primary organic production measurements using an enclosed ecosystem. *Journal of Plankton Research* **6**(3):457-474
- De Filippis L.F., R.Hamp and H.Ziegler (1981). The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. *Archives of Microbiology* **128**:407-411.
- Estebe A., J.M.Mouchel and D.Thevenot (*accepted 1997*) Urban runoff impacts on particulate metal concentration in river Seine. *Water, Air, Soil Pollution*.
- Errecalde O., M.Seidl and P.G.C. Campbell (*accepted 1997*). Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model. *Water Research*.
- Even S., J.M. Mouchel, M. Seidl, P. Servais and M. Poulin, (*submitted*) Simulation des déficits d'oxygène dissout dans la Seine en aval de déversoirs d'orage à l'aide du modèle Prose. *Annales de Limnologie*.
- Fraboulet S., R. Mulliss , J. Flores-Rodriguez, J.M. Mouchel , M. Revitt, E. Garnier-Zarli and D.R. Thévenot (1993) The use of metal bioindicators to assess the impact of combined sewer overflows on the river Seine. *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Storm Drainage, Niagara Falls Canada. vol II*:500-505.
- Frimmel et al (1989). NTA und EDTA in Fliessgewässern der Bundesrepublik Deutschland. *Vom Wasser* **72**:175-184.

- Garnier J., G.Billen, P.Hanset and M. Coste (1992) Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. In Rapport de Synthèse 1989-1992 vol I, CNRS PIREN Seine.
- Guy R.D. and A.R.Kean (1980). Algae as a chemical speciation monitor I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Water Research* **14**, 891-899.
- Hart B.T., N.A.Currey and M.J.Jones (1992). Biogeochemistry and effects of copper, manganese and zinc added to enclosures in Island Billabong, Magela Creek, northern Australia. *Hydrobiologia* **230**:93-134.
- Huang V.W. (1994). Evolutions des métaux dissous dans la Seine. In Rapport 1993/III Bassins versants urbains, CNRS PIREN Seine.
- Huebert D.B. and J.M.Shay (1992). The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **22**:313-318.
- IPL (1996). Institut Pasteur de Lyon, Analyses physico chimique des sources Evian.
- Karez S.C (1989). Les métaux et les algues marines : Toxicité et accumulation du zinc et du cadmium chez *Crisosphaera elongata* et *Acetabularia acetabulum* These de doctorat en toxicologie fondamentale et appliquée Université Paris VII.
- Litchfield J.T. and F.Wicoxon (1949) A simple method of evaluating dose effect experiments *Pharmacology and Experimental Therapy* 1949(**96**):99-113
- Loez C.R., M.L.Topalian and A.Salibian (1995). Effects of zinc to the structure and growth dynamics of a natural freshwater phytoplankton assemblage reared in the laboratory *Environmental Pollution* **88**:275-281.
- Magaud H., B.Migeon, P.Morifin, J.Garric and E. Vindimian (1997). Modelling fish mortality due to urban storm runoff : interacting effects of hypoxia and un-ionized ammonia *Water Research* **31**(2):211-218.
- Marchand M., J.C.Caprais, P.Pignet and V.Porot (1989). Organic pollutants in urban sewage and pollutant inputs to the marine environment. *Water Research* **23**(4):461-470.
- Moore J.W. & S.Ramamoorthy (1983). Heavy metals in natural waters. Springer Verlag New York 268p.
- Morisson M.P., D.M.Revitt and J.B.Ellis (1989). Metal speciation in separate storm water system USWQ conference September 1989 Wageningen.
- Niedrelehner B.R. & J.Cairns (1992). Community response to cumulative toxic impacts: Effects of acclimation on zinc tolerance of Aufwuchs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**:2155-2163.
- NIST (1993). NIST Critical stability constants of metal complexes data base (Edited by Martell A.E. and Smith R.M.). National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Database 46, Gaithersburg, MD.
- Paffoni C. (1994) Caractérisation des eaux déversées par temps de pluie à l'usine de Clichy. *La Houille Blanche* **1/2**:33-38
- Payne J.A. and P.D. Hedges (1989) An evaluation of the impacts of discharges from surface water sewer outfalls. *Proceedings of the 2nd Conference on "Urban Storm Water Quality and Ecological Effects upon Receiving Waters"*, Wageningen Netherlands.
- Peterson R. (1982). Influence of copper and zinc on growth of a freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda* : the significance of chemical speciation. *Environmental Science and Technology* **16**(8):443-447.
- Reynolds C.S. (1990). The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge 384p.
- Schescher W.D. and D.C.McAvoy (1992) MINEQL<sup>+</sup> : a Software Environment for Chemical Equilibrium Modelling. *Computer and Environmental Urban Systems* **16**, 65-76.

- Seager J. and R.G.Abrahams (1989) The impact of storm sewage discharges on the ecology of a small urban river. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Wageningen Conference on "Urban Storm Water Quality and Ecological Effects upon Receiving Waters".
- Seidl M., P.Servais and J.M.Mouchel (*submitted 1997*) Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after combined sewer overflows submitted. *Water Research*.
- Seidl M., C. Bourdier and J.M. Mouchel (1993). Evolution des teneurs en métaux dans *Cladophora Glomerata*. Mise en évidence de l'influence des déversements. in PIREN-Seine Report. 1992-Vol IV. CNRS. France.
- Tessier A. and D.R. Turner eds (1995). Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Wiley, New York, NY. 900p.
- Thomson P.A. and P.Couture (1993). Physiology of carbon assimilation in green alga during exposure to and recovery from cadmium. *Ecotoxicology and Env. Safety* **26**:205-215.
- Tubbing D.M.J., W. Admiraal and W.Van der Meent (1992). Complexes of copper inhibit bacterial metabolism. Second European Conference on Ecotoxicology (SECOTOX). Amsterdam, The Netherlands
- Wallen D.G (1990). The toxicity of chromium to photosynthesis of the phytoplankton assemblage of lake Erie. *Aquatic Botany* **38**:331-340.
- Williams P.B., R.C.T. Raine and J.R.Bryan (1979). Agreement between the <sup>14</sup>C and oxygen methods of measuring phytoplankton production. *Oceanologica Acta* **4**:411-416.
- Wolterbeek H.T., A. Viragh, J.E. Sloof, G. Bolier, B. Van Der Veer and J. Kok (1995). On the uptake and release of zinc in the growing alga *Selenastrum capricornutum* Printz. *Environmental Pollution* **88**:85-90.
- Wong P.T.S. and Y.K.Chau (1990). Zinc toxicity to freshwater algae. *International Journal of Toxicity Assessment* **5**:167-177.
- Xue H., L.Sigg and F.G.Kari (1995). Speciation of EDTA in natural waters : Exchange kinetics of Fe-EDTA in river Water. *Environmental Science and Technology* **29**:59-68

## **L'effet de différents complexants organiques sur la toxicité du cadmium et du zinc chez l'algue verte *Selenastrum capricornutum*: Une exception au modèle de l'ion libre**

**Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model**

Olivier Errecalde, Martin Seidl and Peter G. C. Campbell

*WATER RESEARCH* 1998-2 (32):419-430

### **résumé**

La toxicité de cadmium et zinc en présence des différents complexants organiques a été testée sur *Selenastrum capricornutum* dans le milieu de culture FRAQUIL. Le milieu de culture a été ajusté pour obtenir des concentrations constantes du Ca et Mg. La spéciation des métaux a été calculée à l'aide du logiciel MINEQL+. Les valeurs de toxicité exprimées en concentration d'ion libre, obtenu avec ou sans complexant NTA, ne montrent pas des différences significatives. En présence de citrate, aux mêmes concentrations d'ion libre, l'effet toxique est beaucoup plus prononcé. Les mesures avec  $\text{Cd}^{2+}$  marqué, montrent une accumulation 2 fois plus élevée en présence du citrate. Parallèlement une accumulation du citrate égale à 4 fois l'accumulation du cadmium, a été démontrée. Contrairement aux prédictions du modèle de l'ion libre, nos résultats montrent clairement que la biodisponibilité des métaux peut être influencée par la présence des métabolites de faible poids moléculaire, tels que le citrate.



**INFLUENCE OF a LOW MOLECULAR WEIGHT METABOLITE (CITRATE) on the TOXICITY of CADMIUM and ZINC to the UNICELLULAR GREEN ALGA *Selenastrum capricornutum*: an EXCEPTION to THE FREE-ION MODEL**

**OLIVIER ERRECALDE,\*MARTIN SEIDL\*\* and PETER G.C. CAMPBELL\*<sup>2</sup>**

\*Université du Québec, INRS-Eau, C. P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

\*\*Cergrene ENPC Paris, La Courtine, Noisy le Grand, 93167, France

**ABSTRACT**

Toxicities of Cd and Zn to the chlorophyte *Selenastrum capricornutum* were determined in synthetic media buffered by 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of NTA (FRAQ<sub>NTA</sub>) or citrate (FRAQ<sub>CIT</sub>), or in unbuffered FRAQUIL medium (FRAQ). Metal speciation in these exposure media was adjusted so as to maintain constant free concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Me}^{2+}$  even while the free  $\text{Zn}^{2+}$  or  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations were varied. The growth response of the alga to variations in free  $\text{Zn}^{2+}$  and free  $\text{Cd}^{2+}$  was similar in FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> media, but algal sensitivity to free  $\text{Zn}^{2+}$  or free  $\text{Cd}^{2+}$  increased markedly in FRAQ<sub>CIT</sub> medium. Addition of Zn to FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> or FRAQ<sub>CIT</sub> media (0.02 - 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  free  $\text{Zn}^{2+}$ ) caused a decrease in the algal growth rate, but the algae remained in exponential growth just as long as in the control (72 h). Similar results were obtained for exposures to Cd in FRAQ or FRAQ<sub>NTA</sub> media (0.01 - 0.9  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  free  $\text{Cd}^{2+}$ ), but additions of Cd to FRAQ<sub>CIT</sub> yielded anomalous growth curves (heightened sensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$  at low Cd levels; shortened period of exponential growth at high Cd levels). Short-term (6 min) intracellular uptake of radiolabelled  $^{109}\text{Cd}$  was measured in the three media containing the same free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration (0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Uptake of cadmium was more than 2-fold higher in FRAQ<sub>CIT</sub> than in the other two media. Under the same conditions, the alga could be shown to accumulate citrate; the measured uptake rate (83  $\text{pmol citrate}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) was about 4 times greater than that of Cd in the presence of citrate (21  $\text{pmol Cd}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - the citrate transporter would only have to be "fooled" once every four transport events to account for the enhanced cadmium uptake in the presence of citrate. Our results clearly show that the bioavailability of Cd and Zn diverges from the predictions of the Free-Ion Model in the presence of a low molecular weight metabolite such as citrate - "accidental" or "piggy-back" uptake of the metal-ligand complex across the biological membrane is a plausible explanation for this enhanced availability.

**Key words** - algae, cadmium, citrate, growth rate, NTA, *Selenastrum capricornutum*, speciation, toxicity, uptake, growth yield, zinc

## INTRODUCTION

Such of our current appreciation of how dissolved metals interact with aquatic organisms has been derived from laboratory studies on freshwater and marine algae. The advantages of using algae as bioassay organisms are well documented (for example: small size, access to large populations, ease of culture, use of simple inorganic culture media, rapid growth rate (Walsh, 1988; Luoma, 1995)). Experiments are typically carried out in chemically defined exposure media; metal accumulation by the algae, or the effects of metal additions on algal growth (stimulation or inhibition), are monitored as an indication of metal "bioavailability". From such experiments a convincing body of evidence has been derived to support the tenet that the biological response elicited by a dissolved metal is usually a function of the free-metal ion concentration,  $M^{2+}(H_2O)_n$ ; these empirical observations led to the formulation of the Free Ion Model (FIM) for metal-organism interactions (Morel, 1983; Morel and Hering, 1993; Sunda, 1988/89).

Almost without exception, experiments conforming to the FIM have been performed at a fixed pH, with divalent trace metals (Cu, Cd, Ni, Pb, Zn), in artificial (inorganic) media or in filtered sea water, and in the presence of known quantities of synthetic ligands such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) or nitrilotriacetic acid (NTA) (Campbell, 1995). These ligands act as metal buffers - by manipulating the total metal concentration,  $[M]_T$ , and/or the total ligand concentration,  $[L]_T$ , one can adjust the free-metal ion concentration,  $[M^{2+}]$ , over the desired range. Perhaps fortuitously, these ligands form hydrophilic complexes with the metals of interest, for example  $CuNTA^{-1}$  and  $CuEDTA^{-2}$ , towards which biological membranes are virtually impermeable (Simkiss and Taylor, 1995).

A limited number of exceptions to the FIM have been reported in the literature (Campbell, 1995). Many of these exceptions can be explained by the presence in the exposure media of lipophilic metal ligand complexes,  $M-L_n^0$ , which are able to traverse biological membranes without first dissociating (Florence and Stauber, 1986; Phinney and Bruland, 1994). However, there are a number of intriguing reports in the literature of enhanced metal availability in the presence of low molecular weight, hydrophilic ligands of biogenic origin (primary metabolites). Within the construct of the FIM, complexation of a metal by such a ligand would be expected to decrease its bioavailability, and indeed in all documented examples such a decrease is noted. However, in several carefully controlled experiments with aquatic organisms (Table 1), the metal's "residual" bioavailability in the presence of the ligand proved to be greater than would have been predicted on the basis of the free-metal ion concentration at equilibrium. The designs of the experiments demonstrating these apparent exceptions to the FIM are similar: a concentration-response curve is first determined in the absence of the ligand, and then the experiment is repeated in the presence of the ligand. The free-metal ion concentration in the presence of the ligand is either measured or calculated, and then used to predict the biological response; in each case the metal proved to be more "available" than predicted from the concentration-response curve.

Possible explanations of this apparent anomalous behavior of metals in the presence of low molecular weight metabolites include (a) inadvertent changes in the exposure medium as the ligand concentrations are manipulated (notably a decrease in free  $Ca^{2+}$  levels) and (b) "accidental" metal transport. Given the central metabolic role played by amino acids and organic acids such as citrate, and the possible presence of specific membrane-bound transport systems designed to facilitate the assimilation of these metabolites (Raven, 1980), it is tempting to speculate that metals might traverse biological membranes in the presence of

amino acids or citrate by "accidental" transport, where the ligand is assimilated as a metal-ligand complex and the metal is internalized.

**Table 1.** Apparent exceptions to the Free Ion Model - Low molecular weight ligands forming hydrophilic metal complexes - adapted from Campbell (1995)

Species	Metal (pM <sup>2+</sup> )*	Medium	Exposure time	Response	Reference
<i>Daphnia magna</i> (freshwater cladoceran)	Cu 1(10.3-8.2)	Synthetic medium +glycine or β-alanine or glutamic acid	2 d	mortality: EC <sub>50</sub> (Cu <sup>2+</sup> ) in presence or absence of ligands	Borgman & Ralph (1983)
<i>Poecilia reticulata</i> (guppy)	Cu (8.0-7.4)	"	4 d	mortality: LC <sub>50</sub> (Cu <sup>2+</sup> ) in presence or absence of ligands	
<i>Paratya australiensis</i> (freshwater shrimp)	Cu (7.1-6.5)	Filtered aged tap water + glycine	6 d	mortality: LC <sub>50</sub> (Cu <sup>2+</sup> ) in presence or absence of glycine	Daly <i>et al.</i> (1990)
<i>Selenastrum capricornutum</i> (freshwater chlorophyte)	Cu (11.5-7.8)	Synthetic medium + citrate or ethylenediamine	1 d	growth inhibition: (μ <sub>17-23h</sub> vs. pCu <sup>2+</sup> )	Guy Kean (1980)
<i>Salmo gairdneri</i> (perfused gill of rainbow trout)	Cd (8.0-5.0)	Synthetic medium + citrate	1 h	uptake Cd: (log flux Cd vs. pCd <sup>2+</sup> ; log [Cd] <sub>gill</sub> vs. pCd <sup>2+</sup> ) (1984)	Part & Wikmark

\* Metal concentrations expressed as pM<sup>2+</sup> = - log<sub>10</sub>[M<sup>2+</sup>].

The present experiments were designed to differentiate between these two explanations, in a simple system consisting of a green unicellular freshwater alga (*Selenastrum capricornutum*) as the test species and citrate as the representative low molecular weight, hydrophilic metabolite. The biological endpoints included the algal growth rate (μ), algal cell density after 72 h of incubation, metal uptake and ligand uptake. The experiments demonstrated (i) that the toxicity of cadmium and zinc was enhanced in the presence of citrate, (ii) that cadmium uptake into the algae was enhanced in the presence of citrate, and (iii) that algal uptake of citrate was sufficient to explain the enhanced metal bioavailability in terms of accidental transport.

## MATERIAL AND METHODS

### Experimental design

To demonstrate whether or not metal bioavailability was enhanced in the presence of a low molecular weight (LMW) metabolite, it was first necessary to determine the concentration-response curve in the absence of the metabolite. Two such curves were determined: first in a simple inorganic growth medium and then in the same medium but in the presence of NTA (a metal buffer to which algal membranes are known to be impermeable



(Simkiss and Taylor, 1995; Daly *et al.*, 1990)). Finally, the concentration-response was determined in the presence of citrate as the LMW metabolite. In all three media, the free-metal ion concentrations were calculated and the algal response was related to variations of free  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations. Measured biological responses included algal growth rates, algal densities after 72 h of incubation, short-term metal uptake, and short-term citrate assimilation. The addition of ligands (NTA or citrate) or metals (cadmium or zinc) to algal growth media may lead to changes in the availability of other cationic species; to minimise such potential artefacts, the composition of the exposure media was adjusted as necessary to maintain the free cation concentrations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Me}^{2+}$ ) at constant levels.

All glassware and polycarbonate ware were washed with 15% nitric acid, deionized water and high-purity deionized water ( $>17.5 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) obtained from a commercial system employing mixed-bed ion exchange, charcoal adsorption and filtration ( $0.2 \mu\text{m}$ ) steps. The culture medium and all the other solutions were prepared with high-purity deionized water and analytical grade reagents or better. To minimize possible microbial or chemical contamination, the manipulations were carried out in a laminar flow hood, close to a propane flame used to sterilize laboratory ware.

### Stock culture

*S. capricornutum* UTCC 37 (University of Toronto Culture Collection; received from the Department of Botany, University of Toronto, 09/16/94 and 09/09/96) was grown in the

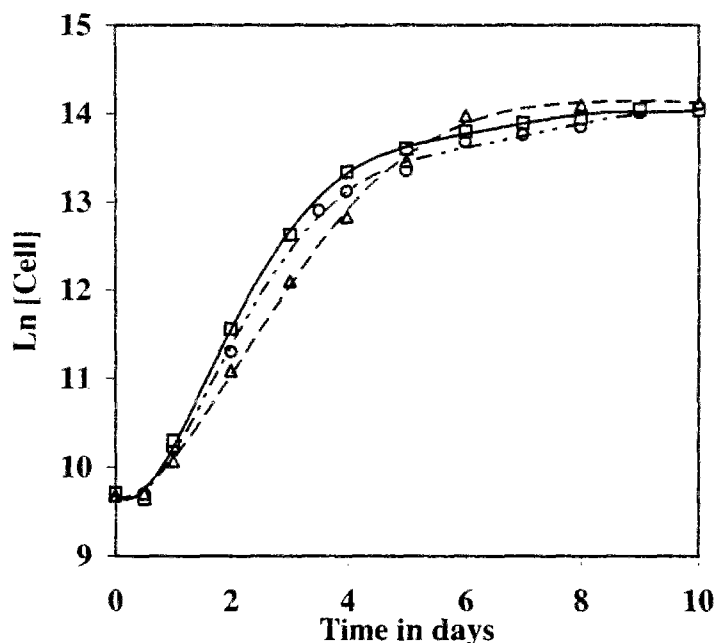
**Table 2.** FRAQUIL composition; Morel *et al.* (1975).

Elements concentration*	Total concentration in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Free-ion in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Sodium	$2.85 \cdot 10^{-4}$	$2.85 \cdot 10^{-4}$
Potassium	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Calcium	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$2.4 \cdot 10^{-4}$
Magnesium	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$
Chloride	$5.01 \cdot 10^{-4}$	$5.0 \cdot 10^{-4}$
Carbonate	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$2.8 \cdot 10^{-8}$
Sulfate	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.43 \cdot 10^{-4}$
Nitrate	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Phosphate	$1 \cdot 10^{-5}$	$2.0 \cdot 10^{-11}$
Silicate	$1.25 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-13}$
Molybdate	$1.5 \cdot 10^{-9}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$
Manganese II	$2.3 \cdot 10^{-8}$	$5.4 \cdot 10^{-10}$
Cobalt II	$2.5 \cdot 10^{-9}$	$3.0 \cdot 10^{-13}$
Copper II	$9.9 \cdot 10^{-10}$	$3.8 \cdot 10^{-16}$
Iron III	$4.51 \cdot 10^{-7}$	$6.4 \cdot 10^{-21}$
Zinc II	$4 \cdot 10^{-9}$	$5.6 \cdot 10^{-13}$
EDTA	$5 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-14}$

\* Free-ion concentrations calculated using the MINEQL<sup>+</sup> chemical equilibrium model, but with updated equilibrium constants (NIST 1993).

artificial freshwater medium FRAQUIL (Morel *et al.*, 1975; see Table 2) at  $20.0^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ , under a continuous light regime and with gyratory shaking of about 50 rpm. A light intensity of  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  was provided by cool white fluorescent bulbs. The medium was

prepared from three stock solutions (nutrients, salts and trace metal-EDTA solution); the nutrient and salt solutions were prepared with analytical grade reagents and were used as prepared. To minimize iron oxide precipitation, the trace metal-EDTA solution was sterilized by filtration through a 0.2  $\mu\text{m}$  Nuclepore membrane filter prior to being introduced into the autoclaved and cooled nutrient salt solution. The complete medium was then equilibrated for 24 h before the algae were introduced (1 L in Pyrex Erlenmeyer flasks of 2 L capacity). Under these conditions, the average exponential growth rate was  $(0.042 \pm 0.007) \text{ h}^{-1}$  or  $(1.0 \pm 0.2) \text{ d}^{-1}$  ( $\mu \pm \text{SD}$ ;  $n = 18$ ; see Fig. 1). A new stock culture was initiated 72 h before each bioassay experiment, in order to have an algal inoculum in exponential growth.



**Figure 1.** Growth curves of *S. capricornutum* in FRAQUIL, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub> media. (•) FRAQUIL average  $\mu \pm \text{SD}$ :  $(0.042 \pm 0.007) \text{ h}^{-1}$ ,  $n=18$ ; (o) FRAQ<sub>NTA</sub> average  $\mu \pm \text{SD}$ :  $(0.042 \pm 0.002) \text{ h}^{-1}$ ,  $n=15$ ; ( $\Delta$ ) FRAQ<sub>CIT</sub> average  $\mu \pm \text{SD}$ :  $(0.049 \pm 0.002) \text{ h}^{-1}$ ,  $n=15$ .

### Metal toxicity experiments

*S. capricornutum* in exponential growth phase (i.e., 72 h after inoculation into fresh FRAQUIL medium) was harvested from the stock culture by gentle filtration onto a 0.4  $\mu\text{m}$  Nuclepore membrane filter and subsequently rinsed with sterile FRAQUIL medium with no trace metal-EDTA solution added. To minimize cell breakage, the applied vacuum did not exceed 13 kPa. Cells were then resuspended in one of three bioassay media to give an initial cell concentration of about 20 000 cells·mL<sup>-1</sup>. The inoculated cultures were then maintained under the same light regime and with the same shaking as the original stock culture. Algal growth was followed over time (see below).

The first test medium (FRAQ) consisted of the artificial freshwater FRAQUIL (Morel *et al.*, 1975) with no trace metal-EDTA solution added, but with additions of inorganic cadmium or zinc. The second medium (FRAQ<sub>NTA</sub>) resembled FRAQUIL but contained trace metals added as a NTA solution rather than as an EDTA solution; total cadmium or zinc concentrations were adjusted to give the same range of free Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> concentrations as in

the first experiment. The third medium (FRAQ<sub>CIT</sub>) consisted of FRAQUIL with a trace metal-citrate solution added; again, the same range of free Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> concentrations was studied as in the first two experiments. A range of free Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> concentrations was achieved with one control solution (the bioassay media FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> or FRAQ<sub>CIT</sub>) and several test solutions with free metal ion concentrations increasing respectively from 0.009 µmol·L<sup>-1</sup> to 0.87 µmol·L<sup>-1</sup> for Cd<sup>2+</sup> and from 0.023 µmol·L<sup>-1</sup> to 2.04 µmol·L<sup>-1</sup> for Zn<sup>2+</sup> (Table 3). These concentration ranges were chosen to bracket the approximate IC<sub>50</sub> value, which had been identified in preliminary screening experiments.

**Table 3.** Composition of the FRAQ, FRAQ<sub>CIT</sub> and FRAQ<sub>NTA</sub> media for the cadmium and zinc experiments: variation of the free concentrations of the other main elements (mol · L<sup>-1</sup>) as the free Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> concentrations were increased.

#### Cadmium experiments

Elements	FRAQ	FRAQ <sub>NTA</sub>	FRAQ <sub>CIT</sub>
Calcium	2.5 · 10 <sup>-2</sup>	2.51 · 10 <sup>-4</sup>	2.46 · 10 <sup>-4</sup>
Magnesium	1.49 · 10 <sup>-4</sup>	1.52 · 10 <sup>-4</sup>	1.48 · 10 <sup>-4</sup>
Manganese	0	4.89 · 10 <sup>-9</sup>	5.92 · 10 <sup>-10</sup>
Cadmium	from 8.05 · 10 <sup>-8</sup> to 8.04 · 10 <sup>-7</sup>	from 8.76 · 10 <sup>-8</sup> to 8.39 · 10 <sup>-7</sup>	from 8.60 · 10 <sup>-9</sup> to 8.70 · 10 <sup>-7</sup>
Cobalt	0	4.38 · 10 <sup>-13</sup>	4.12 · 10 <sup>-13</sup>
Copper	0	3.01 · 10 <sup>-14</sup>	3.77 · 10 <sup>-16</sup>
Iron	0	1.34 · 10 <sup>-24</sup>	2.37 · 10 <sup>-21</sup>
Zinc	0	7.01 · 10 <sup>-13</sup>	4.88 · 10 <sup>-13</sup>
NTA*	0	1 · 10 <sup>-4</sup>	0
Citrate*	0	0	1 · 10 <sup>-4</sup>

#### Zinc experiments

Elements	FRAQ	FRAQ <sub>NTA</sub>	FRAQ <sub>CIT</sub>
Calcium	2.5 · 10 <sup>-2</sup>	2.60 · 10 <sup>-4</sup>	2.45 · 10 <sup>-4</sup>
Magnesium	1.49 · 10 <sup>-4</sup>	1.40 · 10 <sup>-4</sup>	1.50 · 10 <sup>-4</sup>
Manganese	0	3.50 · 10 <sup>-9</sup>	5.92 · 10 <sup>-10</sup>
Cadmium	0	0	0
Cobalt	0	3.20 · 10 <sup>-13</sup>	4.12 · 10 <sup>-13</sup>
Copper	0	2.00 · 10 <sup>-14</sup>	4.23 · 10 <sup>-16</sup>
Iron	0	1.60 · 10 <sup>-20</sup>	4.85 · 10 <sup>-21</sup>
Zinc	from 0.20 · 10 <sup>-6</sup> to 2.00 · 10 <sup>-6</sup>	from 0.30 · 10 <sup>-9</sup> to 2.04 · 10 <sup>-6</sup>	from 0.02 · 10 <sup>-6</sup> to 2.00 · 10 <sup>-6</sup>
NTA*	0	1 · 10 <sup>-4</sup>	0
Citrate*	0	0	1 · 10 <sup>-4</sup>

\* Concentrations expressed as total concentrations.

