

MEDITERRANEAN ACTION PLAN
MED POL



UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME



FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

TOXICITY, PERSISTENCE AND BIOACCUMULATION OF SELECTED
SUBSTANCES TO MARINE ORGANISMS (ACTIVITY G)

TOXICITE, PERSISTANCE ET BIOACCUMULATION DES CERTAINES
SUBSTANCES VIS-A-VIS DES ORGANISMES MARINS (ACTIVITE G)

MAP Technical Reports Series No.24

MEDITERRANEAN ACTION PLAN
MED POL



UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME



FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

TOXICITY, PERSISTENCE AND BIOACCUMULATION OF SELECTED
SUBSTANCES TO MARINE ORGANISMS (ACTIVITY G)

TOXICITE, PERSISTANCE ET BIOACCUMULATION DES CERTAINES
SUBSTANCES VIS-A-VIS DES ORGANISMES MARINS (ACTIVITE G)

MAP Technical Reports Series No.24

This volume is the twenty-fourth issue of the Mediterranean Action Plan Technical Report Series.

This series contains selected reports resulting from the various activities performed within the framework of the components of the Mediterranean Action Plan: Pollution Monitoring and Research Programme (MED POL), Blue Plan, Priority Actions Programme, Specially Protected Areas and Regional Oil Combating Centre.

Ce volume constitue le vingt-quatrième numéro de la série des Rapports techniques du Plan d'action pour la Méditerranée.

Cette série comprend certains rapports élaborés au cours de diverses activités menées dans le cadre des composantes du Plan d'action pour la Méditerranée: Programme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL), Plan Bleu, Programme d'actions prioritaires, Aires spécialement protégées et Centre régional de lutte contre la pollution par les hydrocarbures.

INTRODUCTION

The United Nations Environment Programme (UNEP) convened an Intergovernmental Meeting on the Protection of the Mediterranean (Barcelona, 28 January - 4 February 1975), which was attended by representatives of 16 States bordering the Mediterranean Sea. The meeting discussed the various measures necessary for the prevention and control of pollution of the Mediterranean Sea, and concluded by adopting an Action Plan consisting of three substantive components:

- Integrated planning of the development and management of the resources of the Mediterranean Basin (management component);
- Co-ordinated programme for research, monitoring, exchange of information, assessment of the state of pollution and protection measures (assessment component);
- Framework convention and related protocols with their technical annexes for the protection of the Mediterranean environment (legal component).

All components of the Action Plan are inter-dependent and provide a framework for comprehensive action to promote both the protection and the continued development of the Mediterranean ecoregion. No component is an end in itself. The Action Plan is intended to assist the Mediterranean Governments in formulating their national policies related to the continuous development and protection of the Mediterranean area and to improve their ability to identify various options for alternative patterns of development and to make choices for appropriate allocations of resources.

MED POL - Phase I (1976-1980)

The Co-ordinated Mediterranean Research and Monitoring Programme (MED POL) was approved as the assessment (scientific/technical) component of the Action Plan.

The general objectives of its pilot phase (MED POL - Phase I), which evolved through a series of expert and intergovernmental meetings, were:

- to formulate and carry out a co-ordinated pollution monitoring and research programme taking into account the goals of the Mediterranean Action Plan and the capabilities of the Mediterranean research centres to participate in it;
- to assist national research centres in developing their capabilities to participate in the programme;
- to analyse the sources, amounts, levels, pathways, trends and effects of pollutants relevant to the Mediterranean Sea;
- to provide the scientific/technical information needed by the Governments of the Mediterranean States and the EEC for the negotiation and implementation of the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its related protocols.
- to build up consistent time-series of data on the sources, pathways, levels and effects of pollutants in the Mediterranean Sea and thus to contribute to the scientific knowledge of the Mediterranean Sea.

MED POL - Phase I initially consisted of seven pilot projects (MED POL I - VII), which were later expanded by additional six pilot projects (MED POL VIII - XIII), some of which remained in a conceptual stage only.

MED POL - Phase I was implemented in the period from 1975 to 1980. The large number of national research centres designated by their Governments to participate in MED POL (83 research centres from 15 Mediterranean States and the EEC), the diversity of the programme and its geographical coverage, the impressive number of Mediterranean scientists and technicians (about 200) and the number of co-operating agencies and supporting organizations involved in it, qualifies MED POL as certainly one of the largest and most complex co-operative scientific programmes with a specific and well-defined aim ever undertaken in the Mediterranean basin.

The overall co-ordination and guidance for MED POL - Phase I was provided by UNEP, acting as the secretariat of the Mediterranean Action Plan (MAP). Co-operating specialized United Nations Agencies (ECE, UNIDO, FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC) were responsible for the technical implementation and day-to-day co-ordination of the work of national research centres participating in the pilot projects.

MED POL - Phase II (1981-1990)

The Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States and First Meeting of the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution, and its related protocols (Geneva, 5-10 February 1979), having examined the status of MED POL - Phase I, recommended that during the 1979/80 biennium a Long-term pollution monitoring and research programme should be formulated.

Based on the recommendations made at various expert and intergovernmental meetings, a draft Long-term (1981-1990) Programme for Pollution Monitoring and Research in the Mediterranean (MED POL - Phase II) was formulated by the Secretariat of the Barcelona Convention (UNEP), in co-operation with the United Nations Agencies which were responsible for the technical implementation of MED POL - Phase I, and it was formally approved by the Second Meeting of the Contracting Parties of the Mediterranean Sea against pollution and its related protocols and Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States of the Action Plan held in Cannes, 2-7 March 1981.

The general long-term objectives of MED POL - Phase II were to further the goals of the Barcelona Convention by assisting the Parties to prevent, abate and combat pollution of the Mediterranean Sea Area and to protect and enhance the marine environment of the Area. The specific objectives were designed to provide, on a continuous basis, the Parties to the Barcelona Convention and its related protocols with:

- information required for the implementation of the Convention and the protocols;
- indicators and evaluation of the effectiveness of the pollution prevention measures taken under the Convention and the protocols;
- scientific information which may lead to eventual revisions and amendments of the relevant provisions of the Convention and the protocols and for the formulation of additional protocols;

- information which could be used in formulating environmentally sound national, bilateral and multilateral management decisions essential for the continuous socio-economic development of the Mediterranean region on a sustainable basis;
- periodic assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea.

The monitoring of, and research on, pollutants affecting the Mediterranean marine environment reflects primarily the immediate and long-term requirements of the Barcelona Convention and its protocols, but also takes into account factors needed for the understanding of the relationship between the socio-economic development of the region and the pollution of the Mediterranean Sea.

For this purpose, monitoring was organized on several levels:

- monitoring of sources of pollution providing information on the type and amount of pollutants released directly into the environment;
- monitoring of nearshore areas, including estuaries, under the direct influence of pollutants from identifiable primary (outfalls, discharge and coastal dumping points) or secondary (rivers) sources;
- monitoring of offshore areas (reference areas) providing information on the general trends in the level of pollution in the Mediterranean;
- monitoring of the transport of pollutants to the Mediterranean through the atmosphere, providing additional information on the pollution load reaching the Mediterranean Sea.

Research and study topics included initially in the MED POL - Phase II were:

- development of sampling and analytical techniques for monitoring the sources and levels of pollutants. Testing and harmonization of these methods at the Mediterranean scale and their formulation as reference methods. Priority will be given to the substance listed in the annexes of the Protocol for the prevention of pollution of the Mediterranean Sea by dumping from ship and aircraft and the Protocol for the protection of the Mediterranean Sea against pollution from land-based sources (activity A);
- development of reporting formats required according to the Dumping, Emergency and Land-Based Sources Protocols (activity B);
- formulation of the scientific rationale for the environmental quality criteria to be used in the development of emission standards, standards of use or guidelines for substances listed in annexes I and II of the Land-Based Sources Protocol in accordance with Articles 5, 6 and 7 of that Protocol (activity C);
- epidemiological studies related to the confirmation (or eventual revision) of the proposed environmental quality criteria (standards of use) for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (activity D);
- development of proposals for guidelines and criteria governing the application of the Land-Based Sources Protocol, as requested in Article 7 of that Protocol (activity E);

- research on oceanographic processes, with particular emphasis on surface circulation and vertical transport. Needed for the understanding of the distribution of pollutants through the Mediterranean and for the development of contingency plans for cases of emergency (activity F);
- research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances listed in annexes of the Land-Based Sources Protocol and the Dumping Protocol (activity G);
- research on eutrophication and concomitant plankton blooms. Needed to assess the feasibility of alleviating the consequences and damage from such recurring blooms (activity H);
- study of ecosystem modifications in areas influenced by pollutants, and in areas where ecosystem modifications are caused by large-scale coastal or inland engineering activity (activity I);
- effects of thermal discharges on marine and coastal ecosystems, including the study of associated effects (activity J);
- biogeochemical cycle of specific pollutants, particularly those relevant to human health (mercury, lead, survival of pathogens in the Mediterranean Sea, etc.) (activity K);
- study of pollutant-transfer processes (i) at river/sea and air/sea interface, (ii) by sedimentation and (iii) through the straits linking the Mediterranean with other seas (activity L);

As in MED POL - Phase I, the overall co-ordination and guidance for MED POL - Phase II is provided by UNEP as the secretariat of the Mediterranean Action Plan (MAP). Co-operating specialized United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC) are responsible for the technical implementation and day-to-day co-ordination of the work of national centres participating in monitoring and research.

The first eight volumes of the MAP Technical Reports Series present the collection of final reports of the Principal Investigators who participated in the relevant pilot projects (MED POL I - MED POL VIII). The ninth volume of the MAP Technical Reports Series is the final report on the implementation of MED POL - Phase I, prepared, primarily, on the basis of individual final reports of the principal investigators with the co-operation of relevant United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC).

The tenth volume of the MAP Technical Reports Series was the first one to include final reports on projects implemented within the framework of the research component of MED POL - Phase II. It specifically included final reports on projects dealing with toxicity (1983-85). This twenty-fourth volume of the Series is the second one to include final reports on projects dealing with toxicity, persistence and bioaccumulation (activity G).

INTRODUCTION

Le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) a convoqué une réunion intergouvernementale sur la protection de la Méditerranée (Barcelone, 28 janvier - 4 février 1975) à laquelle ont pris part des représentants de 16 Etats riverains de la mer Méditerranée. La réunion a examiné les diverses mesures nécessaires à la prévention et à la lutte antipollution en mer Méditerranée, et elle s'est conclue sur l'adoption d'un Plan d'action comportant trois éléments fondamentaux:

- Planification intégrée du développement et de la gestion des ressources du bassin méditerranéen (élément "gestion");
- Programme coordonné de surveillance continue, de recherche, d'échange de renseignements et d'évaluation de l'état de la pollution et des mesures de protection (élément "évaluation");
- Convention cadre et protocoles y relatifs avec leurs annexes techniques pour la protection du milieu méditerranéen (élément juridique).

Tous les éléments du Plan d'action étaient interdépendants et fournissaient le cadre d'une action d'ensemble en vue de promouvoir, tant la protection que le développement continue de l'écorégion méditerranéenne. Aucun élément ne constituait une fin à lui seul. Le Plan d'action était destiné à aider les gouvernements méditerranéens à formuler leurs politiques nationales en matière de développement continu et de protection de zone de la Méditerranée et à accroître leur faculté d'identifier les diverses options s'offrant pour les schémas de développement, d'arrêter leurs choix et d'y affecter les ressources appropriées.

MED POL - Phase I (1976 - 1980)

Le programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la Méditerranée (MED POL) a été approuvé au titre de l'élément "évaluation" (scientifique/technique) au Plan d'action.

Sa phase pilote (MED POL - Phase I) avait les objectifs généraux ci-dessous, élaborés au cours d'une série de réunions d'experts et de réunions intergouvernementales:

- formuler et exécuter un programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution en tenant compte des buts du Plan d'action pour la Méditerranée et de l'aptitude des centres de recherche méditerranéens à y participer;
- aider les centres de recherche nationaux à se rendre plus aptes à cette participation;
- étudier les sources, l'étendue, le degré, les parcours, les tendances et les effets des polluants affectant la mer Méditerranée;
- fournir l'information scientifique et technique nécessaire aux gouvernements des pays méditerranéens et à la Communauté économique européenne pour négocier et mettre en oeuvre la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et les protocoles y relatifs;

- constituer des séries chronologiques cohérentes de données sur les sources, les cheminements, les degrés et les effets des polluants de la mer Méditerranée et contribuer par là à la connaissance scientifique de cette mer.

La Phase I du MED POL comportait à l'origine sept projets pilotes (MED POL I - VII) auxquels sont venus ultérieurement s'ajouter six autres (MED POL VIII - XIII) dont certains n'en sont restés qu'au stade de la conception.

La Phase I du MED POL a été mise en oeuvre au cours de la période 1975 - 1980. Le grand nombre de centres de recherche nationaux désignés par leurs gouvernements pour participer au MED POL (83 centres de recherche de 15 Etats méditerranéens et de la CEE), la diversité du programme et sa couverture géographique, l'effectif impressionnant de scientifiques et techniciens méditerranéens (environ 200) ainsi que la quantité d'organismes coopérants et d'organisations d'appui qui y étaient engagés permettent sans conteste de caractériser le MED POL comme l'un des programmes de coopération scientifique les plus vastes et les plus complexes, comportant un objectif spécifique et bien défini, qui a jamais été entrepris dans le bassin méditerranéen.

La coordination et la direction générales de MED POL - Phase I ont été assurées par le PNUE, faisant fonction de secrétariat du Plan d'action pour la Méditerranée (PAM). Les organismes spécialisés coopérants des Nations Unies (CEE - Commission économique pour l'Europe, ONUDI, FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI) étaient chargés de l'exécution technique et de la coordination quotidienne des travaux des centres de recherche nationaux participant aux projets pilotes.

MED POL - Phase II (1981 - 1990)

La réunion intergouvernementale des Etats riverains de la Méditerranée chargés d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action et première réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs (Genève, 5-10 février 1979), ayant examiné la situation de la Phase I du MED POL, a recommandé que, durant la période biennale 1979 - 80, soit formulé un programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution.

Sur la base des recommandations énoncées lors des diverses réunions d'experts et réunions intergouvernementales, un projet de programme à long terme (1981 - 1990) de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL - Phase II) a été formulé par le secrétariat de la Convention de Barcelone (PNUE), en coopération avec les organismes des Nations Unies chargés de l'exécution technique de MED POL - Phase I, et il a été officiellement approuvé lors de la deuxième réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs et réunion intergouvernementale des Etats riverains de la mer Méditerranée chargée d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action, qui s'est tenue à Cannes du 2 au 7 mars 1981.

L'objectif général à long terme de la Phase II du MED POL était de concourir à la réalisation des objectifs de la Convention de Barcelone en aidant les Parties contractantes à prévenir, réduire et combattre la pollution dans la zone de la mer Méditerranée ainsi qu'à protéger et améliorer le milieu marin dans cette zone. Les objectifs particuliers étaient de fournir constamment aux Parties contractantes à la Convention de Barcelone et aux protocoles y relatifs:

- les renseignements dont elles avaient besoin pour appliquer la Convention et les protocoles;
- des indications et une évaluation de l'efficacité des mesures prises pour prévenir la pollution en application de la Convention et des protocoles;
- des renseignements scientifiques qui pourraient servir à réviser et modifier les dispositions pertinentes de la Convention et des protocoles et à rédiger des protocoles additionnels;
- des informations qui pourraient servir à formuler sur les plans national, bilatéral et multilatéral, les décisions de gestion, respectueuses de l'environnement, qui seraient indispensables à la poursuite du développement socio-économique de la région méditerranéenne;
- une évaluation périodique de l'état de pollution de la mer Méditerranée.

La surveillance continue des polluants affectant le milieu marin de la Méditerranée ainsi que la recherche menée à leur sujet répondent en premier lieu aux prescriptions immédiates et à long terme de la Convention de Barcelona et des protocoles y relatifs, mais elles tiennent également compte des facteurs requis pour la compréhension des relations existant entre le développement socio-économique de la région et la pollution de la mer Méditerranée.

A cette fin, la surveillance continue était organisée à plusieurs niveaux:

- surveillance continue des sources de pollution fournissant des renseignements sur la nature et la quantité des polluants directement libérés dans l'environnement;
- surveillance continue des zones situées à proximité du littoral, y compris les estuaires, et qui sont sous l'influence directe de polluants émis par des sources identifiables primaires (émissaires, rejets et sites côtiers d'immersion) ou secondaires (cours d'eau);
- surveillance continue des zones du large (zones de référence) fournissant des renseignements sur les tendances générales du niveau de pollution en Méditerranée;
- surveillance continue du transfert des polluants à la Méditerranée par voie atmosphérique, fournissant des renseignements supplémentaires sur la charge polluante qui atteint la Méditerranée.

Les sujets de recherche et d'étude inclus initialement dans MED POL - Phase II étaient les suivants:

- mise au point de techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance des sources et des niveaux de pollution. Essai et harmonisation de ces méthodes à l'échelle méditerranéenne, et formulation de méthodes de référence. Substances figurant sur les listes de priorité des protocoles sur les opérations d'immersion et sur la pollution d'origine tellurique (activité A);

- mise au point de la présentation type des rapports à soumettre en application des protocoles relatifs à l'immersion, à la pollution résultant de situations critiques et à la pollution d'origine tellurique, (activité B);
- élaboration des fondements scientifiques des critères de qualité de l'environnement qui serviront à définir des normes d'émission, des normes d'usage ou des directives concernant les substances énumérées dans les annexes I et II du protocole relatif à la pollution d'origine tellurique, conformément aux articles 5, 6 et 7 de ce protocole (activité C);
- études épidémiologiques relatives à la confirmation (ou révision éventuelle) des critères de la qualité de l'environnement (normes d'usage) proposés pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (activité D);
- mise au point de projets de directives et de critères régissant l'application du protocole relatif à la pollution d'origine tellurique, conformément à l'article 7 de ce protocole (activité E);
- recherches sur les processus océaniques, et particulièrement sur la circulation en surface et les déplacements verticaux. Cette information est nécessaire à la connaissance de la répartition des polluants en Méditerranée et à la mise au point de plans pour parer aux situations critiques (activité F);
- recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation et le caractère cancérigène et mutagène de certaines substances énumérées dans les annexes du protocole relatif à la pollution d'origine tellurique et du protocole relatif aux opérations d'immersion (activité G);
- recherches sur l'eutrophisation et les floraisons de plancton qui l'accompagnent. Cette information est nécessaire pour évaluer la possibilité de prévenir les effets et les dégâts causés par ces floraisons périodiques (activité H);
- étude des modifications de l'écosystème dans les zones soumises à l'influence des polluants et dans celles où ces modifications sont dues à d'importantes activités industrielles sur la côte ou à l'intérieur des terres (activité I);
- effets des pollutions thermiques sur les écosystèmes marins et côtiers, y compris l'étude des effets connexes (activité J);
- cycle biogéochimique de certains polluants intéressant particulièrement la santé (mercure, plomb, survie des organismes pathogènes dans la mer Méditerranée, etc.) (activité K);
- étude des processus de transfert des polluants (i) aux points de contact entre les cours d'eau et la mer et entre l'air et la mer, (ii) par sédimentation et (iii) à travers les détroits qui relient la Méditerranée aux mers voisines (activité L).

Comme lors de la Phase I du MED POL, la coordination et la direction générales de la Phase II étaient assurées par le PNUE, par l'intermédiaire du secrétariat du Plan d'action pour la Méditerranée (PAM). Les organismes spécialisés coopérants des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI) étaient chargés de l'exécution technique et de la coordination quotidienne des travaux des centres de recherche nationaux participant au programme de surveillance continue et de recherche.

Les huit premiers volumes de la Série des rapports techniques du PAM rassemblent les rapports finaux de chercheurs responsables qui ont participé aux projets pilotes correspondants (MED POL I - MED POL VIII). Le neuvième volume de cette même Série se compose du rapport final sur la mise en oeuvre de la Phase I du programme MED POL, établi essentiellement sur la base des rapports finaux individuels des chercheurs responsables avec la coopération des organismes compétents des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI).

Le dixième volume de la Série des rapports techniques du PAM, était le premier à comprendre les rapports finaux sur les projets mises en oeuvre dans le cadre de la composante "recherche" du MED POL - Phase II. Il comprenait spécifiquement les rapports finaux sur les projets traitant de la toxicité (1983-85). Ce vingt-quatrième volume de la Série est le seconde à comporter les rapports finaux consacrés à la toxicité, à la persistance et à la bioaccumulation (activité G).

CONTENTS/TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Etude de la toxicité de composés silicones en milieu marin par M. Aubert, C. Guillemait-Drai et J. Aubert	1
Population genetic structure of marine organisms as detectors and monitors of marine pollution by E. Nevo, B. Lavie and R. Ben-Shlomo	37
Toxicity of pollutants to marine organisms: Physiological and biochemical studies by Mirjana Ozretic	51
Physiological and biochemical response of marine organisms to PCB pollution in a wide range of environmental factors by L. Dalla Venezia	71
Toxicity and bioaccumulation of pollutants in marine organisms by Mirjana Ozretic	83
Bioaccumulation et tranfert d'alteragène au long d'un réseau trophique court par R.A. Kaim-Malka	99

ETUDE DE LA TOXICITE DE COMPOSES SILICONES EN MILIEU MARIN

par

M. AUBERT, C. GUILLEMAIT-DRAI et J. AUBERT

C.E.R.B.O.M.
Nice, France

1. INTRODUCTION

L'utilisation des produits organosiliconés est en pleine expansion tant dans les domaines industriel (isolant, revêtement, peintures, diélectriques, tubulaires) que médical (prothèses, produits dentaires, matériel chirurgical) et alimentaire (revêtement antiadhérent, antimousse, antifatulents). Pour les pays industriels producteurs de silicones, il se pose alors le problème de leur rejet dans les eaux et de leur conséquences environnementales. Les composés organosiliconés, par leur vaste champ d'application, ont été considérés comme potentiellement dangereux et classés, dans l'attente de la preuve scientifique de leur innocuité, dans une liste qui englobe les acides forts, les composés organohalogénés et certains métaux lourds (FAO/WHO, 1975).

Les silicones sont d'une utilisation si étendue, en particulier en ce qui concerne l'homme (additifs alimentaires, prothèses médicales internes, tubulaires micro-chirurgicales) que leurs effets nocifs ont souvent été étudiés (Hobbs et al., 1975). Les études de toxicité sont effectuées non seulement sur les mammifères (rats) mais aussi sur les organismes aquatiques marins ou dulçaquicoles (Firmin et al., 1984; Maggi et Alzieu, 1977; OMS, 1974). Ces travaux sur la biomasse marine concernent un milieu susceptible d'être contaminé accidentellement ou non (sinistres, fuite, rejet) et des organismes consommables par l'homme (Poissons, Mollusques, Crustacés). La plupart des niveaux d'organisation ont été étudiés du point de vue de la toxicité directe, aiguë, mais très peu d'études ont été réalisées pour évaluer le transfert d'une toxicité à travers les organismes-maillons des chaînes biologiques jusqu'au consommateur final (Aubert et al., 1985; Hobbs et al., 1975). De même, les réponses tissulaires et cellulaires ont rarement fait l'objet d'études détaillées.

C'est pourquoi, le Centre d'Etudes et de Recherches de Biologie et d'Océanographie Médicale (C.E.R.B.O.M.) a entrepris l'étude des effets de produits organosiliconés sur les organismes marins et sur les chaînes trophodynamiques marines. Les effets au niveau tissulaire seront étudiés sur les échelons les plus représentatifs du milieu marin grâce à des études histopathologiques.

2. METHODE GENERALE D'ETUDE DE LA TOXICITE

La présence de polluants dans le milieu marin introduits volontairement ou accidentellement peut avoir une action sur l'environnement biologique à différents niveaux:

- Perte en capital nutritionnel par toxicité directe;
- Risques sanitaires par toxicité enduite due au processus de concentration du polluant le long des chaînes biologiques;

- Enfin, dérive écologique du milieu par atteinte des médiateurs responsables de l'équilibre biologique et de la stabilité du milieu marin.

Les conditions qui règlent la présence des polluants dans les aliments sont des conditions d'apparition, de circulation, de concentration ou de disparition de ces polluants dans le milieu.

La concentration de polluant dans le milieu peut se faire à travers les chaînes biologiques car tout être vivant présente à divers degrés la propriété de pouvoir accumuler dans son organisme toute substance ayant un certain degré de rémanence. Il en résulte que les écosystèmes peuvent être le siège d'une amplification biologique de contamination.

La méthode des chaînes trophodynamiques permet de relier entre-eux les organismes sur le plan trophique et de mettre en évidence une distribution temporelle et spatiale des contaminants à travers les différents maillons (Aubert et al., 1969; Aubert, 1972; Aubert M. et J. Aubert, 1973; Aubert et al., 1975).

Ces systèmes écologiques simplifiés mais contrôlés constituent une méthode d'étude prévisionnelle des effets des polluants chimiques:

- par la détermination des perturbations au niveau d'organismes types représentant divers maillons parmi les plus caractéristiques des chaînes;
- par l'évaluation des phénomènes de concentration et de biodégradation des substances chimiques absorbées successivement par les divers maillons.

Les chaînes biologiques expérimentées au C.E.R.B.O.M. répondent à plusieurs critères importants:

- être représentatives des milieux côtiers ou d'estuaires méditerranéens;
- être produites ou récoltées en quantités suffisantes pour permettre la durée des expériences.

Quatre types de chaînes expérimentales ont été mis au point:

- une chaîne de type pélagique;
- une chaîne de type néritique à mollusques;
- une chaîne benthique à crustacés;
- une chaîne benthique à poissons.

Utilisation

2.1 Toxicité directe

En mettant en contact chacun des échelons de la chaîne envisagée avec le polluant à étudier, à différentes concentrations, on peut ainsi déterminer la sensibilité de chaque espèce à ce polluant et définir les seuils toxiques et les DL 50 (doses létales provoquant 50% de mortalité en 9 jours), (Aubert et al., 1969).

2.2 Toxicité induite

L'expérience consiste à alimenter chaque maillon à l'aide de l'échelon immédiatement inférieur préalablement intoxiqué, à la fois par l'eau et par l'aliment ingéré, comme cela se produit dans les conditions naturelles d'un milieu pollué; ceci à une concentration sublétales permettant le fonctionnement normal des chaînes.

Description des chaînes

2.2.1 Chaîne benthique à poissons

Cette chaîne comprend trois échelons:

- . Premier échelon : bactéries marines et plancton

Cet échelon est très important et intervient en fait au niveau de toutes les chaînes. Les bactéries jouent un rôle majeur dans le cycle de la matière et sont dans l'écosystème, à la base même de la chaîne alimentaire.

De nombreux organismes marins et surtout les suspension-feeders et les détritus-feeders sont capables de capturer un nombre considérable de bactéries dans un but alimentaire, certains étant même capables de vivre et de croître avec un régime alimentaire composé exclusivement de bactéries dont ils peuvent digérer au moins certaines espèces végétatives.

- . Deuxième échelon : Invertébrés (Annélides polychètes)

Ils sont très utilisés comme indicateurs de pollution aussi bien en milieu marin qu'en milieu dulçaquicole. Il est donc important d'introduire ces invertébrés comme échelon dans une chaîne biologique marine. Nous avons utilisé une espèce d'annélides polychètes Nereis diversicolor: c'est une annélide que l'on place dans la catégorie des "détritus-feeders" et souvent des "suspension-feeders".

- . Troisième échelon : poisson Scorpaena porcus (Rascasse brune)

Ces poissons que l'on trouve en abondance également au voisinage des côtes peuvent être élevés facilement en aquarium. Ils nécessitent cependant une alimentation variée, mais se nourrissent facilement avec les Nereis.

2.2.2 Chaîne benthique à crustacés

. Premier échelon : bactéries marines et plancton contenus naturellement dans l'eau de mer, de même que pour la chaîne à crustacés.

- . Deuxième échelon : Invertébrés (Annélides polychètes)

On a utilisé Nereis diversicolor comme pour la chaîne benthique à poissons.

- . Troisième échelon : crustacés Carcinus maenas

Ces crustacés vivant au voisinage des côtes peuvent être ramassés en grand nombre. Ils sont dotés d'une bonne régulation osmotique. Ces organismes peuvent être nourris facilement avec les Nereis.

2.2.3 Chaîne néritique à mollusques

Cette chaîne également définie et expérimentée comprend les échelons suivants:

- . Premier échelon : il est représenté par des organismes autotrophes.

Comme élément phytoplanctonique, il a été choisi une Prasinophycée: Tetraselmis suecica dont les courbes de croissance et les conditions d'élevage ont été étudiées durant plusieurs années.

Ce phytoplancton fréquemment rencontré sur nos côtes pendant la saison froide se cultive aisément en milieu de type Provasoli.

Ce milieu de culture est préparé à partir d'eau de mer naturelle, vieillie et stérilisée, qui reçoit un enrichissement stérile à la fois minéral et organique par l'adjonction de mélange ES Provasoli à 2%.

Les cultures sont effectuées en erlenmeyers de 500 ml dans une salle de culture dont la température est maintenue à $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et qui est munie d'un système d'éclairage à rythme nyctéméral.

Les expérimentations sont effectuées sur des souches non axéniques afin de se placer dans des conditions voisines de celles qui existent en mer.

- . Deuxième échelon : échelon consommateur du phytoplancton: Mytilus galloprovincialis.

Ce mollusque présente l'intérêt d'être un important filtrateur d'eau (environ 5 litres à l'heure) et de ce fait il est susceptible de consommer une grande quantité de phytoplancton et d'induire ainsi de considérables phénomènes de concentration.

2.2.4 Chaîne de type pélagique

Cette chaîne comprend trois échelons marins:

- . Premier échelon : échelon phytoplanctonique représenté par Tetraselmis sp.

- . Deuxième échelon : est un échelon zooplanctonique constitué par un crustacé d'élevage facile : Artemia salina (Branchiopode Anostracé).

Les oeufs d'Artemia salina sont introduits dans une ampoule à décanter contenant de l'eau de mer, une certaine agitation initiale est nécessaire pour dissocier les amas d'oeufs; seuls les oeufs décantant au fond du récipient sont utilisés dans la suite des expériences, les autres, plus légers que l'eau, sont morts et doivent être éliminés. Parmi les oeufs restant, le pourcentage d'éclosion est de 60% à 70% dans les conditions optimales d'élevage.

Dans les premiers stades de sa croissance, ce crustacé est alimenté par les nutritives présents dans le milieu STP de Provasoli, puis il se nourrit de micro-algues. Ces stades nécessitent une température de 25 à 30 °C. Les élevages peuvent ensuite être poursuivis dans la salle de culture.

. Troisième échelon : il est constitué par un labridé (Crenilabrus ocellatus) vivant dans les eaux côtières parmi les prairies sous-marines ou près des roches. Poisson à tendance planctonophage, le labre se satisfait de la nourriture à base d'Artemia et de Tetraselmis.

2.3 Biodégradation

Lors de son rejet en mer, un produit chimique peut être dégradé soit biologiquement (action principalement des bactéries marines), soit physiquement (action des rayons solaires). Cette action chimique fait apparaître des produits de dégradation dont les effets sur les organismes marins peuvent être très différents de ceux du composé chimique de base. On peut ainsi avoir une augmentation de la toxicité ou, au contraire, une diminution voire une disparition de celle-ci (Street, 1984).

Description des chaînes trophiques marines

Chaîne benthique à poissons	Chaîne benthique à crustacés	Chaîne à mollusques	Chaîne pélagique
Micro-organismes 48j. (Bactéries marines)	Micro-organismes 8j. (Bactéries marines)	Phytoplancton 8j. (<u>Tetraselmis sp.</u>)	Phytoplancton 8j. (<u>Tetraselmis sp.</u>)
↓	↓	↓	↓
Annélides 8j. (<u>Nereis diversicolor</u>)	Annélides 8j. (<u>Nereis diversicolor</u>)	Mollusques 15j. (<u>Mytilus gallo-provincialis</u>)	Zooplancton 8j. (<u>Artemia salina</u>)
↓	↓		↓
Poissons 15j. (<u>Scorpaena porcus</u>)	Crabes 15j. (<u>Carcinus meanas</u>)		Poissons 15j. (<u>Crenilabrus ocellatus</u>)

L'expérience consiste à laisser le produit en contact avec le milieu marin pendant un certain nombre d'heures ou de jours (24h, 72h, 144h) avant d'introduire les organismes à tester, les concentrations utilisées étant déterminées à partir des seuils toxiques. On peut voir ainsi si un temps plus ou moins prolongé de vieillissement en eau de mer a un effet sur la toxicité des deux copolymères.

2.4 Histopathologie

Afin de mieux cerner ou de mieux déterminer l'action des composés organosiliconés sur les organismes testés, une série d'analyses histopathologiques a été effectuée d'une part à l'Université de Paris VI (Pr. ORCEL) et d'autre part à l'Université de Perpignan (Mme BIAGIANTI). En effet, même si un produit semble peu toxique extérieurement, il peut induire une réponse interne, en particulier sur le foie, siège de la détoxification.

. Techniques histopathologies:

Les espèces étudiées sont celles qui se révèlent les plus sensibles à l'action des organosiliconés, c'est-à-dire les moules et les poissons.

Pour les moules, nous avons étudié les organes suivants: branchies, gonades, manteau. Les échantillons d'organes sont disséqués, lavés à l'eau distillée, déshydratés à l'éthanol, traités au butanol 1, puis inclus dans la paraffine. Des coupes de 7 um d'épaisseur ont été réalisées et colorées au rouge nucléaire solide picroindigocarmin (Coloration topographique).

Pour les poissons, les organes étudiés sont le foie, l'intestin, le muscle, les branchies et le revêtement cutané. Les échantillons traités et inclus dans la paraffine sont coupés à 5 um et colorés par la technique Hématoxyline-Eosine-Safran qui permet de colorer différemment les noyaux, le cytoplasme et les fibres de collagène.

3. PRODUITS UTILISES

Les produits organosiliconés employés pour les tests de toxicité font partie de la famille des copolymères de polysiloxane et de polyéther, ils sont utilisés pour fabriquer des produits moussants plus ou moins solides et résistants (fausses poutres, matelas, coussins).

a) Le produit codé "Silicone Copolymère MH 101" est composé de 85% de silicones actifs et de 15% d'éléments non actifs dont 50% d'éthylène glycole et 50% de poly-éthylène glycole.