For the FRAQ medium, Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> solutions were prepared from their respective nitrate salts and added aseptically to the autoclaved nutrient salt solution. For FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub> media, trace metal-NTA and trace metal-citrate solutions were added aseptically to the autoclaved nutrient salt solution and allowed to equilibrate for 24 h before addition of the Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> solutions. In all three cases, the algal inoculum was aseptically introduced into the media 24 h after the metal addition. The Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, metal-NTA and metal-citrate solutions were sterilized by filtration through 0.2 µm Nuclepore membrane filters. The final citrate and NTA total concentrations in the buffered media were 100 µmol·L<sup>-1</sup>.

In the two buffered media (FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub>), for experiments involving additions of Cd<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>, total concentrations of Ca, Mg and other metals were adjusted as

necessary so that the other free metal and salts concentrations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Me}^{2+}$ ) remained at constant levels along the range of free  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations (Table 3). In the light of the initial results obtained in  $\text{FRAQ}_{\text{CIT}}$  (see below), an additional experiment was carried out in this medium. The concentration of free  $\text{Cd}^{2+}$  was kept constant, at a level lower than the algistatic concentration to *S. capricornutum*, while the Cd-citrate concentration was increased from  $0.077 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $1.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Metal speciation in the culture media was calculated with the chemical speciation model MINEQL<sup>\*</sup> (Schecher and McAvoy, 1992) with corrected equilibrium constants (NIST, 1993; Serkiz *et al.*, 1996). Variations in pH were less than 0.2 pH units over the incubation time. Equilibrium calculations confirmed that these variations did not induce significant changes in metal speciation. The use of a pH buffer was thus judged to be unnecessary. The initial pH of the bioassay solutions was 7.3 without adjustment for cadmium solutions; for zinc experiments the pH was adjusted aseptically to 7.3 with a suprapure NaOH ( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) solution sterilized by filtration.

All bioassay experiments were performed at least in triplicate, in polycarbonate ware (250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of growth medium) to minimize adsorptive losses to the container walls, and over as short as possible time period (72 h) to minimize possible effects of algal exudates. For the zinc experiments, three separate measures of algal growth were employed: cell numbers, biovolumes, and chlorophyll-*a* concentrations. For the cadmium experiments only cell numbers were followed over time. The manipulations performed were as follows:

- *S. capricornutum* cell concentrations were determined with an electronic particle counter (Coulter Multisizer II, with a  $50 \mu\text{m}$  orifice). The algae were enumerated in the size range  $2.5$  to  $7.5 \mu\text{m}$ , after a ten-fold dilution (1 mL of growth medium aseptically removed and diluted with 9 mL of Isoton II electrolyte that had been prefiltered through  $0.2 \mu\text{m}$  polycarbonate Nuclepore filters). Measurements were made every 12 h and growth rates were calculated for the interval from 12 h to 48 or 72 h.
- Total biovolumes were calculated from the cell density data of each sample as the sum of the cumulative spherical volumes of each size class ( $n = 256$ ) using the Multisizer software. The surface of the cellular biomass was also calculated, for use in the flux calculations, on the basis of the average diameter of the cells measured by the particle counter and with the assumption that the cells were spherical.
- The chlorophyll-*a* concentrations were determined by acetone extraction and fluorescence measurements. A subsample of the diluted culture (0.5 mL) was mixed with acetone (4.5 mL) and a saturated solution of  $\text{MgCO}_3$  (25  $\mu\text{L}$ ) and kept for 12 h in the refrigerator at  $6^\circ\text{C}$ . The mixture was then centrifuged for 10 minutes at 2500 rpm, the acetone layer decanted, and fluorescence ( $F_E$ ) determined with a fluorometer (Turner Designs, model 10-005R). The acetone extract was then acidified (10  $\mu\text{L}$ ,  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl), mixed and recentrifuged for 10 minutes at 2500 rpm. These solutions were analyzed for determination of the acidified fluorescence ( $F_A$ ). Chlorophyll-*a* concentrations were then calculated according to Parson *et al.* (1984):  $\text{Chl-}a = 1.83 \times (F_E - F_A) \times (V_{\text{EX}}/V_S)$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), where  $V_S$  = volume of the sample and  $V_{\text{EX}}$  = volume of the extract.

### Accumulation experiments

<sup>109</sup>Cd: To relate the toxic effects of cadmium to its bioconcentration by the test alga, radiolabelled <sup>109</sup>Cd was used to follow short-term (0 → 6 min) metal uptake rates in the three

bioassay media (FRAQ, FRAQ<sub>CIT</sub> and FRAQ<sub>NTA</sub>). We chose to study short-term uptake in order to minimize the possible influence of the test algae on their exposure medium. The total ligand concentrations in the metal-buffered media were the same as for growth experiments: 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for citrate or 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for NTA. The free  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations were identical in the three media (0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); according to the Free-Ion Model, cadmium uptake should thus be similar in all the uptake experiments. For the  $^{109}\text{Cd}$  bioaccumulation experiments, 100 mL portions of FRAQ, FRAQ<sub>CIT</sub> and FRAQ<sub>NTA</sub> were aseptically spiked with radiolabelled  $^{109}\text{Cd}$  (0.62  $\text{mCi}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 0.083  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl; Amersham, Toronto) and allowed to equilibrate for 24 h. The final specific activities in the exposure media were 180  $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ . The free ion concentrations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Me}^{2+}$ ) and the pH were adjusted to the same values as in growth experiments. Exponentially growing *S. capricornutum* was collected by filtration from the stock culture as previously described, rinsed and resuspended in radiolabelled FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> or FRAQ<sub>CIT</sub> (initial cell densities were 80 000  $\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The assays were performed at least in triplicate, in 250 mL polycarbonate Erlenmeyer flasks. Light and gyratory shaking regimes were the same as in the growth experiments. After a 6 min exposure time, the samples were filtered through 0.4  $\mu\text{m}$  polycarbonate filters (Nuclepore) and immediately rinsed three times with 10 mL of the unlabelled incubation medium. The algae collected on the filter were resuspended in a  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  solution (10 mL; 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 10 min before being refiltered and rinsed as above. Correction for passive retention of radionuclides by the filter membrane was achieved by using two superimposed filters, the bottom filter serving as the control for radionuclide adsorption. The EDTA rinse technique was designed to remove  $^{109}\text{Cd}$  bound to the surface of the algal cells, leaving behind the operationally-defined intracellular metal (Schenck *et al.*, 1988). Metal uptake is expressed as a flux per unit algal surface area ( $\text{pmol Cd}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

**[ $^{14}\text{C}$ ]-citrate:** As a complement to the cadmium uptake experiments, an additional assay was performed with radiolabelled [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate to study uptake of the ligand. Total citrate concentration, exposure times and experimental conditions were the same as for the  $^{109}\text{Cd}$  uptake experiments, but algal cell density was somewhat higher (150 000  $\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The exposure medium was prepared by spiking FRAQ<sub>CIT</sub> medium with [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate ([1,5- $^{14}\text{C}$ ]-citric acid, Amersham, Toronto) to give a final specific activity of 0.5  $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ . The [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate buffered medium contained cadmium at the same free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration as before (0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). After a 6 min exposure time, the samples were filtered through two superimposed 0.4  $\mu\text{m}$  polycarbonate filters (Nuclepore). Algae on the filter were resuspended in 10 mL of a  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  solution (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 10 min, collected on the superimposed filters a second time, and rinsed three times with 10 mL of the unlabelled incubation medium. The algae collected on the upper filter were counted as described below; the lower filter served as a control for passive retention of [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate by the polycarbonate membrane.

**Radio-isotope counting:** For the  $^{109}\text{Cd}$  experiments, filter and solution radioactivities were determined with a gamma spectrometer (LKB Wallac Compugamma Model 1282) in the 21-121 keV energy range. The samples were placed in 5 mL vials with one of three different matrices: incubation solution (2 mL; counting efficiency = 56.0 %; measurement error = 0.7 %); dry filters with algae (filter + algae + 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; counting efficiency = 55.8 %; measurement error = 1 %); or dry filters without algae (filter + 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; counting efficiency = 55.5 %; measurement error = 0.9 %). Counting times were set to collect a minimum of 20 000 counts. For the [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate experiments, filter and solution radioactivities were determined by liquid scintillation counting (LKB Wallac Rack-Beta Model 1215) in the 50-165 keV, 110-145 keV and 145-184 keV energy ranges. Ecolume (ICN, Montreal) was used as the scintillation cocktail. The samples were placed in 20 mL vials and counted with one of

three different analytical matrices: filter with algae (filter + algae + 10 mL Ecolume; counting efficiency = 86.8 %; measurement error = 0.7 %); filter without algae (filter + 10 mL Ecolume; counting efficiency = 86.5 %; measurement error = 0.7 %); incubation solution (5 mL incubation solution + 15 mL Ecolume; counting efficiency = 83.6 %; measurement error = 0.6 %). Counting times were set to collect a minimum of 200 000 counts.

### *Respiration experiments*

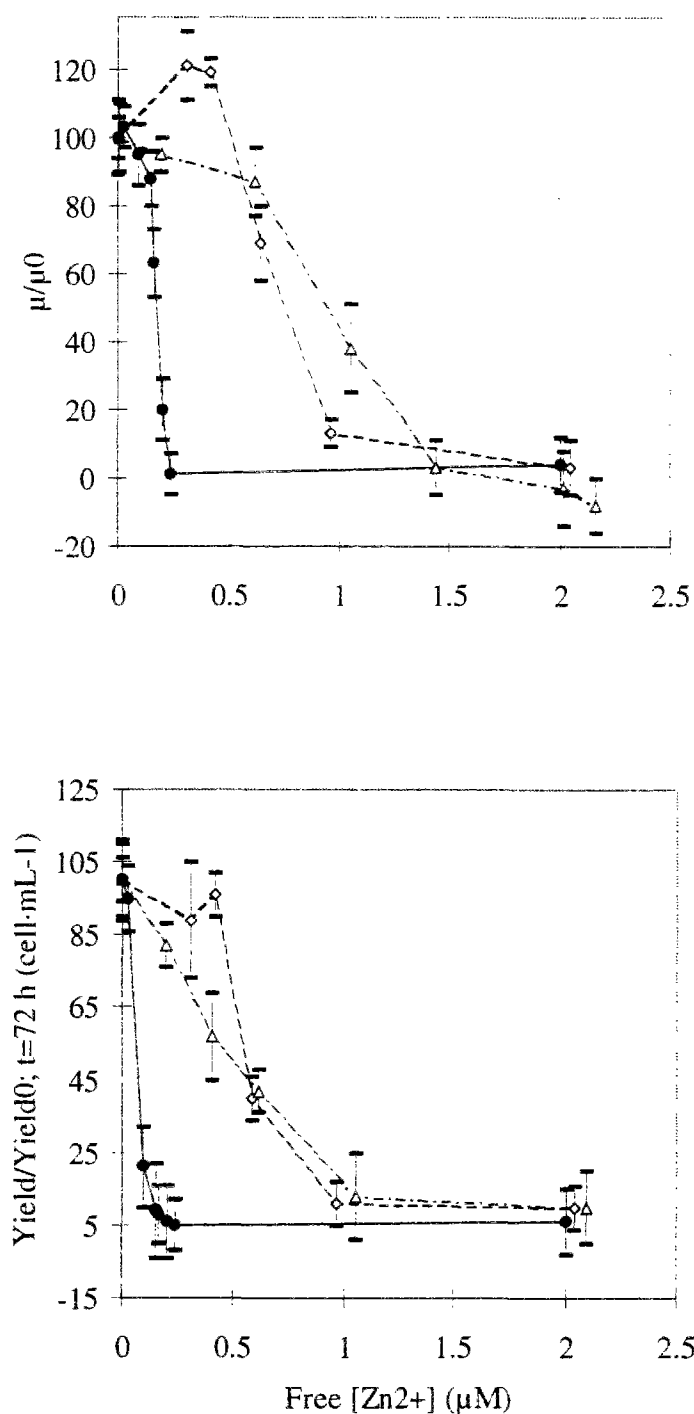
*S. capricornutum* growing exponentially in stock culture was collected by filtration, rinsed and resuspended in FRAQ<sub>CIT</sub> medium that had previously been spiked with [<sup>14</sup>C]-citrate. The composition of the FRAQ<sub>CIT</sub> medium was the same as before and the free-metal ion concentrations (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, M<sup>2+</sup>) were adjusted as previously described. To facilitate the detection of respired [<sup>14</sup>C]-O<sub>2</sub>, both the contact time (2 h) and the algal density (10<sup>5</sup> cell·mL<sup>-1</sup>) were greater than in the citrate uptake experiments. The respiration assays were performed in the light (100 μmol·photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), on 10 mL portions of the culture solution placed in 20 mL closed glass vials fitted with a septum. A filter paper wetted with 30 μL of phenethylamine was suspended above the incubation medium (Cooksey, 1978). Experiments were performed in triplicate in FRAQ<sub>CIT</sub>, with or without added cadmium ([Cd<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> = 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>), and control experiments were carried out under the same conditions but without algae. At the end of the incubation, the solution was acidified with 15 μL of concentrated HNO<sub>3</sub> (60%) added through the septum with a syringe. After a degassing period of 30 min, the vials were opened and the filters removed, placed in scintillation vials, dissolved with scintillation cocktail (Ecolume, 15 mL) and counted as described earlier (filter + 15 mL Ecolume; counting efficiency = 73%; measurement error = 0.6%).

## RESULTS

### *Effects of the test media on the growth characteristics of S. capricornutum*

The growth curves for *S. capricornutum* were analyzed in terms of initial lag times and exponential growth rates for each of the three media (FRAQUIL, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub>). The initial lag phases were of similar duration (~12 h) in all the test media (Fig. 1). The calculations of the exponential growth rates were based on at least 15 assays for each media, and are expressed as the arithmetic mean,  $\mu$ ,  $\pm$  the standard deviation (SD):  $\mu$ -FRAQUIL = (0.042  $\pm$  0.007) h<sup>-1</sup>;  $\mu$ -FRAQ<sub>CIT</sub> = (0.049  $\pm$  0.005) h<sup>-1</sup>;  $\mu$ -FRAQ<sub>NTA</sub> = (0.042  $\pm$  0.002) h<sup>-1</sup>. Clearly there is no marked difference among the main growth parameters for *S. capricornutum* in the three media tested. These results confirm that the two buffers, NTA and citrate, when used in the absence of excess trace metals, were not toxic to *S. capricornutum*.

Student t-tests of the growth rate data confirmed that growth rates in FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> were not statistically different ( $p > 0.05$ ,  $df=32$ ), but did indicate that algal growth in FRAQ<sub>CIT</sub> was slightly better ( $p_{\text{FRAQ}} < 0.0035$ ,  $df=32$ ;  $p_{\text{FRAQNTA}} < 0.00005$ ,  $df=28$ ) than in the other two growth media. This small increase in growth rate may reflect some uptake and metabolism of citrate by the alga, an interpretation supported by the [<sup>14</sup>C]-citrate uptake/respiration experiments discussed below.



**Figure 2.** (A): Relative growth rates ( $\mu/\mu_0$ ) of *S. capricornutum* as a function of the free Zn<sup>2+</sup> concentration in FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub> media.  $\mu$ =growth rate of the assay;  $\mu_0$ =growth rate of the control. (D) unbuffered medium; ( $\hat{a}$ ) medium buffered by NTA; (-) medium buffered by citrate. (B): Relative yields (Yield/Yield<sub>0</sub>) of *S. capricornutum* as a function of the free Zn<sup>2+</sup> concentration in FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub> media (yields measured after 72 h). Yield = yield of the assay; Yield<sub>0</sub> = yield of the control. (D) unbuffered medium; ( $\hat{a}$ ) medium buffered by NTA; (-) medium buffered by citrate. The error bars correspond to standard deviations (n=3).

### Effect of zinc on algal growth

In the experiments with added zinc, algal cell numbers, biovolumes and chlorophyll-*a* concentrations were measured concurrently to evaluate the response of *S. capricornutum* to increasing free  $Zn^{2+}$  concentrations. The three parameters proved redundant, yielding essentially identical  $\mu/\mu_0$  ratios as a function of the free  $Zn^{2+}$  concentrations ( $\mu$  = assay growth rate;  $\mu_0$  = control growth rate); accordingly, only results for cell number measurements will be discussed here.

In both the FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> test media, the growth rate of *S. capricornutum* decreased progressively at free  $Zn^{2+}$  concentrations greater than about  $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , with complete inhibition being observed at free  $Zn^{2+}$  levels greater than  $\sim 1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 2A). In the FRAQ<sub>CIT</sub> medium, a similar decrease in the algal growth rate occurred but with a lower free  $Zn^{2+}$  threshold, around  $0.015 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . In all three cases, at free  $Zn^{2+}$  values below the algistatic concentration the algae remained in exponential growth phase for the same length of time as the control (24  $\rightarrow$  72 h; Fig. 3A) but the overall growth rate decreased as the zinc concentration was raised.

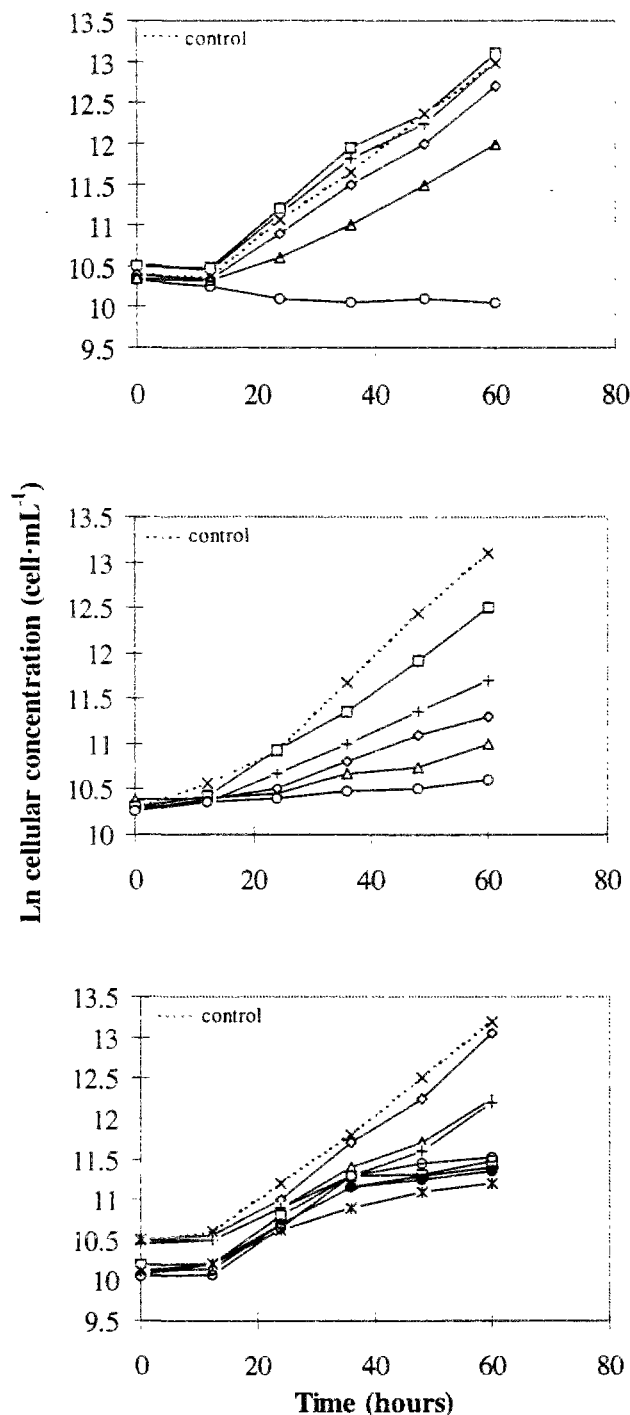
The increased sensitivity of the test alga to free  $Zn^{2+}$  in the presence of citrate is also reflected in the yields of algal biomass after 72 h of incubation (Fig. 2B); for example, at a free  $Zn^{2+}$  concentration of  $0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , in the presence of citrate, the yield of *S. capricornutum* after 72 h of incubation was reduced by about 95%, whereas at a similar free  $Zn^{2+}$  value in FRAQ or FRAQ<sub>NTA</sub> medium the reduction in yield was less than 5%.

### Effect of cadmium on algal growth

The response of *S. capricornutum* to variations in the free  $Cd^{2+}$  concentration was similar in both FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> media (Fig. 4A). As the free  $Cd^{2+}$  concentration was increased from  $0.009 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the growth rate of the test alga decreased to 15% of the control growth rate determined in the absence of added cadmium. As was the case for the zinc exposures, the algae maintained exponential growth in the experimental media for the same length of time as did the control (24  $\rightarrow$  72 h), but the actual growth rate was reduced as the free  $Cd^{2+}$  concentration increased (Fig. 3B). If the toxicity of free  $Cd^{2+}$  to the alga is expressed not in terms of growth rate but rather of yield of *S. capricornutum* biomass after 72 h in FRAQ or FRAQ<sub>NTA</sub> media, the similarities of the algal responses to free  $Cd^{2+}$  are also evident (Fig. 4B).

The response of *S. capricornutum* to the same range of free  $Cd^{2+}$  concentrations, but in the presence of citrate (FRAQ<sub>CIT</sub>), differed markedly from that observed in the other two media. The algal growth rate in FRAQ<sub>CIT</sub> medium decreased abruptly over the range  $0.009$  to  $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  free  $Cd^{2+}$  concentrations (Fig. 4A), but then remained constant at  $\sim 50\%$  of the control growth rate even though the free  $Cd^{2+}$  concentration was increased from  $0.13$  to  $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . At  $Cd^{2+}$  concentrations  $< 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , growth inhibition was greater in the presence of citrate than would have been predicted from the free  $Cd^{2+}$  concentration (FIM). Plots of algal cell numbers as a function of time showed that algal growth slowed markedly after 36 h.





**Figure 3.** (A): Toxicity of  $Zn^{2+}$  to *S. capricornutum* - changes in the algal growth curves in FRAQ, FRAQ<sub>CIT</sub>, and FRAQ<sub>NTA</sub> media as  $[Zn^{2+}]_{free}$  is increased. (x) control, (•)=0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (+)=0.45  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (à)=0.65  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (D)=0.95  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (o)=2.04  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . (B): Toxicity of  $Cd^{2+}$  to *S. capricornutum* - changes in the algal growth curves in FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> media as  $[Cd^{2+}]$  is increased. (x) control, (•)=0.08  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  free  $Cd^{2+}$ , (+)=0.26  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (à)=0.42  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (D)=0.66  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (o)=0.84  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . (C): Toxicity of  $Cd^{2+}$  to *S. capricornutum* - changes in the algal growth curves in FRAQ<sub>CIT</sub> medium as  $[Cd^{2+}]_{free}$  is increased. (x) control, (à)=0.009  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (D)=0.02  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (+)=0.04  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (o)=0.08  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (•)=0.27  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (-)=0.42  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (·)=0.63  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (\*)=0.87  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  in media containing citrate and  $>0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $Cd^{2+}$  (Fig. 3C); this algistatic effect was not observed in the other media, even at the highest  $Cd^{2+}$  concentrations studied (0.84  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

The enhanced sensitivity of *S. capricornutum* to free  $\text{Cd}^{2+}$  at low concentrations and in the presence of citrate was also reflected in the yields of algal biomass at the end of the incubation period (Fig. 4B). For example, at a free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of  $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , in the presence of citrate, the yield after 72 h was reduced by about 93% compared to the control; at the same free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration in FRAQ or FRAQ<sub>NTA</sub> media, the reduction in algal biomass was only 20%.

The foregoing results suggested to us that one or more of the Cd-citrate complexes ( $\text{Cd}\text{-Hcitrate}$ ,  $\text{Cd}\text{-citrate}^-$  and  $\text{Cd}\text{-citrate}_2^{2-}$ ) might be able to cross the *S. capricornutum* plasma membrane and enter the cytoplasm, affecting algal growth. To test this hypothesis, we exposed the test alga in FRAQ<sub>CIT</sub> medium to a constant free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration ( $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) while increasing the total cadmium and total citrate concentrations. As the Cd-citrate concentration was raised 20-fold from  $0.077$  to  $1.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the algal growth rate over the period 12-36 h decreased from 50% of the control to 30% of the control growth rate (Fig. 5). As observed previously for the FRAQ<sub>CIT</sub> medium, severe inhibition of algal growth occurred after 36 h exposure.

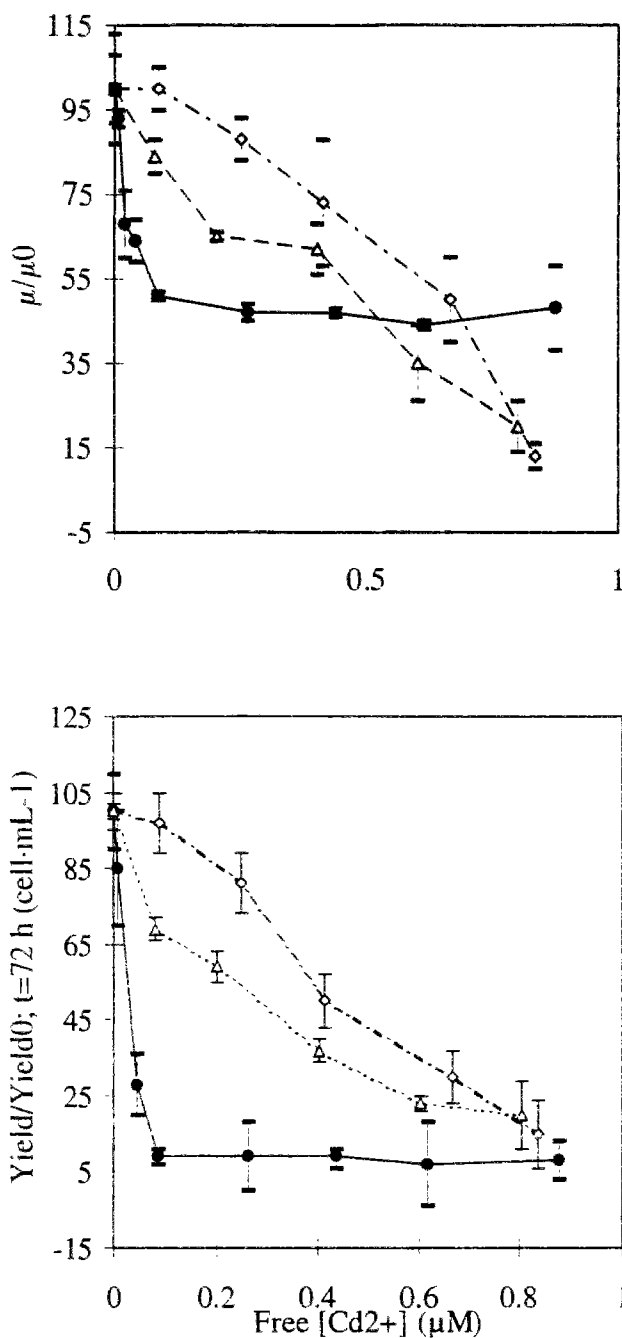
### *Accumulation of cadmium and citrate by S. capricornutum*

To test the hypothesis that citrate was in some manner enhancing metal uptake by the test alga, we measured the uptake of cadmium by *S. capricornutum* in three different media: FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub>. The experimental conditions were adjusted so that the algae were exposed to the same free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration in all three media ( $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Exposure times were kept short (6 min) and cell densities were kept low ( $80\,000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), to minimize the influence of the algae on the test media; total cadmium in solution decreased by less than 2% over the course of the incubation. Uptake rates were expressed as fluxes per unit surface area of algal surface (Schenck *et al.*, 1988); the average cell diameter of the cells was  $4.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SD,  $n=27$ ) for the first set of experiments with radiolabelled  $^{109}\text{Cd}$ , and  $4.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$  ( $n=10$ ) for the second set of experiments with [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate. Despite the fact that the free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration was the same for all three exposures, cadmium uptake in the presence of citrate was markedly higher than in the other two media: flux FRAQ<sub>CIT</sub> > flux FRAQ<sub>NTA</sub> > flux FRAQ (Table 5).

In parallel incubations with the FRAQ<sub>CIT</sub> medium spiked with [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate, the uptake of citrate into *S. capricornutum* was  $83 \pm 8 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ) for the medium containing free  $\text{Cd}^{2+}$  at a concentration of  $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . In 30 minute incubations, less than 1% of the citrate taken up by the alga was respired.

**Table 5.** Short-term intracellular cadmium accumulation by *Selenastrum capricornutum* in FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub>;  $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}=0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $t=6 \text{ min}$ .

Medium	Cadmium flux ( $\text{pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); mean $\pm$ SD
FRAQ	$6.4 \pm 0.2$ ; $n=3$
FRAQ <sub>NTA</sub>	$10.1 \pm 0.1$ ; $n=3$
FRAQ <sub>CIT</sub>	$20.8 \pm 0.3$ ; $n=3$



**Figure 4.** (A): Relative growth rates ( $\mu/\mu_0$ ) of *S. capricornutum* as a function of the free Cd<sup>2+</sup> concentration in FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub> media.  $\mu$ =growth rate of the assay;  $\mu_0$ =growth rate of the control. (D) unbuffered medium; ( $\Delta$ ) medium buffered by NTA; ( $\circ$ ) medium buffered by citrate. (B): Relative yields (Yield/Yield<sub>0</sub>) of *S. capricornutum* as a function of the free Cd<sup>2+</sup> concentration in FRAQ, FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ<sub>CIT</sub> media (yields measured after 72 h). Yield = yield of the assay; Yield<sub>0</sub> = yield of the control. (D) unbuffered medium; ( $\Delta$ ) medium buffered by NTA; ( $\circ$ ) medium buffered by citrate. The error bars correspond to standard deviations (n=3).

## DISCUSSION

### *Algal response to cadmium and zinc in FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> media*

As suggested by Nyholm (1985), two parameters were used to follow the response of the test alga to metal additions: the exponential growth rate ( $\mu$ ), and the biomass obtained after 72 h of incubation (yield); both approaches gave essentially similar results. Additions of cadmium or zinc beyond a toxicity threshold led to an inhibition of algal growth in both FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> media, with the degree of inhibition following the free-metal ion concentrations (Figs. 2A, 2B, 4A, 4B) as predicted by the Free Ion Model. For the zinc experiments in FRAQ<sub>NTA</sub> medium, additions of low concentrations of zinc ( $<0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) frequently stimulated algal growth slightly (Fig. 2A), suggesting that in the presence of excess NTA ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and with only the nominal FRAQUIL levels of total zinc, the test medium was slightly deficient in zinc.

Where there are differences between the two media, they appear at low total metal concentrations; for example, in the cadmium and zinc experiments the two  $\mu/\mu_0$  plots diverge slightly at low free  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations (for example, the upper left quadrant in Fig. 4A, where growth inhibition is greater in the NTA-buffered medium), but converge at higher free  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  values. This slight difference between the two culture media at low free  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations may reflect the fact that in the unbuffered FRAQ medium some loss of cadmium and zinc from the dissolved phase occurs (e.g.: after 96 h of incubation, the total cadmium concentration in the  $0.4 \mu\text{m}$  filtrate had decreased from  $0.23$  to  $0.19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the total zinc concentration from  $0.60$  to  $0.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). As a result of this decrease in dissolved metal concentrations, likely caused by adsorption onto available surfaces (algal biomass and container walls), the effective free  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations experienced by the algae are slightly lower in FRAQ than in the metal-buffered FRAQ<sub>NTA</sub> medium. Despite this divergence at low free  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations, the algal response curves in FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> do remain comparable (Figs. 2A, 2B, 4A, 4B).

The toxicity of cadmium and zinc to the test alga can conveniently be expressed as the free  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations that result in a 50% reduction in growth rate or in biomass yield ( $\text{IC}_{50}$  ( $\text{M}^{2+}$ ) values - Norberg-King 1993). These values have been compiled for our bioassays in FRAQ and FRAQ<sub>NTA</sub> exposure media and compared to those obtained in previous experiments on *S. capricornutum* carried out in defined media (Table 4). With a single notable exception (Wolterbeek *et al.*, 1995), our  $\text{IC}_{50}$  values are generally of the same order of magnitude as those reported previously. Wolterbeek *et al.* (1995) report a  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{Zn}^{2+}$ ) value that is 1000-times lower than estimates reported in the present study or by previous workers; the cause of this extreme sensitivity to free  $\text{Zn}^{2+}$  is not immediately obvious from an analysis of the experimental conditions employed in their experiments. The exponential growth rate of *S. capricornutum* in their control cultures ( $\mu_{\text{max}} = 0.19 \text{ d}^{-1}$ ) is however considerably lower than in our cultures, suggesting that perhaps their algae were already stressed.

### *Algal response to cadmium and zinc in FRAQ<sub>CIT</sub> medium*

The growth response of the test alga to metal additions in the presence of citrate differs markedly from that observed in FRAQ or FRAQ<sub>NTA</sub> media. At low free  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations, the inhibitory effect of the metal is enhanced in the presence of citrate ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). For example, the  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{Cd}^{2+}$ ) value as determined for algal growth rates decreases

from  $\sim 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $0.085 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  in the presence of citrate (Fig. 4A); similarly, the  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{Zn}^{2+}$ ) value decreases from  $\sim 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $0.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 2A) - see Table 4

Table 4. Toxicity of cadmium and zinc to *Selenastrum capricornutum*, as reported in the literature.

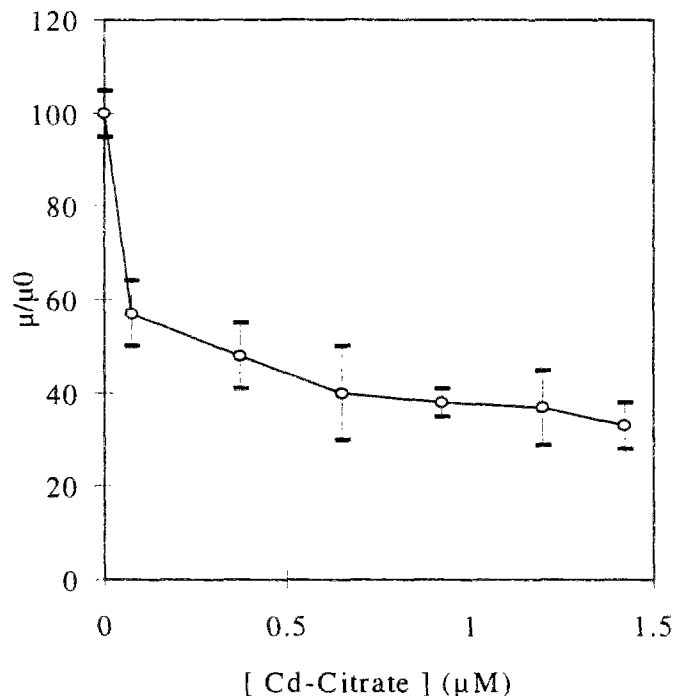
Metal	Incubation medium	Response studied	Toxicity	Reference
Zn	· AABPT medium buffered by EDTA; pH=7.1-7.2	· growth inhibition (visual estimation)	· $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}=1.83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bartlett <i>et al.</i> (1974)
	· CITRI medium buffered by NTA; pH=6.2	· growth rate	· $\text{IC}_{50}=1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$	Wolterbeek (1995) <i>et al.</i>
	· modified SANM medium buffered by EDDHA	· growth rate · yield	· $\text{IC}_{50}=0.135\text{-}0.155 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.115\text{-}0.125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$	Kuwabara (1985)
Cd	· AABPT medium buffered by EDTA; pH=7.1-7.2	· growth inhibition (visual estimation)	· $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}=0.71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bartlett <i>et al.</i> (1974)
	· unbuffered salt medium	· growth rate	· $\text{IC}_{50}=0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$	Sedlacek <i>et al.</i> (1983)
	· AAP unbuffered medium · AAP medium buffered by EDTA; pH=6-6.3	· growth rate · growth rate	· $\text{IC}_{50}=0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}]_{\text{total}}$ · $\text{IC}_{50}=0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}]_{\text{total}}$	Chiaudani & Vighi (1978)
	· lake water; pH=7.8 · FRAQUIL medium buffered by citrate; pH=7.2	· 50% inhibition of $^{14}\text{C}$ uptake	· $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}=0.73\text{-}1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ · $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}=0.8\text{-}1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Laegreid <i>et al.</i> (1983)
Zn	· FRAQUIL medium; pH=7.3 unbuffered medium medium buffered by NTA medium buffered by citrate	· growth rate	· $\text{IC}_{50}=1.05\pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.69\pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.17\pm 0.003 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$	our study*
	unbuffered medium medium buffered by NTA medium buffered by citrate	· biomass yield (72 h)	· $\text{IC}_{50}=0.50\pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.60\pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.063\pm 0.002 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$	our study
	Cd	· FRAQUIL medium; pH=7.3 unbuffered medium medium buffered by NTA medium buffered by citrate	· growth rate	· $\text{IC}_{50}=0.55\pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.65\pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.085\pm 0.003 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$
unbuffered medium medium buffered by NTA medium buffered by citrate		· biomass yield (72 h)	· $\text{IC}_{50}=0.40\pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.28\pm 0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$ · $\text{IC}_{50}=0.036\pm 0.001 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$	our study

\* The  $\text{IC}_{50}$  values ( $\pm 95\%$  confidence intervals) were calculated according to the Inhibition Concentration ( $\text{ICp}$ ) approach (Norberg-King 1993).

For zinc, enhanced toxicity in the presence of citrate is observed for all tested  $Zn^{2+}$  concentrations ( $0.02$  to  $2.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); as the free  $Zn^{2+}$  concentration increases, the slope of the exponential growth curve decreases progressively but the overall shape of the growth curve remains essentially unchanged from that observed in FRAQ or FRAQ<sub>N<sub>T</sub>A</sub> media (Fig. 3A). For cadmium, however, the algal growth curve is radically altered in the presence of citrate: in media containing  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  citrate, free  $Cd^{2+}$  concentrations  $\geq 0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  give virtually indistinguishable results (exponential growth rates  $\sim 50\% \mu_0$  - Fig. 4A; shortened exponential growth phase - Fig. 3C; similar yields,  $\sim 7\%$  control - Fig. 4B). At free  $Cd^{2+}$  concentrations greater than this threshold, and in the presence of citrate, the algae effectively stop growing after 36 h (Fig. 3C); in the absence of citrate, the algae continue growing even at  $Cd^{2+}$  concentrations as high as  $0.66 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , albeit at a reduced rate (Fig. 3B). Clearly the mechanism of Cd toxicity is altered in the presence of citrate.

### *Mechanism of anomalous metal behavior in the presence of citrate*

In carrying out these experiments, we carefully considered the overall speciation of our incubation media; the constituents other than free  $Cd^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  (notably  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and the cationic trace micronutrients) were carefully maintained at constant concentrations even as the free  $Cd^{2+}$  or  $Zn^{2+}$  concentrations were increased. The effect of citrate on cadmium and zinc toxicity is real, not an artifact of, for example, decreased competition from  $Ca^{2+}$  for uptake sites on the cell surface (Part and Wikmark, 1984).



**Figure 5.** Relative growth rates ( $\mu/\mu_0$ ) of *S. capricornutum* as a function of the Cd-citrate concentration in FRAQ<sub>CIT</sub> medium. The free  $Cd^{2+}$  concentration was kept constant in all assays ( $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).  $\mu$ =growth rate of the assay;  $\mu_0$ =growth rate of the control. The error bars correspond to standard deviations ( $n=3$ ).

A plausible explanation for the anomalous metal behavior observed in the presence of citrate would be that the algal membrane recognizes citrate as a low molecular weight metabolite and is permeable to it, as suggested by the experiment showing that the test alga is indeed able to take up [ $^{14}\text{C}$ ]-citrate. If the transporter responsible for citrate uptake were imperfect, and occasionally transported a Cd-citrate or Zn-citrate complex, this would furnish an alternative route for metal transport across the plasma membrane. The metal uptake experiment with  $^{109}\text{Cd}$  showed that cadmium uptake was indeed markedly higher ( $\geq 2$ -fold) in the presence of citrate than in the FRAQ<sub>NTA</sub> and FRAQ culture media. Clearly, at a given free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration ( $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), more cadmium is getting into the algal cells when citrate is present. In addition, in experiments run at a constant free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration but with increasing Cd-citrate concentrations, the degree of growth inhibition increases progressively (Fig. 5).

Under our experimental conditions (pH 7.3,  $T = 22^\circ\text{C}$ ,  $[\text{citrate}]_T = 10^{-1} \text{ M}$ ), the Cd- and Zn-citrate complexes account for 26 and 82% of the total dissolved metal respectively. For the uptake experiments run at a free  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of  $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the initial short-term uptake of citrate ( $83 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) was about 4 times greater than that of cadmium ( $21 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). In other words, the citrate transporter would only have to be "fooled" once every four transport events to account for the enhanced cadmium uptake in the presence of citrate.

The exact mechanism of citrate transport in *S. capricornutum* is unknown. Our literature search failed to uncover any references to the existence of a specific membrane transport system for citrate in algae. However, it is known that algae can take up such low molecular weight metabolites as amino acids and that their transport across the plasma membrane involves amino acid porters (Flynn and Syrett 1986; Flynn and Butler 1986); it seems likely that a similar mechanism applies in the case of citrate. Note, too, that a variety of specific membrane transport systems for citrate have been reported for procaryotes (e.g.: Bergsma and Konings 1983; van der Rest et al. 1992). In at least one case (Bergsma and Konings 1983) citrate uptake was shown to be strictly dependent on the presence of divalent cations, and the metal-citrate complex was reported to be the transported solute.

### Concluding remarks

In the present study, working with a green alga as the test species, we have shown conclusively that the toxicity of the divalent metal ions  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  is enhanced in the presence of citrate ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). These new data for cadmium and zinc are consistent with the earlier results of Guy and Kean (1980), who reported that the algistatic dose of free  $\text{Cu}^{2+}$  was 60 times lower in the presence of citrate ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) than in a growth medium buffered with EDTA ( $6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). These results of these two experiments, taken together with the anomalous permeabilities reported by Part and Wikmark (1984) for Cd-citrate and rainbow trout gills (Table 1), clearly indicate that the bioavailability of divalent metals in the presence of citrate may well diverge from the predictions of the Free Ion Model.

We have suggested through the present research that "accidental" uptake of the metal-ligand complex across the biological membrane is a plausible explanation for this enhanced availability. Note, however, that the citrate levels used in this study, and in the earlier work by Guy and Kean (1980), are greater than the concentrations likely to be encountered in natural surface waters. Trials at lower citrate concentrations, with other assimilable low molecular

weight metabolites (for example free and combined amino acids), and also with a wider range of test organisms are needed if we wish to extrapolate these results to natural phytoplankton communities.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Network of Toxicology Centres (Environment Canada) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Jean-Christian Auclair, Michael Twiss and two anonymous reviewers provided constructive criticism of an earlier draft of the manuscript.

### REFERENCES

- Bartlett L., Rabe F.W. and Funk W.H. (1974) Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Wat. Res.* **8**, 179-185.
- Bergsma, J. and Konings W.N. (1983). The properties of citrate transport in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **134**, 151-156.
- Borgman U. and Ralph K.M. (1983) Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Wat Res.* **17**, 1697-1703.
- Campbell P.G.C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-ion Activity Model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R.), pp. 45-102. J. Wiley & Sons, New York, NY.
- Chiaudani G. and Vighi M. (1978) The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.*, **21**, 316-329.
- Cooksey K.E. (1978) Respiratory assimilation of <sup>14</sup>C-labelled substrates by a microalga. In *Physiological and Biochemical Methods, Handbook of Phycological Methods* (Edited by Hellebust J.A. and Craigie J.S.), pp. 317-327. Cambridge University Press.
- Daly H.R., Campbell I.C. and Hart B.T. (1990) Copper toxicity to *Paratya australiensis*: I. Influence of nitrilotriacetic acid and glycine. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 997-1005.
- Florence T.M. and Stauber J.L. (1986) Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquat. Toxicol.* **11**, 26-32.
- Flynn, K.J. and I. Butler (1986). Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **34**, 281-304.
- Flynn, K.J. and P.J. Syrett (1986). Characteristics of the uptake of L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornerutum*. *Mar. Biol.* **90**, 151-158.
- Guy R.D. and Kean A.R. (1980) Algae as a chemical speciation monitor I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Wat. Res.* **14**, 891-899.
- Kuwabara J.S. (1985) Phosphorus-zinc interactive effects on growth by *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyta). *Environ. Sci. Technol.* **19**, 417-421.
- Laegreid M., Alstad J., Klaveness D. and Seip H.M. (1983) Seasonal variation of cadmium toxicity toward the alga *Selenastrum capricornutum* Printz in two lakes with different humus content. *Environ. Sci. Technol.* **17**, 357-361.
- Luoma S.N. (1995) Prediction of metal toxicity in nature from bioassay: limitations and research needs. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R.), pp. 609-659. J. Wiley & Sons, New York, NY.



- Morel F.M.M. (1983) *Principles of Aquatic Chemistry*, pp. 301-308. Wiley Inter-Science, New York, NY.
- Morel F.M.M. and Hering J.G. (1993) *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*, pp. 405-414. Wiley Inter-Science, New York, NY.
- Morel F.M.M., Westall J.C., Rueter J.G. and Chaplick J.P. (1975) Description of the algal growth media «Aquil» and «Fraquil», Technical note No. 16, pp. 1-33, Water Quality Laboratory, Laboratory for Water Resources and Hydrodynamics, Department of Civil Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA.
- NIST (1993) NIST Critical stability constants of metal complexes' data base (Edited by Martell A.E. and Smith R.M.). National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Database 46, Gaithersburg, MD.
- Norberg-King, T.J. (1993) A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (IC<sub>p</sub>) approach. National Effluent Toxicity Assessment Center, Tech. Rep. 03-93, pp. 1-29, U.S. Environmental Protection Agency, ERL, Duluth, MN.
- Nyholm N. (1985) Response variable in algal growth inhibition tests: Biomass or growth rate? *Wat. Res.* **19**, 273-279.
- Parsons T.R., Maita Y. and Lalli C.M. (1984) *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*, Pergamon Press, Oxford.
- Part P. and Wikmark G. (1984) The influence of some complexing agents (EDTA and citrate) on the uptake of cadmium in perfused rainbow trout gills. *Aquat. Toxicol.* **5**, 277-289.
- Phinney J.T. and Bruland K.W. (1994) Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom, *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1781-1790.
- Schecher W.D. and McAvoy D.C. (1992) MINEQL<sup>+</sup>: a Software Environment for Chemical Equilibrium Modeling. *Comput., Environ. Urban Systems* **16**, 65-76.
- Schenck R.C., Tessier A. and Campbell P.G.C. (1988) The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.* **33**, 538-550.
- Sedlacek J., Källqvist T. and Gjessing E. (1983) Effect of aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum capricornutum* Printz. In *Aquatic and Terrestrial Humic Materials* (Edited by Christman R.F. and Gjessing E.), pp. 495-516. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI.
- Serkiz S.M., Allison J.D., Perdue E.M., Allen H.E. and Brown D.E. (1996) Correcting errors in the thermodynamic database for the equilibrium speciation model MINTQA2. *Wat. Res.* **30**, 1930-1933.
- Simkiss K. and Taylor M.L. (1995) Transport of metals across membranes. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R.), pp. 1-44. J. Wiley & Sons, New York, NY.
- Sunda W.G. (1988/89) Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.* **6**, 411-442.
- Van der Rest, M.E., Molenaar, D. and Konings, W.N. (1992) Mechanism of Na<sup>+</sup>-dependent citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**, 4893-4898.
- Walsh G.E. (1988) Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 979-987.
- Wolterbeek H.T., Viragh A., Sloof J.E., Bolier G., Van der Veer B. and Kok J. (1995) On the uptake and release of zinc in the growing alga *Selenastrum capricornutum* Printz. *Environ. Pollut.* **88**, 85-90.

### **3. MODELISATION des IMPACT de RUTP en SEINE**



## SIMULATION DES DÉFICITS D'OXYGÈNE DISSOUS DANS LA SEINE EN AVAL DE DÉVERSOIRS D'ORAGE À L'AIDE DU MODÈLE PROSE.

Even S.<sup>1</sup>, Mouchel J.M.<sup>2</sup>, Seidl M.<sup>2</sup>, Servais P.<sup>3</sup>, Poulin M.

<sup>1</sup>. CIG, Ecole des Mines, 33, rue Saint Honoré, 77305 FONTAINEBLEAU Cedex

<sup>2</sup>. CERGRENE, ENPC, 6-8 av. Blaise Pascal, Champs sur Marne,  
77455 MARNE-LA-VALLEE Cedex

<sup>3</sup>. GMMA, Université Libre de Bruxelles, Bd du triomphe, CP 221, B-1050 BELGIQUE

### Résumé

Des données de qualité recueillies dans la Seine après une surverse d'orage sont réexaminées à l'aide du logiciel PROSE. On montre que le Carbone Organique Particulaire n'a que peu d'impact sur les déficits en oxygène, alors que les bactéries hétérotrophes apportées par le rejet sont le moteur principal de leur développement. L'impact de la toxicité des eaux déversées pour le phytoplancton, déjà mesurée *in vitro*, a été évalué en situation. Les niveaux de chlorophylle sont fortement affaiblis après une journée de transit dans les masses d'eau ayant subi un rejet. Les conséquences sur les niveaux d'oxygène dépendent de la concentration de cellules planctoniques dans le milieu.

### Introduction

Par temps de pluie, les eaux urbaines ruisselées sont acheminées vers le réseau d'assainissement, séparatif ou unitaire. Dans ce dernier cas les eaux pluviales, déjà chargées en pollution par le ruissellement sur les surfaces urbaines, sont mélangées aux eaux usées domestiques, riches en matière organique. Elles favorisent également la remise en suspension des dépôts accumulés dans le réseau, ce qui constitue une source considérable de pollution. Les grandes quantités d'eau ainsi collectées peuvent être partiellement stockées dans des ouvrages prévus à cet effet, mais elles sont le plus souvent déversées sans traitement dans le milieu récepteur, ce qui constitue une charge de pollution particulièrement importante dans le cas d'un réseau unitaire, sensiblement égale annuellement à la pollution déversée après traitement par la station d'épuration. A plus petite échelle de temps, les flux apportés par ces rejets intermittents sont largement dominants.

Les études d'aménagement de système d'assainissement sont aujourd'hui de plus en plus globales, elles cherchent à appréhender l'ensemble réseau - station - milieu récepteur de façon à optimiser la structuration et le dimensionnement des ouvrages en fonction d'objectifs de

qualité à la fois par temps sec et par temps de pluie. Les équipements de base ayant été construits, et il est aujourd'hui nécessaire de s'orienter vers des solutions plus spécifiques d'une situation géographique donnée, qui demandent des outils de simulation efficaces. La très grande taille des équipements à prévoir pour résoudre le problème des rejets de temps de pluie et la difficulté de leur implantation demande des solutions également spécifiques. Ainsi, une meilleure description du devenir des matières organiques rejetées par les milieux urbains est aujourd'hui d'actualité, sa validation passe par le développement de modèles de simulation qui pourront *in fine* être utilisés pour définir les solutions les plus pertinentes en fonction de chaque situation particulière.

Le programme PIREN-Seine a exploré le fonctionnement micro biologique des multiples écosystèmes aquatiques qui composent le bassin de la Seine, en cherchant à mettre en évidence un ensemble limité de processus sous-jacents dans tous les types d'écosystèmes. Ces processus sont traduits dans une série d'équations qui constituent un "moteur micro biologique du fonctionnement des écosystèmes", le modèle RIVE (Fustec et De Marsily, 1993).

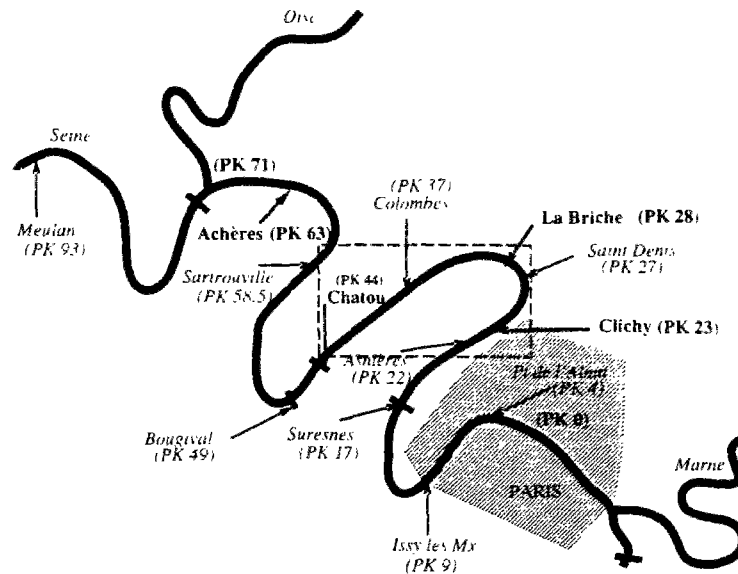
Les situations transitoires observées après les pluies constituent un test particulièrement contraignant, capable de révéler individuellement certains processus qui s'équilibrent normalement dans une situation permanente. Ainsi, l'étude de la qualité des eaux de la Seine à la traversée de Paris a été un volet important du programme PIREN-Seine à la fois de part l'importance de l'enjeu en termes d'assainissement et de part la pertinence scientifique des situations transitoires.

Plusieurs séries de campagnes de mesures ont été organisées en Seine. Cet article est basé sur une réinterprétation des résultats de certaines campagnes au travers du modèle PROSE, basé sur le modèle biologique RIVE, afin de mettre en évidence l'importance respective d'un certain nombre des processus dominants.