Ses caractéristiques sont les suivantes:

- poids moléculaire.....3 300
- pH.....8
- viscosité.....140 cps
- densité.....1,03 g cm⁻³ (à 25 °C)
- point d'ébullition.....62 °C
- pourcentage de Silicium.....15 %

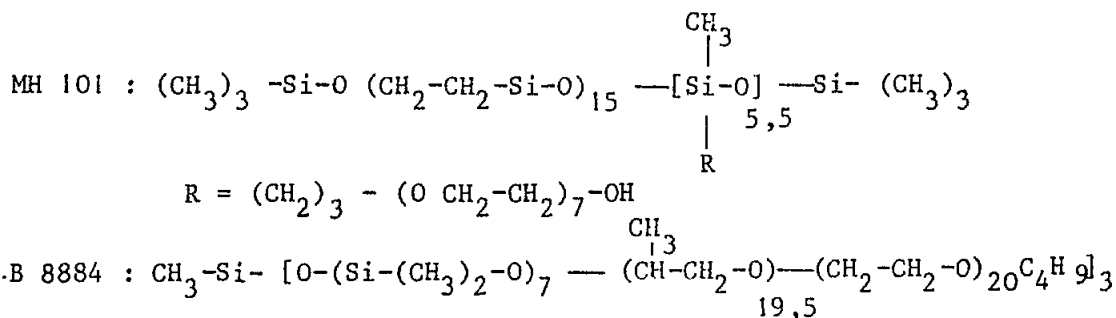
Ce produit est assez stable dans l'eau dans des conditions de température et de salinité normales.

b) Le produit codé "Polyéther Polysiloxane Copolymère B 8884" est un produit plus instable électro-chimiquement que le précédent, ce qui nécessite l'addition de 0,15 à 0,20% de ETA aminé.

Ses caractéristiques sont les suivantes:

- poids moléculaire.....7 850
- pH.....8,2
- viscosité.....1 220 m Pa.s (à 20 °C)
- densité.....1,03 g cm⁻³ (à 20 °C)
- point d'ébullition.....35,5 °C
- pourcentage de Silicium.....7,8 %

Les formules chimiques de ces produits sont les suivantes:



4. METHODE DE DOSAGE UTILISEE

Le silicone peut être extrait d'échantillons de tissus biologiques en utilisant un solvant spécifique (Méthyl 4 pentane 1). La quantité de silicone extraite est mesurée au spectrophotomètre à flamme à absorption atomique (Smith, 1976).

. Extraction:

3 g d'échantillon congelé à l'azote liquide sont broyés au mortier et réduits en poudre, puis transférés dans un tube où l'on ajoute 10 ml de solvant. Après une agitation de 2 heures, on laisse décanter 24 heures l'échantillon ainsi traité qui sera ensuite prêt à être dosé.

. Détermination:

Le spectrophotomètre est préparé avec une flamme à acide nitrique-acétylène, une longueur d'onde spécifique de 251,6 nm, et une cathode creuse spécifique. Une gamme étalon est préparée avec une solution standard DC 200, de 100 cs de viscosité. On dose le silicium dans la phase solvant, puis après correction par rapport au témoin, on évalue directement la teneur en silicone de l'échantillon.

En effectuant le rapport:

$$\frac{\text{concentration dans l'organisme (}\mu\text{l g}^{-1}\text{)}}{\text{concentration dans l'eau (}\mu\text{l g}^{-1}\text{)}}$$

on obtient le facteur de concentration de la substance par l'organisme.

5. RESULTATS

5.1 Paramètres physico-chimiques

Les deux produits organosiliconés ont une faible action sur le pH, la salinité et le taux d'oxygène dissous de l'eau de mer, même à des doses assez élevées comme 10 ml l⁻¹ (Tableaux I, II et III).

L'effet de ces deux composés sur la turbidité est marqué, l'opacité étant en raison croissante de la concentration (Tableau IV).

Ces produits étant utilisés comme substances moussantes il s'établit rapidement à la surface une large couche de mousse aérée qui provoque une diminution de la quantité de lumière et d'oxygène pouvant traverser la couche superficielle. Par leurs effets sur les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer vis-à-vis en particulier de la turbidité, les deux produits siliconés induisent des troubles comportementaux très nets tels que: engluement des cellules planctoniques, soubresauts nerveux des vers, difficultés de respiration des crabes et des poissons, perturbations du comportement alimentaire des poissons carnivores.

5.2 Recherches des seuils de toxicité directe

. Définition des seuils toxiques:

Pour le phytoplancton, le seuil de toxicité est la concentration de produits chimiques testés pour laquelle la culture est restée stationnaire, c'est-à-dire dont le développement est arrêté sans pour autant qu'apparaisse la destruction complète de la culture ou de l'élevage.

Tableau I

Effet des deux produits siliconés sur le pH de l'eau de mer en fonction de leur concentration.

	0 ul l ⁻¹	50 ul l ⁻¹	100 ul l ⁻¹	200 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	5000 ul l ⁻¹	10000 ul l ⁻¹
MH 101	8,00	7,95	8,00	8,05	8,10	7,95	8,15
B 8884	8,00	8,20	8,00	8,05	8,10	8,05	8,15

Tableau II

Effet des deux produits siliconés sur la salinité en fonction de leur concentration.

	0 ul l ⁻¹	50 ul l ⁻¹	100 ul l ⁻¹	200 ul l ⁻¹	500 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	5000 ul l ⁻¹	10000 ul l ⁻¹
MH 101	36,9	35,9	36,3	36,1	36,4	36,6	36,7	37,1
B 8884	36,9	36,1	36,2	36,1	36,1	36,2	36,1	35,0

Tableau III

Effet des deux produits siliconés sur l'oxygène dissous de
l'eau de mer en fonction de leur concentration.

MH 101									
	0	50	100	200	500	1000	2000	5000	10000
	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹	u.l l ⁻¹
To	90,9	89,3	90,4	90,4	89,3	89,3	88,3	88,3	88,3
To+1 h	92,4	91,4	91,4	90,4	90,4	90,4	90,4	91,4	90,4
To+4 h	88,8	85,2	84,1	85,2	85,2	85,2	85,2	85,2	83,1
B 8884									
To	90,9	92,5	91,4	88,3	90,4	90,4	90,4	90,4	88,3
To+1 h	92,4	92,5	91,4	89,3	91,4	91,4	91,4	90,4	88,3
To+4 h	88,8	92,5	91,4	89,3	91,4	91,4	91,4	90,4	88,3

To indique le moment qui suit la mise en eau du produit

Tableau IV

Effet de deux produits siliconés sur la turbidité de l'eau de mer (NTU) en fonction de leur concentration, au bout de 24 heures.

Doses (ul l ⁻¹)	MH 101	B 8884
0	0,3	0,3
50	0,8	1,2
66	1,3	1,5
100	1,4	2
200	1,3	1,9
500	1,3	1,5
1000	2,2	1,8
2000	2,3	2,1
4000	2,4	2,3
5000	2,5	2,3
10000	3	2,9
Brut	5,4	3,4

Pour le zooplancton, les annélides, les mollusques, les crustacés et les poissons, le seuil de toxicité correspond à la concentration pour laquelle il y a une survie de 50 % de l'élevage en 9 jours (soit la DL 50). De plus, dans chaque cas, nous recherchons le TL 50, c'est-à-dire le temps au bout duquel une concentration donnée induit une survie de 50 % de l'élevage.

5.2.1 Toxicité vis-à-vis du phytoplancton (*Tetraselmis suecica*)

A partir du produit initial, nous avons établi une gamme de dilutions successives: 66 ul l⁻¹, 100 ul l⁻¹, 200 ul l⁻¹, 1000 ul l⁻¹.

Pour chaque concentration, nous ensemençons séparément dans trois tubes à essai 1 ml d'inoculum d'une culture ancienne de phytoplancton pour 20 ml, de façon à avoir environ 10000 cellules par ml.

Ce milieu reçoit l'enrichissement ES Provasoli au taux de 2 % qui contient les nutrilites nécessaires au bon développement de ces espèces phytoplanctoniques. Trois tubes témoins sont également ensemencés séparément avec 1 ml de l'inoculum phytoplanctonique.

Les comptages des cellules phytoplanctoniques vivantes sont effectuées à la cellule de Nageotte, pendant 9 jours (Voir figures 1 et 2).

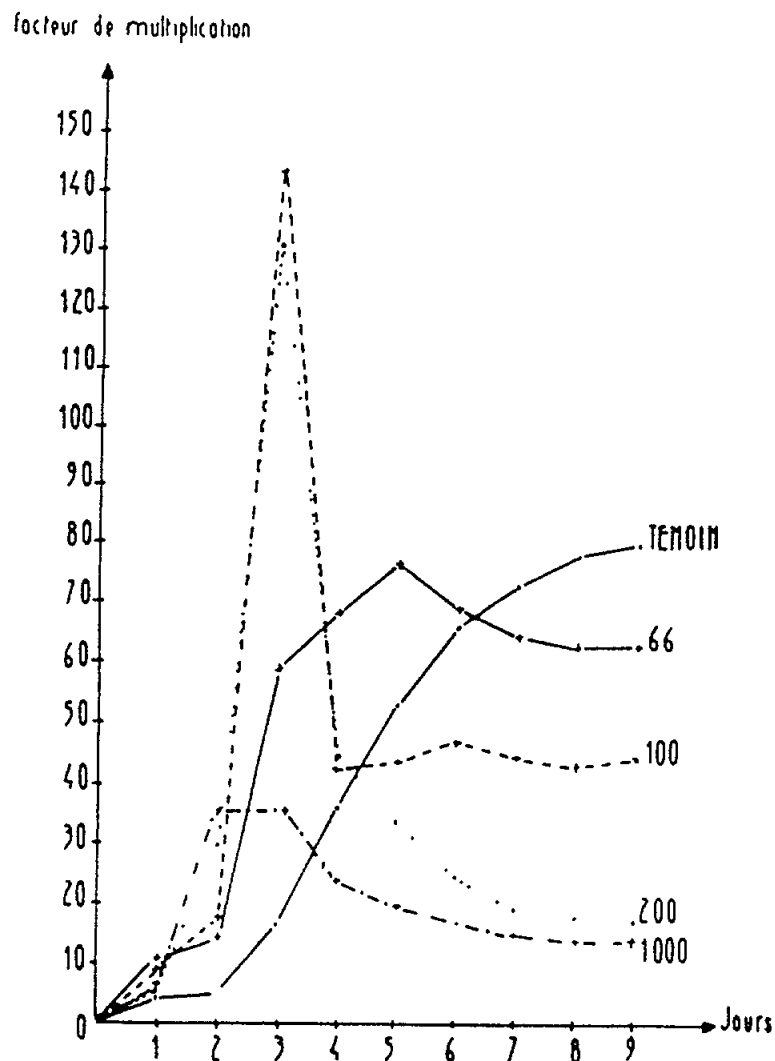


Fig. 1 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de *Tetraselmis suecica*

Les résultats sont consignés dans les tableaux ci-après.

Dilution (ul l ⁻¹)	Témoin 0	66 ul l ⁻¹	100 ul l ⁻¹	200 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	Seuil (ul l ⁻¹)
MH 101 TL 50 (heures)	> 216	192	168	144	144	50
B 8884 TL 50 (heures)	> 216	> 216	168	168	96	66

Pour deux concentrations types (l'une faible 66 ul l⁻¹ et l'autre très forte 1000 ul l⁻¹) nous avons dosé la concentration de silicones dans la culture de phytoplancton:

		Témoin	66 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹
MH 101	Concentration	0	37,73	65,37
	Facteur de concentration	0	0,57	0,066
B 8884	Concentration	0	45,27	70,39
	Facteur de concentration	0	0,69	0,070

* Au regard des figures 1 et 2 on voit que le produit MH 101 à 100 et 200 ul l⁻¹ induit une forte poussé planctonique au 4e jour de culture. Ce bloom disparaît en 48h et la culture devient stable pour 100 ppm et décroît pour 200 ppm.

5.2.2 Toxicité vis-à-vis du zooplancton (Artemia salina)

Pour chaque concentration choisie: 50 ul l⁻¹, 66 ul l⁻¹, 100 ul l⁻¹, 200 ul l⁻¹, et 1000 ul l⁻¹, trois erlens contenant 50 ml d'eau de mer enrichie ont reçu une vingtaine de larves d'Artemia salina. Trois erlens témoins reçoivent la même quantité de larves. Les comptages sont effectués tous les jours, à la loupe binoculaire, pendant 9 jours (Voir figures 3 et 4).

Dilution (ul l ⁻¹)	Témoin 0	66 ul l ⁻¹	100 ul l ⁻¹	200 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	Seuil (ul l ⁻¹)
MH 101 TL 50 (heures)	> 216	168	144	120	74	< 50
B 8884 TL 50 (heures)	> 216	70	44	48	36	50

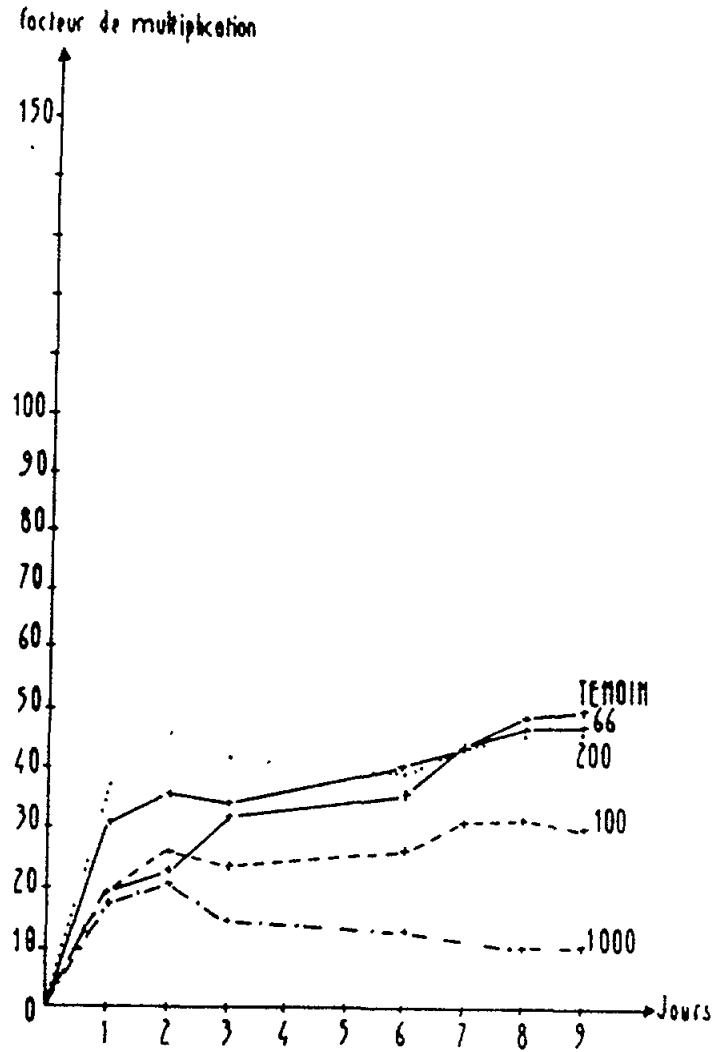


Fig. 2 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de *Tetraselmis suecica*

		Témoin	66 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹
MH 101	Concentration	0	32,71	36,48
	Facteur de concentration	0	0,50	0,036
B 8884	Concentration	0	42,77	76,68
	Facteur de concentration	0	0,86	0,077

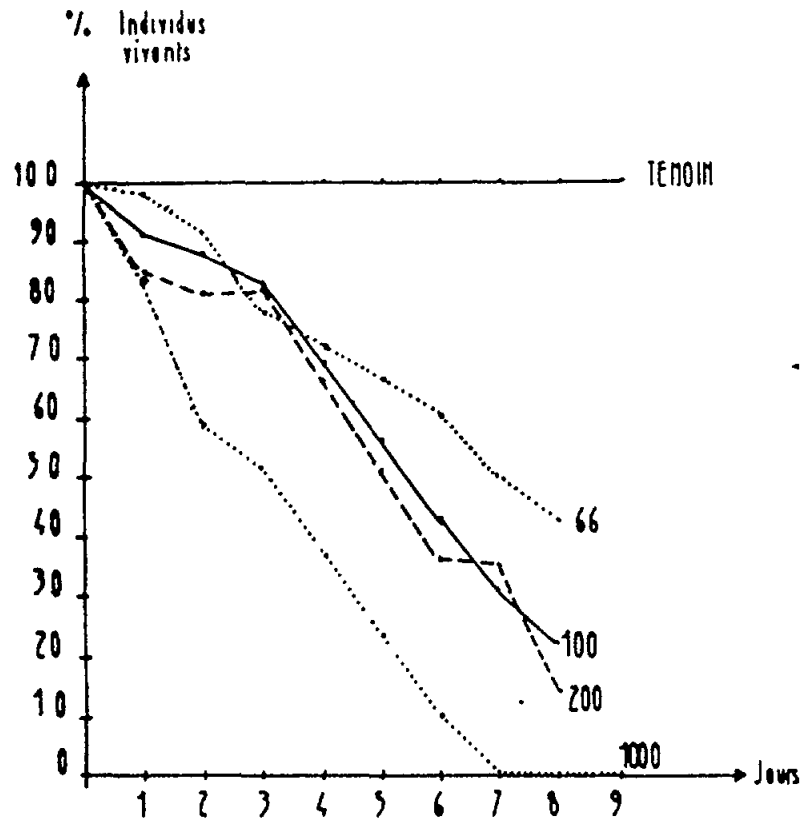


Fig. 3 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Artemia salina. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

5.2.3 Toxicité vis-à-vis des annélides (Nereis diversicolor)

Les Nereis sont maintenues durant 9 jours aux différentes concentrations choisies (50 ul l⁻¹, 100 ul l⁻¹, 150 ul l⁻¹, 200 ul l⁻¹, 300 ul l⁻¹, 400 ul l⁻¹, 500 ul l⁻¹, 1000 ul l⁻¹, 2000 ul l⁻¹, 3000 ul l⁻¹), dans des bacs contenant 1500 cm³ de sédiments marins sablovaseux riches en bactéries marines et 3 litres d'eau. L'eau est renouvelée par siphonnage deux fois par semaine (Voir figures 5 et 6).

	Dilution	Témoin	66	100	150	200	300
	ul l ⁻¹	0	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹
MH 101 TL 50 (heures)	>216	>216	>216	>216	>216	-	-
B 8884 TL 50 (heures)	>216	>216	>216	>216	>216	>216	>216

	Dilution	400	500	1000	2000	Seuil
	ul l ⁻¹	ug l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹
MH 101 TL 50 (heures)	-	>216	>216	60	150	
B 8884 TL 50 (heures)	216	>216	>216	>216	600	

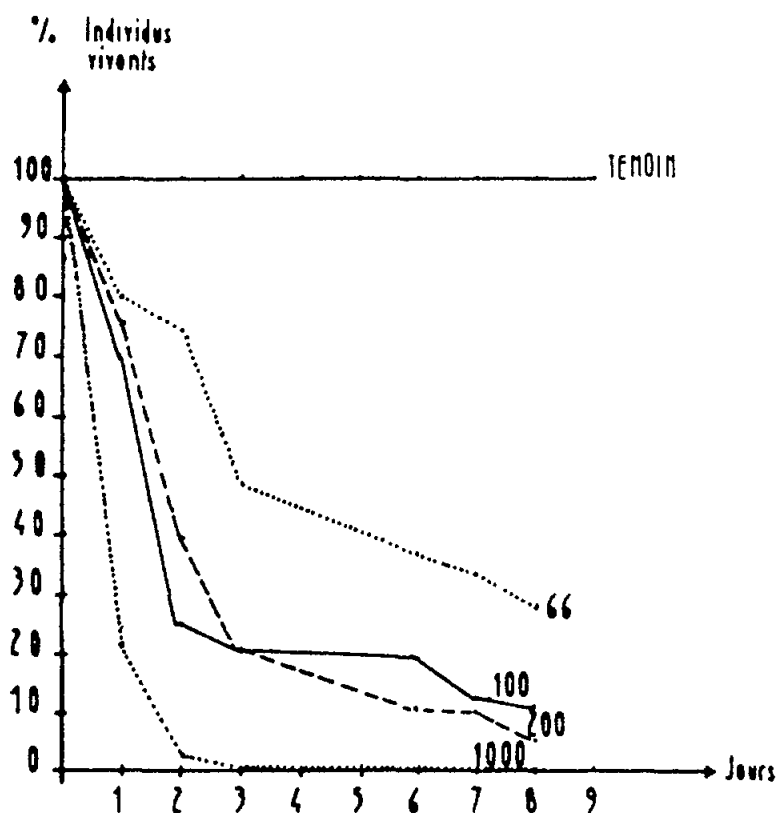


Fig. 4 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Artemia salina. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

Les résultats des analyses chimiques des silicones dans les vers à deux concentrations (150 ul l⁻¹ et 400 ul l⁻¹) sont les suivants:

	Témoin	150 ul l ⁻¹	400 ul l ⁻¹	500 ul l ⁻¹	3000 ul l ⁻¹
Concentration	0	281,08	340,94	-	-
MH 101 Facteur de concentration	0	1,87	0,85	-	-
Concentration	0	-	-	474,50	770,35
B 8884 Facteur de concentration	0	-	-	0,95	0,26

5.2.4 Toxicité vis-à-vis des mollusques (Mytilus galloprovincialis)

Pour chaque concentration (50 ul l⁻¹, 66 ul l⁻¹, 100 ul l⁻¹, 130 ul l⁻¹, 150 ul l⁻¹, 200 ul l⁻¹), les moules (20) sont maintenues durant 9 jours dans des aquariums de 20 litres. L'eau est renouvelée tous les jours (Voir figures 7 et 8).

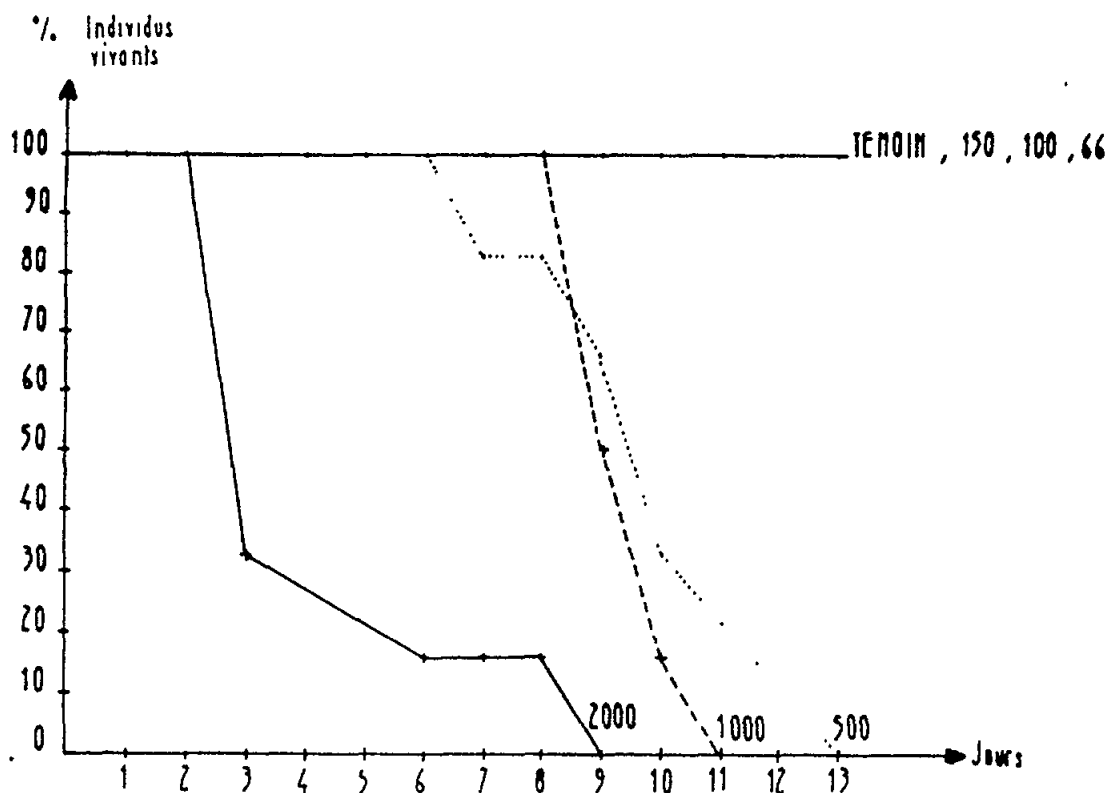


Fig. 5 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Nereis diversicolor. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

	Dilution	Témoin	50	66	100	130	150	200	Seuil
	ul l ⁻¹	0	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹
MH 101 TL 50 (heures)	>216	>216	216	67	60	20	-	10	50
B 8884 TL 50 (heures)	>216	>216	>216	>216	>216	>216	216	92	150

Pour deux concentrations types, les dosages de silicones au sein des moules ont donné les résultats suivants:

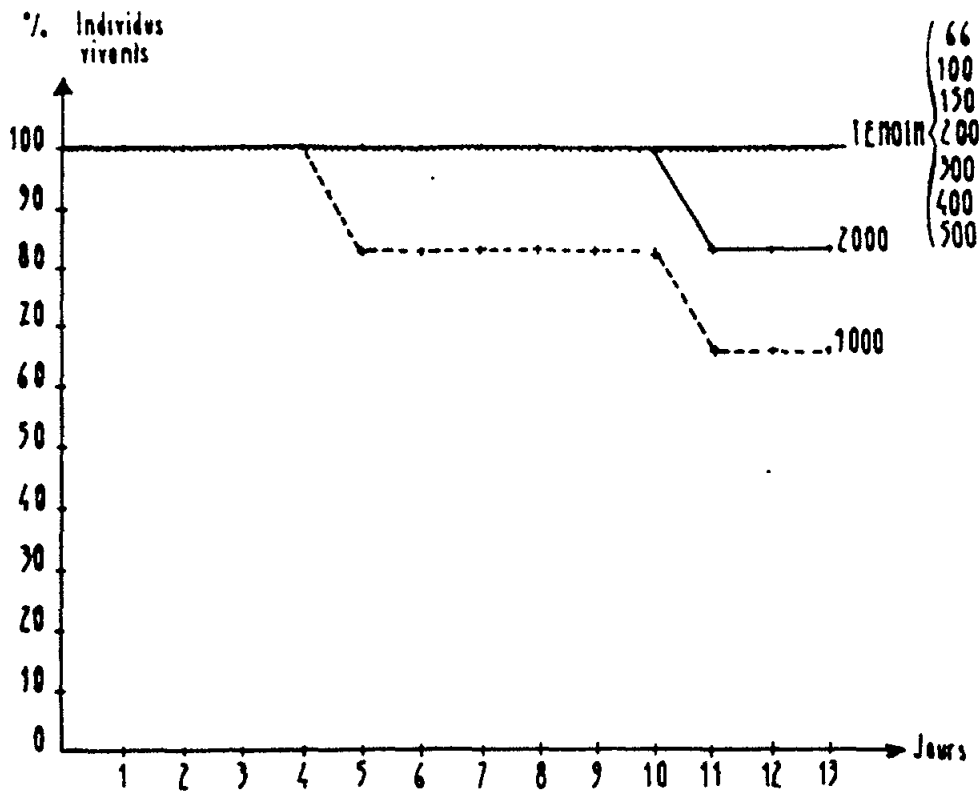


Fig. 6 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Nereis diversicolor. Les concentrations sont données en $ul\ l^{-1}$

	Témoin	50 $ul\ l^{-1}$	130 $ul\ l^{-1}$	150 $ul\ l^{-1}$	200 $ul\ l^{-1}$
Concentration	0	477,76	785,61	-	-
MH 101 Facteur de concentration	0	9,55	5,91	-	-
Concentration	0	-	-	1723,63	1986,61
B 8884 Facteur de concentration	0	-	-	11,49	9,93

5.2.5 Toxicité vis-à-vis des crabes (Carcinus maenas)

Pour chaque concentration (1000 $ul\ l^{-1}$, 2000 $ul\ l^{-1}$, 4000 $ul\ l^{-1}$, 5000 $ul\ l^{-1}$, 10000 $ul\ l^{-1}$), on place 10 crabes dans 20 litres d'eau de mer. On maintient les crustacés pendant 9 jours en renouvelant tous les jours l'eau polluée (Voir figures 9 et 10).

	Dilution $ul\ l^{-1}$	Témoin 0	1000 $ul\ l^{-1}$	2000 $ul\ l^{-1}$	4000 $ul\ l^{-1}$	5000 $ul\ l^{-1}$	10000 $ul\ l^{-1}$	PUR	Seuil $ul\ l^{-1}$
MH 101 TL 50 (heures)	>216	>216	>216	>216	>216	>216	216	216	10000
B 8884 TL 50 (heures)	>216	>216	216	50	-	6	-	-	2000

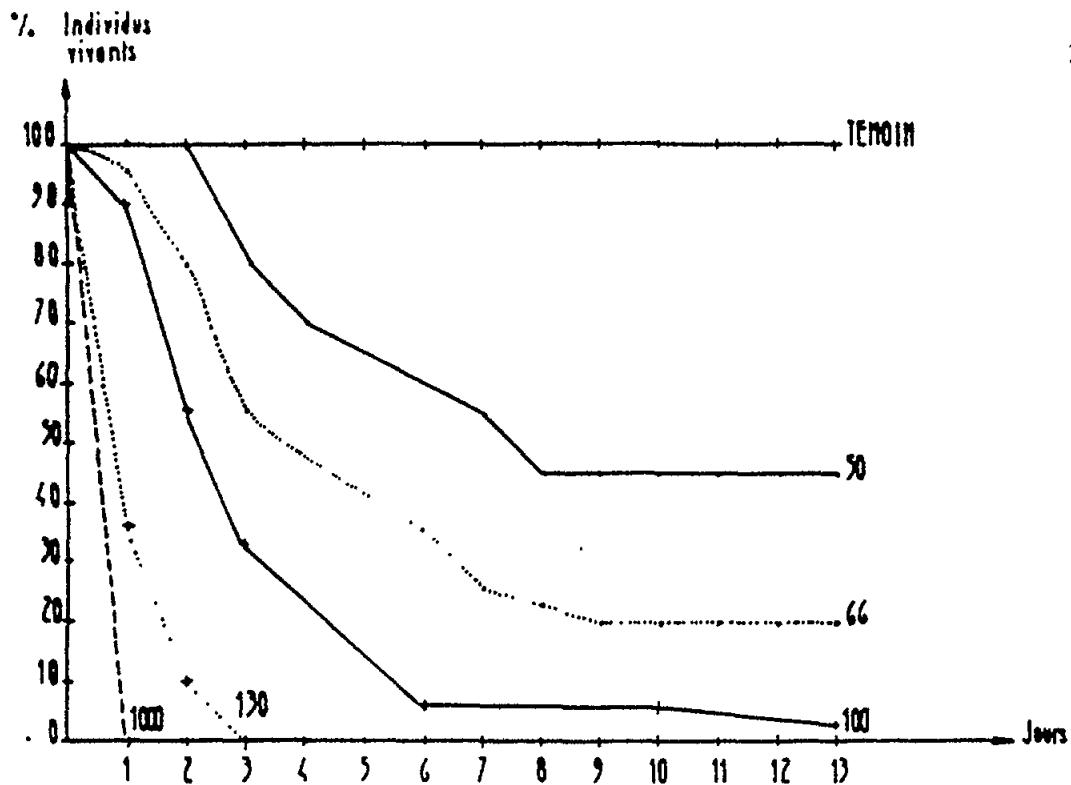


Fig. 7 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Mytilus galloprovincialis. Les concentrations sont données en $\mu\text{l l}^{-1}$

Pour deux concentrations nous avons dosé les silicones dans les organismes au niveau du muscle.