## 1. Matériel et Méthodes

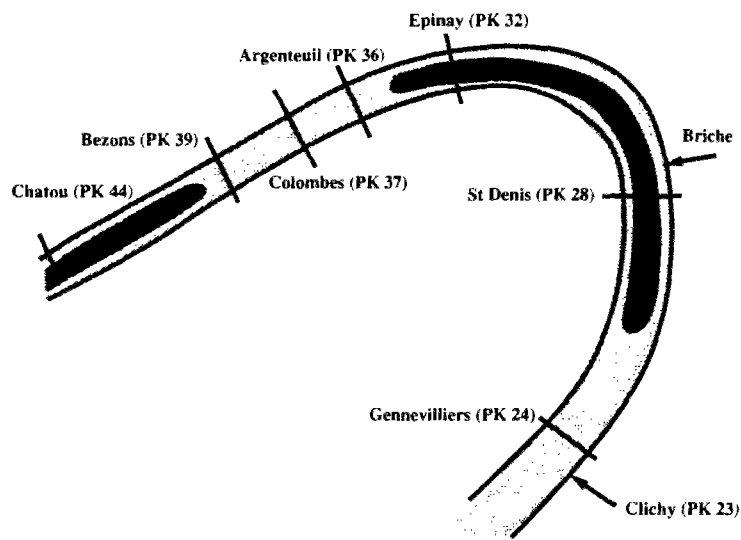
### 1.1 Situation géographique et campagnes

L'agglomération parisienne, avec près de 10 millions d'habitants et un réseau d'assainissement majoritairement unitaire, représente une pression majeure sur la rivière Seine. Par temps de pluie, les eaux qui ne peuvent transiter dans le réseau ou être traitées par les stations d'épuration sont déversées en plus de 200 points, répartis sur l'ensemble de l'agglomération. Environ 50% de ces rejets, pour une forte pluie, sont concentrés en quelques points de déversement, le plus important dans l'état actuel du réseau étant celui de Clichy. Ces déversements contribuent en période estivale à des déficits en oxygène dissous importants. Des situations d'anoxie peuvent se produire plusieurs fois par an dans la Seine, elles compromettent gravement la vie piscicole. Des déversements ont ainsi pu être suivis *in situ* pour trois situations en juillet-août 1995 et 1996. La base de donnée est complétée par une caractérisation de l'état du milieu hors événement pluvieux (Seidl et al., soumis-b). On dispose ainsi de séries de



**Figure 1** : Secteur échantillonné lors des suivis des déversements de Clichy. Points de déversement (Clichy et la Briche, fléchés) et ponts d'où ont été effectués les mesures (traits gras).

mesures du carbone organique dissous et particulaire, des biomasses hétérotrophes et de leur activité et de données d'oxygène dissous qui constitue un paramètre de qualité intégrateur de ce type d'impact. En outre, des données de matières en suspensions (MES), ammonium et conductivité permettent de mieux cerner la position des rejets et le transfert des suspensions. Ces campagnes ont été réalisées en aval du rejet majeur de Clichy (PK 23.4) (figure 1), nous avons choisi d'étudier plus particulièrement la campagne la plus complète, du 22 août 1996. Ces données sont complétées par des séries de données aimablement fournies par le SIAAP, consistant en des suivis en continu de la température et de l'oxygène à Asnières et Colombes (figure 2), ainsi que de mesure de chlorophylle *a* effectuées dans le même secteur une à deux fois par semaine entre avril et octobre.



**Figure 2** : Seine sur 100 km à la traversée et en aval de Paris. Points de mesures du SIAAP (italique) et points majeurs de déversement (gras). Secteur échantillonné lors des suivis des déversements de Clichy (encadré).

## 1.2. Le modèle PROSE

Le modèle biologique RIVE décrit de façon déterministe les processus biologiques de croissance et de mortalité bactérienne et phytoplanctonique, et simule l'impact de ces processus sur les teneurs en carbone, azote, phosphore et oxygène. Le schéma conceptuel se fonde sur la description de processus appréhendés par l'expérience et décomposés en étapes élémentaires. Les paramètres introduits dans le modèle sont pour la plupart mesurés expérimentalement. Les valeurs de références de ces paramètres ont été rapportés par Servais et Garnier, 1993, Garnier et al., 1995 ou encore Billen et al. (1995) pour une description complète de RIVE.

Une bonne simulation de l'hydraulique et du transport est indispensable pour simuler correctement l'évolution des principaux paramètres de la qualité de l'eau. En période estivale où les vitesses sont faibles, l'évolution de la qualité de l'eau du milieu est largement conditionnée par le temps de séjour dans les différents biefs. La dispersion se traduit quant à elle par une homogénéisation progressive des pics de concentration. Les caractéristiques hydrodynamiques conditionnent également les flux de dépôt et de remise en suspension des particules, qui influencent en retour les processus biologiques.

Le logiciel PROSE ajoute aux équations décrivant la microbiologie, une simulation détaillée des processus hydrodynamiques et de transport. Il fonctionne avec des pas de temps réduits (typiquement cinq minutes), et est capable de fonctionner de façon complètement transitoire. Il a plus particulièrement été mis en œuvre pour étudier les impacts des rejets urbains de temps sec et de temps de pluie. Le réseau hydrographique avec plusieurs affluents ainsi que les îles sont pris en compte grâce à une description maillée des axes d'écoulements.

Le modèle hydraulique résout les équations de Saint-Venant monodimensionnelles (Ven Te Chow, 1981) afin de traiter les régimes transitoires. Les ouvrages de navigation, particulièrement nombreux sur la Seine, fonctionnent soit en cote de surface libre imposée, soit avec une loi déversement sur ou sous un seuil. Les propriétés des seuils sont utilisées également pour le calcul de la réoxygénation aux barrages. Le frottement est représenté par la loi de Strickler dont le coefficient est variable en fonction du débit.

Dans la version de PROSE utilisée pour cette étude, la simulation du transport des suspensions repose sur l'hypothèse que dépôt et resuspension sont simultanés. La resuspension quasi continue de particules a en effet été démontrée par l'utilisation de traceurs (Estèbe et al., 1997). Le flux de dépôt pour chaque classe de particules est supposé proportionnel à sa concentration moyenne et sa vitesse de chute spécifique. Les particules organo-minérales agrégées ont des vitesses de chute moyenne en Seine de l'ordre de  $1 \text{ m.h}^{-1}$  (Tangerino, 1994), alors que le phytoplancton et les bactéries libres ont des vitesses de chute beaucoup plus faibles (Reynolds, 1984). Le flux d'érosion est une fonction empirique de la vitesse de l'eau. L'enveloppe supérieure du nuage de point qui figure la relation entre concentration de MES et débit dans la Seine chenalisée, plus la donnée d'une vitesse de chute de référence, permettent d'estimer les flux d'érosion. En effet, tant qu'il y a assez de matériel à éroder, on peut considérer que l'équilibre s'établit assez rapidement entre resuspension et dépôt, les concentrations sont alors maximales pour une vitesse d'eau donnée. La relation obtenue pour le flux d'érosion est en  $u^{3/2}$ .

Les variables particulières, matière en suspension organique ou minérale, bactéries, phytoplancton, sont susceptibles de sédimenter et alimentent ainsi une couche de dépôt récent où les activités biologiques se poursuivent. Les cinétiques des activités sont les mêmes dans le dépôt récent et dans la colonne d'eau. Les aspects numériques du modèle ProSe ont été décrits par Even (1995) et Even et Poulin (1996).

## 2. Résultats et discussion.

### 2.1. Objectifs des simulations

Les données acquises au cours des campagnes de suivi en Seine des rejets de Clichy avaient permis de mettre en évidence une sédimentation très rapide des matières particulières. De fait, il est connu que la majeure partie des matières solides transportées dans les réseaux unitaires en temps de pluie ont des vitesses de chute supérieures à  $1 \text{ m.h}^{-1}$  (Chebbo et Bachoc, 1992). Un de nos objectifs sera donc d'explorer les conséquences prévisibles de cette sédimentation, couplée à une éventuelle resuspension accentuée par les augmentations de débit consécutives aux pluies. Le carbone organique particulaire et la fraction des bactéries attachée aux suspensions seront très sensibles à ces processus. *In fine*, les conséquences des processus de sédimentation sur l'oxygénation de la rivière dépendront donc particulièrement de la vitesse d'hydrolyse des matières organiques particulières et du taux de croissance, donc de l'activité, des bactéries attachées.

Un affaiblissement de l'activité du phytoplancton en raison d'un effet toxique dû aux nombreux micro polluants transportés par les rejets urbains de temps de pluie est un autre effet susceptible d'intensifier les chutes du niveau d'oxygène dissous après les pluies. La Seine est une rivière eutrophe, où la biomasse algale contribue significativement au bilan d'oxygène. La toxicité des fractions dissoutes et non-sédimentables de l'eau déversée à Clichy a été récemment mesurée *in vitro* par Seidl et al. (soumis-a). Nous sommes donc en mesure de pratiquer une évaluation plus globale des conséquences de ce phénomène de toxicité.

### 2.2. Conditions de simulation

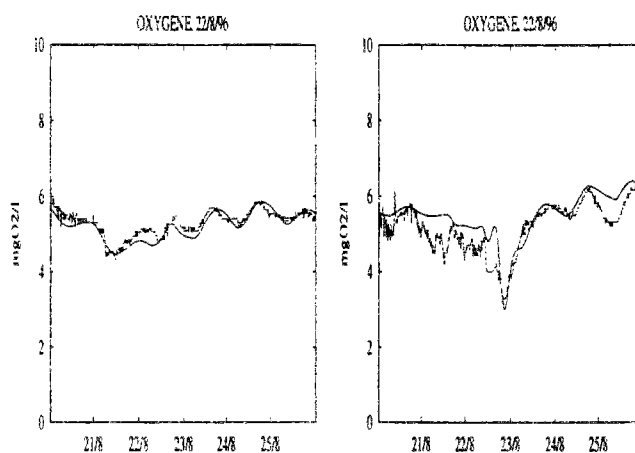
Le domaine simulé s'étend entre Issy les Moulineaux (PK 8) immédiatement à la sortie de Paris et le barrage de Chatou (PK 44.6). Le point de déversement de Clichy est situé un kilomètre en amont de l'île de Saint Denis. Compte tenu de la faible distance, le panache de pollution passe en totalité dans le bras droit de l'île. Afin d'assurer la configuration réelle à l'aide d'un modèle monodimensionnel, le point de rejet a été déplacé juste en amont du bras droit de l'île. Un second point de rejet, La Briche est situé sur le même bras, 5 km en aval.

Compte tenu des distances de mélange, de l'ordre de 5 à 10 km en Seine, nous avons confronté les résultats du modèle aux mesures effectuées à Epinay (PK 31.8), Argenteuil (PK 31.8), Colombes (PK 37.3), Bezons (PK 39.4) et Chatou (PK 44.6). Ce dernier point se est situé en amont d'un barrage de navigation, sur le bras droit de l'île de Chatou. Les mouvements de

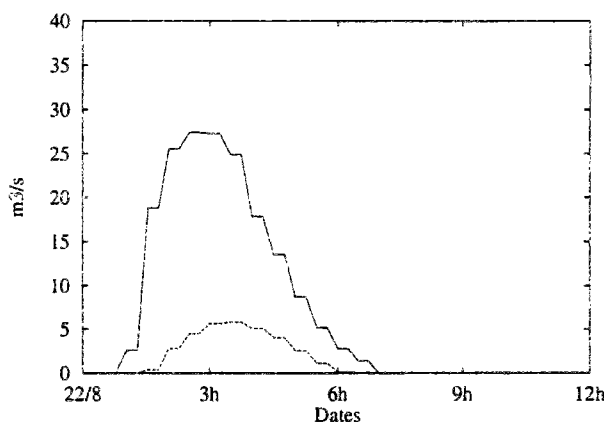


vannes effectués aux barrages de Suresnes, Chatou et Bougival, et soigneusement consignés par les agents du SNS, ont été explicitement pris en compte

.Les concentrations au point limite amont correspondent aux mesures du SIAAP en ce qui concerne l'oxygène et la chlorophylle *a*. Cependant les mesures de chlorophylle *a* se sont arrêtées à la date du 20 août et une incertitude existe quant à l'évolution ultérieure de la biomasse phytoplanktonique. Compte tenu des évolutions d'oxygène montrant une augmentation progressive au delà du 22 août, nous avons supposé une légère augmentation de la biomasse venant de l'amont (figure 3)

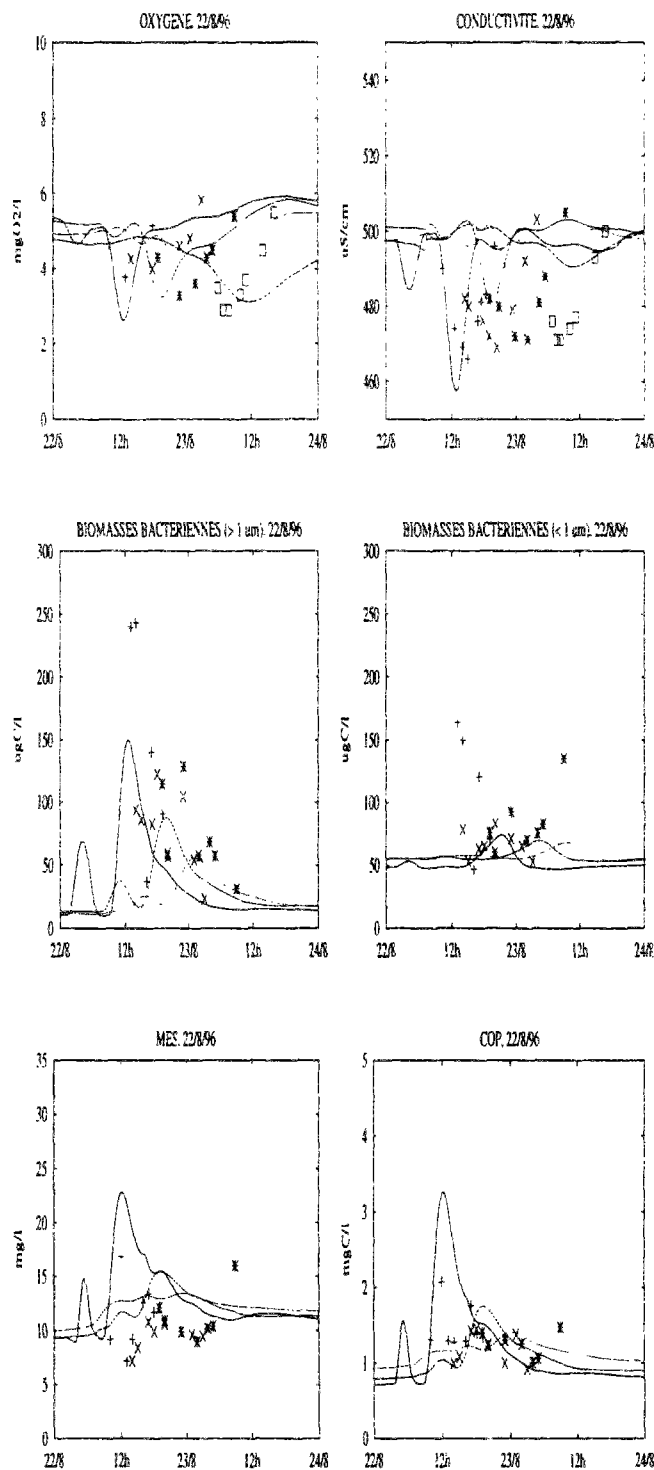


**Figure 3 :** Oxygène simulé et mesuré en fonction du temps aux points de Suresnes (PK 18) et de Colombes (PK 37.3) (simulé en traits pleins et mesures en tireté) entre les 22 et 24 août 1996.



**Figure 4 :** Débits déversés en fonction du temps à Clichy (ligne pleine) et à la Briche (tireté) le 22 août 1996.

Le débit de pointe déversé est de  $30 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  à Clichy, de  $5 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  à La Briche, la durée du déversement étant de 6 heures (figure 4). Le débit moyen journalier de la Seine dans Paris est de  $100 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  dans la semaine précédant l'événement et monte à  $140 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  dans la journée du 22 août 1996. Compte tenu des temps de transfert estimés à partir des variables suivies dans le panache (Seidl et al, soumis-b), il s'avère que le débit de la Seine a atteint une valeur de



**Figure 5 :** Conductivité, oxygène, matières en suspension totales et carbone organique particulaires simulés et mesurés en fonction du temps à Epinay (PK 31.8) (croix droites et traits pleins), Argenteuil (PK 36.1) (croix penchées et tireté), Bezons (PK 39.4) (étoiles et pointillé) et Chatou (44.6) (carrés et pointillé) entre les 22 et 24 août 1996.

pointe de l'ordre de 170-180 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> au cours de la journée. L'augmentation résulte en partie des eaux déversées à Clichy et La Briche, mais également de déversements ayant lieu plus en amont, non pris en compte dans le secteur simulé. Afin de reproduire correctement les temps de transfert des masses de polluants, une pointe de débit à 170 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> au milieu de la journée du 22 a donc été supposée.

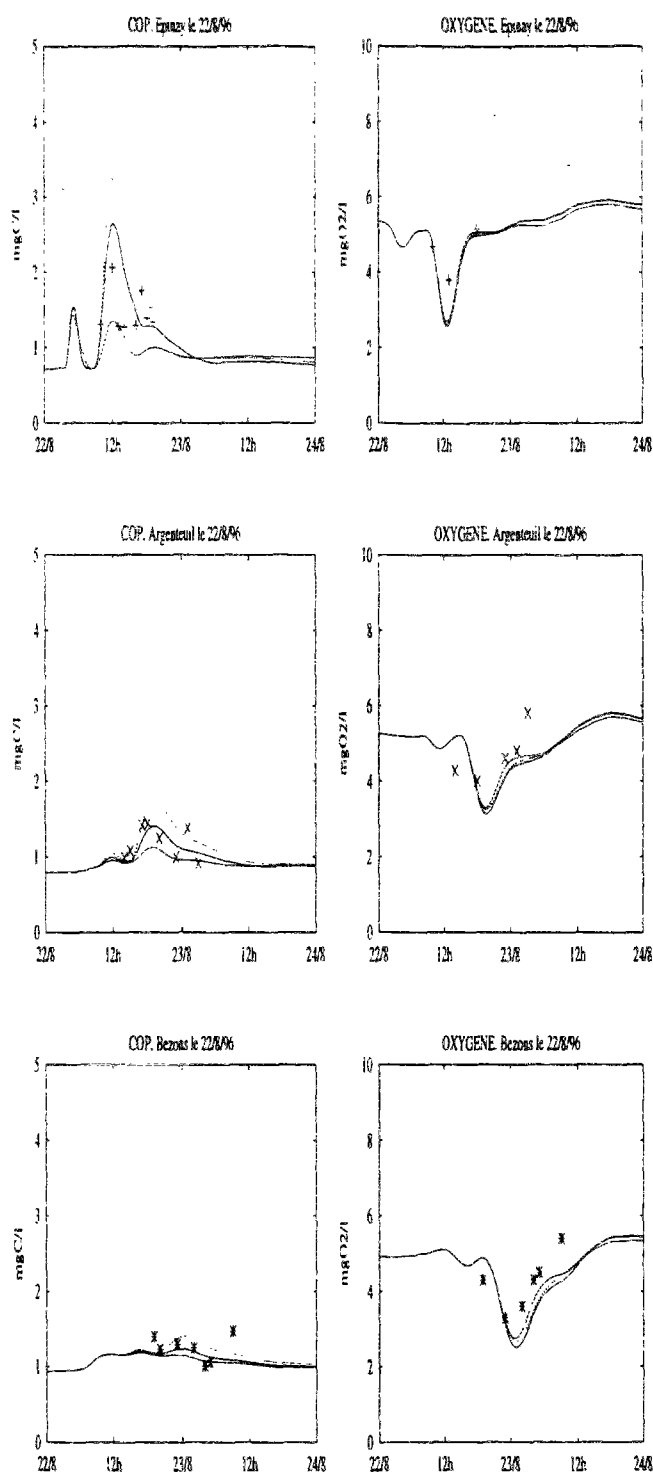
### **2.3. Le rejet du 22 août 1996, situation de référence.**

Les résultats des simulations du rejet du 22 août 1996 sont présentées sur la figure 5. La conductivité, considérée comme un traceur conservatif, permet de valider les temps de transfert et la dispersion rendue par le modèle. Les temps de passage sont corrects aux ponts d'Argenteuil et de Bezons, 12 et 15 km respectivement en aval du point de Clichy. Par contre le panache arrive avec 2 heures d'avance à Epinay, situé à 7 km, et avec presque 2 heures de retard à Chatou, 20 km en aval. Compte tenu de l'incertitude sur la valeur précise du débit dans la rivière au moment de l'événement, nous considérons que les temps de transfert tels que simulés sont acceptables. Le coefficient de dispersion choisi est de 10 m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour toutes les simulations. L'évolution de la conductivité suggère que cette valeur est sous-estimée, les creux observés étant plus large que les creux simulés à Epinay, Argenteuil et Bezons. Cependant les profils d'oxygène montre une dispersion correcte, la valeur de 10 m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> a donc été conservée. La figure 5 montre que les valeurs de base (hors influence du rejet) des conductivités simulés ne sont pas constantes. Ces faibles fluctuations sont dues à de petits rejets, historiquement simulés par PROSE sous forme de flux de rejet et non pas sous forme de séries de concentrations couplées à des séries de débits de rejet. La même technique de simulation des apports pour la conductivité produit les fluctuations simulées en fonction de l'évolution du débit dans la rivière. Dans la réalité, des apports de conductivité intermittents, probablement d'origine industrielle, ont été mis en évidence dans ce secteur (Seidl et al., soumis-b).

Pour la situation de référence, les paramètres physiologiques des bactéries sont identiques à ceux des bactéries existant dans la rivière en dehors du panache (taux de croissance de 0,05 et 0,1 h<sup>-1</sup> et vitesses de chute de 0,2 et 1 m.h<sup>-1</sup> respectivement pour les bactéries de taille inférieure ou supérieure à 1 µm). Les vitesses de chute des matières en suspension minérales ou organique est également de 1 m.h<sup>-1</sup>. On suppose ainsi que les bactéries de grosse taille chutent préférentiellement en étant liées aux matières en suspension.

### **2.4. Sédimentation du Carbone Organique Particulaire (COP).**

Les mesures montrent cependant une disparition plus importante et rapide des matières en suspension, qu'elles soient organique, bactériennes ou totales dans la dizaine de kilomètres suivant le rejet. Les concentrations reviennent alors à des niveaux proches de ceux observés avant le passage du panache. Nous avons testé des vitesses de chute nettement plus élevées (5 m.h<sup>-1</sup>) pour les MES et donc le carbone organique particulaire (figure 6). Cette valeur est très proche de la vitesse de chute médiane des solides de réseau unitaire en temps de pluie (Chebbo et Bachoc, 1992). Nous observons que cette vitesse provoque une sur-disparition du COP, alors que l'effet sur l'oxygène est peu sensible de l'ordre de 0.2 mg.l<sup>-1</sup> dans la queue du panache.



**Figure 6** : Carbone organique particulaire et oxygène simulés et mesurés en fonction du temps à Epinay (PK 31.8), Argenteuil (PK 36.1), et Bezons (PK 39.4) entre les 22 et 23 août 1996. Tests sur la sédimentation du carbone organique particulaire ( $V_{sed} = 5 \text{ m.h}^{-1}$ , tireté) et sur la vitesse d'hydrolyse ( $HY = 0.008 \text{ h}^{-1}$ , trait plein) comparés à la situation de référence ( $V_{sed} = 1 \text{ m.h}^{-1}$ , pointillé). Comparaison aux points de mesure.

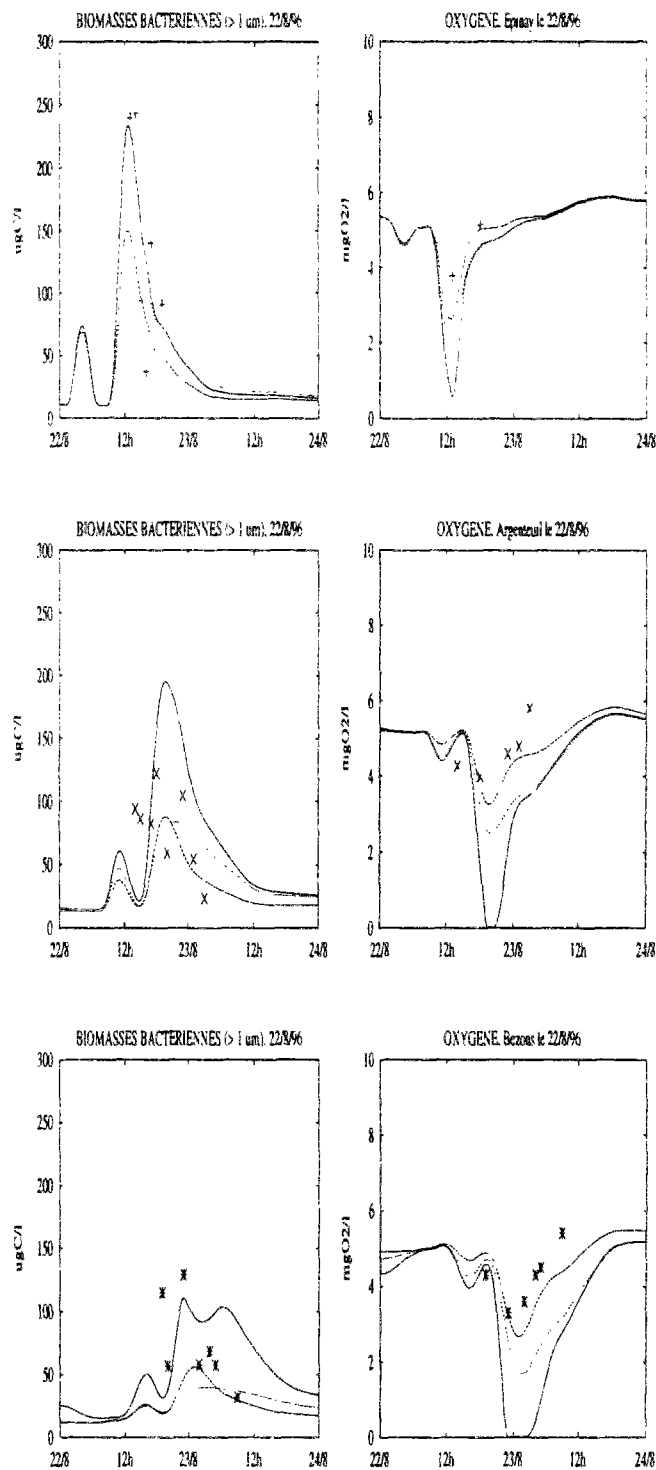
Les concentrations en matières en suspension simulées restent assez élevées après le passage du panache. Ceci s'explique par des remises en suspension simulées par le modèle en réponse à des augmentations de débit. Ces matières en suspension sont responsables d'un déficit supplémentaire d'oxygène dissous de l'ordre de  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  pendant plus de 12 heures. La relation entre le débit et le processus de remise en suspension a été vérifiée pour des épisodes de crue, mais la validation du processus à des débits plus faibles doit être poursuivie.

Un taux d'hydrolyse de la matière organique particulaire plus élevé permettrait également d'expliquer sa disparition rapide de la colonne d'eau. Un facteur 10 par rapport à la valeur de référence de  $0.008 \text{ h}^{-1}$  a été considéré. Cette valeur est issue d'expériences de dégradation du matériel organique prélevé dans les rejets (Seidl et al., 1996). De même, suivant Servais et al. (soumis), nous avons considéré qu'une fraction de 75% de la matière organique était dégradable, ce qui représente une valeur élevée par rapport à la dégradabilité du COP de la Seine. Le processus va dans le sens d'une consommation supplémentaire d'oxygène, la matière organique dissoute produite étant consommée par les bactéries, mais son effet sur le minimum du déficit d'oxygène est très faible, inférieur à  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Aucune apparition de carbone organique dissous supplémentaire n'est simulée par le modèle, même dans ces conditions de forte hydrolyse, alors que Seidl et al. (soumis-b) avaient mis en évidence un stock de COD (carbone organique dissous) en excédent dans le Seine après les rejets.

### ***2.5 Effet de l'activité des bactéries rejetées.***

Les biomasses bactériennes dans le rejet de Clichy sont principalement constituées de bactéries de taille supérieure à  $1 \mu\text{m}$ . Pour la situation de référence, nous avons supposé un taux de croissance de  $0.1 \text{ h}^{-1}$  et une vitesse de chute de  $1 \text{ m.h}^{-1}$  pour ces bactéries, soient des caractéristiques physiologiques typiques des grosses bactéries précédemment évaluées dans l'eau de la Seine. Ces paramètres permettent de simuler une amplitude du creux d'oxygène dissous cohérente avec les mesures. Cependant la quantité de bactéries mesurée dans le panache est supérieure d'un facteur deux, au moins à Epinay. De plus, des taux de croissance de l'ordre de  $0.25 \text{ h}^{-1}$  ont pu être mesurés juste après le déversement (Seidl et al., soumis-b), avec une quantité importante de bactéries retenues sur des filtres de porosité égale à  $5 \mu\text{m}$ , donc fixées sur des suspensions. Ceci permet de présager d'un dépôt plus important des bactéries, soit avec des vitesses de chute supérieures à  $1 \text{ m.h}^{-1}$ .

Un taux de croissance de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  et vitesse de chute constante maintenue à  $1 \text{ m.h}^{-1}$  permettent de mieux rendre compte des concentrations maximales observées en biomasses bactériennes (figure 7). Mais, l'effet sur l'oxygène est extrêmement sensible puisqu'on atteint dans ces conditions des concentrations inférieures à  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  à Epinay, et l'anoxie se produit pendant quelques heures à Bezons. Non seulement l'amplitude du déficit est alors irréaliste compte tenu des observations, mais l'effet différé du rejet est également exagéré. Avec une vitesse de chute doublée ( $2 \text{ m.h}^{-1}$ ) le même taux de croissance de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  simule des biomasses bactériennes plus proches de la situation de référence, voire même légèrement inférieures. Cependant la consommation d'oxygène correspondante est plus importante, le minimum du déficit est inférieur de l'ordre de  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  et l'effet différé est très prononcé. Il est dû à la remise en



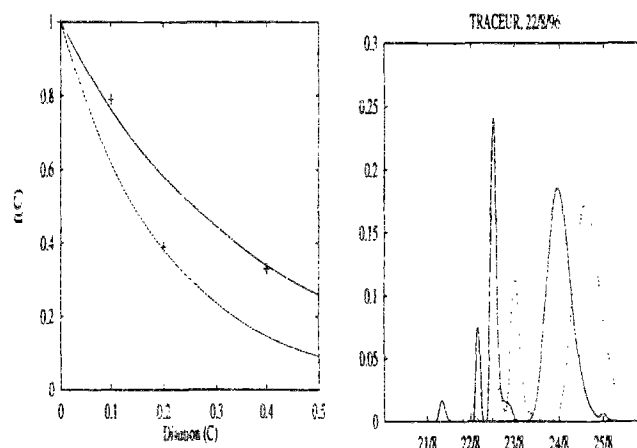
**Figure 7 :** Biomasses bactériennes (> 1 µm) et oxygène simulés et mesurés en fonction du temps à Epinay (PK 31.8), Argenteuil (PK 36.1), et Bezons (PK 39.4) entre les 22 et 23 août 1996. Tests sur le taux de croissance et la sédimentation des bactéries et sur la vitesse de chute ( $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ ,  $V_{sed} = 1 \text{ m.h}^{-1}$ , trait plein) ( $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ ,  $V_{sed} = 2 \text{ m.h}^{-1}$ , tireté) comparés à la situation de référence ( $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ,  $V_{sed} = 1 \text{ m.h}^{-1}$ , pointillé).

suspension des bactéries très actives par un accroissement de débit après le passage de la masse d'eau issue de Clichy. Les cinétiques de croissance des bactéries étant supposées identiques dans la colonne d'eau et dans la vase, les biomasses bactériennes issues du rejet et ayant sédimentées continuent de croître dans le dépôt. Nous n'avons pas encore aujourd'hui d'informations sur les taux de croissance des bactéries fraîchement déposées.

### 2.6. Effet de la toxicité du rejet sur la photosynthèse.

L'effet toxique des effluents chargés en micro polluants a pu être mis en évidence expérimentalement (Seidl et al., soumis-a). Une dilution d'un facteur 10 des eaux du rejet centrifugées conduit à une réduction de 21 % de la production primaire du phytoplancton de la Seine. Des dilutions à 20 et 60% produisent des réductions de 61 % et 67 % respectivement (figure 8). Les concentrations en chlorophylle *a* ont varié autour de 10 et 15  $\mu\text{g}\cdot\text{chl}\cdot\text{l}^{-1}$  dans Paris après le déversement du 22 août 1996. Dans ces conditions la production d'oxygène par photosynthèse joue un rôle déjà important, alors que des teneurs dépassant 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de chlorophylle *a* ont déjà été mesurées au niveau de Chatou.

Afin d'estimer le rôle joué par la toxicité des effluents sur l'oxygène au moment du passage du panache, nous avons adopté une loi d'inhibition fonction du facteur de dilution des eaux des rejets. Un traceur des rejets représentant leur dilution (concentration à 1 dans le rejet, 0 dans la rivière) a été adjoint aux variables normalement simulées par PROSE (figure 8). Compte tenu des valeurs expérimentales obtenues par Seidl et al, soumis), deux coefficients d'extinction extrêmes ont été testés ( $\beta = 2.7$  et  $\beta = 4.8$ ), pour une fonction d'inhibition exponentielle ( $\text{inhib} = \exp(-\beta C)$ ) où  $C$  représente la concentration du traceur des rejets dans la rivière.



**Figure 8 :** Fonctions d'inhibition  $f(C) = e^{-\beta C}$ , où  $C$  est la concentration du traceur conservatif ( $\beta = 2.7$ , trait plein.  $\beta = 4.8$ , courbe en tireté) comparés aux points de expérimentaux. Concentrations en fonction du temps à Epinay (PK 31.8) et Bezons (PK 39.4) d'un traceur conservatif des effluents de Clichy et venant de l'amont à Issy les Moulinaux.

Nous avons également représenté un apport d'eaux toxiques venant de l'amont, il est visualisé par le traceur à Epinay et Bezons sous forme d'un deuxième panache plus tardif (figure 8). Une dilution de 40 % a été attribuée à ces apports de l'amont, en fonction des débits respectifs de la Seine et des apports. Cette dilution tombe à 20 % en raison de la dispersion aux points plus aval d'Epinay, Argenteuil et Bezons. La durée du déversement est estimée à 12 h, soit le double de temps du déversement de Clichy.

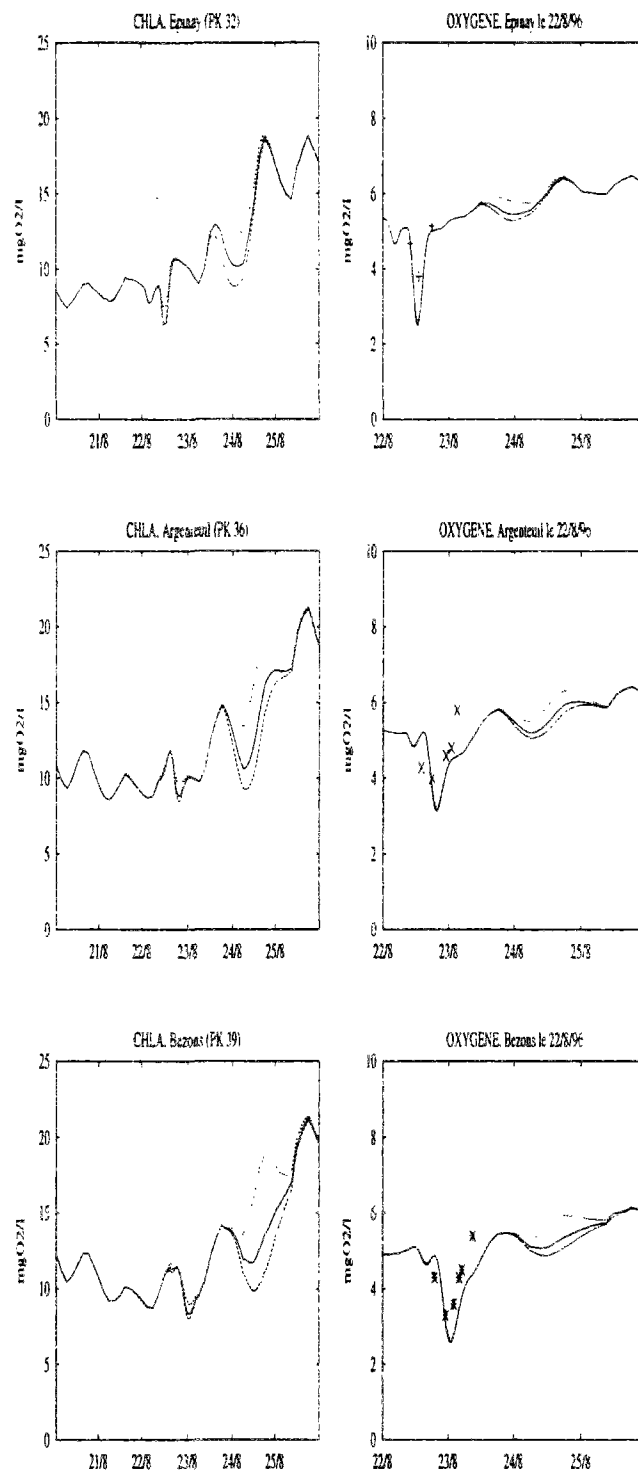
L'effet toxique du panache de Clichy se traduit par un faible effet sur le niveau de chlorophylle et sur l'oxygène, soit moins de  $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  de variation sur le minimum du déficit d'oxygène dissous (figure 9). Les taux de croissance du phytoplancton étant plus faibles que ceux des bactéries, il était prévisible qu'à très faible distance du point d'apport du toxique l'effet serait limité. Par contre, l'ensemble de rejets simulés à l'amont produit une forte diminution de la teneur en chlorophylle et un déficit supplémentaire notable de  $0.5$  à  $0.8 \text{ mg.l}^{-1}$  s'étendant sur une journée compte tenu de l'étalement du panache.

## Conclusion

Les investigations que nous avons menées à l'aide du logiciel ProSe ont permis de tirer parti des connaissances acquises dans le cadre du programme PIREN-Seine dans différents écosystèmes aquatiques du bassin de la Seine, pour explorer les processus d'impact des déversoirs d'orage. Cette stratégie permet de mettre en évidence le rôle joué par certains processus assez spécifiques des rejets urbains de temps de pluie, et donc encore peu étudiés à l'échelle du bassin. Bien que plus de la moitié du carbone rejeté par la surverse d'orage de Clichy soit fixé sur des suspensions, le devenir de ces suspensions a semble-t-il peu d'importance sur le développement des déficits en oxygène. En effet, ces apports sont rapidement incorporés dans un stock de matières particulaires constamment recyclées dans de processus de dépôt-resuspension qui agissent en Seine à l'étiage. Ce sont les mouvements globaux de ce stock plus que le devenir spécifique de matières solides apportées par le rejet qui ont un impact sur les profils d'oxygène dissous. La faible importance du devenir du COP rejeté est due à sa trop lente vitesse de minéralisation. Même en surévaluant cette vitesse d'un facteur 10 (conformément à des mesures réalisées sur des eaux de réseau unitaires de temps de pluie) par rapport à la vitesse admise dans le bassin de la Seine, l'impact du COP sur les bilans d'oxygène reste presque négligeable. Il faudrait une transformation beaucoup plus rapide du COP en COD pour qu'il puisse intervenir sur les bilans d'oxygène avant de sédimenter. On devrait alors faire appel à un processus physique (peut être une défloculation) pour expliquer une telle transformation.

Par contre, le carbone organique particulaire vivant (les bactéries) rejeté par la surverse est extrêmement important, et une très bonne détermination de ses caractéristiques physiologiques au moment du rejet et plus tard dans la Seine, ainsi que des facteurs de sa disparition (sédimentation ou broutage, dans la colonne d'eau et dans les dépôts) est tout à fait critique. Les simulations effectuées montrent que nos connaissances sont encore trop lacunaires pour pouvoir évaluer avec précision la relation entre ces différents facteurs et les déficits d'oxygène.





**Figure 9** : Chlorophylle-A et oxygène simulés et mesurés en fonction du temps à Epinay (PK 31.8), Argenteuil (PK 36.1), et Bezons (PK 39.4) entre les 22 et 23 août 1996. Tests de l'effet toxique des effluents en fonction de la dilution des effluents,  $\beta = 2.7$  (trait plein) et  $4.8$  (tireté) respectivement. Comparaison à la situation de référence ( $\beta = 0$ , pointillé) et aux mesures.

Enfin, nous avons démontré que la toxicité des rejets urbains de temps de pluie avait un impact notoire sur les niveaux de chlorophylle après une journée de contact, et accessoirement sur les niveaux d'oxygène dissous en cas de forte concentration de chlorophylle dans l'eau. Les phénomènes toxiques sont généralement absents des modèles de simulation de la production primaire dans les milieux aquatiques, ce point mérite une mention spéciale. Le phosphore, souvent d'origine urbaine, est connu pour être la cause principale de l'eutrophisation de nos rivières. Dans ces mêmes milieux, la question de la toxicité éventuelle des eaux pour le phytoplancton devrait être également examinée, au moins dans les cas de rejets intempestifs tels que le temps de pluie. Notons enfin qu'un autre effet toxique, non encore examiné, pourrait se traduire par l'excrétion en quantité de carbone organique dissous (complexants pour les métaux par exemple) susceptibles d'accroître encore la consommation d'oxygène potentielle. Ce point mérite un futur examen.

### Remerciements

Ce travail a été conduit dans le cadre du programme PIREN-Seine. Nous sommes très redevables au SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne) et au SNS (Service de Navigation de la Seine) et à la DIREN (Direction Régionale de l'Environnement) de nous avoir gracieusement transmis les séries de données d'oxygène dissous, les données de chlorophylle par temps sec, les hauteurs d'eau et débits en Seine ainsi que les positions des barrages. Les valeurs de l'ensoleillement ont été transmises par METEO-France.

### Références

- Billen G., Dégardin P., Even S. et Thomas W. (1995). Inter comparaison des modèles Kalito, Monet et ProSe. Rapport PIREN-Seine et Agence de l'Eau Seine-Normandie. 168 pp.
- Chebbo G. et Bachoc A. (1992). Characterization of suspended solids in urban wet weather discharges. *Water Science and Technology*, 25:171-180.
- Estebe A., Mouchel J.M. et Thévenot D.R. (1997). Urban runoff impacts on particulate metal concentrations in river Seine. *Water, Air and Soil Pollution*, accepted.
- Even S. (1995). Modélisation d'un écosystème fluvial : La Seine. Le modèle ProSe. Thèse de Doctorat de l'Ecole des Mines de Paris. 400 pages.
- Even S. et Poulin M. (1997). Notice d'utilisation du logiciel ProSe. Version 1.1. Ecole des Mines, CIG. 174 pages.
- Fustec E. et De Marsily G. (1993). La Seine et son bassin, de la recherche à la gestion. Actes du Colloque, 29-30 avril. PIREN-Seine, CNRS.
- Garnier J., Billen G. et Coste M. (1995). Seasonal succession of diatoms and chlorophyceae in the drainage network of the Seine River : observations and modeling. *Limnology and Oceanography*, 40:750-765.

Reynolds C.S. (1984). *The Ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge Univ. Press, 384 pages

Seidl M., Servais P. et Mouchel J.M. (Soumis-b). Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after a combined sewer overflow. *Water Research*.

Seidl M., Huang V. et Mouchel J.M. (Soumis-a). Toxicity of combined sewer overflows on river phytoplankton : the role of heavy metals. *Environmental Pollution*.

Seidl M., Servais P., Anzil A. et Mouchel J.M. (1996). Dégradation des matières organiques dans le milieu naturel après les rejets urbains. Etude et quantification des processus essentiels. Rapport pour l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse. 96 pages + annexes.

Servais P. et Garnier J. (1993). Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microbiol Ecology*, 25:19-33.

Tangerino C. (1994). Mesure de la vitesse de chute des matières en suspension, du carbone organique total et des bactéries en Seine. DEA Sciences et Techniques de l'Environnement, Université Paris-Val de Marne, 52 pages + annexes.

Ven Te Chow (1981). *Open-channel hydraulics*. Mac Graw Hill, 680 pages.

## **4. DISCUSSION GENERALE**



## Introduction

Le milieu parisien est sensibilisé par l'impact des rejets urbains de temps de pluie. L'opinion publique a été marquée par les mortalités piscicoles des dernières années, et le milieu technique sait que la résolution de ce problème passe par la réalisation d'équipements coûteux. Ce travail de thèse s'inscrit en grande partie dans la dynamique scientifique instaurée par le programme PIREN-Seine. Son titre "Caractérisation des Rejets Urbains de Temps de Pluie (RUTP) et de leurs impacts sur l'oxygénation de la Seine" révèle une volonté d'aboutir à des simulations réalistes des désoxygénations. Mais il ne s'agit pas des seuls travaux effectués sur la Seine dans le contexte des rejets urbains de temps de pluie. Les RUTP forment un sujet vaste et complexe, et les 3 volets présentés ici n'en donnent qu'une vue partielle et certainement pas exhaustive.

## Problématique

La Seine est un fleuve de petite taille drainant un bassin qui supporte une densité de population élevée. Le fonctionnement de la Seine est ainsi fortement conditionné par des aménagements comme les réservoirs, les barrages et endiguements de navigation et les stations d'épuration (STEP). Les très fortes exigences de la mégapole parisienne sur ce modeste écosystème aquatique conduisent à d'inévitables conflits d'usage : protection contre les inondations, soutien d'étiage, production d'eau potable, dilution d'effluents, usages récréatifs et piscicoles. Les gestionnaires du bassin sont confrontés à de graves problèmes de qualité d'eau, comme la surconsommation d'oxygène dissous, l'eutrophisation, la contamination par les pesticides ou par les microorganismes pathogènes. Cette situation est typique des bassins versants qui supportent une forte densité de population.

Parmi les différents types de rejets issus des zones urbaines en général, les rejets urbains de temps de pluie sont particulièrement pénalisants vis à vis de la qualité du milieu récepteur. Les données existant en France sur la qualité de ces rejets permettent d'évaluer des fourchettes de concentration. A partir de ces données, Chebbo et al (1995) montrent que la pollution annuellement rejetée par les surverses de temps de pluie d'un réseau unitaire est comparable à la pollution annuellement rejetée par la station d'épuration après traitement. Nous pouvons illustrer ce point par l'exemple numérique décrit au tableau I. Ces valeurs indicatives, situées au centre des fourchettes suggérées par Chebbo et al (1995), conduisent à des pollutions annuelles de  $DBO_5$  rejetées par hectare de 0.4 tonnes par an à l'aval de la station d'épuration, 0.45 tonnes par an par les surverses dans le cas d'un réseau unitaire et 0.15 tonnes par an par le ruissellement urbain dans le cas d'un réseau séparatif.

Notre objectif n'est pas de débattre de l'universalité de ces résultats. La variabilité des concentrations de polluants dans les réseaux, de la densité de population et du coefficient de ruissellement est telle que des résultats fort différents pourraient être obtenus dans des cas particuliers. Les estimations précédentes montrent simplement que les flux de pollution apportés par les rejets urbains de temps de pluie sont déjà très significatifs à l'échelle annuelle.

**Tableau I :** Caractéristiques utilisées pour l'estimation de l'importance annuelle des rejets urbains de temps de pluie.

Paramètre de calcul	Valeur caractéristique
Densité de population	100 eq.hab par hectare
DBO <sub>5</sub> journalière	54 g par hab. et par jour
Rendement de la station d'épuration	80%
Pluie annuelle	800 mm
Coefficient de ruissellement	0.3
DBO <sub>5</sub> dans les eaux unitaire de temps de pluie (réseau unitaire)	180 mg.l <sup>-1</sup>
DBO <sub>5</sub> dans les eaux de ruissellement (réseau séparatif, avec des mauvais branchements en général)	60 mg.l <sup>-1</sup>

A l'échelle d'un événement, le flux de pollution apporté au milieu est considérable. Nous basant sur les mêmes valeurs guide, nous pouvons estimer que l'événement de période de retour annuelle (environ 20 mm) apportera pour une durée de ruissellement typique de l'ordre de 4 heures, 60 fois la pollution rejetée par la station durant la même période. L'impact de cet événement sur l'écosystème récepteur peut être dramatique. De surcroît, le volume d'eau déversé est considérable, et les équipements qu'il faudrait mettre en place pour le retenir sont fort coûteux pour la collectivité.

En réalité, les rejets de matières organiques et les nuisances qui en découlent ne sont pas les seuls impacts sur les milieux aquatiques récepteurs occasionnés par les rejets urbains de temps de pluie. Chebbo et al (1995) en particulier ont synthétisé et relativisé les différents types d'impacts. Ils distinguent trois échelles de temps (effet immédiat, effet retardé de l'ordre de quelques semaines et effet saisonnier) et quatre types d'effet (effet toxique, eutrophisation, risques pour la santé humaine et modification physique du milieu).

Même si nous privilégions l'usage "vie des organismes aquatiques", nous ne souhaitons pas passer sous silence les autres usages de l'eau, pour lesquels les facteurs prédominants de dégradation après les RUTP peuvent être différents. En ce qui concerne la production d'eau potable, les teneurs très élevées en ammonium ou en micropolluants qui font suite à certaines pluies peuvent contraindre des prises d'eau à une fermeture momentanée. Pour l'usage récréatif, la présence de germes pathogènes pour l'homme devient une nuisance considérable. En milieu côtier en particulier, il est fréquent que des plages doivent être déclassées à la suite d'orages. Revenant aux organismes aquatiques, dans le cas de surverses unitaires, et sur la base de données écotoxicologiques de la littérature, Chebbo et al. (1995) ont classé les impacts toxiques pour les organismes aquatiques et montré que la désoxygénation était le risque majeur de mortalité (piscicole en particulier), suivi de près par la présence d'ammoniaque et de beaucoup plus loin par les microtoxiques.

Ce type d'analyse, même si elle ne passe pas sous silence la diversité des impacts possibles, justifie que les problèmes de désoxygénation et de dégradation de matières organiques soient au coeur des études d'impact des rejets urbains de temps de pluie. Ces études visent pour la plupart à l'établissement de schémas d'assainissement cohérents puis au dimensionnement d'ouvrages de stockage et/ou traitement des eaux de temps de pluie.

L'optimisation de ces équipements demande une bonne connaissance des charges rejetées en fonction des événements pluvieux attendus et l'établissement de relations entre rejet et impact. Chacune de ces relations pluie/rejet et rejet/impact peut être évaluée par différents types de modèles. A un extrême se situent les modèles globaux, stochastiques, dont la calibration peut être obtenue à partir de séries de données pour différentes fonctions objectifs (Harremoes et al, 1996). A l'autre extrême, se situent les modèles totalement déterministes dont les paramètres peuvent être évalués avec une certaine précision par des mesures indépendantes (Even, 1995). Entre les deux se trouve une plage complexe de modèles mixtes à adapter en fonction des objectifs recherchés, et des données et connaissances disponibles sur le système à modéliser.

Les variables décrivant la qualité de l'eau des rejets utilisées dans les études d'aménagement sont, dans l'immense majorité des cas, les variables classiques qui décrivent la qualité des eaux résiduaires urbaines, soit en particulier le  $DBO_5$ , la DCO et les MES, et dans certains cas les formes de l'azote et du phosphore. L'oxygène principalement, et l'ammonium en second lieu, sont les variables qui définissent les critères de qualité recherchés dans le milieu. La question des germes pathogènes est également à l'ordre du jour quand le milieu est de qualité suffisante pour que l'usage récréatif s'y soit développé.

Lorsqu'ils ne sont pas uniquement fondés sur une approche de type boîte noire, les modèles utilisés pour simuler la qualité du milieu récepteur sont basés sur la description de la consommation d'oxygène initialement proposée par Streeter et Phelps. Beaucoup de réserves doivent être faites quant à l'utilisation de ces modèles pour simuler des événements fortement transitoires comme les RUTP. Cette approche de modélisation, assez facile à mettre en oeuvre, nous paraît malheureusement trop simplifiée pour être efficace pour les RUTP. Les processus biologiques sont décrits par des cinétiques chimiques de premier ordre, sans doute applicables sur de longues périodes ou en moyenne, mais plus qu'insuffisantes sur des échelles de courte durée comme celle des RUTP. En réalité, l'application typique du modèle de Streeter et Phelps consiste à simuler une courbe en sac ("sag curve") où les concentrations d'oxygène passent par un minimum avant de retourner à vers la valeur de saturation. La formulation de Streeter et Phelps est la formulation linéaire la plus simple capable de simuler un tel comportement de la variable oxygène dissous. Les deux coefficients étant calés, on peut toujours faire passer les simulations par le bon minimum à la bonne distance de la source de pollution. C'est justement la nécessité d'un calage qui permet d'émettre des doutes quant à l'utilisation de ce modèle pour les RUTP. Les coefficients calés pouvant dépendre de la saison, du tronçon de rivière simulé, du débit....., l'utilisation du modèle en régime transitoire doit *a priori* être remise en question. Plus grave est la pratique (courante ?) qui consiste à caler le modèle par temps sec et l'utiliser pour les RUTP (Suarez et al, 1996). Notre approche a consisté à mieux comprendre le développement des désoxygénation après les RUTP de façon à aboutir à l'utilisation de modèles plus adaptés. En particulier, la dégradation des matières organiques étant un phénomène



biologique, il paraît indispensable d'inclure la variable "biomasse" dans la description du système.

Le niveau d'oxygène dans un écosystème aquatique résulte d'une balance entre la photosynthèse, la respiration et la réoxygénation par échange eau/atmosphère. Dans le cas de rivières assez profondes, la photosynthèse est dominée par le phytoplancton plus que les végétaux supérieurs. La respiration a deux composantes principales : la respiration des organismes décomposeurs (principalement les bactéries hétérotrophes) et celle des organismes autotrophes, qui domine la photosynthèse quand l'éclairement s'affaiblit, la nuit en particulier. En Seine, en été, hors période de bloom algal, la photosynthèse contrebalance la consommation hétérotrophe. La réaération naturelle ne contribue que partiellement à cet équilibre. Suite aux RUTP un apport de biomasse hétérotrophe et de matières organiques perturbe profondément cet équilibre. La consommation hétérotrophe augmente rapidement, tandis que la production d'oxygène peut être diminuée par un éclairement moindre (mauvais temps et absorption de lumière par les particules dans le panache pollué) voire par un effet toxique dû à la présence de micropolluants. Une baisse de la production primaire et par conséquent des teneurs en  $O_2$  suite à une diminution de l'ensoleillement simultanée aux RUTP a déjà été observée en Seine (Mouchel et al, 1994). Par ailleurs les effets phytotoxiques des micropolluants organiques et inorganiques sont bien connus, de nombreuses expériences de laboratoire ont permis d'évaluer l'effet de composants individuels. Comme des teneurs spécialement élevées en métaux lourds dans les eaux rejetées par temps de pluie ont été fréquemment rapportées (Chebbo, 1992, Paffoni, 1994, Estebe, 1997), l'accent doit être mis sur le potentiel toxique des métaux sur le phytoplancton.

Pour analyser les processus contribuant à la désoxygénation après les RUTP, une caractérisation des apports et/ou du devenir des trois composants principaux (la matière organique, la biomasse hétérotrophe et le phytoplancton) a été effectuée dans les rejets et dans le milieu récepteur dans le cadre de ce travail de thèse. Le processus ne pouvant pas être estimés in situ ont été examinés au laboratoire. L'impact toxique des rejets sur le phytoplancton a retenu notre attention plutôt que leur impact sur la biomasse hétérotrophe en raison de la plus faible sensibilité et à la plus grande adaptabilité de cette dernière.