	Témoin	1000 $\mu\text{l l}^{-1}$	2000 $\mu\text{l l}^{-1}$	10000 $\mu\text{l l}^{-1}$
Concentration	0	14,0	-	375,12
MH 101 Facteur de concentration	0	0,01	-	0,04
Concentration	0	-	852,53	1444,22
B 8884 Facteur de concentration	0	-	0,43	0,14

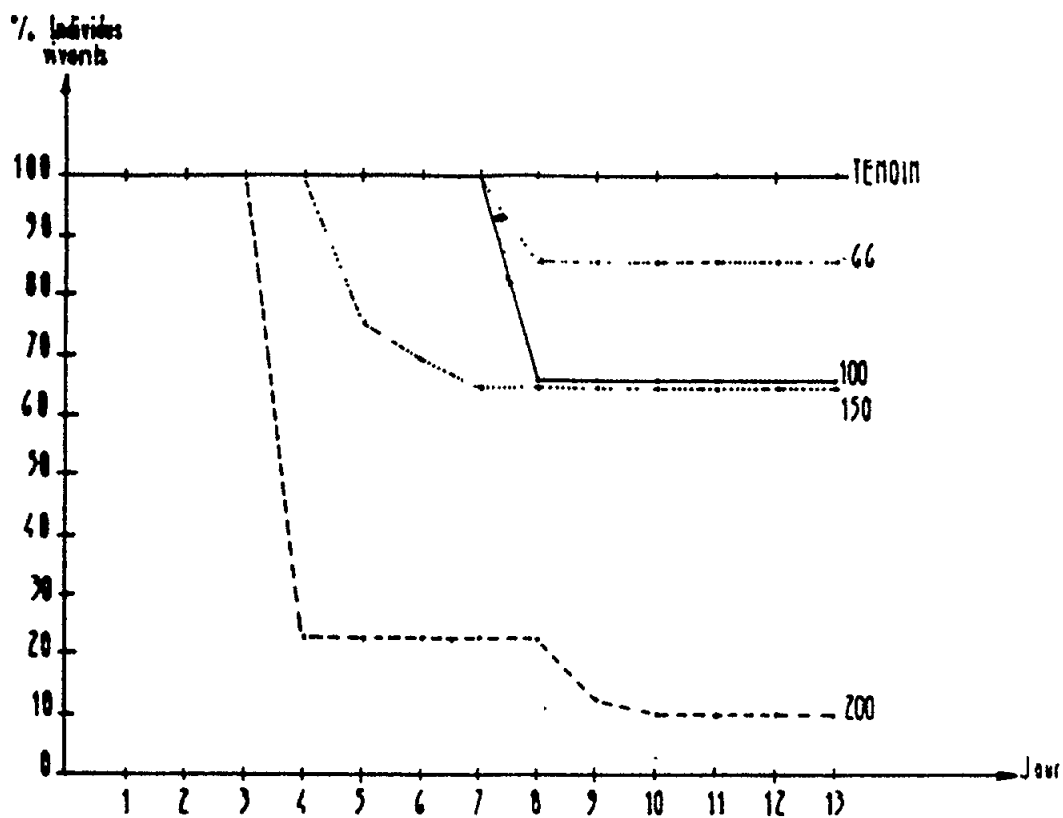


Fig. 8 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Mytilus galloprovincialis. Les concentrations sont données en $\mu\text{l l}^{-1}$

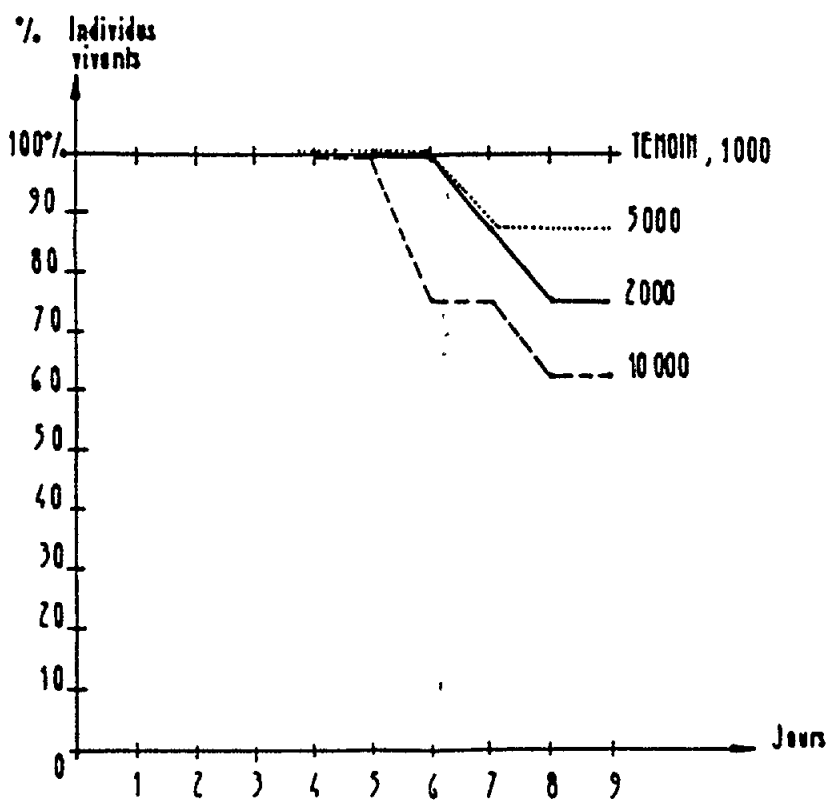


Fig. 9 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Carcinus maenas. Les concentrations sont données en $\mu\text{l l}^{-1}$

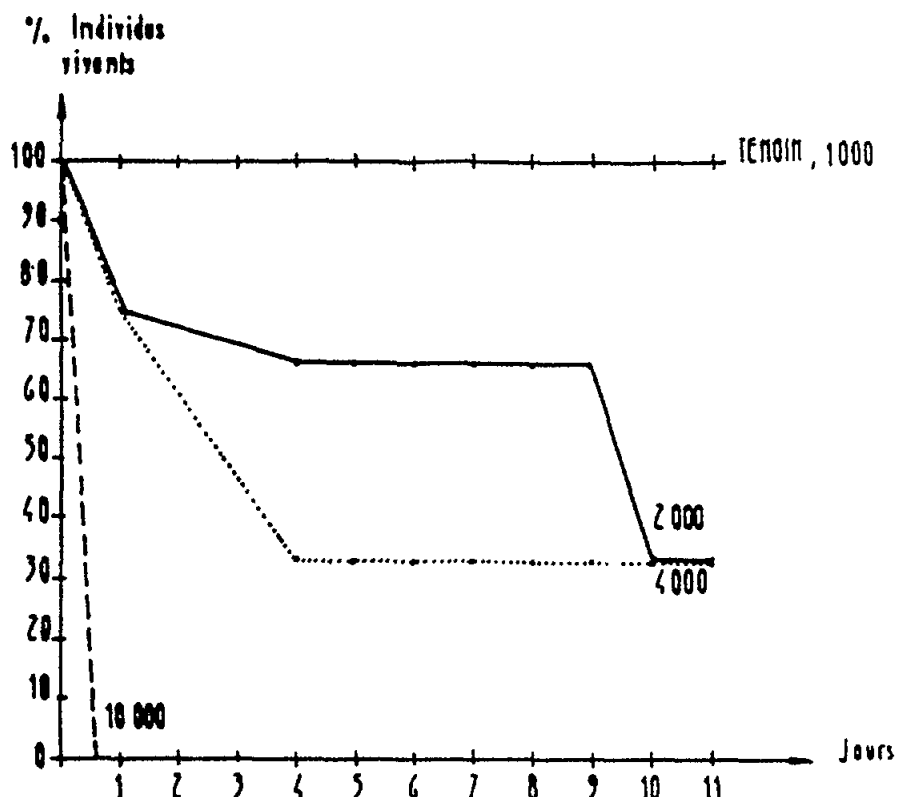


Fig. 10 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Carcinus maenas. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

5.2.6 Toxicité vis-à-vis des poissons benthiques (Scorpaena porcus)

Les rascasses sont maintenues en aquarium de 30 litres pendant 9 jours, aux différentes concentrations choisies: 100 ul l⁻¹, 500 ul l⁻¹, 1000 ul l⁻¹, 5000 ul l⁻¹, l'eau étant renouvelée chaque jour (Voir figures 11 et 12).

Dilution ul l ⁻¹	Témoin 0	100 ul l ⁻¹	500 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	5000 ul l ⁻¹	Seuil ul l ⁻¹
MH 101 TL 50 (heures)	>216	>216	43	24	2	100
B 8884 TL 50 (heures)	>216	>216	>216	204	6	500

Pour des concentrations de 500 ul l⁻¹ et 5000 ul l⁻¹, les analyses des composés siliconés dans les muscles de rascasses ont donné les résultats suivants:

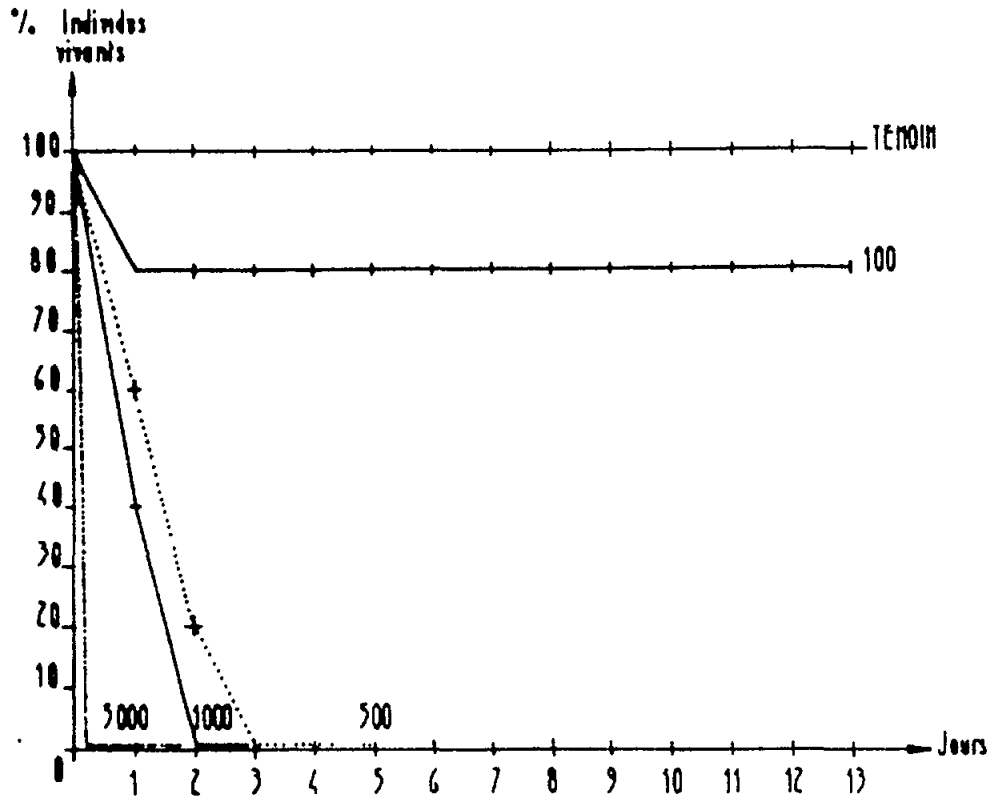


Fig. 11 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Scorpaena porcus. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

		Témoïn	500 ul l ⁻¹	5000 ul l ⁻¹
	Concentration	0	32,35	23,25
MH 101	Facteur de concentration	0	0,06	0,004
	Concentration	0	19,44	69,87
B 8884	Facteur de concentration	0	0,03	0,01

5.2.7 Toxicité vis-à-vis des poissons pélagiques (Crenilabrus ocellatus)

Les labres sont maintenus en aquarium de 30 l pendant 9 jours aux concentrations de produits siliconés suivants: 100 ul l⁻¹, 200 ul l⁻¹, 400 ul l⁻¹, 600 ul l⁻¹, 800 ul l⁻¹, 1000 ul l⁻¹, l'eau étant renouvelée tous les jours (Voir figures 13 et 14).

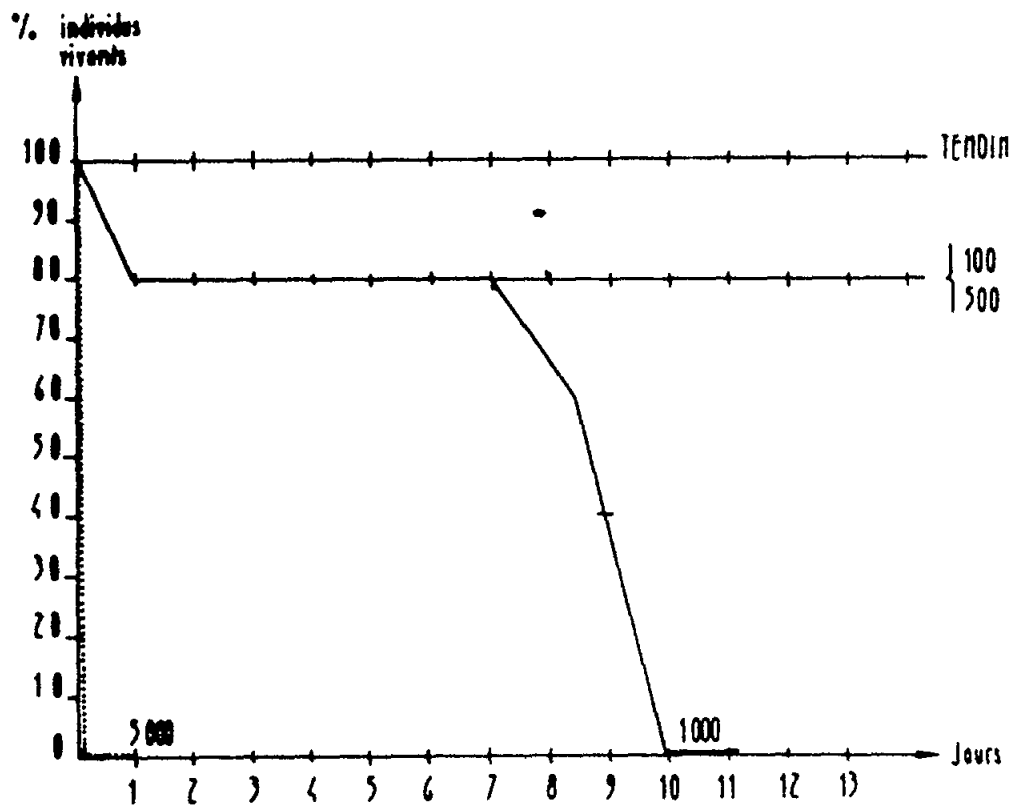


Fig. 12 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Scorpaena porcus. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

	Dilution	Témoin	100	200	400	600	800	1000	Seuil
	ul l ⁻¹	0	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹	ul l ⁻¹
MH 101 TL 50 (heures)	>216	>216	180	-	-	-	-	-	150
B 8884 TL 50 (heures)	>216	>216	>216	>216	>216	>216	>216	130	900

Pour deux concentrations pour chaque produit, les analyses des composés silicones dans le muscle ont donné les résultats suivants:

	Témoin	100 ul l ⁻¹	200 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	
	Concentration	0	24,74	1,52	-
MH 101	Facteur de concentration	0	0,24	0,007	-
	Concentration	0	-	34,61	66,23
B 8884	Facteur de concentration	0	-	0,17	0,06

A partir de ces résultats on peut voir que:

- les deux composés ont une toxicité assez forte sur les échelons planctoniques, le produit B 8884 se révélant en peu plus toxique que le produit MH 101;
- la toxicité varie d'un produit à l'autre pour les échelons supérieurs: vis-à-vis des vers, des moules et des poissons le produit référencé B 8884 est le moins toxique tandis que sur les crabes ce produit a plus d'effets toxiques que le produit référencé MH 101.

Au point de vue absorption et accumulation dans les tissus les résultats montrent les faits suivants:

- les échelons planctoniques concentrent peu (facteur de concentration inférieur à 1) mais paradoxalement le facteur de concentration est plus fort à une faible dose (66 ul l⁻¹) qu'à une forte dose (1000 ul l⁻¹): ils diffèrent d'un facteur 10. Il semble que le plancton ait une capacité d'absorption limitée et atteigne rapidement son seuil d'absorption;
- pour les autres échelons, le produit le plus toxique est celui qui est le plus accumulé par les organismes; par exemple le crabe (Carcinus maenas) est plus sensible à l'action du produit B 8884 qui est le plus concentré: 3 à 4 fois plus que le produit MH 101;
- pour les vers, moules et crabes, il semble qu'il y ait aussi un effet tampon pour l'accumulation des substances dans les organismes: aux doses les plus fortes les facteurs de concentration sont plus faibles: la différence étant d'un facteur 1 à 4;
- pour les poissons: le produit référencé MH 101 est plus toxique que le produit B 8884, son seuil toxique étant 4 à 6 fois plus bas, par contre la bioaccumulation de ce produit est faible.

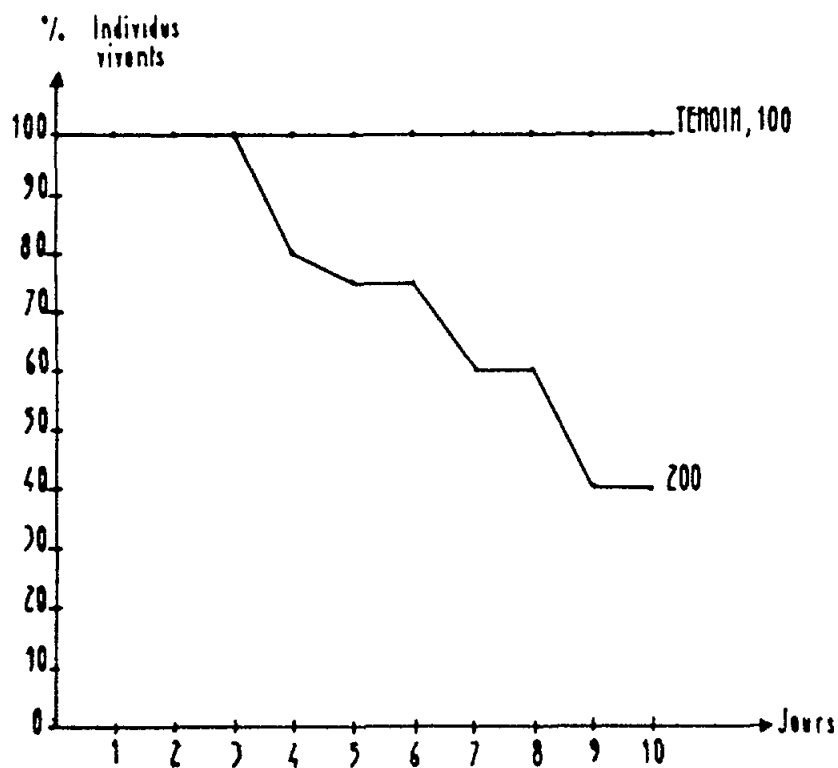


Fig. 13 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Crenilabrus ocellatus. Les concentrations sont données en $ul\ l^{-1}$

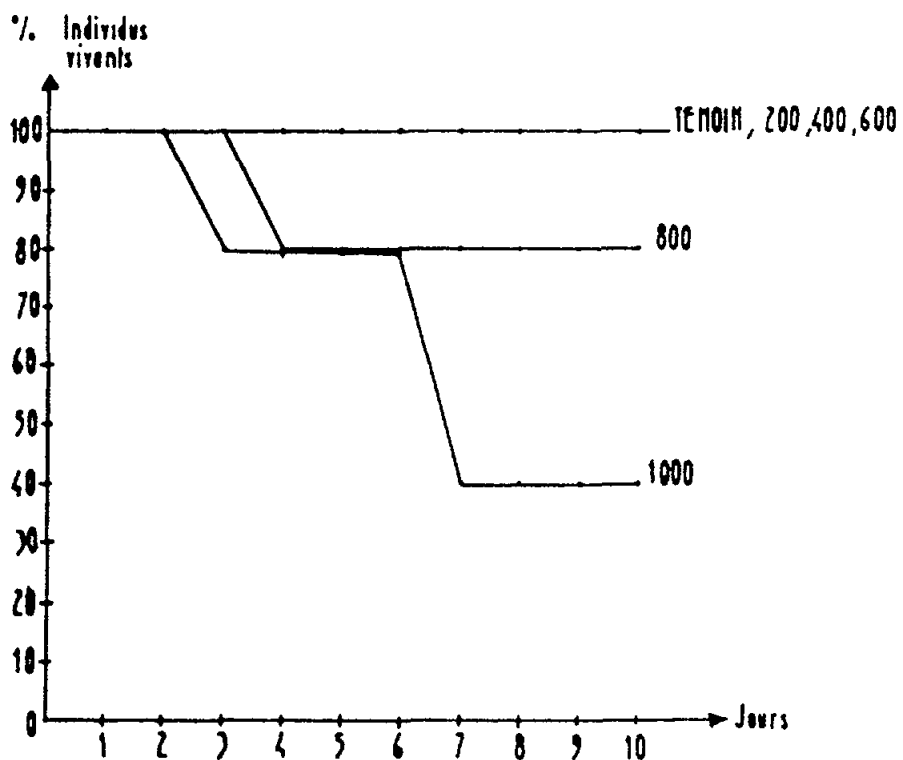


Fig. 14 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Crenilabrus ocellatus. Les concentrations sont données en $ul\ l^{-1}$

En conclusion des résultats de toxicité directe, on peut dire que ces deux produits ont une plus forte action sur les échelons planctoniques et planctonophages, mais que globalement la bioaccumulation en toxicité directe est faible. Néanmoins, l'effet physique de ces produits (engourdissement des organismes mobiles du plancton, engluement des branchies des moules et des poissons) produit un fort effet de stress, très marqué, pour tous les organismes, qui peut induire les mortalités que nous observons au cours de cette étude.

5.3 Recherche de la variation de la toxicité avec la biodégradation

Au regard des résultats de toxicité directe, les études ont porté sur les échelons les plus sensibles: le phytoplancton (Tetraselmis suecica) et les mollusques filtreurs (Mytilus galloprovincialis) (Voir figures 15, 16, 17 et 18).

Nous avons mis en contact chaque produit avec l'eau de mer pendant 24 heures, 72 heures et 144 heures (soit 1 jour, 3 jours et 6 jours), avant d'introduire les organismes marins dans les aquariums d'étude.

. Toxicité vis-à-vis du phytoplancton selon le temps d'exposition:

Dilution (ul l ⁻¹)	Témoin 0	100	100 (24h)	100 (72h)	100 (144h)	1000	1000 (24h)	1000 (72h)	1000 (144h)
MH 101 TL 50 (heures)	>216	168	192	216	>216	144	168	216	>216
B 8884 TL 50 (heures)	>216	168	192	>216	>216	96	168	>216	>216

. Toxicité vis-à-vis des moules selon le temps d'exposition:

Dilution (ul l ⁻¹)	Témoin 0	50	50 (24h)	100	100 (24h)	100 (72h)	100 (144h)	130	130 (24h)
MH 101 TL 50 (heures)	>216	216	>216	60	144	>216	>216	20	110
B 8884 TL 50 (heures)	>216	-	-	>216	>216	>216	>216	-	-

Dilution (ul l ⁻¹)	130 (72h)	130 (144h)	200	200 (24h)	200 (72h)	200 (144h)
MH 101 TL 50 (heures)	>216	>216	10	18	72	84
B 8884 TL 50 (heures)	-	-	92	>216	>216	>216

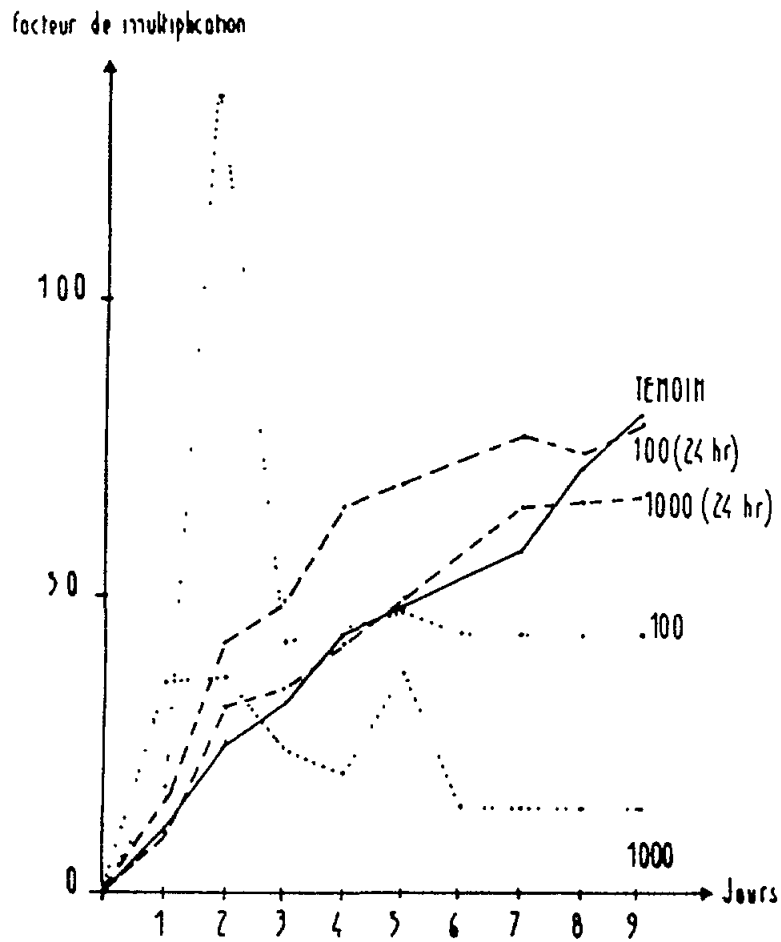


Fig. 15 Toxicité de MH 101 vis-à-vis de *Tetraselmis suecica*, pour deux concentrations après 24h de dégradation, par rapport au produit non dégradé. Les concentrations sont données en $\mu\text{l l}^{-1}$

Nous avons dosé les composés siliconés dans la chair des moules:

Dilution ($\mu\text{l l}^{-1}$)	Témoin	50	50 (24h)	130	130 (24h)	200	200 (24h)
Concentration	0	477,76	114,64	785,61	154,36	-	-
MH 101 Facteur de concentration	0	9,55	2,29	5,91	1,16	-	-
Concentration	0	-	-	-	-	1986,61	507,38
B 8884 Facteur de concentration	0	-	-	-	-	9,93	2,54

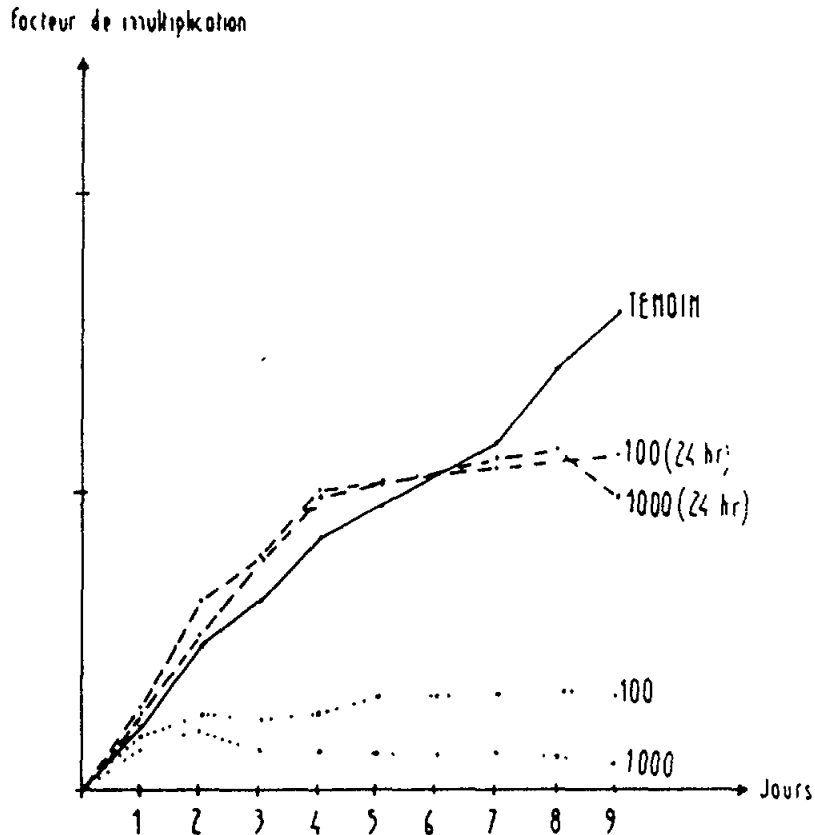


Fig. 16 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de *Tetraselmis suecica* pour deux concentrations après 24h de dégradation, par rapport au produit non dégradé. Les concentrations sont données en $\mu\text{l l}^{-1}$

D'après ces résultats, on peut voir que la toxicité de chaque produit est très diminuée dès 24 heures de dégradation. Ce phénomène est accentué pour 72 heures de contact du produit siliconé avec l'eau de mer. Au delà de 7 jours de dégradation, le produit B 8884 voit sa toxicité disparaître alors que le produit MH 101 est toujours toxique vis-à-vis des moules, à forte concentration.

L'accumulation de produit siliconé par les moules est diminué d'un facteur 4 à 5 entre un produit brut et un produit dégradé pendant 24 heures. On voit que la variation de la toxicité directe est accompagnée de la diminution de la bioaccumulation, lors de ces expériences de dégradation.

5.4 Recherche de la toxicité par induction le long des chaînes trophodynamiques marines

En étudiant la chaîne biologique dans son fonctionnement normal, c'est-à-dire chaque échelon servant à alimenter l'échelon immédiatement supérieur, nous pouvons analyser les éventuels phénomènes de concentration pour chaque échelon et en fin de chaîne. A chaque échelon, le polluant est dosé chimiquement et on détermine sa concentration dans l'organisme selon la méthode de dosage explicitée plus haut.

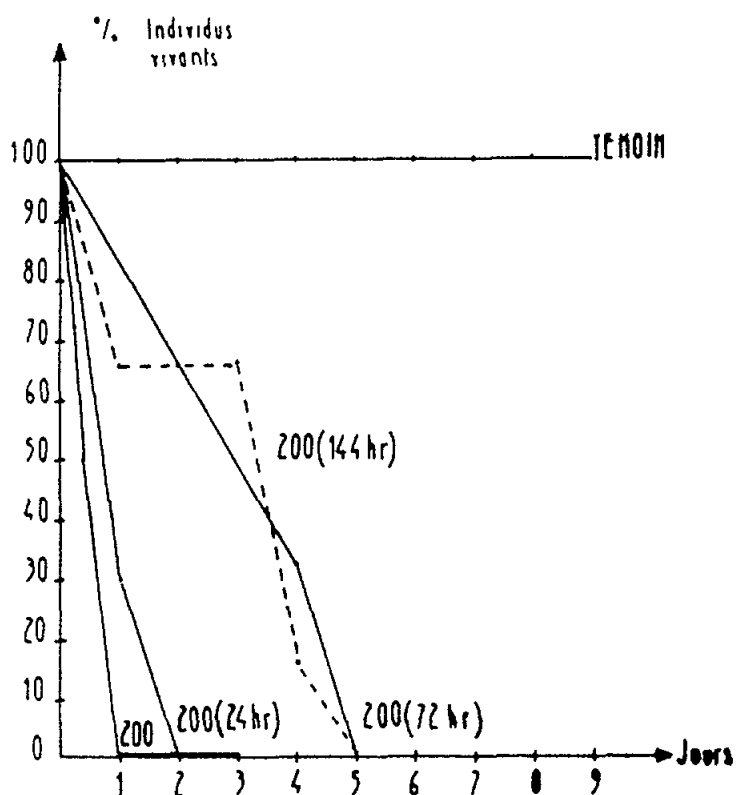


Fig. 17a Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Mytilus galloprovincialis à la concentrations de 200 ul l⁻¹ après 24,72 et 144h de dégradation, par rapport au produit non dégradé

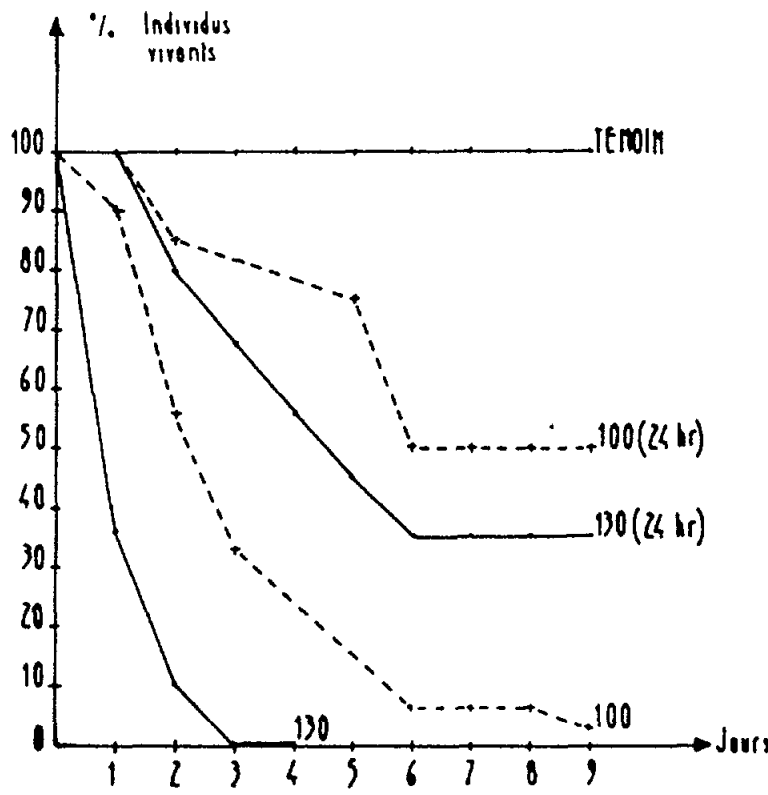


Fig. 17b Toxicité de MH 101 vis-à-vis de Mytilus galloprovincialis pour deux concentrations après 24h de dégradation, par rapport au produit non dégradé. Les concentrations sont données en ul l⁻¹

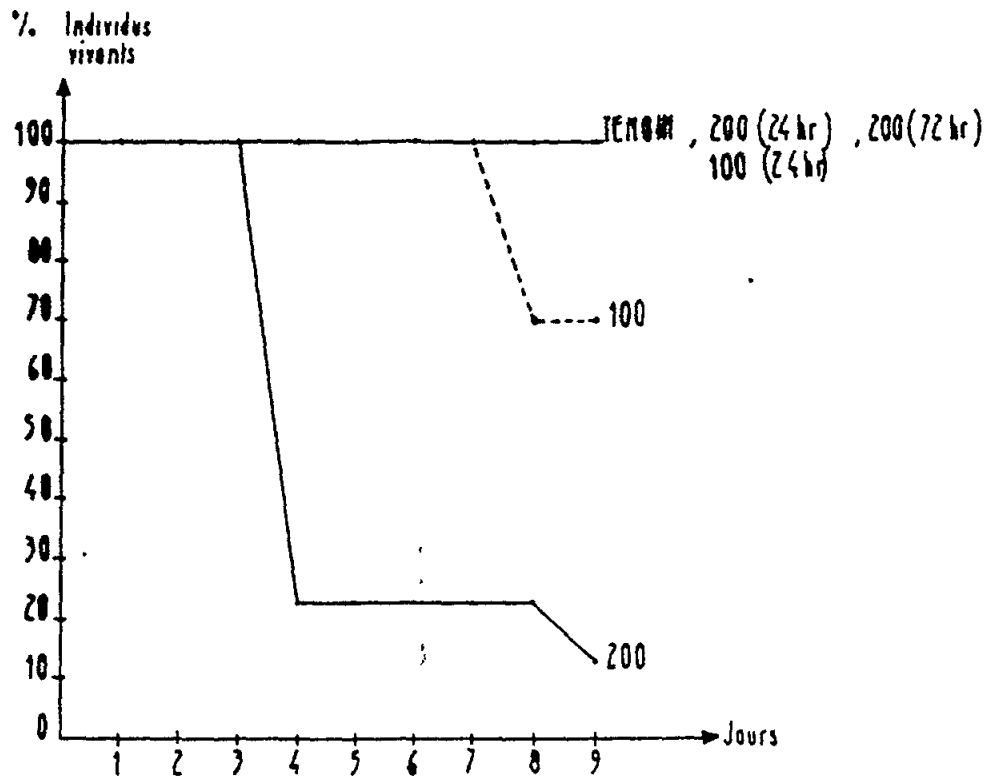


Fig. 18 Toxicité de B 8884 vis-à-vis de Mytilus galloprovincialis pour deux concentrations après 24h ou 72h de dégradation par rapport au produit non dégradé. Les concentrations sont données en ul l^{-1} .

5.4.1 Mise en place des chaînes

Selon la méthode d'étude décrite plus haut, les quatre types de chaînes utilisées sont réalisées comme suit, la concentration utilisée a été choisie inférieure au seuil toxique de tous les échelons de façon à ne pas avoir de rupture de chaînes.

- Transfert au niveau de la chaîne benthique à poissons:

Les annélides sont élevées dans des bacs de 20 litres contenant du sédiment sablo-vaseux et de l'eau de mer additionnée de copolymère. Les bacs sont préparés 48 heures à l'avance de manière à permettre un développement des bactéries marines. Les annélides sont intoxiquées pendant 8 jours. A ce terme elles sont tuées: une partie sert de nourriture aux poissons benthiques, l'autre partie est destinée aux analyses chimiques. Les rascasses sont maintenues 15 jours en aquarium de 45 litres, en étant nourries des vers précédemment intoxiqués. Après 15 jours elles sont tuées et conditionnées pour les analyses chimiques.

La concentration utilisée a été de 50 ul l^{-1} pour le produit MH 101 et 150 ul l^{-1} pour le produit B 8884.

- Transfert au niveau de la chaîne benthique à crustacés:

Le protocole est le même que pour la chaîne benthique à poissons, mais les annélides servent de nourriture aux crabes maintenus 15 jours en bacs de 20 litres.

La concentration utilisée a été de 50 $\mu\text{l l}^{-1}$ pour le produit MH 101 et de 150 $\mu\text{l l}^{-1}$ pour le produit B 8884.

- Transfert au niveau de la chaîne néritique à mollusques:

Les cellules phytoplanctoniques sont maintenues pendant 8 jours, aux doses de produits choisies, puis une partie est prélevée pour alimenter les moules et l'autre partie est destinée aux analyses chimiques. Les moules sont placées en aquarium de 30 litres munis d'un système d'aération continue, elles sont nourries pendant 15 jours par du phytoplancton préalablement intoxiqué. A ce terme, les moules sont tuées et conditionnées pour les analyses.

La concentration de silicones utilisée a été de 40 $\mu\text{l l}^{-1}$ pour le produit MH 101 et de 50 $\mu\text{l l}^{-1}$ pour le produit B 8884.