## Contexte

Pour aider les gestionnaires du bassin de la Seine à résoudre les nombreux problèmes posés par la gestion de l'eau et pour mieux comprendre le fonctionnement du bassin hydrographique de la Seine, un programme de recherche scientifique le PIREN Seine (CNRS) a été mis en place en 1989. Dans le cadre de ce programme, les recherches effectués en région parisienne en aval de la station d'Achères constitue une très bonne base de départ pour nos travaux. La démarche du PIREN-Seine dépasse un simple constat descriptif de l'écosystème et tente d'améliorer la compréhension des processus au travers de la construction de modèles biogéochimiques (Garnier et al, 1995, Billen et al., 1995). RIVE est le modèle de base du PIREN-Seine, c'est le "moteur biologique", il décrit le fonctionnement des principales populations de microorganismes, bactéries et plancton, de l'écosystème Seine. Il décrit une série de processus

biochimiques de base applicables en théorie à tous les maillons du réseau hydrographique. C'est là un concept primaire important, développé dans le cadre du programme PIREN-Seine : une bonne description de la dynamique des microorganismes doit pouvoir être appliquée à (presque) tous les sous-systèmes, la réponse du moteur biologique sera différenciée en fonction des contraintes physiques qui lui sont appliquées. De plus, les processus qui sont intégrés dans le moteur biologique doivent pouvoir être évalués un à un, les paramètres ne devant pas, autant que faire se peut, être déduits d'un calage. Couplé à une modèle hydraulique de transport, mono-dimensionnel, transitoire et maillé, ce moteur devient le modèle ProSe (Even, 1995). Notons qu'un module "transport solide" a également été adjoint à ProSe.

Dans les modèles du PIREN-Seine, l'approche Streeter et Phelps a été remplacée par le modèle HSB. (H) pour indiquer la matière organique complexe de Haut poids moléculaire, qui forme après hydrolyse le Substrat (S) utilisé par les Bactéries (B). Alors que la prise en compte explicite de la biomasse est courante dans les stations d'épuration où la gestion des boues est même le facteur principal, très peu de modèles appliqués en rivière y font explicitement référence. Les quelques exceptions sont par exemple Edeline (1981) sur la Meuse ou Stehfest (1977, in Gromiec et al, 1983) sur le Rhin, mais les modèles américains standards (QUAL II, WASP) développé par l'EPA et largement diffusés, utilisent le concept de Streeter et Phelps. Le contexte des travaux passés du PIREN-Seine constituait donc une excellente base de départ pour les travaux développés dans cette thèse.

Le modèle HSB représente la matière organique selon trois classes  $H_1$ ,  $H_2$  et  $H_3$  de moins en moins rapidement dégradables,  $H_3$  étant complètement réfractaire. La dégradabilité d'une classe est définie par sa vitesse maximale d'hydrolyse par les exoenzymes des bactéries hétérotrophes. Les travaux effectués à l'aval de la station d'épuration Seine-Aval, située sur la commune d'Achères, ont montré que la biomasse hétérotrophe pouvait être différenciée en deux classes ayant des taux de croissance et de disparition distincts (Garnier et al, 1992a et 1992b, Servis et Garnier, 1993). En amont du rejet de la station, la biomasse hétérotrophe est principalement constituée de bactéries inférieures à 1  $\mu\text{m}$ , tandis qu'en aval la majorité de la biomasse est plutôt supérieure à 1  $\mu\text{m}$ . Le taux de croissance maximum des grosses bactéries, dites allochtones est le plus élevé, 0.15  $\text{h}^{-1}$  au lieu de 0.04  $\text{h}^{-1}$  pour les petites, leurs taux de disparition sont également différents (0.02  $\text{h}^{-1}$  pour les petites et 0.07  $\text{h}^{-1}$  pour les grosses). Ces taux de disparition intègrent broutage et sédimentation, la part respective des deux processus n'est pas clairement identifiée. Mon travail sur les RUTP permet de valider ces notions dans le contexte des RUTP et donc de valider la démarche PIREN-Seine qui vise à démontrer qu'un même moteur biologique est applicable dans toutes les parties d'un bassin versant. En effet, jusqu'à présent, seules les données recueillies à l'aval d'Achères montraient cette différenciation des bactéries hétérotrophes.

Nous avons donc articulé notre travail autour de la caractérisation de la dégradabilité des matières organiques, de la quantification de la biomasse hétérotrophe et de son activité, et de l'évaluation de l'effet toxique possible des RUTP. Le facteur "terrain" a été privilégié autant que faire se peut, sauf pour ce qui est de l'évaluation de la toxicité pour laquelle des méthodes de laboratoire ont dû être employées (figure 1).

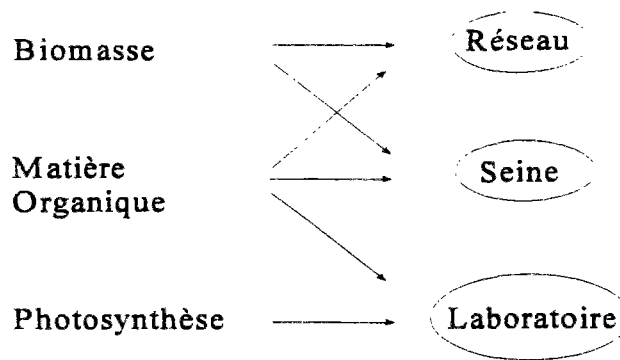


Figure 1 : Description de la démarche.

La biomasse et les matières organiques ont été caractérisées en réseau d'assainissement et en Seine essentiellement après RUTP, mais aussi par temps sec pour comparaison. Des mesures de cinétique de dégradation ont également été réalisées au laboratoire, elles permettent à la fois de caractériser la dégradabilité des matières organiques et l'activité de la biomasse. L'effet toxique sur la photosynthèse ne pouvait pas être étudié in situ car il fallait réaliser des expérimentations en conditions contrôlées. Nous avons donc travaillé avec du phytoplancton tiré de la Seine, en présence de quantités connues de toxiques et présence de mélanges d'eau de rejet et d'eau de Seine.

### Caractérisation des matières organiques et de la biomasse en réseau

L'agglomération parisienne est drainée par 5 grands collecteurs gravitaires, qui transportent 80% de l'eau usée de l'agglomération vers la STEP Seine-Aval située à Achères. Les 200 litres d'eau consommés journalièrement par chaque habitant, augmentés des eaux de nettoyage, des fuites et les chasses d'eau en réseau résultent dans un débit de  $2 \cdot 10^6 \text{ m}^3 \cdot \text{j}^{-1}$  à Seine-Aval, soit un débit de près de  $25 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  d'effluent à la sortie. En temps de pluie, la capacité des collecteurs est dépassée et des eaux usées sont déversées en Seine. Le principal déversoir se situe à Clichy, usine de prétraitement et de pompage et noeud important du réseau d'assainissement de Paris. Les déversements peuvent atteindre des débits de  $50 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  et des volumes d'un million de  $\text{m}^3$ , pour des événements exceptionnels. L'envergure du problème devient plus tangible et plus claire si on compare ces chiffres au débit de la Seine en été, soit environ  $100 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Le déversoir de Clichy ne constitue cependant qu'une dizaine de pour-cents de la quantité totale déversée en Seine par temps de pluie.

L'objectif principal des études menées dans le réseau en temps de pluie était une meilleure caractérisation des matières organiques susceptibles d'être rejetées. La question majeure porte sur la différence fondamentale entre la composition du carbone en temps de pluie et en temps sec. En vue de l'application du modèle HSB, la recherche a été dirigée vers la biodégradabilité des différentes sources du carbone, des fractions dissoutes et particulaires et les estimations de la biomasse hétérotrophe. La très grande taille de l'agglomération parisienne, et la présence de multiples points de déversement correspondant à des bassins de tailles différentes nous ont

incités à effectuer des comparaisons entre différents sous-bassins.

Dans le cadre d'une étude Inter-agences pilotée par l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse, le CERGRENE a été amené à collaborer avec la SAFEGE qui travaillait pour le compte du département des Hauts-de-Seine et l'Agence de l'Eau Seine-Normandie. Cette étude portait sur un bassin versant unitaire expérimental situé à Boulogne-Billancourt. Boulogne est situé sur la rive droite de la Seine, juste en aval de Paris, et sa densité de population peut être comparée à celle de Paris. Le bassin de 43 ha (au site S6), est constitué d'un collecteur ovoïde de faible pente, qui draine au point amont un sous-bassin de 28 ha (au site S3) et d'environ 5 hectare (au site S1). Le site (S4c) est le point de mélange de S1 et S3. 2 avaloirs ont été choisis (S2 et S5), un sur le petit bassin et un sur le collecteur principal. L'ensemble de Boulogne Billancourt (environ 400 ha) a été échantillonné à la station de l'Avre (S7). En tout, 12 périodes de pluie ont été échantillonnées. Chacun des sites a été échantillonné pendant deux périodes de temps sec et 6 périodes de pluies pour les paramètres de qualité tel que la DBO, l'azote ammoniacal et les matières en suspension. Les paramètres déterminant la dégradabilité du carbone et la quantité de biomasse n'ont été mesurés que sur les sites S4c et S6. En outre, une caractérisation des eaux déversées a été réalisée au niveau du déversoir de Clichy.

Les hydrogrammes constituent une donnée de base pour la comparaison des sites et le calcul des flux. Les cycles journaliers de débit apparaissent nettement, ils sont comparables aux données publiées dans la littérature avec une pointe matinale et un creux à la fin de la nuit. L'exemple de la pluie intense du 7 septembre 1995 (14 mm), montre un léger retard des maxima de débits de l'amont vers l'aval et un amortissement du débit au point les plus aval (S7) dû aux temps de transfert différents des sous-bassins versants qui composent la ville de Boulogne et à l'amortissement hydraulique du réseau. La forte augmentation de vitesse due aux apports d'eau de pluie en amont peut remettre des solides déposés en suspension, ils peuvent éventuellement se redeposer dans la partie aval du réseau où les accroissements de débit sont plus faibles. Ces phénomènes sont également fortement dépendants de la géométrie des collecteurs.

Le transport des MES a été évalué par des mesures de turbidité, une mesure rapide et de faible coût. De très bonnes corrélations entre la turbidité et les teneurs en MES ont permis d'utiliser ce paramètre pour toutes les campagnes de mesures, y compris les campagnes réalisées en Seine. Les valeurs de turbidité en temps de pluies ont été comparés à celles d'un temps sec. Une augmentation significative de la turbidité de très courte durée (first flush) est visible à chaque début de pluie, aussi bien pour les pluies matinale que pour celles du soir. Cette augmentation doit être liée à la resuspension partielle des dépôts du collecteur, observés à plusieurs reprises dans le collecteur principal.

Une fois passé ce pic, les pluies matinales échantillonnées ont légèrement augmenté la turbidité, tandis que les pluies du soir l'ont significativement diminuée. Le rapport entre le volume sec transitant dans le réseau et la lame d'eau tombée détermine la dilution de la charge érodée. Il se trouvent que les pluies matinales étaient de volume faible, comme elles coïncident avec la pointe du temps sec dans le réseau la dilution est évidemment faible. Au contraire, les pluies de la fin de la journée étaient plus longues et plus intenses, avec un faible débit de temps sec.

A Clichy, dans un beaucoup plus grand bassin versant unitaire (environ 12000 ha), on n'observe pas les mêmes phénomènes de transport des suspensions (Paffoni, 1994). La teneur en MES est systématiquement plus élevée au cours des périodes de déversements que hors déversement.

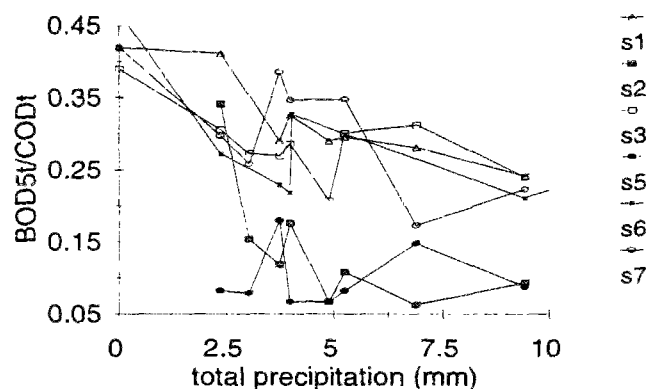
La biodégradabilité des eaux usées a été évalué selon plusieurs méthodes, plus ou moins classiques : a) mesures de la respiration, b) estimation du rapport DBO/DCO et c) mesures du carbone organique biodégradable.

Pour évaluer la demande en oxygène et sa cinétique par temps sec et par temps de pluie des échantillons moyens par événement ont été soumis à des mesures de respiration en quasi continu. Contrairement aux boues activées la respiration initiale des eaux usées est faible ( $<10 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Suite à des recherches bibliographiques et à une série d'expérimentations au laboratoire nous avons pu mettre en place un respiromètre avec une limite de détection de  $0.15 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Le système a été caractérisé par la mesure d' $\text{O}_2$  dans la phase gazeuse et composé d'un réacteur avec un rapport gaz/liquide variable d'environ 1/15 à 1/30, entre le circuit d'air et le circuit d'eau. Les avantages de la mesure en phase gazeuse sont la stabilité de la mesure et la possibilité de calibrer la sonde automatiquement en injectant de l'air extérieur dans le circuit. Une des difficultés principales était de parvenir à un échange eau/gaz très rapide, donc avec de très fines bulles, tout en évitant la formation de mousse favorisée par les détergents présents dans l'eau usée urbaine. La mousse finissait par envahir complètement la phase gazeuse, perturbant la mesure d'oxygène. Un système de jet et de vortex a permis de résoudre le problème. L'ouverture périodique du circuit d'air pour calibration permet également de renouveler l'oxygène et d'éviter l'anoxie. Les mesures de respiration montrent des vitesses de dégradation importantes et généralement sans période de latence, sauf pour une seule des eaux de temps de pluie analysées. L'activité de la biomasse rejetée est donc suffisante pour la consommation d'oxygène. Ces résultats suggèrent qu'en cas de déversement 50% de la demande en oxygène estimée au moyen d'une  $\text{DBO}_5$ , se ferait en moins de 24 heures. Connaissant la composition initiale de l'eau (matières organiques et bactéries), il était possible d'utiliser le modèle HSB pour simuler ces expérimentations (Seidl et al., 1996). Deux conclusions importantes ont pu en être tirées :

- a) il existe effectivement une relation très significative entre la quantité de biomasse hétérotrophe initiale, et la durée de la phase rapide de disparition du carbone organique dissous (COD). Néanmoins, les durées simulées par HSB sont un peu trop longues, il semble que les bactéries du réseau soient plus actives que les bactéries les plus actives paramétrées dans HSB. On note que le point Clichy se distingue de l'ensemble des autres avec une activité bactérienne spécifique apparemment plus faible.
- b) un problème reste la distribution du carbone dégradé dissous entre  $H_1$  et  $H_2$ . Les simulations effectuées avec HSB montrent que dès lors que  $H_1$  est présent en quantité suffisante (plus de 20% typiquement), la consommation est rapide. En effet, la présence de  $H_1$  permet de faire démarrer la croissance des bactéries, qui elle même induira une forte hydrolyse de  $H_2$  en S. C'est seulement lorsque  $H_1$  est faiblement présent que la machine a du mal à se mettre en route et que des cinétiques de dégradation plus lentes

sont observées. Ainsi, la distribution entre  $H_1$  et  $H_2$  n'est guère identifiable, sauf si  $H_1$  est en très faible quantité. Il serait important de vérifier la sensibilité du modèle à  $H_1$  et  $H_2$  dans la simulation du milieu récepteur.

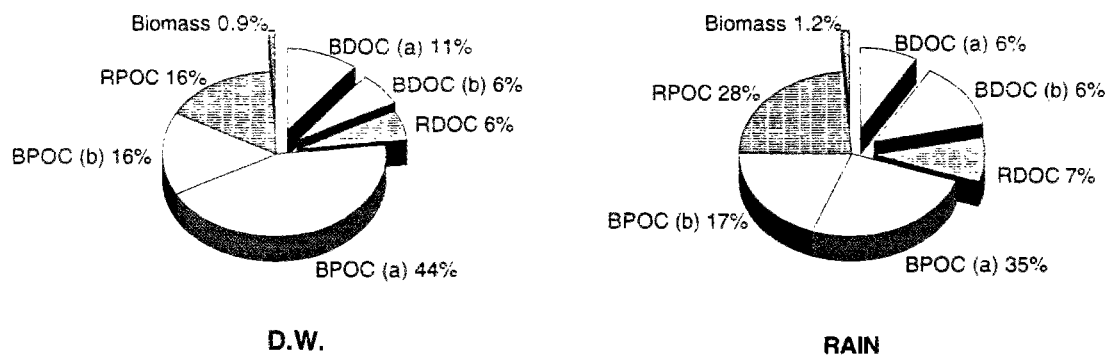
La biodégradabilité peut être aussi définie à l'aide des paramètres classiques tels que la  $DBO_5$  et la DCO. Le rapport  $DBO_5/DCO$ , indique une dégradabilité théorique après 5 jours. En laissant de côté les biais possibles des mesures de la  $DBO_5$ , une période de 5 jours est suffisante pour couvrir la plupart de la consommation qu'on peut observer après un rejet. La comparaison de la biodégradabilité des eaux usées par temps de pluie et de la lame d'eau tombée montre une diminution progressive de la dégradabilité de 45% à 25% environ pour une augmentation de la lame d'eau d'environ 10 mm (figure 2). Par contre, la dégradabilité des matières organiques véhiculées par les eaux de ruissellement reste inchangée autour de 10%. Les grosses pluies transportent donc dans le réseau une matière organique moins dégradable en partie issue du ruissellement. Elles peuvent aussi remettre en suspension des dépôts en réseau contenant une proportion élevée de la matière organique réfractaire.



**Figure 2 :** Evolution de la biodégradabilité par temps de pluie à Boulogne en fonction de la lame d'eau exprimée comme le rapport  $DBO_5/DCO$

Finalement la biodégradabilité peut être également caractérisée à l'aide de mesures de carbone organique, c'est la méthode élaborée en parallèle avec le développement de HSB, de manière à pouvoir fournir directement des concentrations des variables  $H_3$  d'une part et  $H_1 + H_2$  d'autre part. Un autre avantage des mesures de carbone par rapport aux consommations d'oxygène ou aux mesures de DCO est que la sensibilité de la mesure est très élevée. Sous conditions aérobies la différence entre la teneur initiale et finale (après une incubation d'une durée définie) donne la partie de carbone transformée en  $CO_2$ , par l'activité microbienne. Une période de 40 jours s'avère suffisante pour avoir une teneur en carbone stable (Servais, 1989), selon une technique couramment utilisée dans le domaine de la production d'eau potable. Les mesures après 5 jours d'incubation donnent un équivalent de la  $DBO_5$ . Ces mesures permettent d'élaborer une spéciation de la dégradabilité du carbone particulaire et dissous et donc d'estimer l'effet de la sédimentation sur la consommation d'oxygène.

Un exemple de spéciation est donné pour le site S4c (33ha) pour une pluie du soir assez forte. La partition du carbone organique a été établie à partir des incubations à 40 jours et des concentrations de carbone restant dans le réacteur après 5 jours. Le flux transporté en temps de pluie était presque trois fois plus élevé que le flux de temps sec, soit  $40 \text{ kgC.ha}^{-1}$  au lieu de  $17 \text{ kgC.ha}^{-1}$ . La contribution de la fraction dissoute est légèrement plus élevée en temps sec qu'en temps de pluie, avec la moitié dégradée en 5 jours contre un tiers par temps de pluie (figure 3). On remarque que la partie dégradable est plus élevée en temps sec : 78% au lieu de 65% par temps de pluie. Le carbone particulaire est plus facilement et plus rapidement dégradable en temps sec: 60% en 40 jours dont les trois quarts en 5 jours contre 50% et la moitié en 5 jours par temps de pluie. La matière organique susceptible d'être rejetée en Seine par temps de pluie et moins dégradable, et la contribution de la matière organique particulaire est nettement plus élevée que par temps sec.



**Figure 3 :** Distribution du carbone organique en classes de dégradabilité par temps sec et par temps de pluie, à la même station (S4c)

La biomasse hétérotrophe reste le facteur important que nous souhaitons caractériser dans le réseau. Les estimations de biomasse sont faites à partir d'observations au microscope à épifluorescence. La variabilité des résultats est assez élevée, et ne permet pas de distinguer entre le temps sec et le temps de pluie dans le bassin de Boulogne. Les principales différences ont été trouvées en fonction de la saison, la biomasse bactérienne hivernale étant moins élevée que la biomasse estivale. On peut penser que les plus faibles températures nuisent à son développement dans le réseau. Comparant nos résultats de Boulogne et de Clichy à ceux obtenus antérieurement à Achères, des différences très notables peuvent être observées à l'échelle du réseau d'assainissement : la biomasse constituait 1.2% du COTB au site S4c, 4.5% à Clichy et presque 6% à l'arrivée sur la station d'Achères (figure 4). La quantité de biomasse présente, par unité de carbone total présent, est donc fonction du temps de séjour dans le réseau, ce qui démontre que la biomasse est une caractéristique du réseau plutôt que des eaux usées.

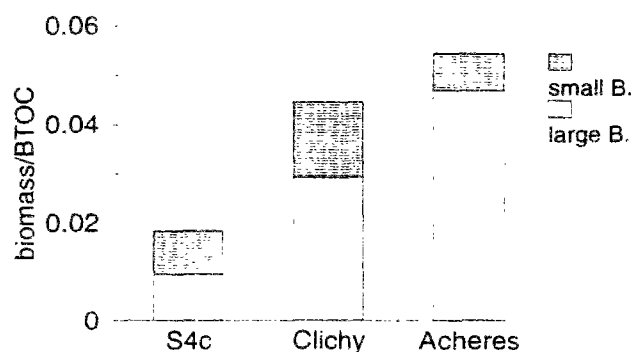


Figure 4 : Evolution de la quantité de biomasse, en proportion du Carbone Organique Total Biodégradable

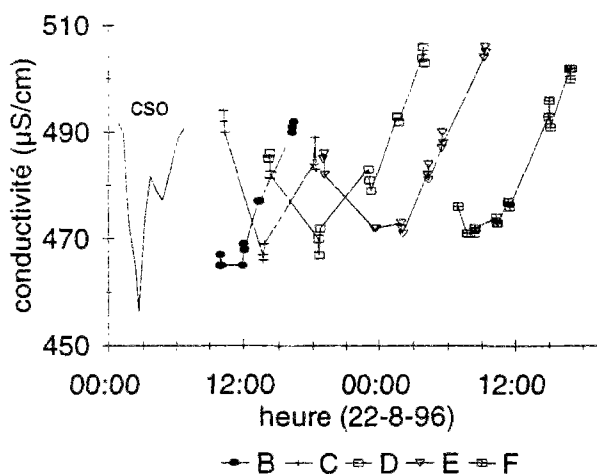
### Transport des matières rejetées et dégradation observée in situ

Après la caractérisation en réseau de la matière organique et de la biomasse susceptibles d'être déversées, nos efforts se sont poursuivis en Seine en vue de la validation du modèle ProSe. L'hypothèse du rejet de grosses bactéries allochtones au taux de croissance élevé par le réseau d'assainissement, formulée après observations antérieures à l'aval d'Achères, devait être confirmée. La caractérisation des matières organiques selon des techniques équivalentes à celles que nous avons utilisées en réseau et la relation entre le déficit d'oxygène et la quantité de carbone rejeté étaient les thèmes principaux pour les suivis en Seine. La dégradation du carbone organique rejeté peut se faire par la population allochtone et/ou autochtone. Les mesures d'activités et de la biomasse de différentes tailles permettront d'éclaircir le partage des tâches.

Le site répondant à notre problématique était la Seine en aval de Clichy. Les études antérieures réalisées par le SIAAP au déversoir de Clichy (Paffoni, 1994), montrent que les événements orageux d'été provoquant des rejets de plus de  $25 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  atteignent des volumes très importants et peuvent provoquer des déficits critiques. Comme les essais en réacteur ont montré que la dégradation de la matière organique et donc la demande d'oxygène étaient les plus intenses durant les premières 24 heures, des suivis immédiats s'imposaient. Les vitesses d'écoulement en Seine en période d'étiage varient entre  $0.10$  et  $0.25 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , il fallait donc travailler sur un trajet d'environ 20 kilomètres (de Clichy à Chatou) pour une bonne évaluation de l'impact des rejets in situ. Deux méthodes de suivi ont été appliquées : à partir d'un petit bateau à moteur et à partir des nombreux ponts qui enjambent la Seine (environ tous les 3 à 4 kilomètres). Le premier rejet que nous avons suivi était de  $375000 \text{ m}^3$ , le travail a été effectué en bateau. Des autres rejets de  $525000$  et  $320000 \text{ m}^3$  ont été suivis à partir des ponts en 1996. Les paramètres principaux de suivis étaient le carbone et l'évolution de la biomasse, plusieurs traceurs ont également été suivis : conductivité, ammonium, oxygène et turbidité. Pour obtenir un point de comparaison, une série de mesures de la qualité de l'eau a été réalisée durant l'été avec une fréquence hebdomadaire par temps sec.



La meilleure façon de repérer les rejets in situ est la conductivité. L'eau rejetée à Clichy par temps de pluie est composée d'eau usée ( $\approx 800 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) mélangée avec une forte proportion d'eau de ruissellement ( $\approx 150 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), ce qui résulte dans une conductivité moyenne au cours des événements étudiés de l'ordre de  $400 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La conductivité de la Seine étant de l'ordre de  $500 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , sa conductivité diminue clairement après mélange avec les eaux du rejet. L'autre traceur peut être l'oxygène car la différence entre le niveau d' $\text{O}_2$  au centre du panache et la teneur naturelle (soit le déficit induit par le rejet) se creuse avec le temps. Sur l'exemple du suivi de 22/8/96 on peut suivre la pointe du rejet vers 3h à Clichy jusqu'au passage du milieu de la tache à 9h le jour suivant à Chatou (figure 5). L'augmentation de la valeur du minimum de conductivité au fur et à mesure du transit traduit la dispersion longitudinale, tandis que les traits verticaux indiquent les conductivités obtenues en trois points (rive gauche, centre et rive droite), et illustrent une assez faible hétérogénéité transversale.



**Figure 5:** Evolution de la conductivité pendant le suivi du 22 août 1996. Mesures aux différentes stations A,B,C. et courbe de mélange initial du rejet en Seine (à gauche sur la figure).

La conductivité est un paramètre conservatif pour la durée du suivi. Les processus biologiques, contrairement aux dilutions, ne la modifient pas substantiellement. Seuls des rejets probablement industriels, déjà identifiés par temps sec nous ont perturbés dans l'utilisation de ce traceur. Ainsi la comparaison des paramètres tel que l'ammonium ou la turbidité à la conductivité, peut nous renseigner sur les processus physico-chimiques ou biologiques qui se développent après le déversement. La ligne de parfait mélange peut être construite à l'aide des moyennes pondérées par les débits de l'eau déversée et de l'eau de Seine avant le déversement. Les lignes pointillées indiquent un "espace de mélange" obtenu en considérant les écarts-type des mesures pour chacun des termes de référence (rejet et Seine par temps sec). En cas de simple mélange la plupart des mesures devront ainsi se situer dans l'espace de mélange, encadré par les 2 lignes de déviation. La présence de point de mesures à l'intérieur de cet espace indique une conservativité, ou une balance équilibrée des termes de production et de consommation durant le trajet.