- Transfert au niveau de la chaîne pélagique à poissons:

Le phytoplancton est mis en culture pendant 8 jours dans de l'eau de mer additionnée de produit siliconé; à ce terme une partie est prélevée pour les analyses chimiques, l'autre partie servant de milieu de culture aux larves d'Artemia. L'élevage d'Artemia se poursuit durant 8 jours; à ce terme, une partie est prélevée, filtrée et analysée, l'autre partie sert de nourriture aux poissons planctonophages. Les labres sont maintenus 15 jours en aquarium et nourris avec le plancton précédemment intoxiqué.

La dose utilisée pour cette chaîne a été de 40 $\mu\text{l l}^{-1}$ pour le produit MH 101 et de 50 $\mu\text{l l}^{-1}$ pour le produit B 8884.

En effectuant le dosage des produits siliconés pour chaque échelon et en appliquant la formule:

Concentration dans l'unité de poids de l'organisme frais
 Concentration dans la même unité de poids de l'eau de mer.

on obtient le facteur de transfert par rapport à l'eau.

5.4.2 Résultats:

Les résultats pour chaque chaîne et pour les deux produits sont consignés dans le tableau ci-après:

CHAINES	Organismes	Produit utilisé	Dose expérimentale ($\mu\text{l l}^{-1}$)	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Facteur de concentration
Chaîne benthique	Annélides	MH 101	50	33,5	0,67
	Rascasses		50	27,81	0,55
à poissons	Annélides	B 8884	150	419,3	2,79
	Rascasses		150	36,15	0,24

Chaîne benthique	Annélides	MH 101	50	33,5	0,67
	Crabes		50	323,8	6,47
à crustacés	Annélides	B 8884	150	419,3	2,79
	Crabes		150	885,4	5,90
Chaîne néritique	Phytoplancton	MH 101	40	209,8	5,24
	Moules		40	410,9	10,27
à mollusques	Phytoplancton	B 8884	50	258,2	5,16
	Moules		50	435,4	8,70
Chaîne pélagique	Phytoplancton	MH 101	40	209,8	5,24
	Zooplancton		40	380,0	9,50
à poissons	Labres	B 8884	40	12,78	0,32
	Phytoplancton		50	258,2	5,16
	Zooplancton		50	554,3	11,08
	Labres		50	24,27	0,48

Cette étude de la toxicité induite de ces deux produits nous permet de constater que les facteurs de concentration sont dans l'ensemble faibles (de 0,24 à 11,1). C'est au niveau des chaînes mettant en présence des organismes planctoniques que le taux est le plus élevé, en particulier pour le zooplancton et les moules.

Les taux les plus bas se rencontrent chez des animaux benthiques comme les vers polychètes (annélides fouisseurs) et les rascasses.

Pour les poissons, on observe qu'ils bioaccumulent peu les silicones dans leur chair, malgré une nourriture contaminée, en particulier les poissons pélagiques.

En comparant, pour les deux produits, les capacités d'accumulation par transfert grâce à une nourriture intoxiquée et les facteurs de concentration lors des études de toxicité directe, on remarque que:

. malgré des doses expérimentales bien inférieures au seuil toxique - donc sublétales - on obtient des taux de concentration très élevés (jusqu'à 885 ug g⁻¹ poids frais pour les crabes et pour le produit B 8884).

. les facteurs de concentration obtenus sont dans l'ensemble supérieurs à ceux que l'on obtient en toxicité directe, à doses égales ou très inférieures. Par exemple, le crabe (*Carcinus maenas*) concentre peu les silicones lors d'expériences en toxicité directe; mis en présence de nourriture contaminée, sa capacité de concentration devient nettement plus élevée:

	Toxicité Directe				Toxicité induite	
	MH 101		B 8884		MH 101	B 8884
	1000 ul l ⁻¹	10000 ul l ⁻¹	2000 ul l ⁻¹	10000 ul l ⁻¹	50 ul l ⁻¹	150 ul l ⁻¹
Facteur de concentration	0,1	0,04	0,43	0,14	6,5	5,9

On peut observer le même phénomène au niveau du zooplancton (Artemia salina):

	Toxicité Directe				Toxicité induite	
	MH 101		B 8884		MH 101	B 8884
	66 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	66 ul l ⁻¹	1000 ul l ⁻¹	40 ul l ⁻¹	50 ul l ⁻¹
Facteur de concentration	0,50	0,06	0,86	0,07	9,50	11,08

Il semble donc que, lors d'intoxication à faibles doses par la méthode des chaînes trophiques, ces composés siliconés soient accumulés d'une manière non toxique au sein des tissus des divers organismes marins que nous avons étudiés.

5.5 Recherche de modifications tissulaires

5.5.1 Chez les Mollusques (Mytilus galloprovincialis)

. Intoxication par le produit MH 101

Le produit MH 101 induit des altérations au niveau de l'épithélium palléal: on assiste à un fort décollement associé à une perte de la ciliature superficielle. De même l'épithélium branchial est le siège d'une intense vacuolisation. L'étendue et la gravité des atteintes sont variables, en relation avec la concentration de polluant dans l'eau d'élevage.

. Intoxication par le produit B 8884

Ce produit induit des altérations au niveau des épithéliums. On observe une lyse importante mais localisée de l'épithélium palléal, avec une augmentation du nombre de cellules muqueuses. L'épithélium respiratoire présente une intense vacuolisation et un décollement au niveau de nombreux filaments branchiaux. Ces atteintes diminuent fortement avec la concentration du produit utilisé.

Lors des expériences de dégradation, les atteintes sont plus légères (dès une dégradation de 24 heures) et correspondent le plus souvent à une prolifération de mucocytes épithéliaux et sous-épithéliaux.

En comparant ces atteintes avec celles provoquées sur les moules par un Poly-Diméthyl-Siloxane (PDMS) on constate que les deux exemples de copolymères étudiés induisent des altérations moins graves que le produit à base de PDMS. En effet, le PDMS induit de graves altérations des épithéliums. L'épithélium palléal présente une lyse et une élimination complète au niveau de larges plages où la lame basale est mise à nu. On observe une vacuolisation et une lyse complète de l'épithélium respiratoire, celui-ci étant presque éliminé de certains filaments branchiaux. Dans une étude précédente (Aubert *et al.*, 1985; Aubert *et al.*, 1985), le C.E.R.B.O.M. avait déterminé une toxicité bien plus faible de ce produit vis-à-vis de la biomasse marine, par rapport aux deux produits siliconés utilisés dans cette présente étude.

En conclusion, les altérations induites par les produits organosiliconés MH 101 et B 8884 intéressent particulièrement les épithéliums branchial et palléal et sont directement liées aux doses d'intoxication. Aucune lésion profonde dégénérative et irréversible n'a pu être mise en évidence chez les mollusques intoxiqués.

5.5.2 Chez les poissons benthiques carnivores (*Serranus scriba* et *Scorpaena porcus*)

. Intoxication par le produit MH 101

On note, pour les deux espèces de poissons, une infiltration lipidique des hépatocytes, plus fine chez la rascasse. On observe aussi une infiltration à cellules rondes du chorion de l'estomac. Chez la rascasse, cette infiltration atteint aussi la sous-muqueuse stomacale et les lamelles secondaires des branchies, et elle est accompagnée, au niveau des sinusoides du foie, de l'apparition de cellules claires. Chez le serran on note, de plus, une importante desquamation épithéliale des caecums pyloriques.

Au niveau du reste du tube digestif, du muscle et du revêtement cutané, on n'observe pas de différences notables avec les organismes témoins.

. Intoxication par le produit B 8884

On observe pour les deux espèces de poissons une fine infiltration lipidique des hépatocytes s'accompagnant chez la rascasse d'une petite infiltration à cellules rondes le long des espaces-portes du foie et de l'apparition de cellules claires le long des sinusoides.

Chez les deux espèces de poissons intoxiqués, l'estomac, le reste du tube digestif, le muscle, les branchies et le revêtement cutané ne présentent pas de particularités notables.

5.5.3 Chez les poissons pélagiques (*Crenilabrus ocellatus*)

. Intoxication par le produit MH 101

Les organes examinés (branchies, muscle, tégument, tube digestif, foie) n'ont présenté aucune différence notable avec les organes des animaux témoins.

. Intoxication par le produit B 8884

Il n'a pas été observé de différence importante entre les organismes témoins et les organismes intoxiqués, ceci pour tous les organes étudiés (branchies, muscle, tégument, tube digestif, foie).

Néanmoins, il faut noter que ces poissons (sauvages) étaient parasités au niveau des branchies par des copépodes; ils présentaient aussi des pseudo-kystes branchiaux. Leur intestin était rempli d'importants vestiges de nourriture. La pathologie cellulaire que nous avons notée à ces niveaux est donc présente aussi chez les organismes témoins et n'est donc pas imputable aux produits d'expérimentation.

6. CONCLUSIONS

En conclusion de cette étude, les deux exemples de copolymères de polysiloxanes et de polyéther que nous avons testés présentent, vis-à-vis de la biomasse marine, une toxicité peu élevée, car pour obtenir une symptomatologie toxique il est nécessaire de s'adresser à des doses très supérieures à celles qui peuvent se rencontrer dans les processus naturels.

En effet, la valeur des seuils toxiques varie de 50 à 10000 $\mu\text{l l}^{-1}$, cette valeur élevée montrant une relative innocuité de ces produits. Néanmoins, au niveau des organismes planctoniques, ces deux produits présentent des seuils assez bas (66 à 50 $\mu\text{l l}^{-1}$), ce qui induirait un danger potentiel pour l'écosystème marin en cas de pollution accidentelle.

En outre, ces deux produits, de composition chimique et d'utilisation très proches, se comportent différemment vis-à-vis des divers organismes marins: le produit B 8884 est plus toxique sur les crabes et les échelons planctoniques que le produit MH 101, tandis que ce produit MH 101 a une plus forte action sur les échelons planctonophages (moules), les vers et les poissons. De même, le produit se révélant le plus toxique est celui qui est le plus accumulé dans les tissus, bien qu'il semble y avoir, de la part des organismes, une réponse de protection empêchant une trop grande accumulation dans les tissus.

En ce qui concerne la toxicité induite, ces composés siliconés se comportent comme des polluants rémanents. Les capacités d'accumulation sont alors multipliées par un facteur pouvant aller jusqu'à 150. Mais, il faut noter, dans ces phénomènes de transfert et d'accumulation, que ces concentrations ne semblent pas toxiques, et qu'il n'y aurait donc pas de transmission d'effets nocifs jusqu'au consommateur final.

Les études histopathologiques, quant à elles, montrent que ces deux composés siliconés ont une action similaire sur les organismes marins étudiés. Cette action se situe sur les branchies des moules et le foie des poissons benthiques, elle est indétectable chez les poissons pélagiques. Globalement, aucune lésion irréversible n'est provoquée par l'un ou l'autre de ces composés.

En conclusion, il semble que ces deux exemples de composés organosiliconés aient des effets peu toxiques sur la biomasse marine. Néanmoins, ils induisent chez les organismes marins certaines réponses physiologiques (bioaccumulation, infiltration lipidique des hépatocytes) qui ne sont pas à négliger.

7. REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier P. STROMBONI, M. COLLET-PLANAS et A. LAFTAS pour leur collaboration technique.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Aubert, M., R. Charra et G. Malara (1969), Etude de la toxicité de produits chimiques vis-à-vis de la chaîne biologique marine. Rev.Int. Océanogr.Méd., 13-14:45-72.
- Aubert, M. (1972), Pollutions chimiques et chaînes trophodynamiques marines. Rev.Int.Océanogr.Méd., 28:9-25.
- Aubert, M. et J. Aubert (1973), Pollutions marines et aménagement des rivages. Rev.Int.Océanogr.Méd., Suppl., 309 p.
- Aubert, M., F. Laumond, M. Barelli, D. Puel et R. Bittel (1975), Techniques de mesure de bioconcentration de nombreux polluants à travers des chaînes trophiques reconstituées. Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux, 381-382:1-7.
- Aubert, M., J. Aubert, H. Augier et C. Guillemaut (1985), Study of some silicon compounds in relation to marine biological chains. Chemosphere, 14(1):127-138.
- Firmin R., C.L. Frye et A.J. Raum (1984), The environmental impact of organo-silicon compounds on the aquatic biosphere. Ecotoxicol.Test.Mar.Environ., 1:591-624.
- FAO/WHO (1975), Expert committee on food additives. FAO/WHO Food additives ser., 1974, n° 6 Rome, Geneva, 168-174.
- Hobbs, E.J., M.L. Keplinger et J.C. Calandra (1975), Toxicity of polydimethylsiloxane in certain environmental systems. Environ Res., 10:397-406.
- Maggi, P. et C. Alzieu (1977), Etude de la nocivité d'huile polydimethylsiloxane à l'égard d'organismes marins. Bull.Inst.Pêches Marit. Nantes, 269:1-3.
- OMS Série "Additifs alimentaires" (1974), Evaluation toxicologique de quelques colorants, enzymes, exaltateurs d'arômes, épaississants et certains autres additifs alimentaires. 6:1-3.
- Smith, A.L. (1976), Analysis of silicones. Chemical analysis. Wiley Interscience Publications, Londres, 41:73-81 et 349-361.
- Street, J.R. (1984), Assessment of biodegradability in the marine environment. Ecotoxicol.Test.Mar.Environ., 2:491-510.

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF MARINE ORGANISMS AS DETECTORS
AND MONITORS OF MARINE POLLUTION

by

E. NEVO, B. LAVIE and R. BEN-SHLOMO

Institute of Evolution,
University of Haifa, Israel

1. INTRODUCTION

The effects of various pollutants on the genetic structure of marine organisms is just beginning to be appreciated (Beardmore *et al.*, 1980; Berry, 1980 and references therein) and critically investigated (Nevo *et al.*, 1977, 1978, 1981a, 1981b, 1983, 1984, 1986, 1987; Nevo 1986 Baker *et al.*, 1985; Lavie and Nevo 1986, 1987;). This situation contrasts with that known in terrestrial plants, where quick evolution and dynamic genetic differentiation of populations associated with heavy metal tolerance (Hg, Ni, Pb, Zn, Cu) has been known for some time (Bradshaw, 1970).

The relatively low concentration of heavy metals in open sea water may be accumulated in sea bed sediments and in organisms to levels as high as 10^4 - 10^6 times above the ambient level. Such bioaccumulation may reach levels unacceptable in seafood and affect critically the activity of enzymes (Mildvan, 1970; Christensen, 1971/1972), their metabolism (Brown and Newell, 1972; Coombs, 1974) and also cause the evolution of resistance to heavy metal toxicity (Russel and Morris, 1970; Bryan and Hummerstone, 1973). Therefore it is of paramount importance to follow the biological effects of heavy metal pollution on marine organisms and explore the genetic basis of physiological adaptation to toxicity.

Marine organisms have been suggested as biological monitors of marine pollution (Bryan and Hummerstone, 1973; Schultz-Baldes, 1974; Disalvo *et al.*, 1975; Grassle and Grassle, 1976; Phillips, 1976; Akesson, 1980; Battaglia *et al.*, 1980; Viarengo *et al.*, 1980/1981). The great importance of such biological monitors notwithstanding, it is of critical importance also to utilize genetic monitors. We are interested not only in the toxic and mortality influences of pollutants on the physiology of organisms but also in the effects of the pollutants on the pattern of genetic diversity within and between populations, which is the basis of adaptive evolution. The objective of the present study was to assess the effects of inorganic and organic pollutants on the genetic structure of diverse marine organisms. Our ultimate goal was to utilize marine organisms as detectors and monitors of marine pollution. Here we present evidence supporting in principle the idea that the population genetic structure of marine organisms could indeed be usefully utilized for safeguarding and improving the quality of the marine environment.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Species tested

The shrimp Palaemon elegans and the marine gastropods Monodonta turbinata and M. turbiformis are widespread and abundant species of the marine littoral zone along the Mediterranean coast. These species were chosen because of their abundance and their small size, which permitted the testing of relatively large samples.

2.2 The pollutants

Heavy metals:

CuCl₂, ZnCl₂, PbCl₂, HgCl₂ and CdCl₂

Organic:

Detergent and crude oil. The nonionic detergent used was the commercially available Marlophen 89 (Hülls, West Germany). This product is a nonylphenol ethoxylate having an approximate molecular weight of 643, the molar ratio between the ethylene oxide and the nonylphenol being 9.55:1 respectively. This nonionic detergent is of the "hard" type, that is, resistant to biological degradation.

The crude oil used ("Sonol 2", obtained from the Israeli Oil Refineries Ltd. in Haifa) had the following specifications:

Density at 15°C: 0.9152

Distillation Range (%wt): up to 150 °C, 8.3%; 150-250 °C, 17.7%;
250-400 °C, 21.2%; Res. 400 °C, 51.9%

Kinematic Viscosity: at 122°F, 15.88cP.

Total Sulphur (%wt): 1.4

Salt PTB: 11

Water (%V): 0.05

Carbon Residue (%wt): 5.3; Asphaltenes (%wt): 0.8.

2.3 Laboratory experiments

Samples of hundreds of individuals from each of the three species were collected near Shikmona, an unpolluted site, south of Haifa Bay, and introduced in batches of 25-150 individuals into partly filled aquaria, of 80 litres capacity (70 x 30 x 40 cm) at the Institute of Evolution, University of Haifa. Fresh sea water for the experiments was pumped from 30m depth at the Shikmona National Institute of Oceanography. Conditions in all aquaria were identical (22 °C, pH = 8.1, constant aeration and no food was provided). The duration of the test varied, depending upon the concentrations of pollutants (Tables I and II). All tests conducted simultaneously were matched with one control. Survival in the controls was almost always 100%; otherwise, all experiments were discarded. The experimental organisms were observed daily; dead animals were removed and deep frozen (-80°C) as were all survivors at the termination of the tests. Both dead and live animals were subjected to electrophoresis, 1,692 individuals of P. elegans analyzed for phosphoglucomutase (PGM) variation and representative samples of 3,672 individuals of Monodonta belonging to the two species, for phosphoglucose isomerase (PGI) variation.

2.4 Exploration and verification in nature

We focused our testing on mercury pollution, because along the Israeli Mediterranean Coast, the Akko site is highly polluted due to the industrial discharge, whereas elsewhere along the coast, the waters are relatively mercury-free.

Table II

Differential survivorship of PGM allelic isozyme genotypes in the shrimp Palaemon elegans caused by two heavy metal pollutants (Zn, Cd).

Genotype	ZnCl ₂ 0.12-0.32 g l ⁻¹		CdCl ₂ 0.04 g l ⁻¹	
	Live (%)	Dead (%)	Live (%)	Dead (%)
F F	3.60	4.70	4.14	4.54
F M	21.95	19.23	24.83	16.88
F S	8.93	12.03*	11.72	16.23
M M	24.08	24.60	26.90	25.32
M S	30.46	28.41	20.69	22.73
S S	8.81	7.37	9.66	9.09
F+F	0.40	0.00	0.00	0.00
F+M	0.31	0.60	0.69	2.60
F+S	0.00	1.03	0.69	0.00
F+S-	0.14	0.00	0.00	0.00
F S-	0.00	0.20	0.00	0.00
M S-	0.84	1.45	0.69	1.95
S S-	0.43	0.00	0.00	0.65
No. of individuals	716	677	145	154
No. of tests	28		6	

* P < 0.05 (Wilcoxon's Signed-Rank test)

We tested electrophoretically PGM variation in 341 individuals from seven populations of the shrimp P. elegans and PGI variation in 192 individuals from three populations of the marine gastropod M. turbinata. In both species we compared allozyme frequencies in the non-polluted versus the polluted Akko site. The mercury concentration at Akko and in two sites north and south of Akko are given in Fig. 3 (Roth and Hornung, 1977).

2.5 Electrophoretic analysis

Whole frozen animals were homogenized and studied by horizontal starch gel electrophoresis (Selander et al., 1971). The PGI of Monodonta consists of two alleles in each species designated S and M for slow and medium in M. turbinata and M and F for medium and fast migrating allelic isozymes in M. turbiformis, recombining into three genotypes in each species. The PGM of P. elegans consists of five alleles designated S-, S, M, F, and F+ for slow, medium and fast migrating allelic isozymes. These recombine into 15 genotypes, 5 homozygotes and 10 heterozygotes. Genotypic and allelic frequencies were calculated directly from electrophoretic analysis of the frozen live and dead animals.

2.6 Biochemical study of PGM polymorphism

We investigated in vitro the effect of six heavy metals on the PGM extracted from individuals of the six most common genotypes (Pontecorvo et al., 1983). The allozymes were partially purified and characterized, by Km and Vmax values for glucose-1-phosphate (G1P) and glucose 1,6-diphosphate (G1,6P2) and by the activity dependent on pH and on Mg concentration.

3. RESULTS

3.1 Laboratory experiments

3.1.1 PGI in *Monodonta turbinata* and *M. turbiformis* (Fig. 1, Table I)

3.1.1.1 Heavy metal pollution

Significant differential survivorship was found among genotypes in all the pollution tests except for *M. turbiformis* in Zn pollution, which was excluded from Table I. However, survivorship varied among pollutants. For example, MM, the only genotype shared by both species, was significantly favoured in Cd but not favoured in Cu in a parallel fashion in both species. Similar differential selective patterns occurred for FM and MS. The MM homozygote was by far the most favoured genotype in most pollutants, whereas the other four genotypes showed tolerance in only two pollutants each.

Differential patterns of survivorship of heterozygotes also displayed a parallel genetic pattern in both species of either higher (in Pb and Cu pollutions) or lower (in Cd, Zn, Hg) viability (Table I and Fig. 1).

The parallel genetic pattern of both species was observed not only in genotypic, but also in allelic profiles. Selection acted primarily for the M allele, but even in the only case (Cu) when selection acted against M, the same trend was observed in both species.

Each of the five pollutants generates a characteristic response profile for the five genotypes. For example, Cu is characterized by +(FF, FM, MS, SS) and -(MM). In sharp contrast, Hg is characterized by +(MM, FF) and -(FM, MS, SS), Zn in *M. turbinata* by +(MM, SS) and -(FF, FM, MS). Thus, the characteristic response of genotype profiles, associated with specific pollutants, may prove to be diagnostic for the detection of specific pollutants.

The extent of pollution poisoning varied among pollutants. Thus, while four genotypes were not favoured by Hg, only one was selected against by Cu.

3.1.1.2 Detergent and crude oil pollution

a) Detergent. The nonionic detergent appears to select against the SS genotype in *M. turbinata*. This is true for all six experiments and the result is significant by the sign test (Siegel, 1956); ($P=0.031$). It should be noted that the allozyme SS which was selected against in *M. turbinata* is absent in *M. turbiformis*. In *M. turbiformis* five out of six experiments showed higher FM frequency among the dead (by the sign test, $P=0.218$). Testing the null hypothesis that there is no differential viability in *Monodonta* (including the two species) due to detergent, the chi square of the combined probabilities of the two separate significance tests was:

$$\chi^2 = 9.99; P < 0.05 \text{ (Sokal and Rohlf, 1969)}$$

(4)

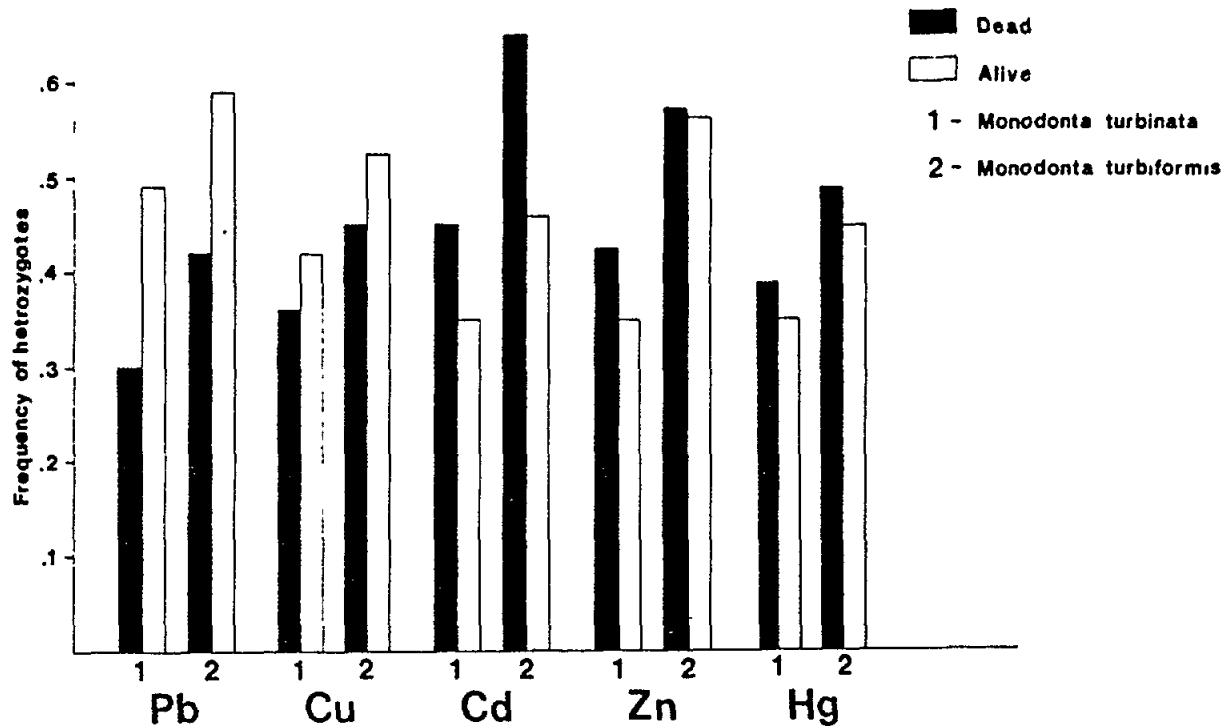


Fig. 1 Differential survivorship of heterozygotes of phosphoglucose isomerase (PGI) of *Monodonta turbinata* and *M. turbiformis* in five pollutants

b) Crude oil plus nonionic detergent. In all six experiments of *M. turbinata* the MM was higher in frequency among the live, and MS showed a higher frequency among the dead animals. For *M. turbiformis* in eight out of nine experiments there was a higher proportion of FF among the live specimens. Both results are statistically significant (sign tests, $P < 0.05$). In the oil detergent experiments the main effect observed was the synergism of the two pollutants but it is not surprising that, although not significant, the presence of the detergent is felt, displaying similar trends to those that resulted from the detergent solution alone: a higher proportion of SS among the dead in *M. turbinata* and a higher proportion of FM among the dead in *M. turbiformis*.

3.1.2 PGM in Palaemon elegans (Figs. 2 and 3, Table II)

We found the following patterns of response: FF, MM and FM were not favoured in increasing Hg concentration; MS was favoured in midranges of Hg (0.02-0.20 ppm), and MM was not favoured at mid Hg ranges but distinctly favoured at higher concentrations (Fig. 2). Following are our results concerning Zn and Cd pollution of the same PGM system (Table II).

The overall allelic frequencies of the 13 genotypes are significantly different in the live and dead animals in the highest Zn concentration, 0.32 gr l⁻¹ (chance chi square to $X^2 = 13.02$; $P < 0.05$).

In both Zn and Cd pollutions, FM was favoured and FS was not favoured. No distinct differences were found for MS, FF, and MM, but SS appears higher in the live individuals at the highest Zn concentration. All other genotypes are too rare to generalize.

3.2 Exploration and verification in nature

The data presented indicate that the heterozygote MS of PGM in P. elegans and the homozygote MM of PGI in M. turbinata, previously shown to be mercury tolerant in laboratory experiments, displayed their highest frequencies at the mercury-polluted Akko site (Figs. 3 and 4). Also the most sensitive genotype MS of PGI in Monodonta displayed its lowest frequency at the same site. We analyzed the data by focusing on the major comparison between frequencies of tolerant allozyme genotypes at the Akko site as opposed to all other non-polluted sites. The two independent-significance tests (Bailey, 1959), gave $P = 0.089$ of Palaemon and $P = 0.090$ for Monodonta. Each test alone is approaching significance level. Pairwise comparisons between sites were insignificant.

We conclude that allozyme frequency distributions found in nature were consistent with the expectations of laboratory tests. We suggest that mercury selection operates in nature on allozyme genotypes of these marine organisms along patterns similar to those found in the laboratory.

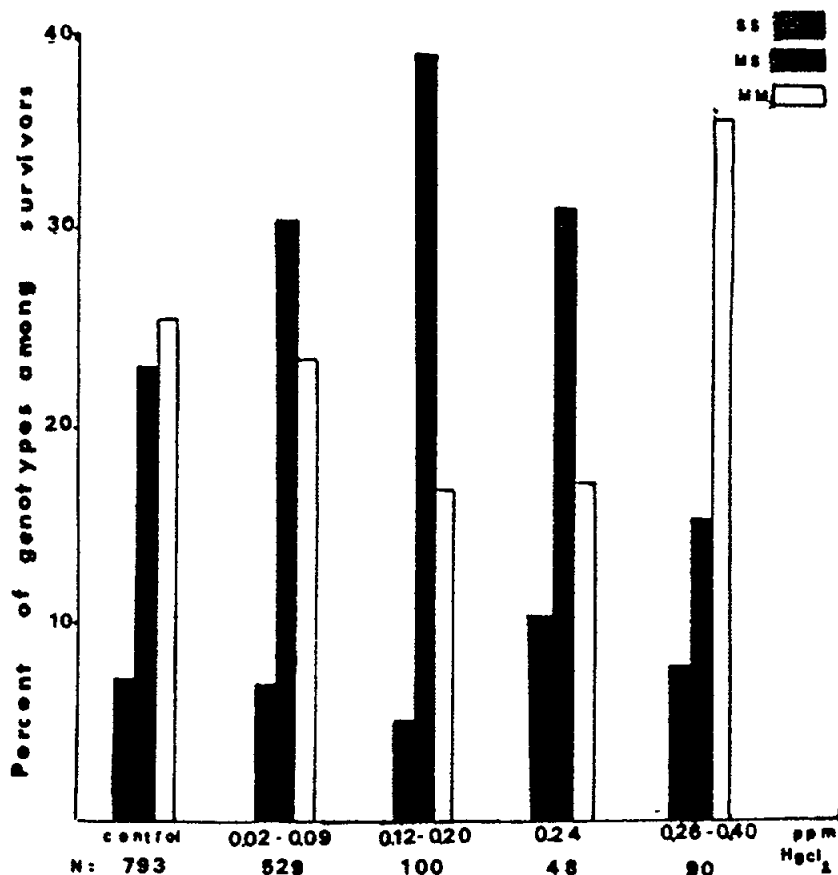


Fig. 2 Differential survivorship of three PGM genotypes of Palaemon elegans as a function of increasing concentration of HgCl₂

3.3 Biochemical study (Pontecorvo et al., 1983)

The activity of PGM and PGI was inhibited in vitro when the staining reaction contained the pollutants used in our experiments. This was true both in Palaemon and in Monodonta. In Palaemon PGM, no significant differences were found in Km and Vmax values for GlP and Gl,6P2 and in the activity dependent on pH and on Mg concentration. Instead, the following different effects on genotypes of the heavy metals tested have been observed:

- (i) Cadmium and Copper at high concentration (40 ppm) strongly inhibited the PGM-M allozyme, whereas in the range of concentration 0.8 - 0.02 ppm they had an activator effect; these two metals did not have any significant effect on the other allozymes PGM-F and PGM-S;
- (ii) Mercury inhibited all the allozymes and the inhibition was dependent upon the concentration. It is interesting to note that the enzyme from heterozygotes MS was more inhibited than the enzyme from the two homozygotes MM and SS;
- (iii) Zinc at high concentration inhibited mainly the PGM-M allozyme and at low concentrations had an activator effect on the same allozyme only;
- (iv) Lead and Manganese had an inhibitory effect at high concentrations on the M allozyme, the only one tested.

Of all the allozymes studied, it is mainly the PGM-M which is very easily modulated by all metals tests. The behaviour of the enzyme from a heterozygous genotype is sometimes in the same direction as the two pure allozymes, sometimes intermediate or even completely different. This can be explained on the basis of different affinity, in addition to different sensitivity, to heavy metals of the two allozymes coexisting in the heterozygote. In conclusion, these effects of heavy metals in vitro can be related to the population data and can offer a biochemical basis to the maintenance of PGM polymorphism in Palaemon elegans.

4. DISCUSSION

If the changes in allozyme frequencies of organisms are indeed sensitive to and vary adaptively with the level and type of pollutant(s), as indicated in the studies reported here, then such changes of resistance to toxicity can be explored and used as a promising biological indicator of pollution (Luoma, 1977; Battaglia et al. 1980; Beardmore, 1980; Beardmore et al., 1980; Lavie and Nevo, 1982; Lavie et al., 1984; Nevo et al., 1981a, 1981b and 1983).

The results of our pollution studies show positive supporting evidence indicating that different allelic isozymes in either PGM or PGI display differential tolerance to specific pollutants (Tables I and II). Thus, for example, at the PGM locus, MM displays a high tolerance to Hg pollution but a lower tolerance to Zn and Cd. Likewise, at the PGI locus, MM displays a high tolerance to Hg, Cd, Pb and Zn pollution but a significantly low tolerance to Cu pollution. Similar additional examples are shown in the Tables. These differential patterns indicate the adaptive nature of the allelic isozymes studied, since neither migration nor genetic drift are involved in our analysis. Consequently, they provide the qualitative and quantitative basis for detecting and monitoring marine pollution. Further, genetic analyses at specifically polluted sites in the sea confirm the patterns found in the laboratory and biochemical tests unveiled the molecular basis of the selective mechanisms involved.

The results of our pollution studies suggest that a monitoring system based on changes in population genetic structure is not only theoretically commendable but practically feasible. This conclusion is supported by the rapid and precise genetic changes that follow the effect of pollution.

Ideally, using in situ populations of different marine species, specific genetic loci, either singly or in combination, may prove sensitive to different pollutants and would be easily assayed by relatively quick and easy electrophoretic tests. Such direct genetic monitoring may become an indispensable tool, sometimes preferable (Luoma, 1977) to the chemical ones used routinely (Toribara et al., 1977) as it alerts us to both the short- and long-term genetic changes that populations undergo before their final extermination as a result of pollution. An extensive and systematic search for the appropriate enzymatic systems in various sedentary marine organisms exposed to a variety of pollutants is therefore of prime importance. It is urgent to find the optimal species and enzyme variants to assess pollution effects both quantitatively and qualitatively and put them into use to safeguard the quality of the marine environment.

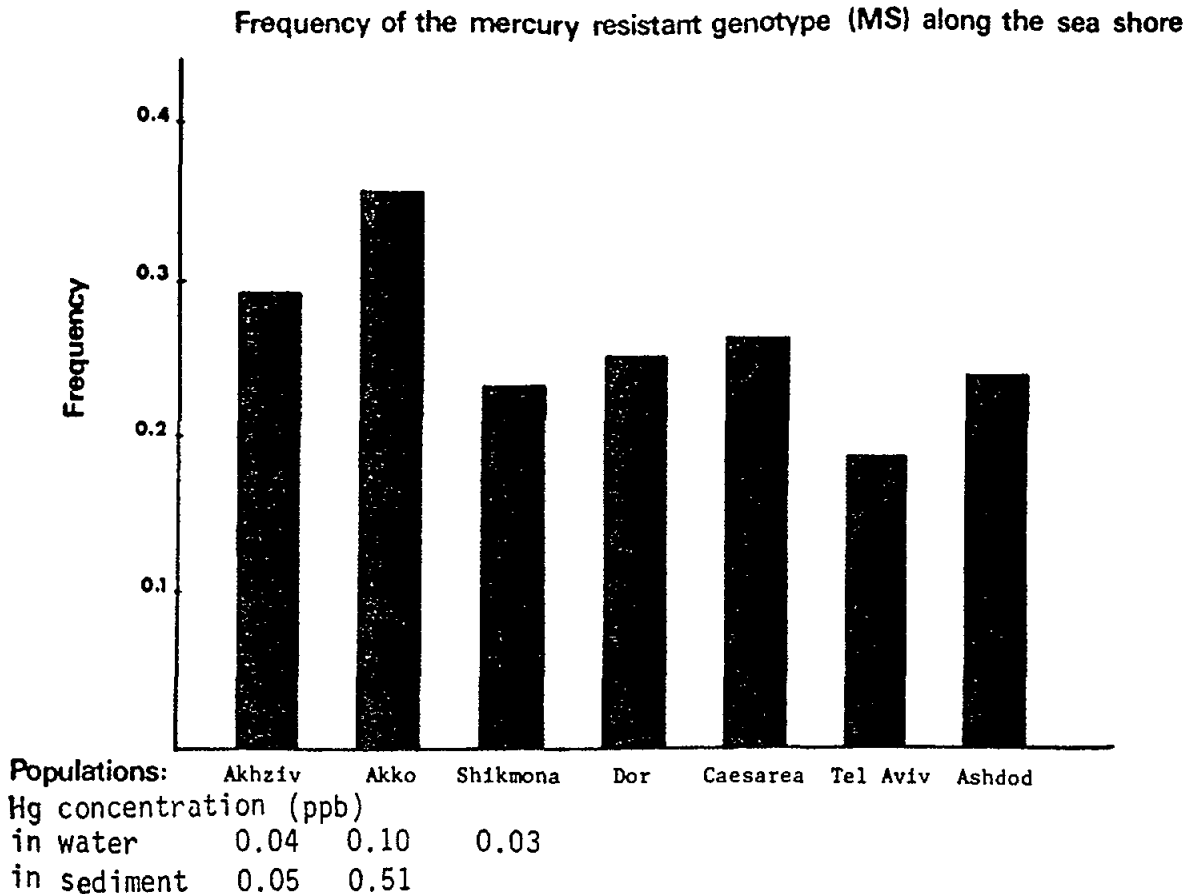


Fig. 3 Frequency of the mercury resistant genotype (MS) of P. elegans along the sea shore

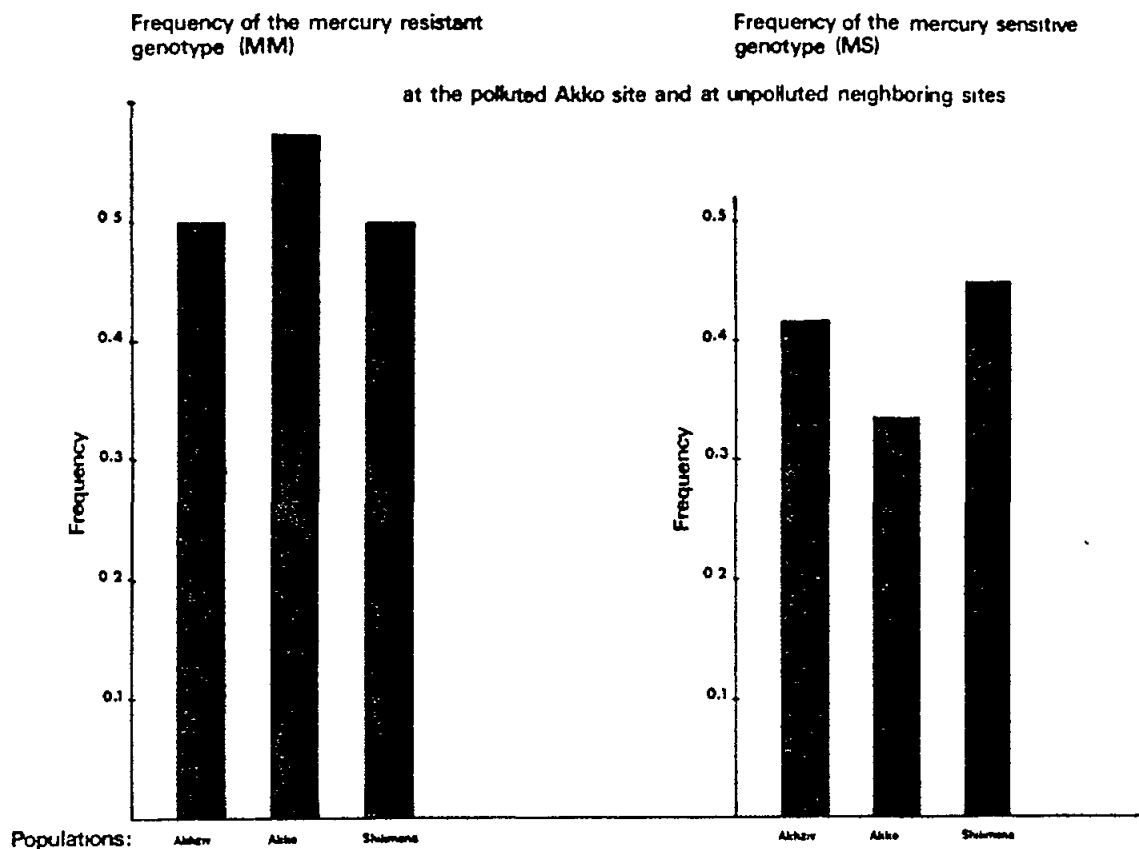


Fig. 4 Frequency of the mercury resistant genotype (MM) and mercury sensitive genotype (MS) of Monodonta turbinata at the polluted Akko site and at unpolluted neighbouring sites

5. ACKNOWLEDGEMENT

We thank Shimeon Simson for field and laboratory assistance and wish to extend our deep gratitude to FAO/UNEP, to the Israel Discount Bank Chair of Evolutionary Biology and to the "Ancell-Teicher" Research Foundation for Genetics and Molecular Evolution established by Florence and Theodore Baumritter, for financial support.

6. REFERENCES

- Akesson, B. (1980), The use of certain polychaetes in bioassay studies. Rapp.P.-V.Réun.CIEM., 179:315.
- Bailey, N.Y.Y. (1959), Statistical methods in biology. London. English Univ. Press, pp. 38-39.
- Baker, R., B. Lavie and E. Nevo (1985), Natural selection for resistance to mercury pollution. Experientia, 41:697-699.

- Battaglia, B., P.M. Bisol, V.U. Fossato and E. Rodino (1980), Studies on the genetic effect of pollution in the sea. Rapp.P.-V.Réun.CIEM., 179:267-274.
- Beardmore, J.A. (1980), Genetical considerations in monitoring effects of pollution. Rapp.P.-V.Réun.CIEM., 179:258-266.
- Beardmore, J.A., C.J. Barker, B. Battaglia, J.F. Payne and A. Rosenfield (1980), "The Use of Genetical Approaches to Monitoring Biological Effects of Pollution" (Genetics Panel Report). Rapp. P-V.Réun.CIEM., 179:299-305.
- Berry, R.J. (1980), Genes, pollution and evolution. Rapp.P.-V.Réun.CIEM., 179:253-257.
- Bradshaw, A. (1970), Pollution and plant evolution. New Scientist, 17:497-500.
- Brown, B.E. and R.D. Newell (1972), The effects of copper and zinc on the metabolism of the mussel Mytilus edulis. Mar.Biol., 16:108-118.
- Bryan, G.W. and L.G. Hummerstone (1973), Adaptation of the polychaete Nereis diversicolor to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. J.Mar.Biol.Assoc.UK, 53:839-857.
- Christensen, G.M. (1971/1972), Effects of metal actions and other chemicals upon the in vitro activity of two enzymes in the blood plasma of the white sucker, Catostomus commersoni (Lacepedae). Chem.Biol.Interact., 4:351-361.
- Coombs, T.L. (1974), The nature of zinc and copper complexes in the oyster Ostrea edulis. Mar.Biol., 28:1-10.
- Disalvo, L.H., H.E. Guard and L. Hunter (1975), Tissue hydrocarbon burden of mussels as potential monitor of environmental insult. Environ.Sci.Technol., 9:247-251.
- Grassle, J.P. and J.F. Grassle (1976), Sibling species in the marine pollution indicator Capitella (Polychaeta). Science (Wash.), 192:567-569.
- Lavie, B. and E. Nevo (1982), Heavy-metal selection of phosphoglucose isomerase allozymes in marine gastropods. Mar.Biol., 7:17-22.
- Lavie, B., E. Nevo and U. Zoller (1984), Differential viability of phosphoglucose isomerase allozyme genotypes of marine snails in nonionic detergent and crude oil-surfactant mixtures. Environ.Res., 35:270-6.
- Lavie, B. and E. Nevo (1986), Genetic selection of homozygote allozyme genotypes in marine gastropods exposed to cadmium pollution. Sci.Tot.Environ., 57:91-98.
- Lavie, B. and E. Nevo (1987), Differential fitness of allelic isozymes in the marine gastropods, Littorina punctata and Littorina neritoides, exposed to the environmental stress of the combined effects of cadmium and mercury pollution. Environ.Manag., 11(3):345-349.
- Luoma, S.N. (1977), Detection of trace contaminant effects in aquatic ecosystems. J.Fish.Res.Board.Can., 34:436-9.

- Mildvan, A. (1970), Metals in enzyme catalysis. In Enzymes Kinetics and Mecnanism. New York, Academic Press, pp. 445-536.
- Nevo, E. (1986), Pollution and genetic evolution in marine organisms: Theory and practice. In: Environmental Quality and Ecosystem Stability, Vol. IIIA/B. Z. Dubinsky and Y. Steinberger (eds.). Bar Ilan Univ. Press, Ramat-Gan, Israel, pp. 841-848.
- Nevo, E., T. Shimony and M. Libni (1977), Thermal selection of allozyme polymorphisms in barnacles. Nature (Lond.), 267:699-701.
- Nevo, E., T. Shimony and M. Libni (1978), Pollution selection of allozyme polymorphisms in barnacles. Experientia, 34:1562-4.
- Nevo, E., T. Pearl, A. Beiles, D. Wool and U. Zoller (1981a), Genetic structure as a potential monitor of marine pollution. Journ.Etud.Pollut.CIESM., 5(1980):61-68.
- Nevo, E., T. Pearl, A. Beiles and D. Wool (1981b), Mercury selection of allozyme genotypes in shrimps. Experientia, 37:1152-4.
- Nevo, E., B. Lavie and R. Ben-Shlomo (1983), Selection of allelic isozyme polymorphisms in marine organisms: pattern, theory and application. In Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. Vol. 10: Genetics and Evolution Ed. M.C. Ratazzi, J.G. Scandalios and G.S. Whitt, New York, Alan R. Liss, Inc., pp. 69-92.
- Nevo, E., R. Ben-Shlomo and B. Lavie (1984), Mercury selection of allozymes in marine organisms: Prediction and verification in nature. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:1258-9.
- Nevo, E., R. Noy, B. Lavie, A. Beiles and S. Muchtar (1986), Genetic diversity and resistance to marine pollution. Biol.J.Linn.Soc., 29:139-144.
- Nevo, E., B. Lavie and R. Noy (1987), Mercury selection of allozymes in marine gastropods: Prediction and verification in nature revisited. Environ.Monitor.Assess., 9:233-238.
- Phillips, D.J.H. (1976), The common mussel Mytilus edulis as indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. II. Relationships of metals in the mussel to those discharged by industry. Mar.Biol., 38:56-80.
- Pontecorvo, G., E. Nevo, L. Gaudio and M. Carfagna (1983), Biological studies of phosphoglucomutase polymorphism adaptive value in the shrimp Palaemon elegans. Atti Associazione Genetica Italiana, 29:197-8.
- Roth, I. and H. Hornung (1977), Heavy metal concentrations in water sediments and fish from Mediterranean coastal area, Israel. Environ.Sci.Technol., 11:265-9.
- Russel, G. and O.P. Morris (1970), Copper tolerance in the marine fouling alga Ectocarpus siliculosus. Nature (Lond.), 228:288-9.
- Schultz-Baldes, M. (1974), Lead uptake from sea water and food, and lead loss in the common mussel Mytilus edulis. Mar.Biol., 25:177-93.

- Selander, R.K., M.H. Smith, S.Y. Yang, E.W. Johnson and G.B. Gentry (1971),
Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. I.
Variation in the old field mouse (Peromyscus polionotus), Univ. Texas
Publ., 7103:49-90.
- Siegel, S. (1956), Nonparametric Statistics for the Behavioural Sciences.
New York, Acad. Press, pp. 312.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf (1969), Biometry. San Francisco, Freeman. pp. 776.
- Toribara, T.Y., J.R. Coleman, B.E. Dahneke and I. Feldman (1977),
Environmental Pollutants. New York, Plenum Press. pp. 500.
- Viarengo, M.P., G. Mancinelli, R. Capelli and M. Orunesu (1980/1981), Effects
of copper on the uptake of amino acids on protein synthesis and on ATP
content in different tissues of Mytilus galloprovincialis Lam.
Mar. Environ. Res., 4:145-52.

TOXICITY OF POLLUTANTS TO MARINE ORGANISMS:
PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES

by

Mirjana OZRETIC

"Rudjer Boskovic" Institute
Center for Marine Research
Rovinj, Yugoslavia

A B S T R A C T

Former investigations concerned physiological and biochemical changes in representative Adriatic organisms under the effect of sublethal concentrations of phenol, cyanides and mercury.

It was shown that grey mullets (Mugil auratus) like other fish are relatively insensitive to phenol and that obvious harmful effects occur only in mg l⁻¹ concentrations. The earliest neurotoxic symptoms were observed in 5 mg phenol l⁻¹. The excited phase was rather short but the changes in plasma were highly significant, particularly as regards the increase of glucose concentration and GOT and LDH activity.

Acute toxicity tests of simple and complex cyanides proved the developing embryo of Mytilus galloprovincialis to be the most sensitive test organism. An increased percentage of abnormalities and retarded growth of veliger larvae was observed at concentration levels beyond 6 ug CN⁻¹. The toxic effect was most pronounced at the highest temperature.

Pretreatment of the shrimps Palaemon elegans with Se reversed the toxicity effects of Hg. In the presence of Se, the retention of both radioactively labelled mercurial forms (²⁰³HgCl₂ and CH₃HgCl) increased in the whole body and hepatopancreas. The effect of Hg was also studied on isolated perfused Carcinus gills. Hg chloride (50 ug Hg l⁻¹) and methylmercury chloride (5 ug Hg l⁻¹) added to the perfusion side reduced TBP from -3 to -4 mV to values close to zero. Both mercurial forms added basolaterally had an effect on chloride influxes which were reduced to 60 % of the control values.

The subcellular Hg distribution in Mytilus galloprovincialis was dependent on the type of tissue and Hg concentration level as well as on the duration of exposure. The proportions of soluble Hg for gills and digestive gland were 25-45 % for laboratory exposed mussels and 3-11 % for field mussels. Of the particulate Hg in the cell, the lowest concentrations were found in the nuclear fraction in controls and in short-term laboratory exposed mussels. In contrast, the majority of Hg was bound to nuclear and mitochondrial-lysosomal fractions in organs of mussels from Kastela Bay.

The distribution of Hg-binding proteins obtained from gel chromatographed cytosol demonstrated that, in both laboratory and environmentally Hg-exposed mussels, Hg was bound largely by high molecular weight proteins (HMW). It was found that 70-85 % of total cytosol Hg in gills and 66-76 % of total cytosol Hg from the digestive gland was associated with these proteins. The induction of Hg-binding proteins in the range of molecular weight corresponding to metallothionein-like proteins (MLP) was observed in the digestive gland of mussels from Kastela Bay and in gills of highly contaminated laboratory mussels, but they contained a smaller fraction of total cytosolic Hg. In control mussels no distinct Hg peak was observed.

1. INTRODUCTION

The identification of small morphological, histological, physiological or ethological changes induced in marine organisms is the first but perhaps the most essential step for understanding the sublethal, long-term effects of pollutants in the marine environment. The detection of sensitive biochemical changes, the study of specific metabolic pathways and the related physiological response to pollution have been recently included in marine ecotoxicological studies. The present investigations focused mainly on finding a satisfactory way to recognize toxicity and the sublethal effects of cyanides, phenol and Hg in representative Adriatic organisms.

Phenols are responsible for the tainting of fresh-water fish flesh and at higher concentrations they act as neurotoxic agents. Data about the sublethal effects of phenol, particularly on marine organisms, are rather scarce. Therefore our investigations dealt with the identification of some physiological and biochemical changes in mullet blood as a consequence of exposure to phenol.

Cyanides are the most toxic constituents among several compounds originating in the waste waters of a petroleum refinery located in Rijeka Bay. The main purpose of our study was to quantify and compare the toxicity of free cyanides as well as that of two unstable cyanide complexes of Cd and Zn on two species of marine invertebrates, in addition to the effect of different temperatures which could modify the tolerance of test organisms to cyanides.

Hg is regarded as one of the most dangerous marine pollutants because of its high toxicity and its presence in anthropogenic inputs. Although the toxicity of Hg to marine organisms has been extensively studied, the mechanisms of its toxicity are still unknown. Therefore, our work focused on the physiological effects, the identification of the presence or the induction of Hg-binding proteins, and the investigation of the subcellular distribution of Hg in the gills and the digestive gland of mussels.

2. MATERIAL AND METHODS

Grey mullets, Mugil auratus Risso, (weight about 125 g, length 22-25 cm) were used as test organisms. The experiments were carried out in a 200 l tank at a temperature of 12 ± 0.5 °C with a constant continuous flowing sea water system (about 1000 l d^{-1}) to which a corresponding quantity of phenol was added with a dosing apparatus. Phenol concentration in experimental basins was determined with the aminoantipyrine method (Ochynski, 1960). The number of heterotrophic "phenolic bacteria" in experimental basins was checked with the inoculation of Bushnell-Heas media containing 150 mg ml^{-1} phenol as the only source of organic carbon.

Mulletts were exposed to various phenol concentrations: 0.5; 5.0; 7.5; 10 and 25 mg ml^{-1} . The exposure time and sampling were determined according to adopted concentrations. Blood samples were taken by heart puncture and several haematological and biochemical parameters were measured: haemoglobin (Hb, standard cyanmethemoglobin), haematocrit (Hct, in heparinized microcapillaries), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), total protein in plasma (Biuret method), total lipids in plasma (colorimetric method), blood sugar (God-period method), glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase (GOT and GPT colorimetric method of Reitman and Frankel, 1957) and lactate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase (LDH and GLDH-activated UV method, Bergmeyer and Bernt, 1974; Schmidt, 1974). The enzyme activity was expressed as International Units (mU ml^{-1}).

Acute toxicity tests of the static type were performed on two species of marine organisms, the blue mussel Mytilus galloprovincialis (embryonic and veliger stages) and a small crustacea called mysids, Leptomysis mediterranea (adult). Natural sea water was used for acclimatization on testing ($s=37-38$ 10^{-3} , $pH=8.2$). NaCN nominal concentrations were prepared by successive dilution of the cyanide stock solution containing 1 mg CN ml^{-1} . Complex metalocyanides of Ca and Zn were obtained by mixing appropriate volumes of the same NaCN stock solution with $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ or $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ stock solutions. Cyanide determination in sea water samples was performed through a continuous system with an amperometric flow-through cylindrical silver electrode developed by Pihlar et al. (1979) and Pihlar and Kosta (1980). This method allows the determination of both free and complex cyanides in waters down to the ug l^{-1} level. Cyanide concentrations in the test medium were recorded daily and the median lethal (LC_{50}) or effective (EC_{50}) concentrations were estimated on the basis of average concentrations within a 48 or 96 hr period.

Oxygen consumption of the tested organisms was determined in closed static system (300 ml Erlenmeyer flash with cut glass stopper) during a short exposure period (6-7 hrs). Oxygen content of the medium was measured by Winkler titration, while consumption was expressed as $\text{ul O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ on a dry weight basis.

Shrimps, Palaemon elegans, and green crabs, Carcinus mediterraneus, were collected for experimental purposes on shores of the Adriatic Sea on the Istrian coast near Rovinj.

The experimental protocol for proceduring with $^{203}\text{HgCl}_2$ and Se has already been published in detail by Lucu and Skreblin (1981, 1982).

The effects of the mercurial compounds HgCl_2 and CH_3HgCl on chloride fluxes and transbranchial potentials (TBP) were studied on isolated perfused Carcinus gill preparations. The gills were perfused with diluted sea water ($500 \text{ mOsmol l}^{-1}\text{P}$) in a solution identical to the external bathing solution. TBP values were measured with a Keithley Instrument 601 Electrometer, supplied with Ag-AgCl Ingold electrodes immersed in 3 M KCl and connected by agar bridges with bathing solution and gill epithelia. Chloride fluxes were traced by radioactive ^{36}Cl . The methodological description of the gill preparation was described in detail by Lucu and Siebers (1986).

Mussels, Mytilus galloprovincialis, used for laboratory exposure to Hg and also as reference controls, were collected from a cultivation place in Limski kanal, Istria, Northern Adriatic. In the first laboratory experiment, mussels were placed in an aquarium with flowing sea water ($s=38.10^{-3}$, $t=9\pm 1$ $^{\circ}\text{C}$) for 33 days and were exposed to 60 ug l^{-1} (nominal concentration) inorganic Hg. In the next experiment, mussels were exposed to 2.5 ul l^{-1} of Hg for 4 days ($t=13$ $^{\circ}\text{C}$). For field studies, mussels were sampled from an area with a known industrial input of Hg, in Kastela Bay, Central Adriatic. Gills and digestive glands were dissected and stored deep frozen until analysed.

For gel chromatography, tissues were prepared by homogenization in 3 vol. of ice cold buffer (20 mM Tris-HCl, $pH=8.6$ and 0.1 mM PMSF) using a glass homogenizer with a motorized teflon pestle, and then centrifugated at 27000 x g for 1 hr. at 4 $^{\circ}\text{C}$.

For isolation of subcellular fractions, 10 % homogenates of gills and digestive gland were prepared in 50 mM Tris-HCl, pH=7.5 with 0.44 M sucrose according to the method of Julsham and Andersen (1983). The nucleus, mitochondria, microsomes and cytosol were separated by differential centrifugation (using a Sorwal superspeed RC-2B and MSE superspeed 40 centrifuges) at 1500, 253300 and 7840000 g min., respectively. Cytosol was ultrafiltered by means of a 2000 mol wt cut-off membrane (Amicon, UM-2) for subsequent chromatography.

To obtain the distribution of Hg-binding proteins, extracts (cytosol) of gills and digestive gland were analyzed by gel chromatography on a calibrated Sephadex G-75 column (2.5 x 70 cm) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH=8.6, at a flow rate of 19.2 ml h⁻¹, at 4 °C. Fractions of 5-7 ml were collected and analyzed for Hg, absorbance at 280 and 254 nm. Total Hg was determined by the method of neutron activation analysis (NAA) or by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) with amalgamation on elemental gold. Using the fact that Hg and Se can be simultaneously determined by NAA, samples of homogenates and extracts were also analyzed for Se content.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 Phenol

It was observed that although a constant dosage was established, the actual concentration of phenol during the experiments was decreased and after a few days it had dropped to 50 % of the initial values. This was due to a rapid proliferation of some "phenolic bacteria", which was demonstrated by the inoculation of water samples from basins containing phenol, into Bushnell-Heas culture media enriched with phenol only. From basins containing 7.5 mg phenol l⁻¹ the number of developing bacterial colonies was about 20 times higher than the control - phenol free - basins; these appeared to be the main type of microorganism population. It was therefore necessary to measure the phenol concentration more frequently (twice a day) and adjust the dosing system in proportion to phenol deficiency.

Characteristic neurotoxic symptoms and gross pathology observations in relation to phenol concentration and exposure time are presented in Table I. Soon after their introduction into basins with 5 mg phenol l⁻¹ mullets were generally excited: fast swimming and faster branchial ventilation were observed, but after less than one day the fish had become conditioned. The first stage of intoxication: excitation followed by a general depression of activity, was noted in fish exposed to 7.5 mg phenol l⁻¹.

Loss of balance, described as the second stage of intoxication (Lukyanenko, 1965) and eventual convulsions as well as progressive lethality were observed at concentrations of 10 and 25 mg phenol l⁻¹. A few hours after their introduction into higher phenol concentrations the gills were evidently damaged and internal hemorrhages with blood coagula in heart cavity, dark liver and gall bladder were observed. Less severe damage involving swollen and dark green gall bladder, dark liver and anaemic kidney occurred also in fish surviving 8 days in 7.5 mg phenol l⁻¹.

The concentration of 0.5 mg l⁻¹ did not induce any evident change in the haematological and biochemical values (Table II), while in fish that were exposed for 4 days to 5 mg phenol l⁻¹ only glucose, LDH and GOT activity in plasma were increased. The LDH increase was temporary and after 8 days it returned to the level of the control group. The most obvious alterations were

Table I

Survival, behavior and gross pathology observations on grey mullets exposed to various phenol concentrations.

Phenol mg l ⁻¹	Exposure	Survival %	Fish behaviour	Gross pathology observations
0.5	8 d	100	normal	no evident changes
5.0	8 d	100	excited, fast swimming	no evident changes
7.5	8 d	90	excited, sensitive to light/later depressed activity	hemorrhagic opercula, lips, dark liver, swollen gall bladder, anaemic kidney
10	5 h	75	losing equilibrium	inflamed gills haemorrhagic viscera, coagula in heart cavity
25	1 h	50	convulsions, suffocation and decease	damaged and inflamed gills, dark liver and gall bladder

observed in groups exposed for 8 days to the sublethal for concentration, 7.5 mg l⁻¹, as well as in the group exposed only for 5 hours to the lethal concentration, 10 mg phenol l⁻¹, and then transferred to clean sea water and successively sampled after 2 and 6 days. In both groups, the haemoglobin and haematocrit were decreased, while MCHC values remained at the same level as the control group. It was supposed that a certain number of erythrocytes had been destroyed and hemoglobin was lost in haemorrhagic organs and tissues and this was confirmed by gross pathology observations. A decrease in Erythrocyte was observed also by Halsband and Halsband (1963) and by Waluga (1966) after exposure of trout and sea bream to subtoxic phenol concentrations. Glucose concentration in the blood was not altered but significant decreases of lactate, proteins, total lipids, triglycerides and cholesterol were observed. Concurrent with the reduction of protein and lipid concentration, the enzyme activity in the plasma was generally increased and correlated positively with both phenol concentration and exposure time. The enzyme activity increase was observed even when haematological changes were not detected. The highest LDH activity was measured immediately after the exposure of mullets, but in a few days it showed a tendency to recover, decreasing towards the control values. On the contrary, the GOT activity increased even during the recovery period. The originally very low GPT activity in plasma increased only after a prolonged exposure (8 days to 7.5 mg phenol l⁻¹) and GLDH activity was also found to be 15 times higher than the control group. The observed enzyme activity increase in plasma could be explained as a consequence of enzyme leaking from the damaged tissues where the enzymes are functionally located as metabolic activity to compensate for the stress induced by phenol intoxication. The latter explanation is compatible with the decreased

concentration of proteins and lipids measured in mullet plasma. The increase of transaminase activity was also observed in pike, Esox lucius (Kristoffersson, 1974), in Notopterus notopterus (Verma et al., 1981), and in Leuciscus idus (Tiedge et al., 1986) exposed to phenol. Recently Gluth and Hanke (1983) found a significant decrease of plasma proteins linked with the decrease of cholesterol. It is not easy to understand such a decrease of plasma proteins and lipids in fish because their presence and functional significance has not yet been clearly explained. As the concentration of lipids decreases at the same time as proteins, plasma dilution with water could perhaps be expected. But there are several pathological processes which can also contribute to the decrease of plasma components: renal damage and excretion through the urine, decreased liver protein synthesis, alterations in hepatic blood flow and/or haemorrhages into the peritoneal cavity and intestine.

3.2 Cyanides

The results of acute toxicity of simple and complex cyanides are summarized in Table III. The developing embryo of M. galloprovincialis (48 h $EC_{50} = 10.6 \text{ ug CN-l}^{-1}$) is the most sensitive test organism, being approximately 15 times less resistant than the straight-hinge veliger larvae of the same species (154 ug CN-l^{-1}). The elevated cyanide concentrations also produced an over-development of the vegetal part of the echinoid embryos (Czihak, 1971) associated with the inactivation of the enzyme cytochrome oxidase responsible for the normal function of cell respiration. Toxic effects of two unstable metalocyanide complexes of Cd and Zn were comparable with the toxic response of simple NaCN from the practical point of view (15 ug CN-l^{-1} and $11.7 \text{ ug CN-l}^{-1}$ respectively). The mysid L. mediterranea was significantly less sensitive to NaCN (48 h $LC_{50} = 88 \text{ ug CN-l}^{-1}$) compared to Cd-cyanide (45 ug CN-l^{-1}), probably because Cd itself contributed to the toxicity of the complex compound. Bearing in mind the relatively high acute toxicity of Cd on L. mediterranea (96 h $LC_{50} = 77 \text{ ug Cd l}^{-1}$, Lucu and Skreblin, unpublished) and the related species Mysidiopsis bahia (96 h $LC_{50} = 15.5 \text{ ug Cd l}^{-1}$, Nimmo et al., 1977) it seems that Cd itself contributes to the toxicity of the Cd-cyanide complex.

The growth of the primary larval shell of M. galloprovincialis is represented by its median length as a function of increasing concentrations of cyanides in the test medium (Fig.1). The most pronounced effect on growth was caused by NaCN beginning with 6.4 ug CN-l^{-1} which produced a significant reduction of about 85 % in shell length in relation to the untreated control larvae (Table IV).

The combined effects of cyanides associated with three different temperatures on developing embryos of M. galloprovincialis as well as adult L. mediterranea were expressed as EC_{50} and the increment of larval shell is presented in Table V. The resulting toxic responses are not easy to explain because the development in the shelled larvae at different temperatures appears to be a time-dependent process. At 20°C it took 48 hours and the toxic effect was more pronounced than at the two lower temperatures tested. Embryogenesis took longer at 7°C and 14°C and the developing early stages proved to be more resistant within 96 and 72 hours respectively. A significantly higher tolerance at lower temperatures was probably associated with the metabolic rate decrease but otherwise evaporation of HCN was also reduced.

Growth inhibition was more pronounced at 20°C and 7°C than at the intermediate 14°C .

Table II

Haematological, biochemical and plasma enzyme activity values
in mullet exposed to various concentrations of phenol.

Phenol mg l ⁻¹	Control	0.5	5.0		7.5	10		25	
Exposure time		8 d	4 d	8 d	8 d	5 h		1 h	
Sampling time		8 d	4 d	8 d	8 d	2 d	6 d	1 h	4 d
Haemoglobin (g 100 ⁻¹ ml)	8.9 (0.9)	9.1 (0.4)	8.9 (0.6)	10.0 (0.4)	5.7< (0.2)	5.3< (0.1)	4.2< (0.2)	8.8 (0.6)	9.0 (0.7)
Haematocrite (%)	36 (5)	38 (1)	40 (2)	48 (4)	28< (3)	26< (2)	22< (1)	41 (3)	37 (3)
MCHC (%)	24	24	22	22	20	20	19	22	25
Glucose (mg 100 ⁻¹ ml)	48 (8)	43 (4)	67> (10)	45 (16)	59> (5)	55 (10)	50 (7)	68> (11)	70> (11)
Lactate (mg 100 ⁻¹ ml)	37 (3)				18< (2)	12< (1)	11< (1)		
Total protein (g 100 ⁻¹ ml)	3.5 (0.3)	3.8 (0.3)	3.5 (0.2)	4.4> (0.5)	1.3< (0.3)	1.7< (0.3)	1.8< (0.3)	3.8 (0.1)	3.5 (0.6)
Total lipids (mg 100 ⁻¹ ml)	1366 (456)				402< (90)	555< (113)	803< (150)	1400 (180)	1004 (365)
Triglycerides (mg 100 ⁻¹ ml)	211 (72)				59< (8)	56< (12)	68< (10)		
Cholesterol (mg 100 ⁻¹ ml)	180 (28)				72< (12)	78< (15)	94< (18)	160 (12)	165 (16)
G O T (mU ml ⁻¹)	14 (3)	18 (7)	53> (20)	55> (14)	328> (72)	165> (63)	275> (62)	53> (11)	180> (71)
G P T (mU ml ⁻¹)	3.0 (0.4)				15> (3.4)	3.2 (0.8)	3.6 (0.2)		3.0 (0.4)
L D H (mU ml ⁻¹)	85 (25)	100 (30)	287> (33)	90 (11)	127 (21)	389> (111)	95 (8)	1335 (635)	328> (110)
G L D H (mU ml ⁻¹)	60 (5.5)				912> (54)				

Control group = 8-10 specimens; phenol groups = 5 specimens; (n) = s.d.; significantly higher (>) or lower (<) from control, p < 0.01

Table III

Summarized results of median effective (EC₅₀) and lethal (LC₅₀) concentrations associated with acute toxicity of cyanides in the form of simple salts NaCN as well as metalocyanide complexes. Both values, one estimated on the basis of nominal (Nom.) concentrations and the other determined by the amperometric method (Det.) are presented.

Exposure time (h)	EC ₅₀ (ul CN l ⁻¹) and 95 % confidence limits		
	NaCN	Cd-cyanide complex	Zn-cyanide complex
Mussel (embryo)			
48 Det.	10.6(10.4-10.8)	15.0(14.5-15.5)	11.7(11.4-12.0)
Nom.	13.5(13.0-14.0)	20.0(19.5-20.5)	20.0(19.5-20.5)
Exposure time (h)	LC ₅₀ (ul CN l ⁻¹) and 95 % confidence limits		
	NaCN	Cd-cyanide complex	Zn-cyanide complex
Mussel (veliger)			
48 Det.	154(125-190)		
Nom.	154(125-190)		
Myside (adult)			
48 Det.	88(82-95)	45(39-54)	94(86-103)
Nom.	98(91-105)	65(58-73)	101(91-112)
96 Det.	37(34-41)	21(18-25)	60(49-74)
Nom.	46(41-51)	22(18-25)	79(61-102)

The adult myside L. mediterranean displayed a similar pattern of temperature-dependent toxicity. At 24 °C the toxic response was more pronounced than at 10 °C and 17 °C, which had approximately the same level of toxic response. Otherwise, the relatively low resistance of S. gairdneri to elevated cyanide concentration added as NaCN into the medium reported by Doudoroff (1976) was probably associated with the decrease in the detoxification rate.