Une telle évaluation pour la turbidité montre une disparition rapide des MES de la colonne d'eau. Même les échantillons prélevés près du point de déversement, soit au point B à 5 km en aval de Clichy (moins de 7 heures après le déversements) montrent une disparition importante et ce pour tous les événements échantillonnés. Ces résultats indiquent des vitesses de chute supérieures à  $0.6 \text{ m.h}^{-1}$ . Les analyses de COP confirment la disparition des particules et des vitesses de chute élevées. Le carbone dissous et le carbone particulaire vont ainsi suivre des cheminements différents. Le carbone particulaire ne reste pas dans la colonne d'eau et sa participation au déficit d'oxygène ne peut être qu'indirecte.

Les calculs de bilan d'oxygène et de carbone dans les masses d'eau polluées par les RUTP de Clichy montrent clairement que le déficit d'oxygène à Chatou est principalement lié au carbone organique dissous et non pas au COP (Tableau II). Le rapport entre COD rejeté (dégradable à 80% environ) et le déficit d'oxygène est d'environ 2, le CODB peut ainsi être tenu pour responsable de la plupart de la consommation bactérienne d'oxygène. Cependant les analyses de carbone ne montrent pas une diminution significative du COD dans le panache au cours de temps. Il semble donc qu'une source additionnelle ait contribué au bilan de carbone organique. Une comparaison entre le COD résiduel et dégradable dans les masses d'eaux suivies, la dégradabilité du carbone rejeté à Clichy (rapport CODB/COD d'environ 0.8) et celle du carbone organique de l'eau de Seine de temps sec (rapport d'environ 0.4) montre que le carbone additionnel résulte de l'apport d'une autre source hautement dégradable. Les explications plausibles pourront être une contribution de lyse du phytoplancton ou une déflocculation du COP rejeté, dont la dégradabilité est également très élevée. Cependant ces hypothèses restent à confirmer.

**Tableau II** : Bilans de carbon et oxygène à Chatou pour les trois événements étudiés.

suivi N°	temps de transit	initial O <sub>2</sub> déficit	Excess O <sub>2</sub> consommé à Chatou	Excess bacterial production	COD rejeté	MES rejetées
	(h)	tonnes-O <sub>2</sub>	tonnes-O <sub>2</sub>	tonnes-C	tonnes-C	tonnes
#1	23.5	2.0	10.5	1.1	7.5*	113
#2	26	3.0	17.6	-	9	142
#3	28.8	1.7	12.3	2.0	6.2	30

Les résultats des mesures de la masse biomasse bactérienne en temps sec et en temps de pluie montrent pour tous les trois déversements suivis, une augmentation de la biomasse en grande partie due aux bactéries de grande taille provenant du rejet. Les points se rapprochent d'une droite de pente 1 avec un intercepte de  $50 \mu\text{gC.l}^{-1}$ , équivalent à la biomasse de temps sec. Le même diagramme établi à partir de mesures d'activité plutôt que de biomasse est encore plus évocateur, l'activité spécifique des petites bactéries étant nettement inférieure à celle des grosses. Ainsi le surplus de production bactérienne et donc la consommation d'oxygène provient principalement des bactéries allochtones, les plus actives, apportées par les rejets. Le taux de croissance de bactéries dans la tâche d'eau usée (22-8-96) varie entre  $0.25 \text{ h}^{-1}$  pour les bactéries du rejet à moins de  $0.06 \text{ h}^{-1}$  pour les bactéries mesurées dans le panache. La diminution du taux de croissance des bactéries entre les eaux du rejet et celles de la Seine dans

le panache, alors que les bactéries présentes dans le panache sont principalement issues du rejet n'est pas bien comprise aujourd'hui. Ce point mérite des travaux futurs.

Nos résultats confirment néanmoins les observations effectuées préalablement en aval de la station d'Achères : la majeure partie de l'activité hétérotrophe dans les masses d'eau contaminées est due à un apport de bactéries allochtones de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , de plus ces bactéries allochtones ont des activités spécifiques bien supérieures aux bactéries autochtones. Cette confirmation est un premier pas pour la validation de la théorie sur les bactéries de tailles inférieures et supérieures à 1  $\mu\text{m}$ . Néanmoins, deux points restent à approfondir : l'origine de l'excès de carbone dégradable dans les masses d'eau et l'explication de la diminution relative de l'activité des bactéries allochtones après rejet.

### **Action des RUTP sur l'activité photosynthétique du phytoplancton**

Dans un écosystème aquatique, comme nous l'avons rappelé en introduction, la photosynthèse contrebalance l'activité hétérotrophe. La question principale que nous cherchons à résoudre est l'effet inhibiteur des micro polluants contenus dans les rejets sur la production primaire du phytoplancton. Une éventuelle inhibition de la photosynthèse par un excédent de MES sera déjà pris en compte par le modèle ProSe, pour autant qu'il reste des particules dans l'eau.

L'évaluation de relations dose-effet oblige à éliminer certaines variables en travaillant au laboratoire. Pour s'approcher le plus possible de la situation réelle, nous avons choisi de travailler sur une population phytoplanctonique complexe de la Seine et non pas sur une seule espèce. Comme l'effet du déversement se fait ressentir principalement durant le premier jour après la pluie, l'effet à mesurer était la production primaire plutôt que la croissance. Les avantages de mesurer la production sont multiples : d'abord on mesure l'effet direct de toxiques sur le bilan d'oxygène, l'élément clef de notre problématique, d'autre part, les mesures de la productivité sont une méthode courante et bien documentée. L'originalité de notre approche était l'application de cette méthode sous la forme de mesure directe de type DBO aux estimations de la toxicité. La technique d'incorporation de  $^{14}\text{C}$  est fréquemment appliquée mais elle est plus coûteuse, donne des résultats de même précision, et évalue la production primaire et non la photosynthèse.

La méthode a été validée avec des tests effectués en présence d'un seul métal toxique. Nous avons choisi des métaux présents majoritairement dans les eaux déversées par temps de pluie et présentant des risques potentiels : le zinc, le cuivre et le plomb. Ces métaux nous servent comme référence pour comparer notre technique aux résultats relevés dans la bibliographie et peuvent aider à évaluer la toxicité des rejets. Le zinc est le métal le plus abondant dans les rejets, soluble et répertorié comme phytotoxique. Le cuivre, potentiellement très toxique et le plomb sont présents en concentration élevée dans les rejets de Clichy tandis que le cadmium plus toxique que le zinc n'a pas été détecté en concentration importante (Paffoni, 1994, Estebe, in press). Le nickel possède une phytotoxicité comparable au zinc bien plus élevée que le chrome (Moore et al 1984). Par leurs utilisations ils sont moins présents dans les eaux usées que le zinc et ne présentent pas de risques potentiels (Lester 1987). Le choix des métaux de

référence Zn, Cu et Pb a été ainsi guidé par a) la présence des quantités potentiellement phytotoxique dans les rejets b) leur toxicité.

Les teneurs de métaux dans la Seine aussi bien en amont qu'en aval peuvent être de 10 à 100 plus élevées que dans un milieu aquatique non perturbé. Pour éliminer l'effet d'adaptation des espèces planctoniques à de fortes teneurs en métaux, une brève période de croissance (<2 jours) en présence d'un complexant métallique a été appliquée. La culture ainsi obtenue a été utilisée directement pour les tests nécessitant la présence d'EDTA ou filtrée et resuspendue dans de l'eau d'Evian pour les tests avec différents facteurs de mélange d'eau de Seine et d'eau de Clichy. L'eau d'Evian est exempte de pollution, d'une qualité constante avec des caractéristiques ioniques proches de celles de la Seine.

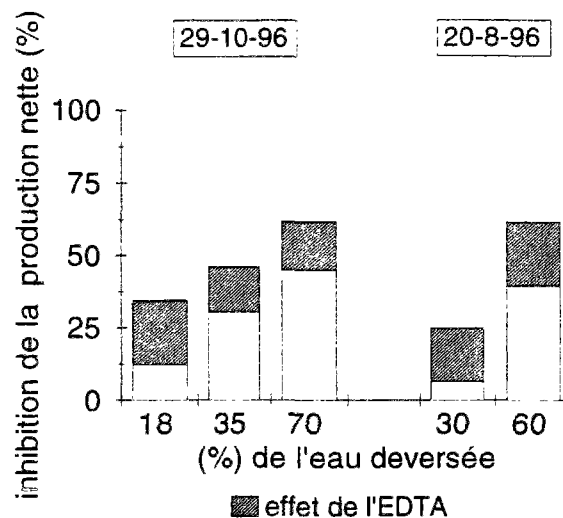
L'ajout d'un complexant non toxique comme l'EDTA est régulièrement pratiqué pour les tests de phytotoxicité, cette technique permet de maintenir les concentrations des métaux libres à un niveau stable. La présence d'une quantité importante (5  $\mu\text{M}$ ) d'un complexant puissant tel que l'EDTA, et la connaissance des constantes d'équilibre et la composition du milieu permettent d'estimer la concentration de l'ion libre pour les métaux utilisés. Dans le cas d'un milieu tel que l'eau de Seine, seules les concentrations des principaux cations et anions sont connues. L'EDTA étant le ligand le plus fort va déterminer principalement la distribution du métal, les autres ligands tels que les carbonates, les chlorures ou les hydroxydes n'interviennent que partiellement. La variation naturelle des concentrations de ces ligands dans de l'eau prélevée ne modifie pas significativement la spéciation. Cependant divers facteurs peuvent influencer le résultat final : la présence de ligands inconnus avec des constantes de complexation non négligeable, et la présence d'autres métaux comme par exemple le chrome ou le nickel. Les résultats des calculs sont présentés comme des estimations, faites sous des conditions identiques pour tous les métaux de référence. Les essais avaient une durée relativement courte (<6h) sous des conditions sensiblement constantes ( $dC(\text{O}_2)$ , pH, température) pour atténuer une évolution éventuelle de précipitation ou de complexation. Malgré ces inconvénients, les calculs de spéciation métallique restent une des seules façons d'estimer des concentrations extrêmement faibles, indetectables par les méthodes actuelles et souvent adoptés pour les essais de toxicité (Campbell, 1995, Errecalde et al., 1997, Wolterbeek et al., 1995). Différents modèles numériques peuvent être utilisés, ils donnent des résultats comparables. Le modèle utilisé ici est Mineql+ (Schecher et Mc Avoy, 1992).

Les suspensions d'algues étaient mélangées avec des concentrations différentes de toxiques tout en maintenant la densité algale constante. Des incubations d'environ 6 heures à l'obscurité et à la lumière ont permis de déterminer la production et la respiration phytoplanktonique. La bouteille incubée au noir donne la respiration, celle qui été incubée à la lumière donne la production nette d'oxygène. La photosynthèse est obtenue par différence entre les deux. Les résultats sont toujours exprimés en référence à un blanc réalisé avec la même culture de départ et dans les mêmes conditions. Le test de l'effet de cuivre, par exemple, confirme que la photosynthèse est plus sensible que la respiration.

Que l'action toxique soit principalement le fait des ions libres, non liés aux divers ligands et non le fait du métal total est démontré à nouveau par les ajouts de plomb. En effet, une

augmentation du plomb total ne résulte pas dans un effet toxique plus élevé, car les concentrations du plomb libre restent limitées suite à la précipitation de carbonate de plomb. Nous exprimons les résultats en CE50, soit la concentration pour laquelle une diminution de 50% de la photosynthèse est obtenue. Les valeurs de CE50 (ion libre) obtenues dans nos tests étaient de  $3.6 \cdot 10^{-10}$  M pour le cuivre,  $5.2 \cdot 10^6$  M pour le zinc et  $4.1 \cdot 10^6$  pour le plomb, elles sont en bon accord avec les valeurs publiées dans la littérature et ont ainsi validé la méthode utilisée.

Plusieurs tests effectués avec les eaux des déversements du 20 août et 28 octobre 1996 ont montré une différence nette entre les deux événements. Malgré la valeur identique des CE50, l'action toxique est très différente. À une dilution de 20%, régulièrement observée en étiage après les événements orageux, le déversement du 20 août ne donne qu'une inhibition de 10% tandis que l'autre déversement monte jusqu'à 30%. La composition des déversements de Clichy (Paffoni, 1994) montre une très grande hétérogénéité ce qui explique les différences observées ici. On notera que des essais effectués avec des eaux de Clichy centrifugées pour enlever le matériel décantable seulement et non pas toutes les particules ont donné des inhibitions beaucoup plus fortes. L'absorption de lumière par les fines particules demeurées en suspension ne permettait pas d'expliquer cet effet. Ce résultat indique donc qu'une partie significative de la toxicité du rejet est due à des produits adsorbés sur des particules non décantables.

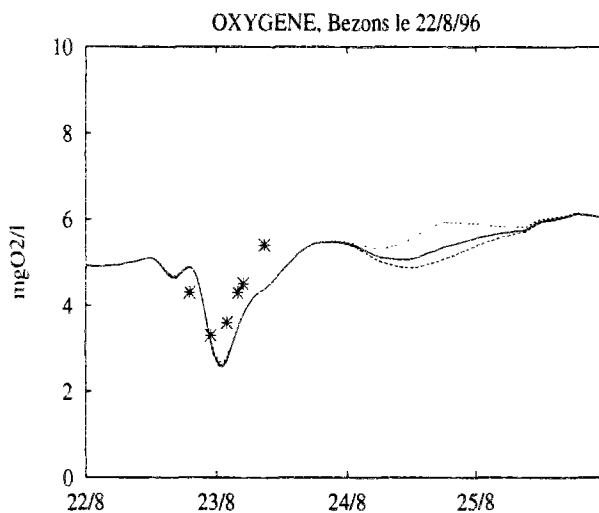


**Figure 6 :** Effet de l'action complexante de l'EDTA sur la toxicité des eaux filtrées de RUTP

Pour justifier l'hypothèse de la toxicité des métaux lourds, des tests de toxicité de l'eau déversée en présence et en absence d'EDTA ont été conduits. La quantité d'EDTA ajoutée ( $5 \mu\text{M}$ ) est théoriquement capable de fixer tous les métaux toxiques potentiellement présents. La fraction dissoute ( $<0.2 \mu\text{m}$ ) testée ne contenait que quelques  $\mu\text{M}$  de zinc, moins d'un  $\mu\text{M}$  de cuivre et moins d'un centième de  $\mu\text{M}$  du plomb. La diminution nette de la toxicité suite à la complexation des métaux, montre qu'une partie non négligeable de la toxicité des effluents est bien due aux métaux lourds : la valeur de la dilution CE50 peut presque doubler de 0.4 à 0.8 avec ou sans EDTA (figure 6). Les teneurs entre 1 et  $4 \mu\text{M}$  de zinc dans la phase dissoute

du rejet utilisé peuvent expliquer partiellement cette diminution. Cependant les effets de synergie ou antagonisme en présence de multiples toxiques et l'accentuation de l'effet des petits ligands organiques de type citrate (Errecalde et al., 1997) rendent impossible l'évaluation de la contribution directe de tel ou tel toxique dans le cocktail que constituent l'eau déversée par les rejets urbains de temps de pluie.

Ces résultats montrent qu'une population mixte de phytoplancton, en phase de croissance exponentielle adaptée aux faibles concentrations de métaux, peut subir un effet substantiel des eaux usées rejetées par temps de pluie à Clichy. Cependant l'effet inhibiteur in situ peut être modifié par l'état physiologique du phytoplancton, ou les conditions climatiques comme la température ou l'ensoleillement. En ajoutant un terme d'inhibition de photosynthèse au modèle ProSe, nous avons pu quantifier les conséquences de l'effet toxique sur les teneurs en oxygène dissous. Ces simulations avec ProSe ont été réalisées en modifiant également le terme de chute des grosses bactéries. En effet, nous avons mesuré que la majorité des bactéries filtrables à  $1 \mu\text{m}$  l'étaient aussi à  $5 \mu\text{m}$ , ce qui prouve qu'elles sont en fait fixées sur des particules. Nous avons donc adopté pour les grosses bactéries allochtones vitesses de chute médianes préalablement mesurées pour les MES de Seine (Tangerino, 1994), soit  $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ . L'application du modèle a permis de montrer que l'effet toxique était en fait assez lent à se développer. En effet, pour des teneurs en chlorophylle-a courantes en Seine de l'ordre de  $30$  à  $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , l'excédent de déficit en oxygène est très faible dans la masse d'eau directement polluée par le rejet de Clichy une journée après le rejet.



**Figure 7** : Effet d'un impact toxique tel que modélisé avec ProSe. Les conditions du rejet sont celles du déversement du 22 août 1996.

Par contre, on note des effets significatifs pour les masses d'eau suivantes (environ  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  d'oxygène en moins en tenant compte de l'effet toxique), polluées par des RUTP plus amont, pour lesquelles le temps de transit a été suffisant (figure 7). L'analyse des courbes simulées de chlorophylle montre que le mécanisme est en fait double, la diminution de photosynthèse effet toxique inhibe la production primaire, ce qui a pour effet d'affaiblir ultérieurement la photosynthèse en dehors de tout effet toxique.

## Références

- Billen G., Dégardin P., Even S. et Thomas W., 1995. Intercomparaison des modèles KALITO, MONET et PROSE. *Rapport PIREN Seine Paris. AESN Nanterre* 168p.
- Campbell P.G.C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-ion Activity Model. *IN Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R. Wiley & Sons, New York, ): 45-102
- Chebbo G. (1992) Solides des rejets pluviaux urbains, caractérisation et traitabilité. *Thèse de doctorat, ENPC Paris* 600p
- Chebbo G. et Bachoc A., 1992. Characterization of suspended solids in urban wet weather discharges. *Water Science and Technology*, **25**:171-179
- Chebbo G., Mouchel J.M., Saget A., Gousailles M., 1995 La pollution des rejets urbains par temps de pluie : flux, nature et impacts. *TSM* **90**(11):796-806
- Edeline F., 1981. Model of the river Sambre, Belgium. *IN: Models for Water Quality Management* (Biswas A.K. ed. Mc Graw Hill): 128-157.
- Estebe A., J.M.Mouchel and D.Thevenot (1997) Urban runoff impacts on particulate metal concentration in river Seine. *Accepted Water Air Soil Pol.*
- Even S. (1995) Modélisation d'un écosystème fluvial: la Seine. Le modèle ProSe. *Thèse de doctorat, Ecole de Mines Paris* 300p
- Garnier J., Billen P. and Coste M., (1995) Seasonal succession of diatoms and chlorophyceae in the drainage network of the river Seine : Observation and modelling. *Limnology and Oceanography*, **40**:750-765.
- Garnier J., Billen G. et Servais P., 1992a. Physiological characteristics and ecological role of small and large sized bacteria in a polluted river (Seine river). *Achiv. Hydrobiol.Beih.* **37**:83-94.
- Garnier J., Servais P. et Billen G., 1992b. Bacterioplankton in the Seine river (France) : impact of the parisian urban effluent. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**:56-64.
- Gromiec M.J., Loucks D.P. et Orlob G.T., 1983. Stream quality modelling. *IN:Mathematical modelling of water quality : streams, lakes and reservoirs.* (G.T. Orlob ed. IASA-Wiley):176-226
- Lester, J.N., Editor (1987) Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes - volume 1: Source, Analysis and legislation. *CRC Press Florida* 183p.
- Moore J.W. & S.Ramamoorthy (1983) Heavy metals in natural waters. *Springer Verlag N.York* 268p.
- Mouchel J.M., Simon L. et Maldiney M.A., 1994. Impacts en Seine des rejets urbains de temps de pluie sur les concentrations d'oxygène dissous. *La Houille Blanche* **1/2**: 135-141.
- Paffoni C. (1984) Caractérisation des eaux déversées par temps de pluie à l'usine de Clichy *La Houille Blanche* **1/2**:33-38
- Schecher W.D. et Mac Avoy D.C., 1992. MINEQL+ : a software environment for chemical equilibria modeling. *Comput., Environ. Urban Systems* **16**:65-76
- Seidl M., Servais P., Anzil A. et Mouchel J.M., 1996. Dégradation des matières organiques dans le milieu naturel après les rejets urbains : étude et quantification des processus.*Rapport Agence de l'Eau Rhin-Meuse programme Inter-Agences* 120p.
- Servais P. et Garnier J., 1993. Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microbial Ecology*, **29**: 115-128.
- Servais P., Anzil A. et Ventresque C., 1989. Simple method for the determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**:2732-3734.
- Stehfest H., (1977) Mathematical modeling of self-purification in rivers. *Professional Paper PP-77-11. IASA. Laxenburg.*
- Suarez J., Ascarbe A., Colominas I., Liano A., Sainz J.A., Temprano J. et Tejero I., 1996. Dynamic simulation of water quality in rivers. WASP5 application to the river Nalon (Spain). *Proceedings of the 7th ICUSD Hannover, Germany*: 1371-1376.

## **5. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES**





## Bilans.

Nous avons au cours de ce travail caractérisé par des mesures globales la dégradabilité des matières organiques transportées en réseau par temps de pluie en comparaison au temps sec. Ces résultats ont permis de mettre en évidence la très faible dégradabilité et la forte teneurs en matières minérales des matières ruissellées sur les chaussées mais également la contribution des dépôts en réseau, également moins dégradables. La biodégradabilité des matières en suspension dans un petit réseau diminue significativement avec l'intensité des pluies en raison d'un apport de carbone faiblement dégradable par les eaux de ruissellement et les dépôts en réseau. La plupart des pluies interceptées ont donné lieu au phénomène de "first flush" dans les collecteurs de faible pente, suite à la resuspension des dépôts de temps sec. L'amplitude des fluctuations des paramètres de qualité diminue avec l'augmentation du temps de séjour dans le réseau, suite au décalage temporel entre les flux provenant des divers sous-bassins. Cette évolution a été perçue aussi bien dans le cycle journalier en temps sec, que dans la propagation du ruissellement par temps de pluie. La position de déversoir dans le réseau va ainsi jouer sur le flux polluant rejeté par temps de pluie.

La biomasse représentant quelques pour cents de la matière organique, ne montrait pas de fortes différences pas temps sec et par temps de pluie ni dans un petit, ni dans un grand bassin versant unitaire, mais des évolutions notables ont été observées d'amont en aval, et en fonction de la saison. Ceci démontre que la biomasse déversée, qui joue un rôle important dans les déficits en rivière, n'est pas un composant des eaux usées, mais se développe dans les réseaux. Ce fait laisse présager que des techniques de curage des biofilms en réseau pourraient limiter l'impact des rejets.

En Seine, nous avons pour confirmer que les idées mises en avant à la suite de l'étude du devenir des effluents de la station d'Achères restaient en grande partie valides en ce qui concerne les RUTP, à savoir l'apport massif de grosses bactéries à fort taux de croissance par les rejets et leur disparition plus rapide que celle des bactéries autochtones, essentiellement par sédimentation dans le cas de RUTP. La forte sédimentation nous pousse également à conclure que le COP ne joue qu'un rôle mineur dans les désoxygénations.

Les masses d'eau polluées issues par temps de pluie du principal déversoir de la région parisienne ont pu être suivies in situ à l'aide de la conductivité et de la teneur en oxygène. La conductivité et l'ammonium, contrairement au COD et à la biomasse, apparaissent comme conservatifs. L'impact principal des RUTP unitaires, le déficit d'oxygène n'est en fait pas lié à la quantité des MES rejetés mais à l'apport de COD, qui sera le substrat principal des bactéries hétérotrophes. La quantité de CODB rejetée correspond bien au déficit d'oxygène mesuré 20 km en aval du rejet. Cependant l'augmentation des concentrations de COD mesurées en ce point indique un apport de carbone supplémentaire, provenant en partie du COP rejeté, mais aussi probablement du phytoplancton. L'apport de carbone par le phytoplancton peut être dû à la diminution de l'ensoleillement, mais aussi aux effets phytotoxiques des rejets.

Enfin, nous avons abordé un phénomène fort peu étudié dans le domaine des RUTP, à savoir leur toxicité pour le phytoplancton. Les rejets urbains de temps de pluie apportent au milieu une quantité extrêmement importante de micro polluants, suffisante pour affaiblir l'activité photosynthétique et diminuer les concentrations d'oxygène dissous en dehors de tout effet dû

à l'activité hétérotrophe. La toxicité de rejets est prouvée, même après une dilution au cinquième. Environ un quart de l'effet serait dû aux métaux lourds, notamment au zinc, et trois quarts aux micro-polluants organiques. Nous concluons que, contrairement au cuivre et au plomb, les concentrations en zinc présentes dans les rejets et en Seine après les déversements de temps de pluie, sont capables de diminuer la production primaire. Nous considérons cependant que la complexité des interactions entre les différents effets toxiques demande qu'une étude complémentaire soit entreprise. L'effet toxique serait comparable en ampleur à la réaération naturelle en Seine. Le modèle courant pour la toxicité des métaux est celui de l'ion libre, nous avons participé à des travaux qui montraient sa non-validité en présence de certains complexants.

Tous ces résultats ont pu être rassemblés dans le modèle ProSe pour simuler très raisonnablement l'impact du RUTP de Clichy, y compris les effets toxiques. Le travail sur RUTP a constitué ainsi un test important pour la validation plus générale des résultats obtenus précédemment à l'aval d'Achères. La modélisation par ProSe des rejets urbains par temps de pluie confirme que l'augmentation de la consommation hétérotrophe peut être équivalente à la diminution de photosynthèse due aux conditions météorologiques précédant le déversement. L'état physiologique du phytoplancton joue ainsi un rôle clef dans le bilan d'oxygène en situation d'étiage après les rejets urbains de temps de pluie en Seine. Les déversements sont susceptibles de diminuer la production primaire plus par leur action toxique que par l'augmentation de la turbidité. Un prétraitement de type décantation ne peut diminuer significativement le déficit in situ que par la rétention de la biomasse bactérienne et ne peut pas retenir les micro-polluants liés aux particules très fines, susceptibles de relargage des toxiques

Les résultats obtenus ont permis de mieux comprendre les processus de transformation des matières organiques apportées par les rejets urbains, et de quantifier leur relation à la désoxygénation. Plusieurs chemins ont été éclaircis, mais des nouveaux ont été découverts, proposant des suites.

## **Perspectives.**

Plusieurs grandes lignes de perspectives s'ouvrent à l'issue de ce travail :

- d'une part des perspectives scientifiques pour répondre à certaines des questions qui sont restées en suspens ou se développées au cours de ce travail,
- d'autre part des perspectives en matière de gestion. En effet nos résultats pourraient suggérer qu'une bonne gestion de la biomasse en réseau permettrait d'agir sur l'impact des RUTP, ce point mérite d'être approfondi, de même que la caractérisation de l'impact des réseaux séparatifs devrait être abordé maintenant,
- enfin, nous pensons que ces travaux devraient être poursuivis dans un milieu différent de la Seine, les questions de sédimentation, et la part des bactéries autochtones en particulier pouvant y être fort différents.

Des études complémentaires seront nécessaires notamment pour élucider les flux de carbone entre les différents compartiments in situ : bactéries, phytoplancton et MES abiotiques :

- Comment caractériser les différents substrats des bactéries du modèle HSB ?
- Comment se passe l'éventuel transfert de matière organique de la phase particulaire à la phase dissoute ? S'agit-il d'un phénomène physique (défloculation) ou biologique (lyse partielle des macromolécules particulaires) ?