Oxygen consumption of test organisms determined by the Winkler method is presented in Table VI. The estimated values on control/untreated animals were comparable with the respiration rate of related species (Bayne, 1976; Gaudy et al., 1980). Short-time exposure to 50 ug CN l⁻¹ resulted in a significant reduction of oxygen consumption by M. galloprovincialis veliger as well as by L. mediterranea (approximately 65.2 and 64.3 % respectively of the normal respiration rate of control/untreated organisms). At higher cyanide concentrations of 100 ug CN l⁻¹ the effect was even more pronounced. The reduction of oxygen consumption by the above-mentioned organisms should be ascribed to the well-known inactivation of cytochrome-oxydase from the respiratory enzyme system. Evidently, in the developing embryo M. galloprovincialis the toxic response was not distinctly expressed at 95 % probability level.

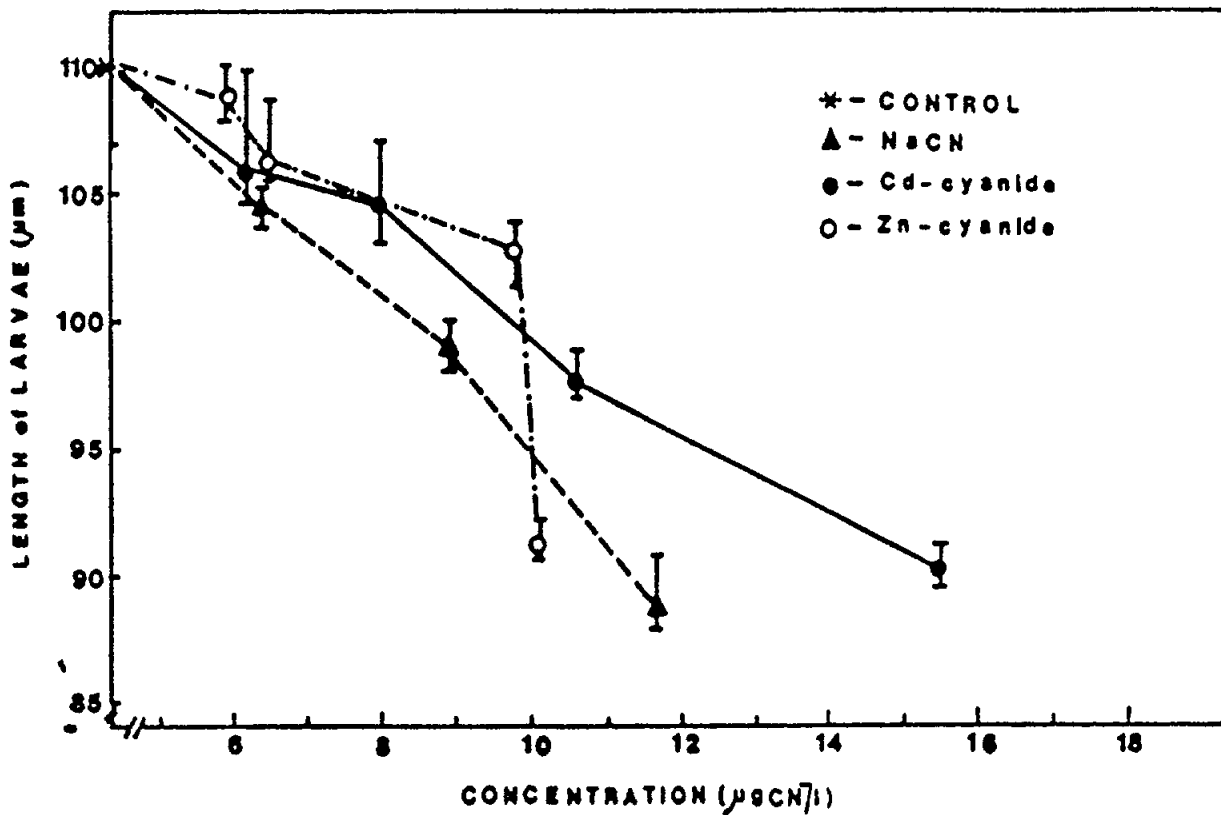


Fig. 1 Effect of CN^- concentration on growth of primary shell of *M. galloprovincialis* larvae in sea-water containing simple and complex cyanides. Length of larvae represents median value with 95 % confidence interval

Table IV

Effect of cyanides (simple NaCN as well as Cd- and Zn-cyanide complexes) on the growth of primary shell of *M. galloprovincialis* straight-hinge) veliger larvae after 48 hrs. of exposure at 20 °C. Concentrations of cyanides were analysed by the amperometric method.

Cyanide (compound)	Concentration (ug CN l ⁻¹)	Median length (um) (95 % conf. limits)	Increment of length (um)	% of control
Control	-	110.4 (107.1-112.0)	40.4	100.0
NaCN	6.4	104.3*(103.8-105.1)	34.3	84.9
	8.9	98.8*(98.0-99.9)	28.8	71.3
	11.7	88.7*(87.8-90.7)	18.7	46.3
Cd-cyanide	6.2	105.9 (104.6-109.7)	35.9	88.9
	8.0	104.5*(102.9-106.9)	34.5	85.4
	10.6	97.7*(97.0-98.7)	27.7	68.6
	15.5	90.2*(89.5-91.1)	20.2	50.0
Zn-cyanide	5.9	108.6 (107.9-109.8)	38.6	95.5
	6.5	106.2 (105.5-107.5)	36.2	89.6
	9.8	102.6*(101.3-103.8)	32.6	80.7
	10.1	91.2*(90.7-92.2)	21.2	52.5

* significantly different from control

Table V

Combined effects of cyanides added to sea water as NaCN at three different temperatures on developing embryos of M. galloprovincialis and adult mysides L. mediterranea.

Temperature (°C)	Time (h)	EC ₅₀ or LC ₅₀ (95 % conf. lim.) ug CN-1 ⁻¹	Length increment (% of control)	
			10 ug CN 1 ⁻¹	15 ug CN 1 ⁻¹
<u>M. galloprovincialis</u> - embryonic development				
7	96	14.7 (14.1-15.3)	68.2	62.8
14	72	14.5 (14.0-15.0)	78.1	72.9
20	48	12.4 (12.0-12.8)	72.6	59.0
<u>L. mediterranea</u> - adult				
10	48	75 (67-83)		
17	48	61 (53-70)		
24	48	43 (38-50)		

Table VI

Oxygen consumption in early development stages of M. galloprovincialis and adult myside L. mediterranea exposed for a 6 to 7 hr. period to sea water containing elevated CN concentrations.

Concentration (ug CN 1 ⁻¹)	Temperature (°C)	Oxygen consumption (ul O ₂ mh ⁻¹ h ⁻¹)	% of control
<u>M. galloprovincialis</u> (embryo)			
control	20	2.8 (2.2-3.4)	100.0
20	20	1.8 (1.3-2.3)	64.3
50	20	2.1 (1.7-2.5)	75.0
<u>M. galloprovincialis</u> (veliger)			
control	20	2.3 (2.1-2.6)	100.0
20	20	2.3 (2.0-2.5)	100.0
50	20	1.5 (1.2-1.7)	65.2
100	20	1.0 (0.6-1.4)	43.5
<u>L. mediterranea</u> (adult)			
control	23	4.6 (4.1-5.1)	100.0
50	23	3.5 (3.0-4.0)	76.1
100	23	2.8 (2.5-3.1)	60.9

3.3 Interaction of Hg and Se in shrimps

Experimental data indicate that the percentage survival of shrimps pretreated for 72 hrs. in sea water with 5 mg SE l⁻¹ before exposure to HgCl₂ was significantly increased compared to control animals that had not been pretreated. The results were compatible with the cumulative mortality delay for the shrimps Palaemon elegans pretreated in 3.99 and 17.5 mg Se l⁻¹, and compared with the single Hg treated group. The increased binding of the high molar ration (Se/Hg=1) was evident (Lucu and Skreblin, 1982). Following Hill (1974) we assumed that the reversal of Hg and Se toxicity occurred through the formation of mercurial-selenite complexes which do not react with sulphhydryl groups in the same way as mercurial or selenite ions alone.

A single dose of Hg chloride or methylmercury from 0.0025 to 0.025 umol Hg g⁻¹ fresh weight was intramuscularly injected into the control shrimps and the group of animals previously treated with equimolar Se concentrations (in Se dioxide form). The specific radioactivity of ²⁰³Hg in the whole body and the hepatopancreas was significantly different in the Se pretreated group than in the control group.

3.4 Effects of Hg on TBP and Cl⁻ fluxes

After the addition of 5 ug Hg (CH₃HgCl) on the basolateral membrane side of the Carcinus gill preparation, TBP values were increased from -3.5 mV to a value close to zero. However, 10 times higher Hg²⁺ concentration of HgCl₂ effected similar changes in the TBP values as in the case of gills treated with methylmercury (Lucu and Siebers, 1986). TBP has been described as an active potential generated by unequal distribution of ions, i.e. Na⁺ and Cl⁻, a consequence of active transport processes. A similar effect of Cu²⁺ on the reduction of positively charged potentials (polarity in the perfusion side in reference to the bathing solution) of a similar magnitude and reversal polarity to the results obtained on the perfused Carcinus gill preparation has been described for teleostean gills by Stagg and Shuttleworth (1982).

Both mercurial compounds inhibited chloride influxes and values were 57-60 % of the control values. Chloride fluxes were also inhibited by specific inhibitor ouabain (Lucu and Siebers, 1986). We assume that Na/K coupled Cl⁻ absorption is a secondary active transport, whereby energy for Cl⁻ transport was apparently provided by a counter ion. Therefore, Na/K exchange sensitive to ouabain which in the present case is damaged by mercurial compounds may affect hypothetical KCl transport mechanisms located on the basolateral membrane side. Further investigations using this technique could provide us with knowledge about the mechanisms of Hg interaction with ionic regulatory processes in marine organisms.

3.5 Subcellular distribution of Hg and Hg-binding proteins in gills and digestive gland of the marine mussel, Mytilus galloprovincialis

Hg and Se concentrations in homogenates and extracts (cytosol) of gills and digestive gland of mussels from field and laboratory experiments are compared in Tables VII and VIII.

The results obtained from the first experiment (February 1984) showed a surprisingly low percentage of Hg extraction (3-4 %) for both mussel organs from the natural environment (Limski kanal and Kastela Bay). In the case of laboratory exposed mussels, the extraction percentages were 10 times higher (34-44 %) for both tissues. Se extraction from gills and digestive glands containing natural levels of Se was similar for all investigated groups and was on an average 45 % (Table VII).

Table VII

Hg and Se concentrations determined by NAA in homogenates and supernatants (cytosol) of gills and digestive glands of mussels. 25 % homogenates were prepared in 20 mM Tris-HCl, pH=8.6 with 0.1 mM PMSF. Supernatants were obtained by centrifugation at 1620000 g min.

Sample		Hg (ug g ⁻¹)	% extract.	Se (ug g ⁻¹)	% extract.
Control organisms (Limski kanal, January 1984)					
Gill	homogenate	0.08		0.33	
	supernatant	0.003	3.8	0.13	39.4
Mussels from natural contaminated area (Kastela Bay, December 1983)					
Gill	homogenate	2.07		0.11	
	supernatant	0.08	3.9	0.05	45.5
Digestive gland	homogenate	3.83		0.27	
	supernatant	0.16	4.1	0.09	33.3
Laboratory exposed mussels (33 days, 60 ug hg l ⁻¹ , February 1984)					
Gill	homogenate	46.53		0.28	
	supernatant	20.55	44.2	0.14	50.0
Digestive gland	homogenate	19.51		0.38	
	supernatant	6.72	34.4	0.20	52.6

In the next series of experiments (March, 1985) which were designed to examine the distribution of the remaining Hg in the cell, almost the same pattern of Hg extraction was obtained (Table VIII), although a different homogenization procedure was used.

Table VIII

Hg and Se concentrations determined by NAA in homogenates and supernatants (cytosol) of gills and digestive gland of mussels. 10% homogenates were prepared in 50 mM Tris-HCl, pH=7.5 with 0.44 M sucrose. Supernatants were obtained by ultracentrifugation at 7840000 g min.

Sample		Hg (ug g ⁻¹)	% extract.	Se (ug g ⁻¹)	% extract.
Control organisms (Limski kanal, March 1985)					
Gill	homogenate	0.00229		0.02	
	supernatant	0.00026	11.3	0.05	25.0
Digestive gland	homogenate	0.00588		0.02	
	supernatant	0.00064	10.8	0.01	50.0
Mussels from natural contaminated area (Kastela Bay, December 1983)					
Gill	homogenate	0.16		0.06	
	supernatant	0.005	3.1	0.02	33.3
Digestive gland	homogenate	0.35		0.08	
	supernatant	0.014	4.0	0.06	75.0
Laboratory exposed mussels (4 days, 2.5 ug Hg l ⁻¹ , March 1985)					
Gill	homogenate	0.14		0.10	
	supernatant	0.064	45.7	0.02	20.0
Digestive gland	homogenate	0.085		0.05	
	supernatant	0.021	24.7	0.02	40.0

It is interesting to note that both groups of laboratory exposed mussels show a very similar percentage of Hg extraction, in spite of the great difference in their tissue burden. On the other hand, comparing tissues with similar Hg contents (gill; 4 days laboratory exposure, and Kastela Bay, February, 1985) it can be seen that the extractable Hg in cytosol of short-term exposed mussels was ten times more than that from the long-term exposed mussels. It seems that following short-term exposure Hg first enters the cytosolic compartment of cells. During long-term exposure the intracellular redistribution of Hg is possible, similar to inter-organ redistribution. It is known that the gills are the primary site of uptake for Hg, and the digestive gland has a function in trace metal storage. In accordance with this, Hg concentrations found in the gills for laboratory exposed mussels (in both experiments) were greater in comparison with the digestive gland. Inversely, in natural long-term exposed mussels greater Hg concentrations were found in the digestive system (Tables VII-IX).

Hg concentrations in subcellular fractions of gills and digestive gland are shown in Table IX. The only purpose of this experiment was to give an approximate picture of intracellular localization of Hg and therefore the tedious purification and characterization of the subcellular fractions were omitted. From the results obtained it is seen that the subcellular distribution of Hg depended on the type of tissue as well as on exposure conditions, and thus it is difficult to generalize about Hg behaviour. Nevertheless, according to the results obtained it can be observed that mussels from an unpolluted environment and from short-term laboratory exposure possessed the lowest Hg concentration in the nuclear fraction, while those from Kastela Bay had the greatest Hg part associated with nuclear and mitochondrial-lysosomal fractions (cytosol fractions were not compared).

Table IX

Hg concentrations determined by NAA in gills and digestive gland tissues and subcellular fraction expressed in $\mu\text{g Hg l}^{-1}$ fresh weight.

Control mussels (Limski kanal, March 85) Gills, Digestive gland		Laboratory exposure (4 days, $2.5 \mu\text{g Hg l}^{-1}$) Gills, Digestive gland		Natural polluted area (Kastela Bay, Feb. 85) Gills, Digestive gland	
Tissue					
0.017	0.064	2.37	0.91	1.92	6.14
Nuclear fraction					
0.027	0.079	3.49	0.94	7.30	7.89
Mitochondrial-lysosomal fraction					
0.093	0.152	8.32	3.25	6.77	9.15
Microsomal fraction					
	0.136	14.04	1.69	0.92	1.65
Cytosol					
0.0026	0.006	0.64	0.21	0.05	0.14

The distribution of Hg-binding proteins obtained from gel chromatographed cytosol of gills and digestive gland are presented in Fig. 2 and 3. Elution profiles on Sephadex G-75 obtained from all samples had two well-separated peaks, registering in the UV spectrum at 280 and 254 nm. The first corresponded to high molecular weight proteins ($\text{HMW} > 80000$ Daltons), while the second corresponds to low molecular weight compounds ($\text{LMW} < 3000$ Daltons).

Hg concentrations in fractions obtained from control organisms were very low (less than 1 ng ml^{-1}) and there were no distinct Hg peaks either in gills or in digestive gland.

Typical features for all other elution profiles were a significant HMW Hg-peak and the absence of a LMW Hg-peak (except for highly contaminated gills). It was found that 70-85 % of total cytosol Hg from gills and 66-76 % of total cytosol Hg from the digestive gland was associated with HMW proteins.

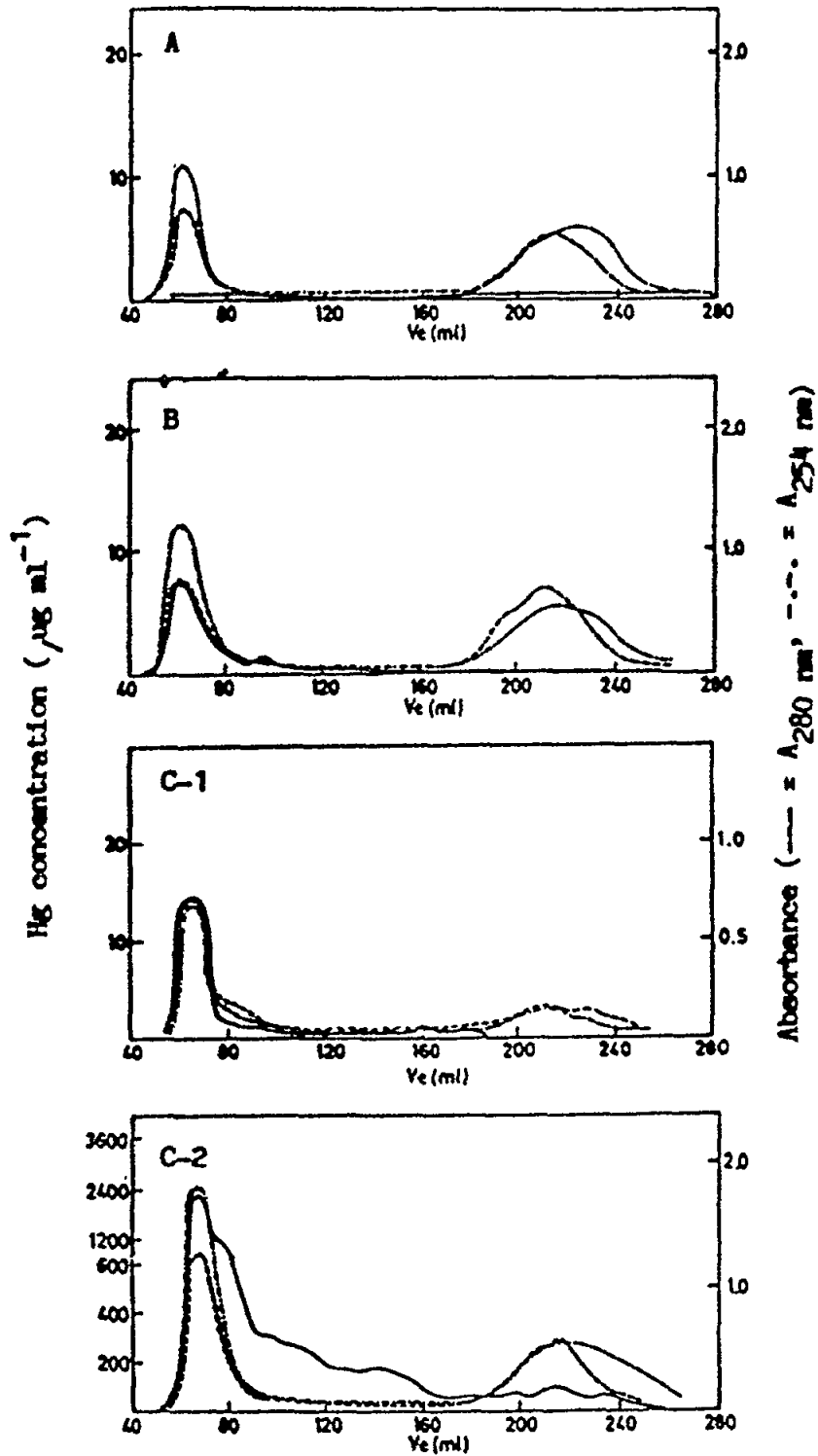


Fig. 2 Sephadex G-75 chromatograms of supernatants of mussel gills. A: control organisms (Limski kanal, January 1984), B: mussels exposed to high levels of Hg in natural environment (Kastela Bay, December 1983), C: laboratory exposed mussels: 1) 4 days, 2.5 ug Hg l⁻¹, 2) 33 days, 60 ug Hg l⁻¹

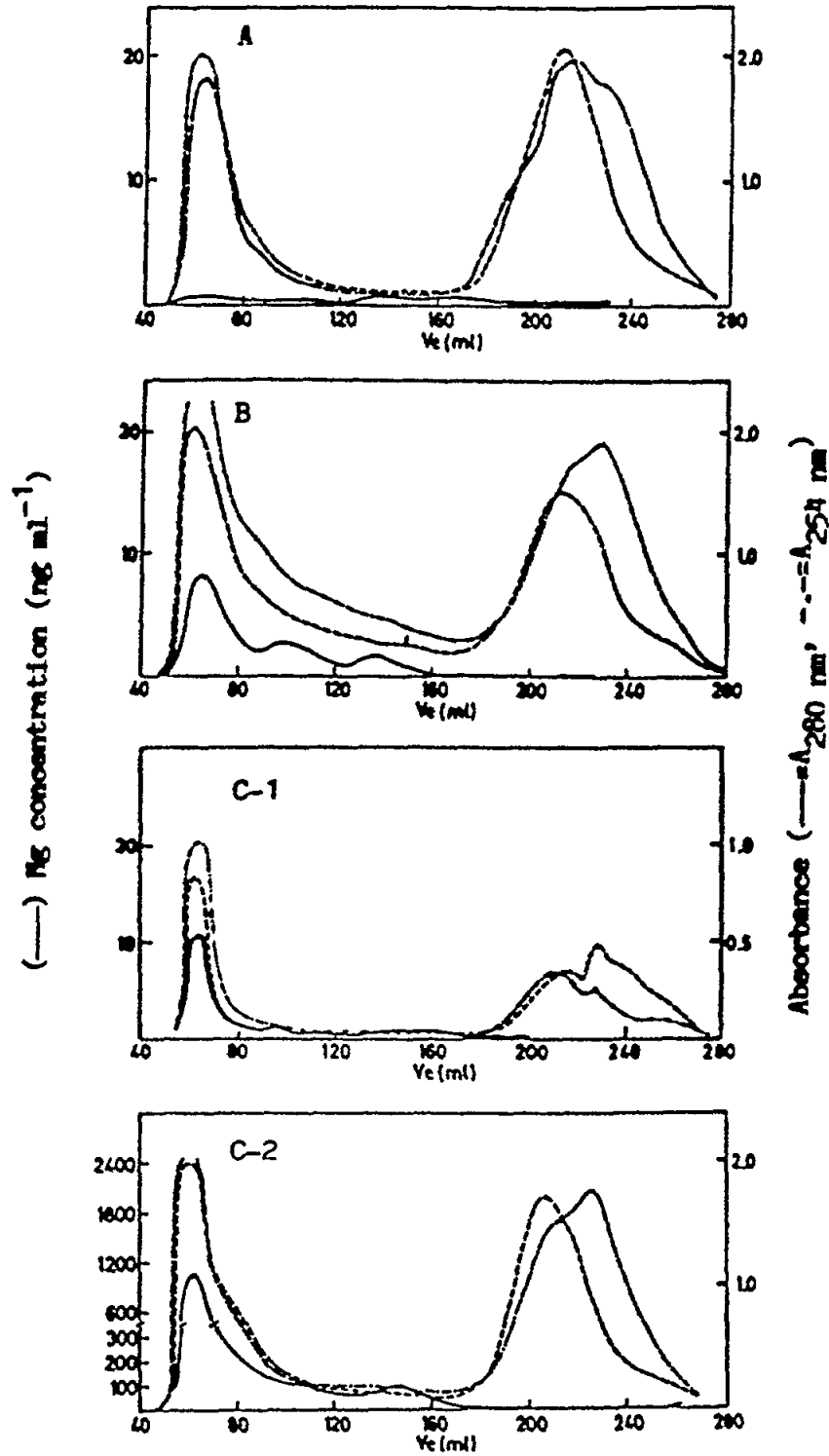


Fig. 3 Sephadex G-75 chromatograms of mussel digestive gland supernatant. A: control organisms (Limski kanal, January 1984), B: mussels exposed to high levels of Hg in natural environment (Kastela Bay, December 1983), C: laboratory exposed mussels: 1) 4 days, 2.5 ug Hg l⁻¹, 2) 33 days, 60 ug Hg l⁻¹

In the region of molecular weight corresponding to metallothionein-like proteins, two Hg-peaks were found from the digestive gland of mussels from Kastela Bay, which contained 34 % of total cytosol Hg. Very little or no Hg was associated with these proteins in other investigated samples (except in highly contaminated gills where appreciable Hg amounts were associated with proteins of a wide range of molecular weight).

In the literature, there is insufficient information relating to Hg subcellular distribution and Hg-binding proteins in marine invertebrates. Roesijadi (1982) investigated Hg incorporation into the soluble fraction and into Hg-binding proteins of gills of Mytilus edulis as a function of time during 28 days of exposure to 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ Hg. According to his observations, in the early phase of exposure Hg in the soluble fraction was associated primarily with HMW proteins; then (after Day 4) the induction of the predominant Hg-binding proteins occurred and Hg was incorporated into these proteins until they became saturated. The next steps were Hg spillover into HMW protein, saturation of the soluble cytosol fraction and a Hg increase in particulate fractions. Our results partially confirmed this idea. Discrepancies related to the proportion of Hg-binding proteins may be attributed to different exposure conditions and, in the light of the spillover hypothesis, to different sampling points in the time sequence.

The importance of the induction of Hg-binding proteins similar to metallothionein for organisms living in a natural Hg-polluted environment is questionable. While these proteins were the predominant cytosol fractions in the case of laboratory exposed mussels, they represented only a small Hg pool in the cytosol of the same species (M. edulis) collected from Hg-contaminated areas (Roesijadi et al., 1981). The major fraction of soluble Hg in these samples was associated with LMW substances, in contrast to our results, which showed that Hg did not associate with LMW proteins.

Recently reported results on the subcellular Hg distribution in the marine mammal Monodon monoceros and in the insect Blattella germanica (Bouquegneau et al., 1985) have shown a similar pattern of Hg distribution, in spite of differences in species and in the type of Hg exposure. It was shown that in the ileum of a subcellular injected insect, 80 % of total tissue Hg was found by cellular pellet and that most of the cytosolic Hg was associated with HMW proteins.

4. CONCLUSIONS

Like other fish, mullets are relatively insensitive to phenol and obvious harmful effects occur only at mg l^{-1} concentrations. The earliest neurotoxic symptoms were observed in 5 mg phenol l^{-1} . The excited phase was rather short but the changes in plasma were highly significant, particularly the increase of glucose concentration and the GOT and LDH activity increase.

Results obtained on acute toxicity of simple and complex cyanides proved invertebrates to be more sensitive organisms than fish which are conventionally used in aquatic toxicity testing.

The developing embryo of M. galloprovincialis was the most sensitive test organism as it was evident in increased percentages of abnormalities and retarded growth of veliger larvae at a concentration level beyond 6 $\mu\text{g CN- l}^{-1}$. At the highest temperature toxic effects were more pronounced. Oxygen consumption of exposed organisms measured in a closed system was a less sensitive parameter, showing a significant reduction at 50 $\mu\text{g CN- l}^{-1}$.

According to the Yugoslav regulations dealing with the protection of surface waters, the maximum allowable concentrations for the Adriatic should be 10 ug CN^{-1} . In that respect our results may contribute to a better evaluation of a more realistic limit of cyanide "safe concentration".

Hg interaction (HgCl_2 and CH_3HgCl) with Se (SeO_2 , Na_2SeO_3) in the shrimp Palaemon elegans and the effects of two mercurial forms on transbranchial potentials (TBP) and Cl⁻ fluxes in isolated Carcinus gill preparations were studied. Pretreatment of shrimps with Se reversed the toxicity effects of Hg. In the presence of Se, the retention of both radioactively labelled mercurial forms ($^{203}\text{HgCl}_2$), and CH_3HgCl) in the whole body and the hepatopancreas increased. The effects of Hg on the isolated Carcinus gill preparations perfused with diluted sea water identical to the bathing solution were studied. Mercuric chloride (50 ug Hg l^{-1}) and methylmercury chloride (5 ug Hg l^{-1}) added to the perfusion side reducing TBP from -3 to -4 mV to values close to zero. Both mercurial compounds added basolaterally had an effect on chloride fluxes which were reduced from 57-60 % of the control values.

Hg subcellular distribution in the gills and in the digestive gland of mussels, Mytilus galloprovincialis, depends, in addition to biotic factors, on Hg concentration levels and on the duration of the exposure.

Mussels from laboratory experiments showed a proportion of the animals which was ten times higher than that in specimens living in Kastela Bay. Of the cellular particulate Hg, the lowest concentration was found in the nuclear fraction of the control group and of the briefly exposed laboratory mussels. In the mussels from Kastela Bay the majority of Hg was bound to nuclear and mitochondrial-lysosomal fractions.

The typical elution profile of gel chromatographed cytosol demonstrates that in all cases of Hg exposure (laboratory or field) mussels possessed HMW-proteins which bind a significant proportion of cytosolic Hg. In control groups, there were no distinct Hg peaks. Induction of Hg-binding proteins in the range of molecular weight corresponding to metallothionein-like proteins was observed in the digestive gland of mussels collected from Kastela Bay and the gills of highly exposed laboratory mussels contributed only a minor part of total cytosolic Hg content. According to the results obtained, it appears that Hg-binding HMW proteins represent a more sensitive response to the presence of Hg in the environment; thus, further studies are needed in order to determine its role in Hg metabolism in marine organisms.

5. REFERENCES

- Bayne, B.L. (1976), The biology of mussels larvae. In: Marine Mussels: Their ecology and Physiology (B.L. Bayne, Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 81-115.
- Bergmeyer, H.U. and E. Bernt (1974), Lactate dehydrogenase. UV-assay with pyruvate and NADH. In: Methods of Enzymatic Analysis, (H.U. Bergmeyer Ed.), Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 574-579.
- Bouquegneau, J.M., C. Ballan-Dufrançais and A.Y. Jeantet (1985), Storage of Hg in the ileum of Blatella germanica: Biochemical characterization of metallothionein. Comp.Biochem.Physiol., 80:95-98.

- Czihak, G. (1971), Echinoids. In: Experimental Embryology - Marine and Fresh-water Invertebrates (G. Reverberi, Ed.), North Holland Publ. Co., Amsterdam, London, pp. 363-506.
- Doudoroff, P. (1976), Toxicity of Cyanides to Fish and Related Compounds. EPA, 600/3-76-038, 154 p.
- Gaudy, R., J.P. Guerin and M. Pagano (1980), Ecophysiologie comparée des mysidacés Hemimysis speluncola Ledoyer (cavernicole) et Leptomysis ligvura G.O. Sars (non cavernicole). Respiration et excrétion. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 44:29-46.
- Gluth, G. and W. Hanke (1983), The effect of temperature on physiological changes in carp, Cyprinus carpio L., induced by phenol. Ecotoxicol.Environ.Safety, 7:373-389.
- Halsband, E. and I. Halsband (1963), Veranderungen des Blutbildes von Fischen infolge toxischer Schaden. Arch.Fischerewiss., 14 (1/2), pp. 64-68.
- Hill, C.H. (1974), Reversal of selenium toxicity in chickens by mercury, copper and cadmium. J.Nutr., 104:593-598.
- Julsham, K. and K.J. Andersen (1983), Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed molluscs in western Norway, II The distribution of binding of Cd, Zn, Mg, Mn and Fe in the kidney and the digestive system of the common mussel Mytilus edulis. Comp.Biochem.Physiol., 75A:13-16.
- Kristoffersson, R., S. Broberg, A. Oikari and M. Pekkarinen (1974), Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike Esox lucius L. in brackish water. Ann.Zool.Fennici, 11:220-223.
- Lucu, C. and M. Skreblin (1981), Evidence on the interaction of mercury and selenium in the shrimp Palaemon elegans. Mar.Environ.Res., 5:265-274.
- Lucu, C. and M. Skreblin (1983), Further notes on mercury and selenium interaction in two marine invertebrates. Journ.Etud.Pollut.CIESM, 5(1982):657-661.
- Lucu, C. and D. Siebers (1986), Amiloride-sensitive sodium flux and potentials in perfused Carcinus gill preparations. J.Exp.Biol., 122:23-35.
- Lukyanenko, V.I. (1965), General characteristics and phases of phenol intoxication of crucian carp in the light of "stress" theory. Voprosy Ikhtiology, 5:540-547.
- Nimmo, D.R., L.H. Bahner, R.A. Rigby, J.M. Sheppard and A.J. Wislon, Jr. (1977), Mysidiopsis bahia: An estuarine species suitable for life-cycle toxicity tests to determine the effects of a pollutant. In: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (F.L. Mayer and J.L. Hamelink, Eds.), ASTM, pp. 109-116.
- Ochynski, F.W. (1960), The absorptiometric determination of phenol. Analyst, 85:278-281.

- Pihlar, B., L. Kosta and B. Hristovski (1979), Amperometric determination of cyanide by use of a flow-through electrode. Talanta, 26:805-810.
- Pihlar, B. and L. Kosta (1980), Determination of cyanides by continuous distillation and flow analysis with cylindrical amperometric electrodes. Anal.Chim.Acta, 114:275-281.
- Reitman, S. and S. Frankel (1957), A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Amer.J.Clin.Pathol., 28:56-63.
- Roesijadi, G., A.S. Drum and J.R. Bridge (1981), Mercury in mussels of Bellingham Bay, Washington (USA): The occurrence of mercury-binding proteins. In: Biological Monitoring of Marine Pollutants (A. Calabrese, W. Vernberg, F.P. Thurberg and E.J. Vernberg, Eds.), Academic Press, New York, pp. 357-376.
- Roesijadi, G. (1982), Uptake and incorporation of mercury into mercury-binding proteins of gills of Mytilus edulis as a function of time. Mar.Biol., 66:151-157.
- Schmidt, E. (1974), Glutamate dehydrogenase, UV-assay. In: Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer, Ed.), Vol. 2, pp:650-656., Academic Press, New York.
- Stagg, W. and B. Shuttleworth (1982), The effect of copper on ionic regulation by the gills of the sea water adapted flounder Platichthys flesus. J.Comp.Physiol., 56:84-90.
- Tiedge, H., R. Nagel and K. Urich (1986), Effect of substituted phenols on transaminase activity in the fish, Leuciscus idus melanotus L. Bull.Environ.Contam.Toxicol., 36:176-180.
- Verma, S.R., S. Rani and R.C. Dalela (1981), Responses of serum transaminases in Notopterus notopterus chronically exposed to phenolic compounds and their combinations. Environ.Res., 24:218-223.
- Waluga, D. (1966), Phenol effects on the anatomico-histopathological changes in bream Abramis brama L. Acta Hydrobiol., 8:55-78.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSE OF MARINE ORGANISMS TO
PCB POLLUTION IN A WIDE RANGE OF ENVIRONMENTAL FACTORS

by

L. DALLA VENEZIA

Institute of Marine Biology,
C.N.R., Venice, Italy

A B S T R A C T

The purpose of the research carried out in the last few years was to find the threshold concentration of Aroclor 1254, which causes alterations in the physiological parameters of invertebrates. The crustacean decapod Leander adspersus was considered because of its abundance in the lagoon of Venice. Toxicity tests were performed by keeping acclimated adult shrimps in nine PCB-salinity combinations, ranging from 10 to 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ PCBs and from 10 $^{\circ}$ /oo to 50 $^{\circ}$ /oo salinity. The 96-hour LC₅₀ ranged from 10 to 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ at 50 $^{\circ}$ /oo salinity; from 100 to 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ at 30 $^{\circ}$ /oo and 10 $^{\circ}$ /oo salinity. Osmoregulation measurements, performed after different treatments, ranging from 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ PCBs plus clean food to 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ PCBs plus PCB-contaminated food, from one week to sixteen weeks of exposure to the pollutant, demonstrated that Leander adspersus is an exceptional osmoregulator, both in diluted and in concentrated sea water. Oxygen consumption measurements were carried out firstly using the Winkler method. Then, because of the large individual variability, we used polarographic electrodes, the same individual acting as its own control. While the concentration of 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ Aroclor did not cause any overt effect on oxygen consumption, 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ increased it significantly, both when shrimps were transferred from clean sea water to PCB-polluted water and when they had been maintained in 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ PCBs and then transferred into clean sea water for the oxygen measurements. We observed a significantly higher oxygen consumption, in comparison with the controls, in order that the same osmotic difference between blood and sea water be reached. From the bioaccumulation analyses it was shown that the concentration of PCBs in flesh is not proportional to the external concentrations. The concentration in flesh of Leander adspersus probably depends also on the lipid content.

1. INTRODUCTION

The short and long-term effects of PCB Aroclor 1254 in marine organisms have been our principal research aim over the past several years. We have studied the copepod Tisbe bulbisetosa (Dalla Venezia et al., 1981) and the bivalve Mytilus galloprovincialis (Dalla Venezia et al., 1983) under polluted conditions, in regard to different parameters such as survival, fecundity and coupling for the first species; survival, behaviour, bioaccumulation and oxygen consumption, for the second. Both species proved to be very tolerant to concentrations of 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Tisbe bulbisetosa) or even 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Mytilus galloprovincialis) for a period of at least one week, at normal salinity levels (33 to 35 $^{\circ}$ /oo).

For the present study we chose the crustacean decapod Leander adspersus (syn. Palaemon adspersus), firstly because it is quite common in the lagoon of Venice, and secondly because it has been previously used in similar experiments with hydrocarbons (Pihl Baden, 1982a, 1982b).

The aims of the present research were: to test the toxicity of PCBs in adult Leander adspersus; to find the threshold concentration of PCBs at which some physiological parameters, namely oxygen consumption and osmoregulation, are disturbed; to determine the PCB concentration in the flesh of shrimps after different exposures and to correlate it with any subsequent physiological effect.

2. MATERIALS AND METHODS

Adult shrimp Leander adspersus were collected by trawl in a station of the lagoon of Venice far removed from pollution sources and transferred into laboratory aquaria ranging from 80 to 160 litres capacity. The aquaria contained natural sea water at 33 to 35‰ salinity and at a temperature as close as possible to the external one. Then the temperature was raised or lowered by 1 °C per day to reach the maintenance temperature of 18 °C by using a cryo-thermostat. The shrimps were fed every second day with the soft parts of mussel (average amount per animal 0.30 g). The water was well aerated and filtered. The shrimps were acclimated for at least one week in these conditions. PCB suspensions were prepared by adding an ethanolic solution of 10 ug l^{-1} Aroclor 1254 to sea water.

In some of the experiments described below, PCB-contaminated mussels were used as food, in order to increase the level of PCBs in the flesh; they had been prepared for this purpose by maintaining them for one month at 10 ug l^{-1} PCBs and analysed in our laboratory. All the experiments were performed in a constant temperature room.

The specific experiments, the different treatments and the parameters measured are listed below.

- (a) Aroclor 1254 toxicity: this is the only experiment where Aroclor was mixed with 0.2 ml l^{-1} Corexit 7664, the well-known oil emulsifier. This was done in order to obtain a more stable PCB suspension. Groups of ten acclimated shrimps were distributed in jars containing 3 litres of sea water at 18 °C and at nine PCB salinity combinations, in the range 10-1000 ug l^{-1} PCBs and 10-50‰ salinity, and the controls. Every second day the water was changed in all the jars, because it was not advisable to use filters, since we were working with a suspension. The mortality was recorded over a period of nine days.
- (b) Acclimated shrimps were kept for one week in sea water containing 1 ug l^{-1} PCBs at 18 °C and 33-35‰ salinity. They were fed on wild mussels (PCB: 0.041 to 0.55 ug g^{-1} wet weight). Five groups each of ten shrimps coming from the PCB-polluted aquarium were distributed in as many jars containing sea water at 10‰, 20‰, 30‰, 40‰, 50‰. The same was done for the controls. After two hours we used a plastic syringe to take a sample of haemolymph from each animal. Before making the measurements by a Vogel Osmometer (based on freezing point depression), each sample was centrifuged at 15,000 $r \min^{-1}$ for 2-3 min. in order to separate the serum from the clot.
- (c) Acclimated shrimps were kept in sea water containing 1 ug l^{-1} PCBs at 18 °C and 33-35‰ salinity. The shrimps in the clean aquarium served as controls. The shrimps of the PCB-polluted aquarium were given PCB-contaminated mussels as food (PCB: 3.2 ug g^{-1} wet weight); the shrimps of the control aquarium were given wild mussels (PCB: 0.041-0.55 ug g^{-1} net wt). After periods ranging from 3 to 4 weeks, groups of fifteen adult Leander adspersus, coming both from PCB-polluted and from

control aquaria, were distributed individually in as many flasks containing oxygen-saturated clean sea water at three salinities: 10⁰/oo, 30⁰/oo, 50⁰/oo. The flasks were stoppered and after two hours the residual oxygen was determined by the Winkler method. The difference between the oxygen content in the experimental and the blank (without shrimp) flasks was taken as the oxygen consumed during the period (Ansell, 1973). The measurements were repeated at three different temperatures (10 °C, 18 °C, 25 °C). Other shrimps maintained in the same treatment for periods ranging from 21 to 28 days were distributed in three jars containing sea water at different salinities (10⁰/oo, 30⁰/oo, 50⁰/oo). After two hours, a sample of haemolymph was withdrawn from each animal using a plastic syringe. This procedure was repeated at three different temperatures (10 °C, 18 °C, 25 °C). Osmolality was determined as was described above.

At the end of each experiment, i.e., after 21 to 28 days of exposure to PCB suspension and PCB-contaminated feeding, the shrimps were shelled. The flesh was freeze-dried, then extracted for eight hours with n-hexane in a Soxhlet apparatus. The extract was concentrated, cleaned by shaking with sulphuric acid and subjected to gas-chromatographic analysis. The results were calculated on the basis of wet weight.

- (d) Taking into consideration that the large individual variability masked the small differences in oxygen consumption existing between groups exposed to different salinities or to differently polluted conditions, we decided to use polarographic electrodes in order to measure oxygen consumption. Thus every shrimp acted as its own control. Acclimated shrimps were kept in 1 ug l⁻¹ PCB suspension and fed on wild mussels, like the controls. After periods ranging from 17 to 38 days, two shrimps were chosen every day, one from a PCB-contaminated aquarium, the other from a control aquarium and put into two 600 ml flasks containing oxygen-saturated sea water at a temperature of 18 °C and 25⁰/oo salinity. Both flasks were stoppered and polarographic electrodes (Orion and Chemtrix) were inserted through the rubber stoppers. Oxygen consumption of both shrimps was calculated by measuring the decrease of oxygen concentration in the medium. Oxygen decrease was recorded for seven hours in two consecutive days, the first at 35⁰/oo, the second at 50⁰/oo salinity. During the intervening night the shrimps were maintained in two separated and aerated jars, one containing clean sea water, the other polluted sea water at 35⁰/oo salinity.
- (e) On the basis of these considerations, two shrimps from an acclimation aquarium were transferred into two 600 ml flasks containing sea water saturated with oxygen and with the same acclimation salinity and temperature. Oxygen consumption of each individual shrimp was recorded for five consecutive days under the same conditions. This served as the control. In the following five consecutive days, the flasks were filled with a 10 ug l⁻¹ PCB suspension in sea water and the oxygen consumption of each shrimp was recorded, using the method described previously. This was then compared with the oxygen consumption of the same individual in clean sea water.
- (f) We carried out the same experiment as that described in (c) above, but using instead 10 ug l⁻¹ PCBs. The shrimps of PCB-polluted aquarium were fed on PCB-contaminated mussels (PCB: 3.2 ug g⁻¹ wet weight); the shrimps of the control aquarium were fed on wild mussels (PCB: 0.041-0.055 ug g⁻¹ wet weight). After periods ranging from 70 to 105 days of treatment, two shrimps, one taken from the PCB-treated, the other

from the control aquarium, were put into two 600 ml flasks containing oxygen saturated sea water at 18 °C and 35‰ salinity. Oxygen decrease was recorded for two hours by an Omniscribe Recorder. The flasks were then uncorked and the sea water, containing the shrimps, was carefully stirred and allowed to regain the consumed oxygen slowly. After two to three hours the water contained in the flasks was replaced by oxygen saturated sea water at salinities of 35, 10 or 50‰. Oxygen concentration recording, as described above, was continued for two hours. At the end of this period both shrimps were weighed and their haemolymph sampled by using a plastic syringe. Finally the shrimps were shelled and their flesh stored in a freezer, prior to lyophilization. The flesh was analysed by gas chromatography. The haemolymph sample of each individual shrimp was centrifuged at 15,000 min⁻¹ for about 2 minutes and the osmotic concentration of the serum, as well as that of the medium, was measured by means of a Vogel Osmometer.

3. RESULTS

3.1 Toxicity

The graphs in Fig. 1 show the percentage mortality at three PCB concentrations and three different salinities, and controls, over a period of nine days. The 96-hour LC₅₀ of Aroclor 1254 in adult Leander adspersus may be calculated by graphic interpolation and ranges from 10 to 100 ug l⁻¹ PCBs at 50‰ salinity; from 100 to 1000 ug l⁻¹ PCBs at 30‰ salinity as well as 10‰ salinity.

3.2 Osmoregulation

In Fig. 2 the results of three experiments are compared. Graph A shows that the treatment of 1 ug l⁻¹ PCBs plus clean food (wild mussels) for one week does not produce any overt effect on the capability of shrimps for osmoregulation if compared with the controls. The values referring to 20‰ and 40‰ are not shown on the graph; however, they agree with the other values.

Graph B in Fig. 2 (1 ug l⁻¹ PCBs plus PCB-contaminated food for 3 to 4 weeks) and graph C (10 ug l⁻¹ PCB plus PCB-contaminated food for 10 to 16 weeks) show the tendency of PCB-treated animals to hyper- and hypo-osmoregulate better than controls.

Table I reports the values of osmolality measured at nine temperature-salinity combinations in PCB-treated and control shrimps. It shows that Leander adspersus is an exceptional osmoregulator. Its osmoregulation ability is almost independent of both temperature and PCB pollution. In Table I one can also see that the individual variability of osmotic concentration of serum is rather small and, in spite of this, the difference between the average osmolalities of PCB-treated and controls is not significant.

3.3 Oxygen consumption

The results reported in Table II (Winkler method) and Table III (polarographic electrodes) show that the concentration of 1 ug l⁻¹ PCBs, with or without PCB-contaminated food, for periods not exceeding 38 days, did not cause any significant difference in oxygen consumption between PCB-treated and control animals. On the contrary the graphs of Fig. 3 show that individual shrimps consume more oxygen in a suspension of 10 ug l⁻¹ Aroclor

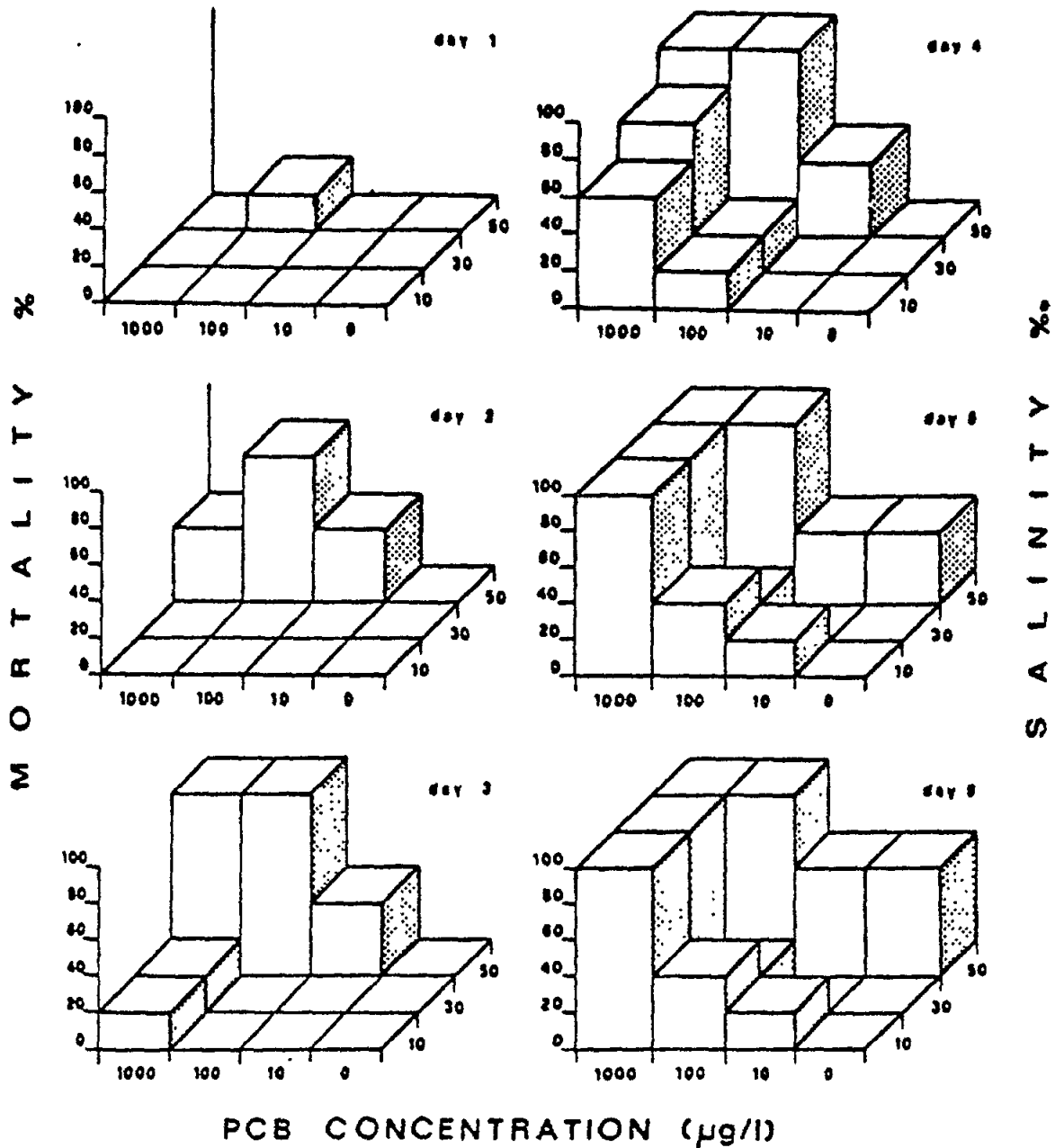


Fig. 1 Leander adspersus. Three-dimensional graphs showing the toxicity of Aroclor 1254 at different salinities and at 18 °C. The length of exposure (days) is reported on the right of each graph

1254 than in clean sea water. Table IV confirms that 10 ug l⁻¹ PCBs can increase the oxygen consumption in Leander adspersus. All values referring to 10 ug l⁻¹ are higher than those referring to controls: in particular the difference between the two values at 50‰ is significant (P < 0.05).

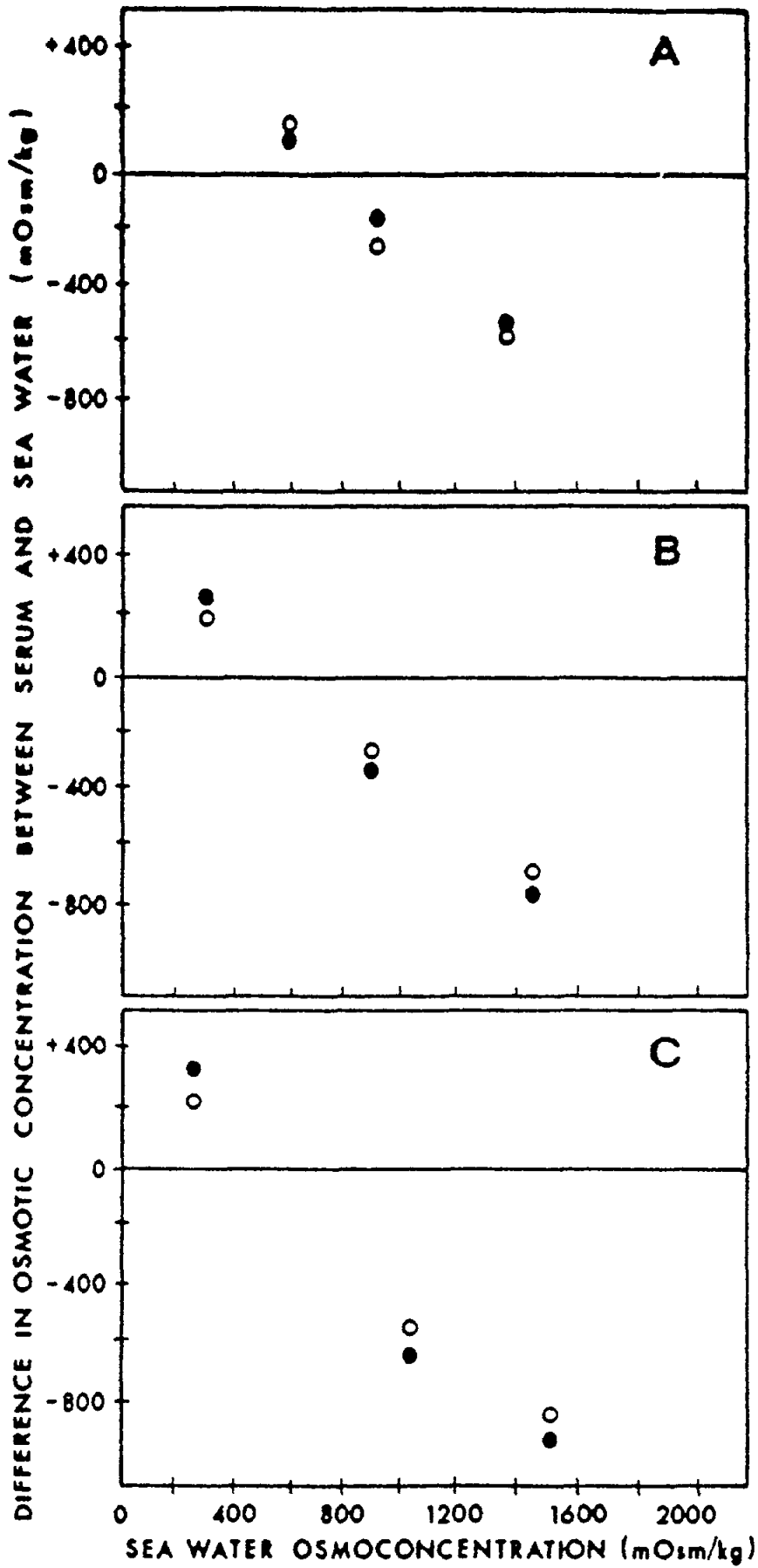


Fig. 2 Leander adspersus. Positive or negative differences between the osmotic concentrations of serum and of sea water at different salinities in PCB-treated shrimps (full circles) and in control (open circles). Data are expressed in mOsm kg^{-1} .
A. Treatment : 1 ug l^{-1} PCBs; food : clean (wild) mussels; time : 1 week
B. Treatment : 1 ug l^{-1} PCBs; food : PCB-contaminated mussels; time : 3 to 4 weeks
C. Treatment : 10 ug l^{-1} PCBs; food : PCB-contaminated mussels; time : 10 to 16 weeks

Table I

Osmotic concentration (mOsm kg⁻¹) of serum in relation to salinity and temperature. Mean and standard deviations. Treatment: 1 ug l⁻¹ PCBs for 21 to 28 days; PCB-contaminated food.

S ^o /oo	Medium		Serum		n	t °C
	mOsm kg ⁻¹	Controls	n	PCB-treated		
10	282	579.2 ± 52.0	9	607.1 ± 47.7	8	10
30	878	631.0 ± 51.3	9	710.4 ± 93.3	9	10
50	1444	721.4 ± 73.9	9	769.6 ± 23.9	9	10
10	282	520.6 ± 52.9	8	555.6 ± 21.8	5	18
30	878	611.3 ± 59.7	7	606.9 ± 61.2	7	18
50	1444	777.3 ± 93.5	9	723.8 ± 84.6	8	18
10	282	567.4 ± 32.1	9	571.2 ± 21.5	10	25
30	878	663.7 ± 33.3	11	643.6 ± 30.5	9	25
50	1444	816.6 ± 44.9	11	824.7 ± 46.1	10	25

Table II

Oxygen consumption (ug g⁻¹ dry weight h⁻¹) measured by the Winkler method at different temperature-salinity combinations in groups of five individuals. Mean and standard deviations. Treatment: 1 ug l⁻¹ PCBs for 21 to 28 days; PCB-contaminated food.

S ^o /oo	Controls	n	PCB-treated	n	t °C
10	868.3 ± 87.5	5	825.9 ± 257.3	5	10
30	1180.3 ± 299.6	5	1290.8 ± 395.4	5	10
50	909.3 ± 183.7	5	875.7 ± 174.3	5	10
10	1630.6 ± 218.6	5	-	-	18
30	1779.4 ± 612.4	5	-	-	18
50	1681.1 ± 199.7	5	-	-	18
10	2308.9 ± 240.3	5	2118.6 ± 490.9	5	25
30	2711.6 ± 466.5	5	1907.2 ± 955.8	5	25
50	2487.1 ± 603.9	5	1968.9 ± 350.4	10	25

3.4 Bioaccumulation

Table V reports the three treatments described in Materials and Methods and the relative concentrations of PCBs in the flesh of Leander adspersus at the end of each experiment. The PCB concentrations in the controls are not constant, because the shrimps used in different experiments were collected at different times. However, one can observe that the PCB concentration in the

flesh of shrimps coming from the second treatment was six times higher than that of the controls; the PCB concentration in shrimps coming from the third treatment was only ten times higher than that of controls. This indicates that the bioaccumulation is not proportional to the level and the length of exposure to Aroclor 1254.

Table III

Oxygen consumption ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight h^{-1}) measured by polarographic electrodes at 18°C and two salinities in consecutive days on individual shrimps. Treatment: $1 \mu\text{g l}^{-1}$ PCBs for 17 to 38 days; wild food.

Exposure days	Reference	Controls		Reference	PCB-treated	
	no	$35^\circ/\text{ooS}$	$50^\circ/\text{ooS}$	no	$35^\circ/\text{ooS}$	$50^\circ/\text{ooS}$
17	1	2175.3	1977.5	7	1106.1	663.6
24	2	1977.3	1258.3	8	1468.8	856.8
29	3	1660.6	1107.1	9	2429.2	1670.1
31	4	1522.1	1343.1	10	3742.8	1981.5
36	5	2813.7	2110.3	11	1740.4	1160.3
38	6	2950.1	1659.4	12	1601.5	800.7
Mean		2182.7	1576.0		2014.8	1188.8
S.D.		589.0	407.1		951.6	528.7

Table IV

Oxygen consumption ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight h^{-1}) measured by polarographic electrodes at 18°C in individual shrimps exposed to different salinity sequences. Treatment: $10 \mu\text{g l}^{-1}$ PCBs for 70 to 105 days; PCB-contaminated food.

Controls				$10 \mu\text{g l}^{-1}$ PCB					
Ref.	$35^\circ/\text{oo}$	$10^\circ/\text{oo}$	$50^\circ/\text{oo}$	Ref.	$35^\circ/\text{oo}$	$10^\circ/\text{oo}$	$50^\circ/\text{oo}$		
A ₁	1169	1101		B ₁	1479	1480			
A ₂	1200		1585	B ₂	1499		2120		
A ₃	1216		791	B ₃	1504		1282		
A ₄	863	880		B ₄	1510	1510			
A ₅	1114		919	B ₅	876		923		
A ₆	830		683	B ₆	1015		1291		
A ₇	840	821		B ₇	1490	1460			
A ₈	800		943	B ₈	1452		1277		
A ₉	801		741	B ₉	667		740		
A ₁₀	1394	1400		B ₁₀	2351	2350			
A ₁₁	1088		1462	B ₁₁	857		1178		
A ₁₂	1875		193	B ₁₂	2375		1465		
X	1099	1051	1227	602	X	1423	1700	1375	1195
SD	315	262	346	276	SD	535	434	519	314

Table V

Bioaccumulation of PCBs in the flesh of shrimp Leander adspersus kept in aquaria under different regimes. T = 18 °C; S = 33-35‰.

Treatment	Exposure (weeks)	Bioaccumulation ug h ⁻¹ wet weight
1 ug l ⁻¹ PCBs food: unpolluted mussels containing 0.04-0.06 ug g ⁻¹ wwt	1	-
1 ug l ⁻¹ PCBs food: PCB-polluted mussels containing 3.20 ug g ⁻¹ ww	3 - 4	0.69 - 0.79
controls	3 - 4	0.09 - 0.15
10 ug l ⁻¹ PCBs food: PCB-polluted mussels, as above	10 - 16	2.97
controls	10 - 16	0.31

4. DISCUSSION

The purpose of this research was to find the threshold concentration of Aroclor 1254 that causes changes in the physiological parameters of Leander adspersus. The concentration of 1 ug l⁻¹ PCBs did not produce any effect on the parameters observed, even if it was two to three orders of magnitude higher than the environmental concentrations (Elder, 1976; Elder and Villeneuve, 1977; Picer and Picer, 1979; Fossato et al., 1982; Fossato, 1983).

The results obtained with 10 ug l⁻¹ Aroclor 1254 show that this concentration did not cause any negative effects except for an increase in the oxygen consumption both in animals exposed to the pollutant for a long time (Table IV) and in animals abruptly transferred from clean sea water to 10 ug l⁻¹ Aroclor (Fig. 3). Similar results on oxygen consumption were obtained by Vernberg et al. (1978) in Uca pugnator, exposed to 50 ug l⁻¹ PCBs and by Dalla Venezia et al. (1983) in Mytilus galloprovincialis exposed to 100 ug l⁻¹ PCBs.

In respect of osmoregulation, our results confirm the work of Roesijadi et al. (1976) on the grass shrimp Palaemonetes pugio. They found that exposure to sublethal and 96-h LC₅₀ (60 ug l⁻¹) levels of Aroclor 1254 did not seriously alter osmotic concentrations in adult shrimps. As for bioaccumulation, in the experiment in which adult shrimps had been exposed to 1 ug l⁻¹ Aroclor for 3 to 4 weeks, the PCB concentration in the flesh was six times higher than in the controls; in the experiment in which the shrimps

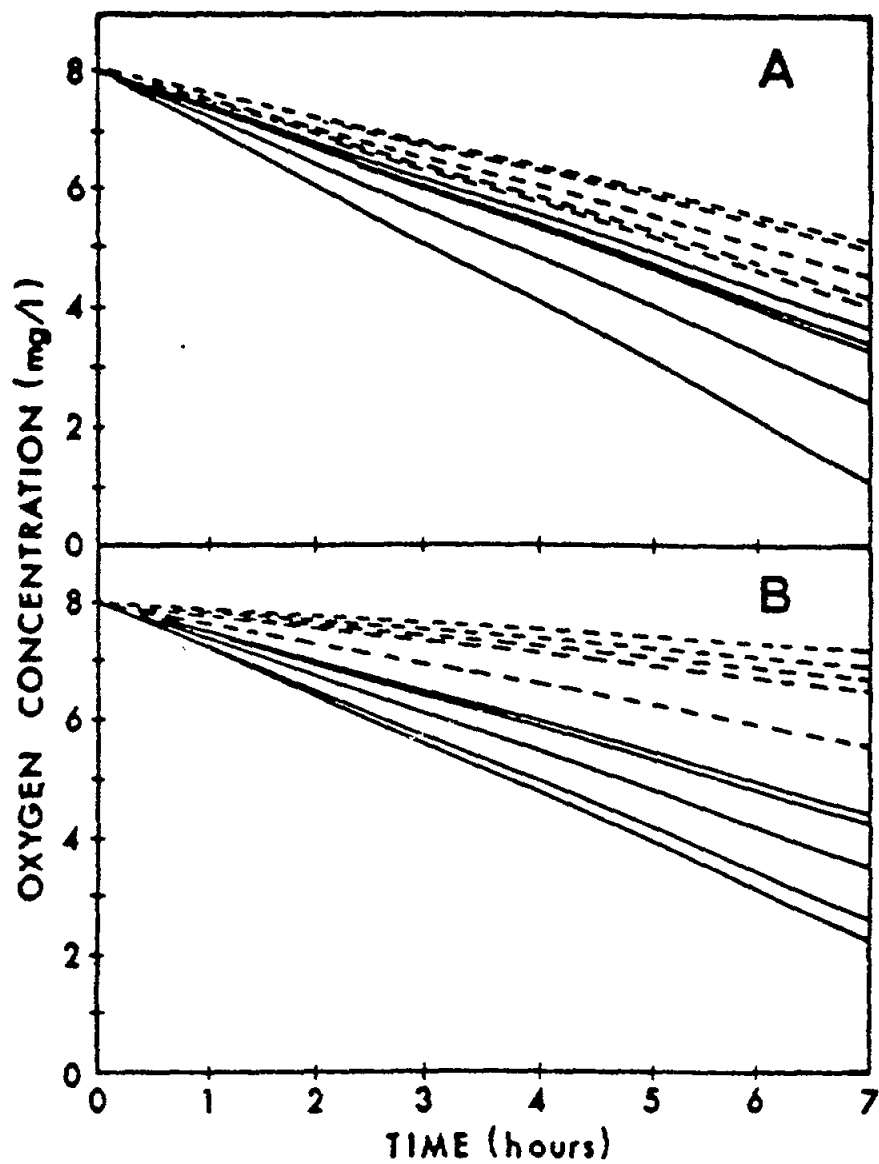


Fig. 3 Leander adspersus. Decrease with time of dissolved oxygen in clean sea water (dashed line) and in 10 ug l⁻¹ PCBs suspension (continuous line) respectively, of two flasks both containing one shrimp (see text).
A. Shrimp's wet weight = 1.2 g; flask volume = 0.616 litres
B. Shrimp's wet weight = 1.6 g; flask volume = 0.649 litres
Data are expressed in mg l⁻¹

had been exposed to 10 ug l^{-1} Aroclor for 10 to 16 weeks, one might expect the PCB concentration in the flesh to be at least sixty times higher than the controls. On the contrary the results showed that it was only ten times higher than in the controls. This suggests that the concentration probably reaches a maximum value which depends more on the lipid content of flesh than on external PCB concentration. As for toxicity, the 96-h LC_{50} of Aroclor 1254 for Leander adspersus of the lagoon of Venice is more than one order of magnitude higher than the lethal levels reported in US EPA (1980) and Ernst (1984) for other species of shrimps. Fig. 4 summarizes well the effect of the concentration of 10 ug l^{-1} Aroclor 1254 in Leander adspersus. This graph demonstrates that the treated animals osmoregulate as well as the controls, but they need more oxygen than the controls in order to maintain the same osmotic difference between serum (haemolymph) and medium (external sea water).

5. CONCLUSION

The results of this research demonstrate that 10 ug l^{-1} PCB Aroclor 1254 may be considered as the minimal concentration of PCBs in sea water which produces measurable effects on Leander adspersus. Among the different parameters taken into consideration, oxygen consumption proved to be the most sensitive.

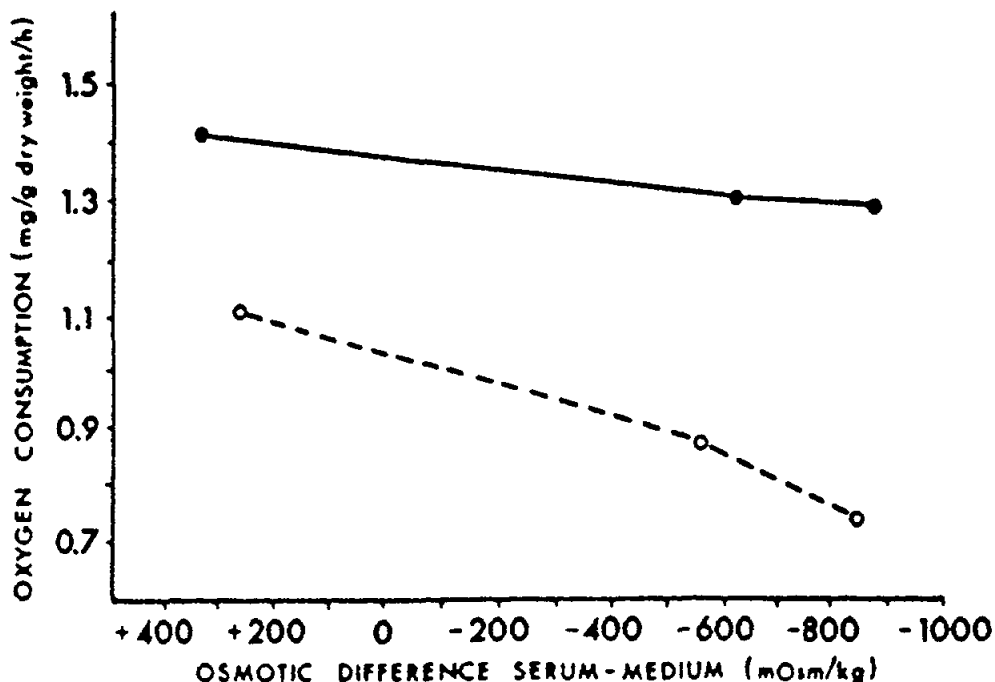


Fig. 4 Leander adspersus. Oxygen consumption ($\text{mg g}^{-1} \text{ dry weight h}^{-1}$) as a function of osmotic difference between internal and external media for PCB-treated (full circles) and for control individuals (open circles)

6. REFERENCES

- Ansell, A.D. (1973), Oxygen consumption by the bivalve Donax vittatus. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 11:311-28.
- Dalla Venezia, L., V.U. Fossato, and S. Scarfi (1981), Characteristics of suspensions of PCB Aroclor 1254 and Corexit 7664 and their short and long-term effects on Tisbe bulbisetosa. Journ.Etud.Pollut.CIESM., 5(1980):613-20.
- Dalla Venezia, L., V.U. Fossato, and S. Scarfi (1983), First observations on physiological and behavioural response of Mytilus galloprovincialis to PCB Aroclor 1254 pollution. Journ.Etud.Pollut.CIESM., 6(1982):669-75.
- Elder, D.L. (1976), PCBs in N.W. Mediterranean coastal waters. Mar.Pollut.Bull., 7:63-64.
- Elder, D.L., and J.P. Villeneuve (1977), Polychlorinated biphenyls in the Mediterranean Sea. Mar.Pollut.Bull., 8:19-22.
- Ernst, W. (1984), Pesticides and technical organic chemicals. In Marine Ecology, Vol. V, Part 4, (Ed. O. Kinne). New York, John Wiley, pp. 1617-1709.
- Fossato, V.U. (1983), Etude des hydrocarbures chlorés dans l'environnement de la lagune de Venise. Journ.Etud.Pollut.CIESM., 6(1982):465-8.
- Fossato, V.U., C. Nasci, and L. Craboledda (1982), Idrocarburi clorurati nell'acqua, nel materiale sospeso e nello zooplancton dell'area antistante il Delta del Po. In Atti Convegno Sottoprogetti Risorse Biologiche e Inquinamento Marino, Rome, 15-17 Dicembre 1981, pp. 829-41.
- Picer, N., and M. Picer (1979), Monitoring of chlorinated hydrocarbons in water and sediments in the North Adriatic coastal waters. Journ.Etud.Pollut.CIESM., 4(1978):133-6.
- Pihl Baden, S. (1982a), Impaired osmoregulation in the shrimp Palaemon adspersus exposed to crude oil extract. Mar.Pollut.Bull., 13:208-10.
- Pihl Baden, S. (1982b), Oxygen consumption rate of shrimp palaemon adspersus exposed to crude oil extract. Mar.Pollut.Bull., 13:230-3.
- Roesijadi, G., J.W. Anderson, S.R. Petrocelli and C.S. Giam (1976), Osmoregulation of the grass shrimp Palaemonetes pugio exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). I. Effect on chloride and osmotic concentrations and chloride- and water-exchange kinetics. Mar.Biol., 38:343-55
- Vernberg, F.J., M.S. Guram and A.M. Savory (1978), Metabolic response to thermal changes of adult fiddler crab Uca pugilator and the effect of PCBs. Mar.Biol., 48:135-41.
- U.S. EPA (1980), Ambient water quality criteria for polychlorinated biphenyls. U.S. EPA Rep. 440/5-80-068, 211 p.