En ce qui concerne les bactéries, l'importance des bactéries allochtones dans la consommation d'oxygène appelle des développements complémentaires:

- Si le processus de perte de ces bactéries est bien une sédimentation, que deviennent ces bactéries déposées ?
- La différence entre les bactéries de grande et de petite taille est elle morphologique ou fonctionnelle? Autrement dit quel est l'activité spécifique des petites bactéries du réseau ?
- Est ce qu'un traitement de RUTP éliminant ces bactéries est efficace ?

Enfin, en ce qui concerne le phytoplancton, nous pensons que l'action des facteurs défavorables au phytoplancton mérite une attention particulière.

- Comment réagit le phytoplancton en condition défavorable ? Le carbone organique dissous qui pourrait être produit à cette occasion, est-il spécifiquement lié à un processus de détoxification ou le manque de lumière peut-il l'expliquer ?

## **Remerciements.**

Je voudrais ajouter que les travaux de terrain aussi bien que les travaux de laboratoire ont été rendus possibles grâce au soutien personnel aussi bien que financier du SLAAP, des Agences de l'Eau Seine-Normandie et Rhin-Meuse, du SNS, du GMMA de l'Université libre de Bruxelles, de l'Institut de Biogéochimie Marine à Montrouge et évidemment du "consortium" CERGRENE-LABAM.



## **BIBLIOGRAPHIE** (*récapitulation*)



- AFNOR (1994). Recueil de normes françaises de l'eau. Méthode d'essai. Vol. 1, Agence Française de Normalisation (Paris).
- Allen H.E, R.H.Hall & T.D.Brisbin (1980) Metal speciation, effects on aquatic toxicity. *Env.Sci & Tech.* **14**(4):441-442
- APHA (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition. APHA, Washington. Clesceri L.S. Ed. 1000p.
- Azeez P.A. & K.Banerjee (1986) Effect of copper and cadmium on carbon assimilation and uptake of metals by algae *Tox. and Env.Chemistry* **12**:77-86
- Bachoc A. (1992) Le transfert des solides dans les réseaux d'assainissement unitaires. *Thèse de doctorat, INP Toulouse*, 281p.
- Barillier A., J.Garnier, P.Servais & G.Billen (1992) Apports et devenir de la matière organique dans la seine: Rôle des bactéries hétérotrophes. Rapport CNRS PIREN Seine I/92/01
- Barillier A. & Garnier J., (1993) Influence of temperature and substrate concentration on bacterial growth yield in Seine river water batch cultures. *App. Env. Microbiology* **59**:1678-1682
- Barillier A. (1992). Caractérisation et dynamique de la matière organique: cas d'autoépuration d'un milieu fluvial anthropisé, la Seine. Ph.D. Thesis 103 p. (Université of Paris VI).
- Bartlett L., Rabe F.W. & Funk W.H. (1974) Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Wat. Res.* **8**:179-185.
- Bates S.S., A.Tessier, P.C.G.Campbell & J.Buffle (1982) Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *scenedesmus subspicatus* (chlorophyceae) grown in semicontinuous culture *J.Phycol* **18**:521-529
- Bergsma J. & Konings W.N. (1983). The properties of citrate transport in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **134**:151-156.
- Billen G., P.Dégardin, S.Even & W.Thomas (1995) Intercomparaison des modèles Kalito, Monet et Prose. *Rapport PIREN Seine Paris, AESN Nanterre* 168p.
- Billen G. & J.Allardi (1993) Le fonctionnement de l'écosystème: analyses des processus et modélisation. *CNRS PIREN Seine rapport de synthèse 1989-1992 Vol.I Université ParisVI* 160p.
- Billen G. & Servais P. (1991). Modélisation des processus de dégradation de la matière organique en milieu aquatique. in "Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques", Masson pub., 219-245.
- Billen G., J. Garnier, M. Poulin, & P. Servais, (1993). Evaluation de l'impact sur la qualité de l'eau du traitement de l'azote et du phosphore dans les effluents urbains. In : La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion, E. Fustec & G. Marsily, ed, 319-347.



- Billen G, Servais P & A. Fontigny (1988) Growth and mortality in bacterial population dynamics of aquatic environments. *Arch.Hydrob.Beih* **31**:173-183
- Biswas A.K. Ed. (1981) Models for quality Management. *Mc Graw Hill, London* 150p.
- Boet P., Duvoux B., Allardi J. & Belliard J. (1994) Impact des orages estivaux sur le peuplement piscicole de la Seine à l'aval de l'agglomération parisienne. *La Houille Blanche* **1/2**:141-147.
- Borchardt D. & Statzner B. (1990) Ecological impact of urban stormwater runoff studied in experimental flumes : population loss by drift and availability of refugial space. *Aquatic Sciences* **52**:299-314.
- Borchardt D. (1993) A framework for the evaluation of ecological impacts of sewer overflows discharges in running waters. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Conference on Urban Storm Drainage, Niagara Falls, Vol 1*: 42-47
- Borgman U. & Ralph K.M. (1983) Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Wat. Res.* **17**: 1697-1703.
- Boudet F. (1877) Rapport à M. le Prefet de Police sur l'Altération des Eaux de la Seine par les Egouts Collecteurs d'Asnières et du Nord, mesures d'Assainissement. IN: Rapport Général sur les Travaux d'Hygiène Publique et de Salubrité de 1872 à 1877, première partie, chapitre 5.
- Bowie G.L., Mills W.B., Porcella D.B., Campbell C.L., Pagenkopf J.R., Rupp G.L., Johnson K.M., Chan P.W.H., Gherini S.A. & Chamberlin C.E. (1985) Rates, constants and kinetics formulations in surface water quality modeling. EPA Athens Georgia USA EPA/600/3-85/40 455pp.
- BPR-SOGREAH-HYDRATEC (1997). Etude d'assainissement en zone centrale d'Ile de France. Technical Report.
- Brouwers C. (1984) Les algues et la pollution par les métaux lourds. *Revue des questions scientifiques* **155**(3):301-323
- Campbell P.G.C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-ion Activity Model. *IN Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R. Wiley & Sons, New York, ): 45-102.
- Carlson C.E.A. & G.M.Morrison (1992) Fractionation and toxicity of metals in sewage sludge. *Env.Techn.* **13**:751-759
- Chebbo G. (1992) Solides des rejets ppluviaux urbains, caractérisation et traitabilité. *Thèse de doctorat, ENPC Paris* 600p.
- Chebbo G. and Bachoc A., (1992) Characterization of suspended solids in urban wet weather discharges. *Water Science and Technolohy*, **25**:171-179.

- Chebbo G., J.M.Mouchel, A.Saget & M.Gousailles (1995) La pollution des rejets urbains par temps de pluie: flux, nature et impacts. *TSM* **90**(11):796-806
- Chesterikoff B., B.Garban & D. Ollivon (1991). Daily rhythms in the river Seine: relative impacts of natural and anthropogenic factors. *Water.Res.* **25**:1523-1528
- Chevreuil M.,L.Granier, A.Chesterikoff & R.Letolle (1990) PCB partitioning in waters from river, filtration plant and wastewater plant: teh case for Paris (France) *Wat.res.* **24**(11):1325-1333
- Chiaudani G. & Vighi M. (1978) The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.*, **21**: 316-329.
- Chocat B., Cathelain M., Mares A.& Mouchel J.M. (1994)La pollution due aux rejets urbains par temps de pluie : impacts sur les milieux récepteurs. *La Houille Blanche*, **1/2**:97-105.
- Cooksey K.E. (1978) Respiratory assimilation of <sup>14</sup>C-labelled substrates by a microalga. In *Physiological and Biochemical Methods, Handbook of Phycological Methods* (Edited by Hellebust J.A. and Craigie J.S.), pp. 317-327. Cambridge University Press.
- Daly H.R., Campbell I.C. & Hart B.T. (1990) Copper toxicity to *Paratya australiensis*: I. Influence of nitritotriacetic acid and glycine. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**: 997-1005.
- Dauta A. (1982) Condition de developpement du phytoplacton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. 2. Rôle des nutriments. *Annales de Limnologie*, **18**:263-292.
- Davies J.M & P.B. Williams (1984) Verification of C14 derived primary organic production measurements using an enclosed ecosystem *Jour. of Plankton Research* **6**(3):457-474
- De Filippis L.F., R.Hamp & H.Ziegler (1981) The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena* *Arch.Microbiology* **128**:407-411
- DeCuyper K. & Loutz, S. (1992). Les caractéristiques des eaux usées domestiques. *Tribune Cebedeau*. **560** (6): 7-19
- Delbec M., Mouchel J.M. & Paffoni C. (1997). Statstical analysis of oxygen depletion after rain events in the urbanized river Seine. *In preparation*.
- Ellis, J.B. Ed. (1988) Urban sicharges and receiving waterquality impacts. Proceedongs of 14th IAWPRC Conference July 1988 Brighton UK Advance in Water Pol. Control
- Edeline F., 1981. Model of the river Sambre, Belgium. *IN: Models for Water Quality Management* (Biswas A.K. ed. Mc Graw Hill): 128-157
- Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA.  
NIST (1993) NIST Critical stability constants of metal complexes' data base (Edited by Martell A.E. and Smith R.M.). National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Database 46, Gaithersburg, MD.

- Errecalde O. M., Seidl & P.G.C. Campbell (1997) Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model *accepted Water Research May 1997*
- Estébe A., J.M. Mouchel & D. Thevenot (1997) Urban runoff impacts on particulate metal concentration in river Seine. *Accepted Water Air Soil Pol.*
- Estébe A. (1996) Impact de l'agglomération parisienne et de ses rejets de temps de pluie sur les concentrations en métaux des matières en suspension et des sédiments en Seine en période estivale. Thèse doctorat Université Paris XII, Val de Marne 400p.
- Even S., Billen G., Mouchel J.M. & Poulin M. (1996). Simulating the impact of CSO's from greater Paris on the river Seine using the model PROSE. *Proceedings of 7th IUCSD September 1996 Hannover* (I):581-586
- Even S. (1995) Modélisation d'un écosystème fluvial: la Seine. Le modèle ProSe. *Thèse de doctorat, Ecole de Mines Paris* 300p.
- Even S. Poulin M., Garnier, J., Servais, P., Chesterikoff, A. and Coste, M. (1997). River Seine ecosystem modelling Prose : a multipurpose software for complex river system *Hydrobiologia*, In press
- Even S. & Poulin, M. (1993). Le modèle Prose: hydrodynamique, transport et qualité de l'eau. In : *La Seine et son bassin : de la recherche à la gestion*, E. Fustec & G. de Marsily, ed, p 311-318.
- Fischer H.B., List E.J., R.C.Koh, J.Imberger & N.H.Brooks (1979) *Mixing in inland and coastal waters* academic press inc Orlando USA 490P.
- Florence T.M. & Stauber J.L. (1986) Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquat. Toxicol.* **11**: 26-32.
- Flores Rodriguez (1992) Les métaux toxiques dans les eaux pluviales en milieu urbain: caractéristiques physico-chimiques. *Thèse de doctorat Université Paris XII, Val de Marne* 500p.
- Flynn K.J. & I. Butler (1986). Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **34**: 281-304.
- Flynn K.J. & P.J. Syrett (1986). Characteristics of the uptake of L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.* **90**: 151-158.
- Ford T.E. editeur (1993) *Aquatic Microbiology, An ecological Approach* Blackwell Publ. Oxford 520p.
- Fraboulet S., R. Mulliss, J. Flores-Rodriguez, J.M. Mouchel, M. Revitt, E. Garnier-Zarli & D.R. Thévenot, (1993) The use of metal bioindicators to assess the impact of combined sewer overflows on the river Seine. *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban*

- Storm Drainage. Niagara Falls, Niagara Falls Canada. vol **II**:500-505.
- Frimmel et al (1989) Nta und EDTA in Fliessgewaessern der Bundesrepublik Deutschland  
*Vom Wasser* **72**:175-184
- Garnier J., G.Billen, P.Hanset & M. Coste (1992) Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine IN: CNRS Piren Seine rap. de Synthèse 1989-1992 vol I, LGA Universite Paris VI, 75252 Paris France
- Garnier J., Servais, P. & Billen, G., (1992). Dynamics of bacterio plankton in the river Seine (France): impact of Parisian effluents. *Can.J. Microbiol.*, **38** : 56-64. (Annexe 3.5)
- Garnier J., Servais P. & Billen G. (1992). Bacterioplankton in the Seine river (France) : impact of the parisian urban effluent. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**:56-64.
- Garnier J., Servais, P. & Billen, G. (1992 a). Dynamics of bacterioplankton in the river Seine (France): impact of parisian effluents. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**:56-64.
- Garnier J., Billen G. & Servais P. (1992) Physiological characteristics and ecological role of small and large size bacteria in a polluted river (Seine river France).  
*Arch.Hydrobiol.Beih* **37**:83-94
- Garnier J., Billen P. & Coste M., (1995) Seasonal succession of diatoms and chlorophycee in the drainage network of the river Seine : Observation and modelling. *Limnology and Oceanography*, **40**:750-765.
- Gromiec M.J., Loucks D.P. & Orlob G.T., (1983) Stream quality modelling. *IN:Mathematical modelling of water quality : streams, lakes and reservoirs*. (G.T. Orlob ed. IIASA-Wiley): 176-226
- Guy R.D. & Kean A.R. (1980) Algae as a chemical speciation monitor I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Wat. Res.* **14**: 891-899.
- Harremoes P. (1982) Immediate and delayed oxygen depletion in rivers. *Water Research*, **16**:1093-1098.
- Harremoes P. (1988) Overflow quantity, quality and receiving water impact. IN Ellis(1988):9-16
- Hart B.T, N.A.Currey & M.J.Jones (1992) Biogeochemistry and effects of copper, manganese and zinc added to enclosures in Island Billabong, Magela Creek, northern Australia  
*Hydrobiologia* **230**:93-134
- Hvitved-Jacobsen T.(1982)The impact of combined sewer overflows on the dissolved oxygen concentration of a river.*Water Research*, **16**:1099-1105.
- Huang V.W. (1994) Evolutions des métaux dissous dans la Seine. CNRS PIREN Seine  
Rapport 1993/III Bassins versants urbains

- Huebert D.B. & J.M.Shay (1992) The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca*. *Arch.Env.Contam.Toxicol.* **22**:313-318
- IPL (1996) Institut Pasteur Lyon, Département d'hygiène appliquée à l'homme et à son environnement. Analyses physico chimique des sources Evian (id 960130117)
- Karez S.C (1989) Les métaux et les algues Marines: Toxicité et accumulation du zinc et du cadmium chez *Crisophaera elongata* et *Acetabularia acetabulum* Thèse de doctorat en toxicologie fondamentale et appliquée Université Paris VII
- Kuwabara J.S. (1985) Phosphorus-zinc interactive effects on growth by *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyta). *Environ. Sci. Technol.* **19**: 417-421.
- Laegreid M., Alstad J., Klaveness D. & Seip H.M. (1983) Seasonal variation of cadmium toxicity toward the alga *Selenastrum capricornutum* Printz in two lakes with different humus content. *Environ. Sci. Technol.* **17**: 357-361.
- Lebreton L. (1996) Impact de la mise en suspension de sédiments urbains: évaluation expérimentale de la mobilité des métaux (Zn, Pb,Cu,Cd, Fe,Mn) *Thèse doctorat Université Paris XII, Val de Marne* 400p.
- Lesouef A. & A.Andre (1982) Mise au point d'un modèle de qualité de la Seine de Montereau à Poses. rapport SHF 15<sup>ème</sup> journées de l'Hydraulique Nantes
- Lester J.N., Editor (1987) Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes - volume 1: Source, Analysis and legislation. *CRC Press Florida* 183p.
- Litchfield J.T. & F.Wicoxon (1949) A simple method of evaluating dose effect experiments *Pharmacology and Experimental Therapy* 1949(**96**):99-113
- Loez C.R., M.L.Topalian & A.Salibian (1995) Effects of zinc to the structure and growth dynamics of a natural freshwater phytoplankton assemblage reared in the laboratory *Env.Poll* **88**:275-281
- Loucks D.P. (1981) Water Quality models for river systems. *IN:Biswas(1991)*:1-33
- Luoma S.N. (1995) Prediction of metal toxicity in nature from bioassay: limitations and research needs. *IN Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Ed.
- Magaud H., B.Migeon, P.Morifin, J.Garric 1 E. Vindimian (1997) Modelling fish mortality due to urban storm run-off: interacting effects of hypoxia and un-ionized ammonia *Wat.Res* **31(2)**:211-218
- Marchand M., J.C.Caprais, P.Pignet & V.Porot (1989) Organic pollutants in urban sewage and pollutant inputs to the marine anvironment. *Wat.Res.* **23(4)**:461-470
- Marino R.P., J.J.Gannon (1991) Survival of fecal coliforms and fecal streptococci in storm drain sediment. *Wat.Res.* **25(9)**:1089-1098

- Marsily G. & Fustec E. (1993). "La Seine en son Bassin, De la Recherche à la Gestion." Actes du colloque PIREN-Seine, CNRS. Paris, 29-30 mars 1993.
- Melon P., Bequevorts., Billen G. & Servais P. (1996) Kinetics of flagellate grazing in the presence of two types of bacterial prey. *Microb.ecol* **31**:89-101
- Metcalf & Eddy Inc. (1984) Wastewater engineering, Treatment, Disposal & Reuse TATA McGraw-Hill New Delhi 920p.
- Meybeck M. (1982) Carbon, Nitrogen and Phosphorus transport by world rivers. *American Journal of Science*, **282**:401-450
- Moore J.W. & S.Ramamoorthy (1983) Heavy metals in natural waters. *Springer Verlag New York* 268p.
- Morel F.M.M., Westall J.C., Rueter J.G. & Chaplick J.P. (1975) Description of the algal growth media "Aquil" and "Fraquil", Technical note No. 16, pp. 1-33, Water Quality Laboratory, Laboratory for Water Resources and Hydrodynamics, Department of Civil
- Morel F.M.M. & Hering J.G. (1993) *IN* Principles and Applications of Aquatic Chemistry, pp. 405-414. Wiley Inter-Science, New York, NY.
- Morinigo M.A., R.Cornax, M.A.Munoz, P.Romero & J.Borrego (1992) Relationships between salmonella spp and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Wat.Res.* **24**(1):117-120
- Morisson M.P, DM.Revitt & J.B.Ellis (1989) Metal speciation in separate storm water system USWQ conference September 1989 Wageningen
- Mouchel J.M., Simon L. & Maldiney M.A., 1994. Impacts en Seine des rejets urbains de temps de pluie sur les concentrations d'oxygène dissous. *La Houille Blanche*, **1/2**: 135-141.
- Mouchel J.M., Seidl M. & Servais P. (1997). Measurement of biodegradable wastewater during rain events by means of respirometry. *In preparation*.
- Niedrelehner B.R. & J.Cairns (1992) Community response to cumulative toxic impacts: Effects of acclimation on zinc tolerance of Aufwuchs *Can.J.Fish.Aquat.Sci* **46**:2155-2163
- NIST (1993) NIST Critical stability constants of metal complexes' data base (Edited by Martell A.E. and Smith R.M.). National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Database 46, Gaithersburg, MD.
- Norberg-King T.J. (1993) A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. National Effluent Toxicity Assessment Center, Tech. Rep. 03-93, pp. 1-29, U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN.
- NWRW (1989) Effecten van emissies op oppervlaktewater. *Hoofdrapport 9.1 VROM & STORA Den Haag, Nederland* 60p.

- NWRW (1991) Final report of the 1982-1989 NWRW research programme: conclusions and recommendations *Ministry of Housing, Physical Planning and environment (VROM) & STORA Den Haag, Netherlands* 30p.
- Nyholm N. (1985) Response variable in algal growth inhibition tests: Biomass or growth rate? *Wat. Res.* **19**: 273-279.
- O'Connor D.J. & Dobbins W.E. (1958). Mechanisms of reaeration in natural streams *ASCE Transactions*, **123**:641-666.
- Paffoni C. (1984) Caractérisation des eaux déversées par temps de pluie à l'usine de Clichy *La Houille Blanche* **1/2**:33-38
- Parsons T.R., Maita Y. & Lalli C.M. (1984) A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis, Pergamon Press, Oxford.
- Part P. & Wikmark G. (1984) The influence of some complexing agents (EDTA and citrate) on the uptake of cadmium in perfused rainbow trout gills. *Aquat. Toxicol.* **5**, 277-289.
- Payne J.A. & P.D. Hedges (1989) An evaluation of the impacts of discharges from surface water sewer outfalls. Proceedings of the 2nd Wageningen Conference on "Urban Storm Water Quality and Ecological Effects upon Receiving Waters".
- Peterson R. (1982) Influence of copper and zinc on growth of a freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda*: significance of chemical speciation *Env.Sci.Technology* **16**(8):443-447
- Phinney J.T. & Bruland K.W. (1994) Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom, *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 1781-1790.
- Pitter P. & Chuboda, J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC PRESS. 306p.
- Ponge F. (1989) Le parti pris des choses. *Gallimard poesie* 221p.
- Porter K.G. & Feig, Y.S. (1980). Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. & Oceanogr.* **25** : 943-948.
- Raunkjaer K., T.Hvitved-Jacobsen & P.H.Nielsen (1994) Measurements of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater *Wat.Res.* **28**(2):251-262
- Reynolds C.S. (1990) The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge 384p.
- Safege (1996) Etude des flux de pollution par temps de pluie sur un bassin versant test du département des Hauts-de-Seine. Safege Nanterre
- Saget A. (1994) Base de données sur la qualité des rejets urbains de temps de pluie: distribution de la pollution rejetée, dimensions des ouvrages d'interception. *Thèse de doctorat ENPC Paris*, 340p.

- Schecher W.D. & D.C. McAvoy (1992) MINEQL<sup>+</sup>: a Software Environment for Chemical Equilibrium Modeling. *Comput., Environ. Urban Systems* **16**:65-76
- Schenck R.C., Tessier A. & Campbell P.G.C. (1988) The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 538-550.
- Seager J. & R.G.Abrahams (1989) The impact of storm sewage discharges on the ecology of a small urban river. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Wageningen Conference on "Urban Storm Water Quality and Ecological Effects upon Receiving Waters".
- Sedlacek J., Källqvist T. & Gjessing E. (1983) Effect of aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum capricornutum* Printz. In Aquatic and Terrestrial Humic Materials (Edited by Christman R.F. and Gjessing E.), pp. 495-516. Ann. Arbor. Sci. Publ., Ann Arbor, MI.
- Seidl M., P.Servais, A. Anzil & J.M. Mouchel (1996) Dégradation des matières organiques dans le milieu naturel après les rejets urbains: étude et quantification des processus. *Rapport Agence de l'Eau Rhin-Meuse programme Inter-Agences* 120p.
- Seidl M., P.Servais, M.Martaud C.Gandouin & J.M.Mouchel (*accepted 1997*) Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events. *Water.Sci.Technology*
- Seidl M., P.Servais & J.M.Mouchel (1997) Organic matter transport and degradation in the river Seine (France) after combined sewer overflows submitted *submitted Water Research July 1997*
- Serkiz S.M., Allison J.D., Perdue E.M., Allen H.E. & Brown D.E. (1996) Correcting errors in the thermodynamic database for the equilibrium speciation model MINTQA2. *Wat. Res.* **30**: 1930-1933.
- Servais P., Seidl M. & Mouchel (1997) Comparison of parameters characterising organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather. *Submitted to Water Environment Research*.
- Servais P., Barillier A. & Garnier J., (1995) Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Annl. Limnol.* **31**:75-80
- Servais P. & Garnier J., (1993) Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microb. Ecol* **25**:19-23
- Servais P. (1989) Bacterio plankton biomass and production in the river Meuse (Belgium) *Hydrobiologia* **174**:99-110
- Servais P., (1990) Estimation de la production bactérienne en milieu marin par mesure du taux de synthèse protéique. *Oceanologica Acta*, **13**: 229-235. (Annexe 1.7)
- Servais P., (1995) Measurement of the incorporation rates of four amino-acids into proteins for estimating bacterial production. *Microbial Ecology*, **29**: 115-128.



- Servais, P., Garnier, J., Demarteau, N., Brion, N. & Billen, G. (1995). Caractérisation des apports de matière organique, nutriments et micro-organismes par les rejets d'eaux usées. PIREN-Seine Report (CNRS) Janvier 1995.
- Servais P., Barillier A. and Garnier J. (1995). Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon. *Annales de Limnologie* **31**(1): 75-80.
- Servais P. (1987) Etude de la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes en rivière: Développement d'une démarche méthodologique et application à la Meuse belge. *Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles*, 270p.
- Servais P., Anzil A. & Ventresque C., (1989) Simple method for the determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**:2732-3734.
- Servais P. & Garnier J. (1993). Contribution of Heterotrophic Bacterial Production to the Carbon Budget of the River Seine (France). *Microbial Ecology*, **25** : 19-33.
- Simkiss K. & Taylor M.L. (1995) Transport of metals across membranes. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Edited by Tessier A. and Turner D.R.), pp. 1-44. J. Wiley & Sons, New York, NY.
- Simon M. & Azam F., (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **51** : 201-213.
- Sogreah & Safege (1993) Etude de diagnostic du fonctionnement du réseau d'assainissement de Paris Marie de Paris, Direction de la protection de l'environnement section de l'assainissement de Paris
- Stehfest H., (1977) Mathematical modeling of self-purification in rivers. *Professional Paper PP-77-11. IIASA, Laxenburg.*
- Suarez J., Ascarbe A., Colominas I., Liano A., Sainz J.A., Temprano J. & Tejero I., (1996) Dynamic simulation of water quality in rivers. WASP5 application to the river Nalon (Spain). *Proceedings of the 7th International Conference on Urban Storm Drainage, Hannover, Germany*: 1371-1376
- Sunda W.G. (1988/89) Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.* **6**, 411-442.
- Tangerino C (1994) Mesure de vitesses de chute des matières en suspension, du carbone organique total et des bactéries en Seine. Rapp DEA Univ Paris XII, ENPC Cergrene
- Tessier A. & Turner D.R. eds (1995) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Wiley & Sons, New York, NY. 900p.
- Thomson P.A., & P.Couture (1993) Physiology of carbon assimilation in green alga during exposure to and recovery from cadmium *Ecotox. & env.safety* **26**:205-215

- Tubbing D.M.J, W.Admiraal & D van der Meent (1992) Complexes of copper in river inhibit bacterial metabolism. Presentation for 2nd european conf. on ecotoxicology SECOTOX Amsterdam May 1992.
- Van der Rest M.E., Molenaar D. & Konings W.N. (1992) Mechanism of Na<sup>+</sup>-dependent citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**: 4893-4898.
- Wallen D.G (1990) The toxicity of chromium to photosynthesis of the phytoplankton assemblage of lake Erie *Aquatic Botany* **38**:331-340
- Walsh G.E. (1988) Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**: 979-987.
- Williams P.B., R.C.T. Raine & J.R.Bryan (1979) Agreement between the C14 and oxygen methods of measuring phytoplankton production *Oceanol Acta* **2** (4):411-416
- Wolterbeek H.T., Viragh A., Sloof J.E., Bolier G., Van Der Veer B. & Kok J. (1995) On the uptake and release of zinc in the growing alga *Selenastrum capricornutum* Printz. *Environ. Pollut.* **88**: 85-90.
- Wong P.T.S. & Y.K.Chau (1990) Zinc toxicity to freshwater algae *Int. Journal of Toxicity Assessment* **5**:167-177
- Xue H., L.Sigg & F.G.Kari (1995) Speciation of EDTA in natural waters: Exchange kinetics of Fe-EDTA in river water. *En.Sci.Techn* 1995 (**29**):59-68