TOXICITY AND BIOACCUMULATION OF POLLUTANTS
IN MARINE ORGANISMS

by

Mirjana OZRETIC

"Rudjer Boskovic" Institute
Center for Marine Research, Rovinj
Yugoslavia

A B S T R A C T

Previous investigations into the accumulation of toxicity levels of pollutants and the study of their bioaccumulation processes in coastal marine organisms were continued.

The sea urchin (Paracentrotus lividus Lam.) sperm motility test was elaborated in detail and successfully used to calculate the effective concentration (EC₅₀) for pentachlorophenol (PCP). The values obtained (0.73 mg PCP l⁻¹) agree with the previously elaborated embryo toxicity tests (0.42 mg PCP l⁻¹). Both methods can be used in sea water toxicity testing. A decreased sperm motility was also demonstrated in relation to the presence of Cd in sea water (10-1000 ug Cd l⁻¹).

The pretreatment of the shrimp Palaemon elegans with selenium resulted in reduced accumulation and slightly increased retention of ²⁰³Hg in the hepatopancreas, while the pretreatment of adult mussels (Mytilus galloprovincialis) with cadmium did not affect the accumulation of ⁶⁵Zn and ¹⁰⁹Cd in veliger larvae.

Methods for the determination and quantification of metallothionein-like proteins (MLP) as indicators of metal pollution in marine organisms were improved further. Heat treatment of crude homogenates (10 min. at 70 °C) is the most efficient method for total MLP determination, whereas the application of the protease inhibitor method (PMSF) may be more advantageous in physiological studies for certain metals because of the lower risk of metal redistribution.

1. INTRODUCTION

Northern Adriatic coastal and offshore organisms are subject to continuous and progressive exposure to toxic elements and organic compounds that may induce physiological dysfunctions and biochemical alterations in single specimens, but also endanger life and lower the survival capacity of whole populations and communities. Previous results indicate that the actual and potential pollutants are mostly related to the presence of mineral oils, biocides such as PCB and PCP, and that, among heavy metals, Hg, Zn and Pb are the most critical. In order to obtain a more precise evaluation of predictable environmental conditions, detailed research on toxic effects of Hg, Cd, Zn and PCP on representative Adriatic organisms was carried out.

2. MATERIALS AND METHODS

Dry sperm was collected from mature male gonads of the sea urchin Paracentrotus lividus Lam. and, just before use, was diluted with filtered sea water (Millipore 4 u) to obtain a suspension of about $3-5 \times 10^6$ spermatozooids ml^{-1} . The optimal spermatozoid concentration was established by measuring the optical density of the prepared sperm suspension and the respective proportional dilutions and compared with the actual number of spermatozooids counted with a haemocytometer. Optical density was measured with a standard spectrophotometer in a 1 cm cuvette at 540 nm and compared with a sea water blank.

The effects of Se on the uptake of ^{203}Hg from sea water and on Hg release from the organisms were investigated in the shrimp Palaemon elegans in laboratory conditions. The accumulation of Hg ($^{203}\text{HgCl}_2$, NEN) was performed in glass beakers containing 2 l aerated sea water (12°C), $5.6 \text{ kBq } ^{203}\text{Hg } \text{ml}^{-1}$ (specific activity = $44.8 \text{ kBq } \mu\text{g}^{-1}$) and 9-12 specimens ($0.75-0.20 \text{ g}$) each. Two groups of shrimps were used: one was kept for a month in running sea water containing $300 \mu\text{g Se l}^{-1}$, while the other acted as the control. Following the 86 hours of ^{203}Hg bioaccumulation phase, both groups of shrimps were transferred to clean running sea water to measure the loss of the incorporated ^{203}Hg . Radiometric determinations were done on a Nuclear Chicago gamma scintillation counter connected to a Hershaw well type crystal. Total Hg and Se were determined simultaneously by NAA using a volatilization technique (Byrne and Kosta, 1974) after samples had been irradiated at a Triga Marck II reactor of the "Jozef Stefan" Institute, Ljubljana.

The bioaccumulation of radiotracers ^{109}Cd and ^{65}Zn in the straight-hinge veliger stage of Mytilus galloprovincialis larvae within 48 hours of embryonic and early larval development was also investigated. The experiment was performed by using 4 cultures of previously filtered and UV sterilized sea water (5 l glass containers). The culture medium was also enriched with 100 μl of diluted isotope stock solutions to attain $4.4 \text{ kBq } ^{109}\text{Cd } \text{ml}^{-1}$ or $1.5 \text{ kBq } ^{65}\text{Zn } \text{ml}^{-1}$. Both radiotracers were added to medium number 3. Twenty hours later an aliquot of M. galloprovincialis fertilized eggs was added to cultures numbers 1, 2 and 3, to obtain a density of $50-100 \text{ eggs } \text{ml}^{-1}$ in the medium. One culture (No. 4) was previously pretreated with stable Cd via a 3-month exposure of adult mussels to $0.1 \mu\text{g Cd } \text{ml}^{-1}$ in order to accumulate $9.2 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ in ripe eggs (wet weight). Following 48 hours of development the larvae were transferred by means of a 50 μm plastic net into clean sea water for one hour to rinse the surface activity. Radioactivity was measured on a gamma-spectrometric analyzer.

The determination of metallothionein-like proteins was carried out through a comparison of three different methods with regard to pretreatment of the sample prior to application on a chromatographic column. Tissue extracts of M. galloprovincialis digestive gland were prepared from mussels exposed to acute intoxication ($1.3 \mu\text{g Cd } \text{ml}^{-1}$ during 7 days). They accumulated $63.7 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ (wet weight). The tissue was divided into two portions which were subsequently subjected to different procedures (Webb, 1972; Olafson *et al.*, 1979; Viarengo *et al.*, 1980) according to the scheme shown in Fig.1. The columns (Sephadex G-75: 77 2.5 cm and 65 2.4 cm) were calibrated with protein standards of known molecular weight. Cd concentrations in fractions were analyzed with direct aspiration by using a Varian atomic absorption spectrophotometer (flame technique).

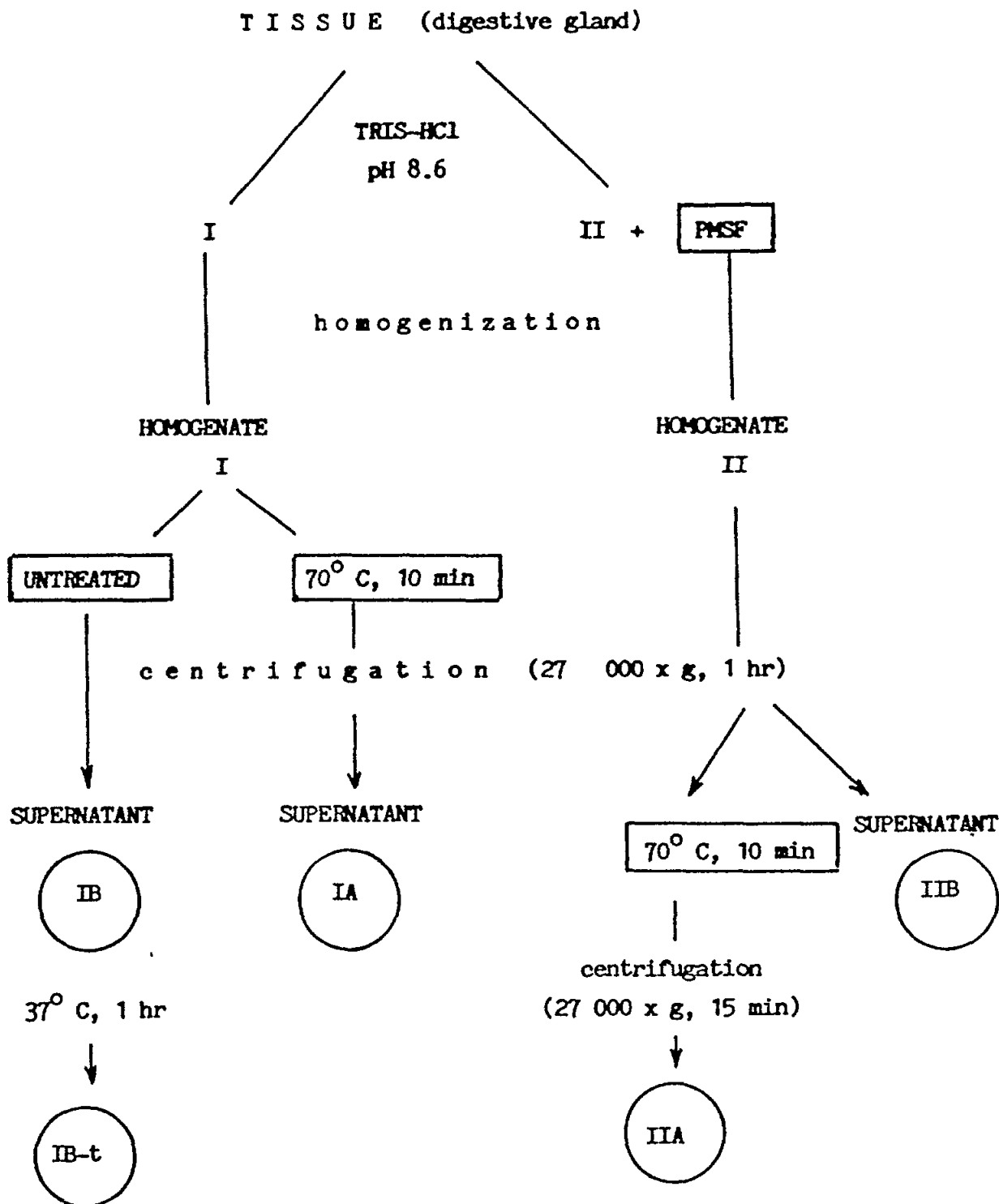


Fig. 1 The procedural scheme of the first experiment performed on the digestive gland of *M. galloprovincialis* exposed to $1.3 \text{ ug Cd ml}^{-1}$ in sea water during 7 days, showing the different steps at which the preliminary treatments of tissue were applied. The resulting samples (IA, IB, IB-t, IIA, and IIB) were ready for application to the Sephadex G-75 column

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Pentachlorophenol - sea urchin sperm motility test

The basic principle of the sperm motility test is related to the positive geotoxic reaction of the swimming spermatozooids that in a low centrifugal field tend to move in a centrifugal direction while the immotile sperm cells exhausted by stress or by ageing remain in supernatant suspension. By measuring the changed optical density of the supernatant the relative concentration of immotile sperm cells can be calculated (Nelson, 1972; Dunham et al., 1982).

Results are presented in Fig.2 and since they are distributed in an exponential pattern, for routine calculations the lower portion of the curve was used, because in the range between 0.200 to 1.000 extinction units it satisfies the linear regression equation with a very high correlation and level of significance (Fig.3).

Different PCP concentrations (0.125-8.00 mg PCP ml⁻¹) were inoculated in tubes, each containing 5 ml of sperm suspension (3-5x10⁶ spermatozooids ml⁻¹). The tubes were shaken with a vortex and incubated at 20 °C. After 15 minutes 1 ml aliquots were transferred into graduated centrifuge tubes, diluted to 10 ml and centrifugated for 10 minutes at a speed corresponding to about 100 g. Optical density was measured in the upper 2 ml supernatant of each tube. The results were then expressed as percentages of the control group (Table I), and finally the effective concentration (EC₅₀) was calculated on the basis of the probit/concentration regression equation (Fig.4).

The motility of spermatozooids was evidently depressed by pentachlorophenol and EC₅₀ was 0.73 mg PCP ml⁻¹. This value was higher than the mean value obtained by measuring the depressed activity of GOT and GPT and the reduced echinochrome production (0.42 mg PCP ml⁻¹) in the developing embryos of the same sea urchin species (Ozretic and Krajnovic-Ozretic, 1984). But the differences, tested on the basis of their respective correlation coefficients, were not statistically significant (Table II).

The sperm motility test will be further elaborated and tested in relation to other actual pollutants; it could then be used as a rapid bioassay procedure to test and quantify the toxicity of polluted sea water.

3.2 Effects of Cd on sea urchin spermatozoa

The swimming speed of sea urchin spermatozoa was decreased in Cd enriched sea water (Table IV). Sperm suspended in sea water with 10-1000 ug Cd²⁺ showed motility inhibition from 30.9 to 85.0% of the control group.

Many factors that can affect sperm motility have been identified, such as changes in O₂/CO₂ tension, pH, osmotic concentration in sea water etc. Sea urchin spermatozoa move in vigorous circles until they make contact with an egg. It is well known that the boring movement of spermatozoa is a prerequisite to fertilize a sea urchin egg. The movement of sea urchin and mammalian spermatozoa is influenced by the interaction between the sperm cell components and environmental factors. We have therefore proposed a sensitive tool to study the effects of heavy metals on the swimming speed of sea urchins, which is in direct correlation with the success of fertilization.

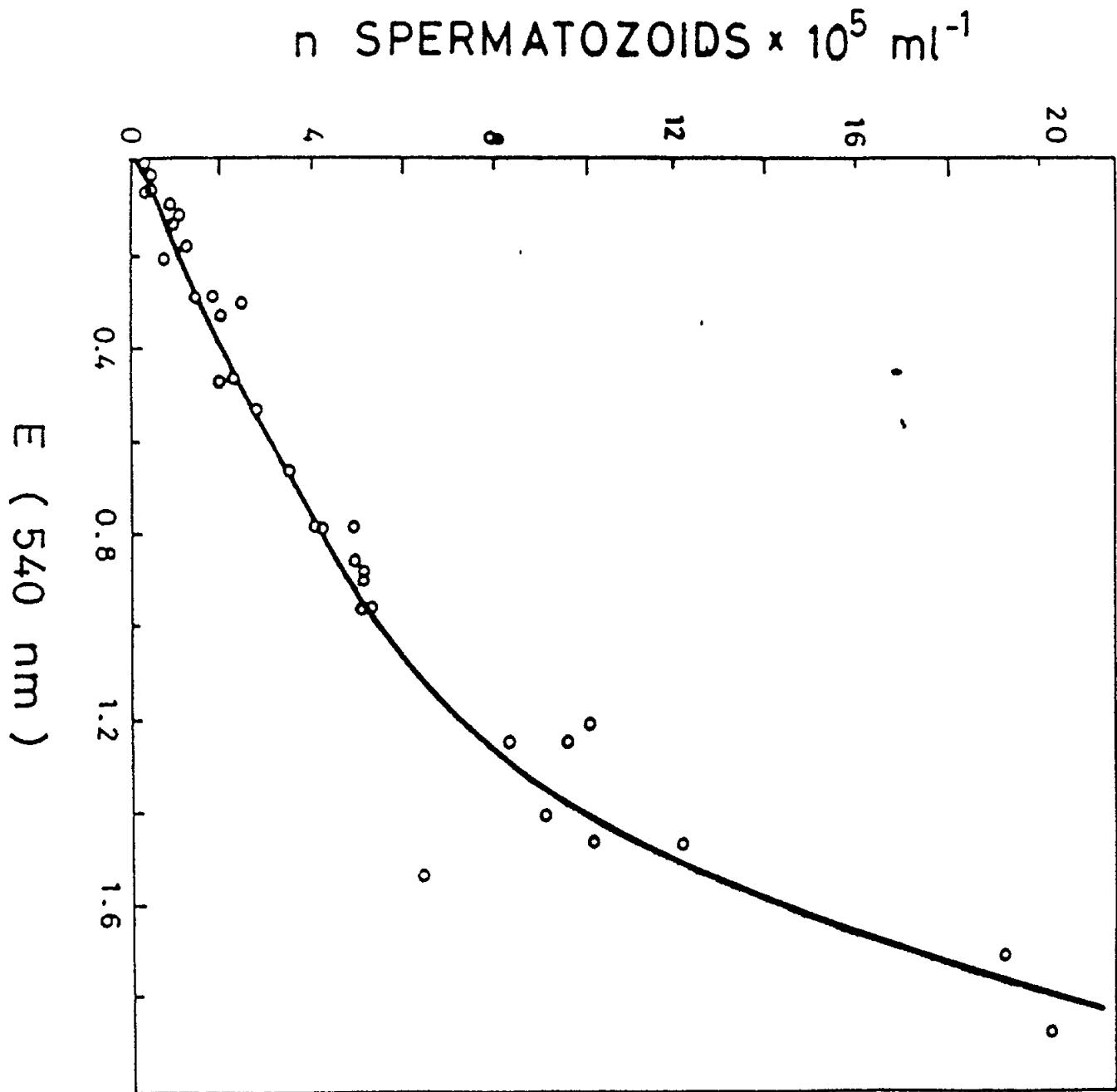


Fig. 2 Concentration of spermatozooids in relation to the optical density of sperm dilutions measured at 540 nm

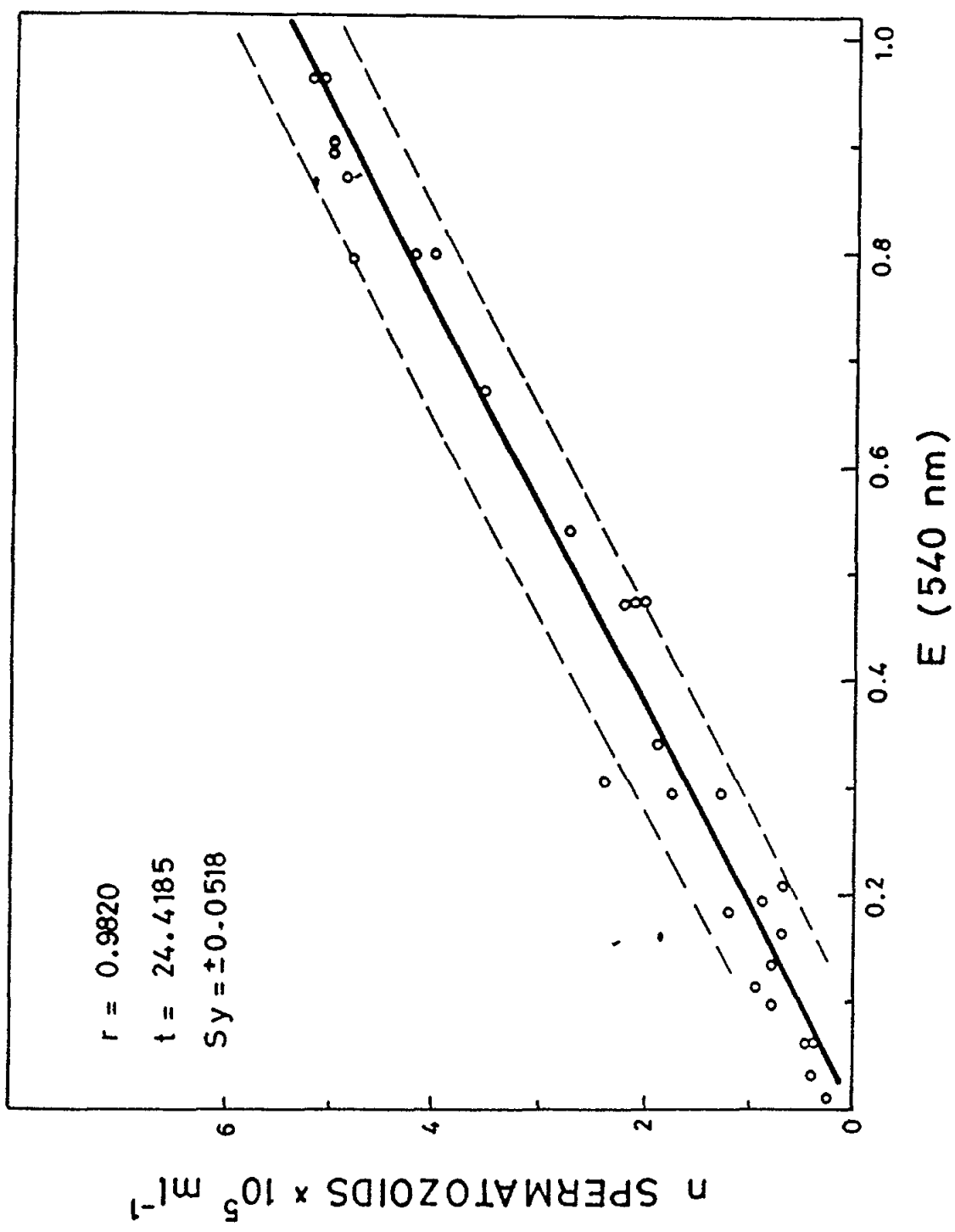


Fig. 3 Calibration diagram of the spermatozoid concentration in relation to the optical density in the range between 0.2 and 1.0 extinction units

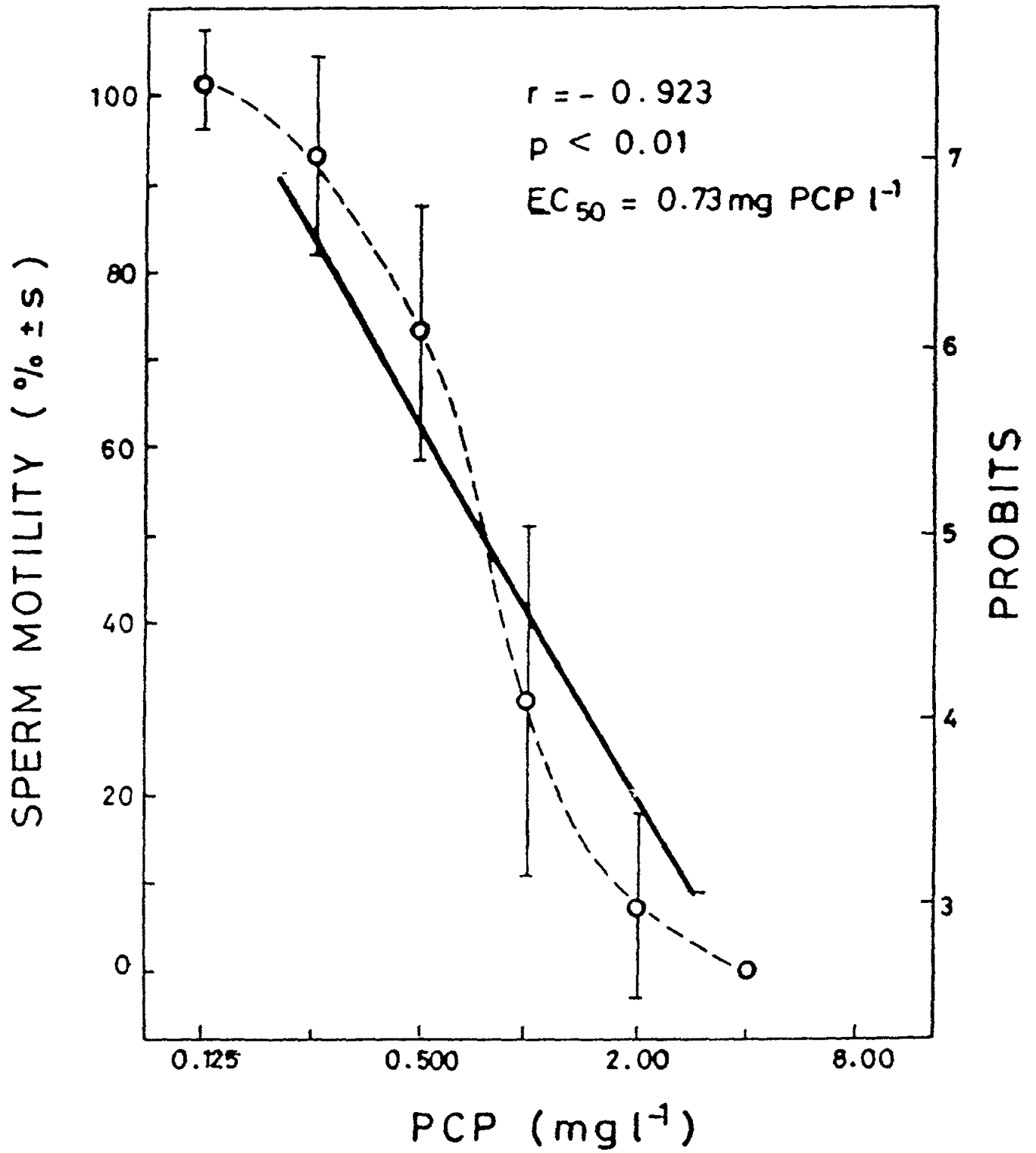


Fig. 4 Sperm motility expressed as % of the control group and the probit-linear equation for the calculation of the EC₅₀ value

Table I

Paracentrotus lividus: PCP sperm motility test. Percent motility in relation to the control group (+ s) calculated from 6 experiments and the respective probit values.

	Control	PCP (mg l ⁻¹)						
		0.125	0.250	0.500	1.00	2.00	4.00	8.00
mean %	100	102	93.7	73.4	31.1	7.3	0	0
+ s	-	5.6	11.5	15.0	20.2	10.7	-	-
probits	-	-	6.53	5.63	4.51	3.55	-	-

Table II

Paracentrotus lividus: EC₅₀ values calculated on the basis of the embryo toxicity test (E) and the sperm toxicity test (S).

		N	EC ₅₀	r	p	Zr
Embryo test	E	29	0.42	-0.877	0.01	1.354
Sperm motility test	S	19	0.73	-0.923	0.01	1.610

$$t_{E-S} = \frac{Zr_e - Zr_s}{\sqrt{1/N_E - 3 + 1/N_S - 3}} = \frac{1.354 - 1.610}{\sqrt{1/26 + 1/16}} = 0.806$$

The above value being 0.806, then 1.96 which was the difference between E and S, was not significant.

N = number of records; EC₅₀ = effective concentration (mg PCP l⁻¹); r = correlation coefficient; p = significance; Zr = Fisher's transformation of r to z; t = test of significance.

3.3 Bioaccumulation of mercury cadmium, and zinc

In the present study which concerns the effect of Se on accumulation of ^{203}Hg from sea water, a significantly reduced uptake of ^{203}Hg from sea water was observed during the first 36 hours in Se pretreated shrimps (*P. elegans*) it compared with the control group. This phase was followed by a 24 hours. accumulation, where the differences between the two groups disappeared and finally, in the final 24 hours. period of bioaccumulation, a steady state was reached in the control group, while a decline of the concentration factor was observed in the pretreated group (Fig.5). These data suggest that the interaction of Hg and Se in an organism is a time-dependent process and consequently different results may be expected at different uptake intervals. In this context, our results agree with those of Kim et al. (1977) who found that fish which were pretreated with Se accumulated significantly less Hg than those which were not pretreated. Rudd et al. (1980) suggested that an elevated concentration of Se in an experimental aquatic ecosystem appeared to retard the rate of Hg bioaccumulation by fish and crayfish.

The results of the ^{203}Hg loss experiment are expressed as a percentage of the retained ^{203}Hg in an organism and are presented in Fig. 6. The statistical analysis indicated that the differences between the two groups were not significant at $p=0.05$. On the contrary, a significantly decreased release of ^{203}Hg as compared with the control group was observed in Se pretreated *P. elegans*, when shrimps had been successively injected with SeO_2 and $^{203}\text{HgCl}$. If we compare the two experiments we can deduce that the lack of effect in the present study is probably due to the difference in the intake route of the elements.

The relations of percentages of Hg retained in the shrimp tissues in the presence of Se and single Hg group for $^{203}\text{HgCl}_2$ and $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$ forms are presented in Table III.

In the presence of Se (0.0025 $\mu\text{mol Se}$), the retention of both radioactively labelled mercurial forms increased in the hepatopancreas. On the contrary, no effect of Se treatment on Hg depuration kinetics was observed on muscles. We believe that the main route of the Se-Hg release in shrimps went through the permeable membrane barriers of the gills and to a lesser degree through urine and faecal pellets. Both elements may compete for the same carrier protein at the internal transport site.

The accumulation of radiotracers ^{109}Cd and ^{65}Zn which was recorded at the time of completion of the straight-hinge veliger larvae formation of *M. galloprovincialis* is presented in Table V. Concentration factors show that the uptake of Zn (FC=404) was a more rapid process related to Cd (FC=172).

The markedly higher accumulation level of Zn compared to Cd may be an additional argument supporting our earlier results, associated with an unexpectedly low tolerance of Zn (30 times) in comparison to Cd observed in this particular phase of early development.

In developing embryos which were simultaneously exposed to ^{65}Zn and ^{109}Cd (culture No 3) the concentration factors were not significantly different from the values related to single metal uptake. Furthermore, the previous treatment of gametes with stable Cd via adult organisms did not markedly contribute to the alteration of the ^{65}Zn accumulation level (culture No 4). Apparently, it is not consistent with our earlier findings that combined Cd-Zn toxicity is less cumulative or even antagonistic in most of the tested combinations.

Table III

Palaemon elegans: Percentage of retained radioactive labeled ^{203}Hg ($^{203}\text{HgCl}_2$ and $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$) in the presence of selenium and single mercury dose. Mean \pm SEM. In brackets are the number of specimens examined. Base level mercury concentration for the tissues was measured by NAA.

	$\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$	$\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$ + SeO_2	$^{203}\text{HgCl}_2$	$^{203}\text{HgCl}_2$ + SeO_2
Administered dose ($\mu\text{M g}^{-1}$ fresh weight)	0.0025 $\mu\text{M Hg}$	0.0025 $\mu\text{M Hg}$ + 0.0025 $\mu\text{M Se}$ (Hg:Se = 1:1)	0.025 $\mu\text{M Hg}$	0.025 $\mu\text{M Hg}$ + 0.025 $\mu\text{M Se}$ (Hg:Se = 1:1)
Time (hrs)	% of whole body retained ^{203}Hg			
24	80.9 \pm 4.8 (8) (P < 0.05)	94.6 \pm 4.2 (10)	54.0 \pm 3.2 (10) (P < 0.001)	79.3 \pm 4.2 (11)
48	83.3 \pm 3.6 (8) (P < 0.05)	98.6 \pm 5.6 (10)	47.1 \pm 2.3 (10) (P < 0.001)	65.5 \pm 4.1 (10)
	<u>specific activity of tissue</u>		<u>Base level mercury concentration</u>	
	specific activity of whole body		(g Hg g $^{-1}$ fresh weight)	
	(Hepatopancreas)			
	0.09 \pm 0.02 (7) (P < 0.05)	0.20 \pm 0.04	0.136 \pm 0.024 (12)	
	(Muscle)			
	0.74 \pm 0.26 (9) (n.s.)	0.75 \pm 0.33 (9)	0.206 \pm 0.024 (5)	

Table IV

Cd effects on sperm motility. Sperm was incubated in various Cd concentrations for 10 min. Cd concentrations in the control sea water were 0.03-0.06 $\mu\text{g Cd}^{2+} \text{ l}^{-1}$. The means and \pm S.E. in brackets are the given numbers of measurements.

Cd in sea water ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Percentage of control motility
10	85.0 \pm 4.9 (6)
50	55.5 \pm 2.9 (6)
100	51.3 \pm 4.3 (6)
500	35.2 \pm 4.0 (6)
1000	30.9 \pm 3.6 (5)

Table V

Accumulation of ^{65}Zn and ^{109}Cd in the straight-ninge veliger of M. galloprovincialis presented as relative activity of the culture medium and larvae including accompanying concentration factors (FC). Additional biological parameters (mean length and weight) of larvae in each culture were also recorded.

Culture No	Length (um)	Weight (um)	Tracer applied	Relative S.W.	Activity larvae	FC
1	108.1	0.27	^{109}Cd	0.0443	7.591	171
2	108.4	0.27	^{65}Zn	0.0828	33.418	404
3		0.28	$^{109}\text{Cd}+$ ^{65}Zn	0.0690 0.0600	10.792 25.058	156 414
4*	106.5	0.24	^{65}Zn	0.084	35.803	423

* gametes pretreated with stable Cd

3.4 Metallothionein-like proteins

The present study focused mainly on methodological problems dealing with preparation of the sample (27000xg supernatant) before application on a chromatographic column (Sephadex G-75). Our intention was to minimize the possible breakdown of metallothionein-like proteins (MLP) by application of the heat-treatment of either crude homogenate or supernatant, and by addition of a strong protease inhibitor (PMSF).

Fig.7 gives comparative data from 6 Sephadex G-75 chromatograms of soluble cytoplasmatic fraction from the digestive gland of mussels previously exposed to Cd and the control group which was not treated with Cd.

Inducible proteins isolated and partially characterized in this study were considered as MLP because of their optical properties (low absorbance at 280 nm related to that at 250 nm) being characteristic of proteins containing a low level of aromatic amino-acids and Cd-mercaptide bond. Furthermore, their strong inducibility and affinity to Cd as well as a remarkable thermostability (at 70 °C for 10 min.) were unique characteristics of these proteins.

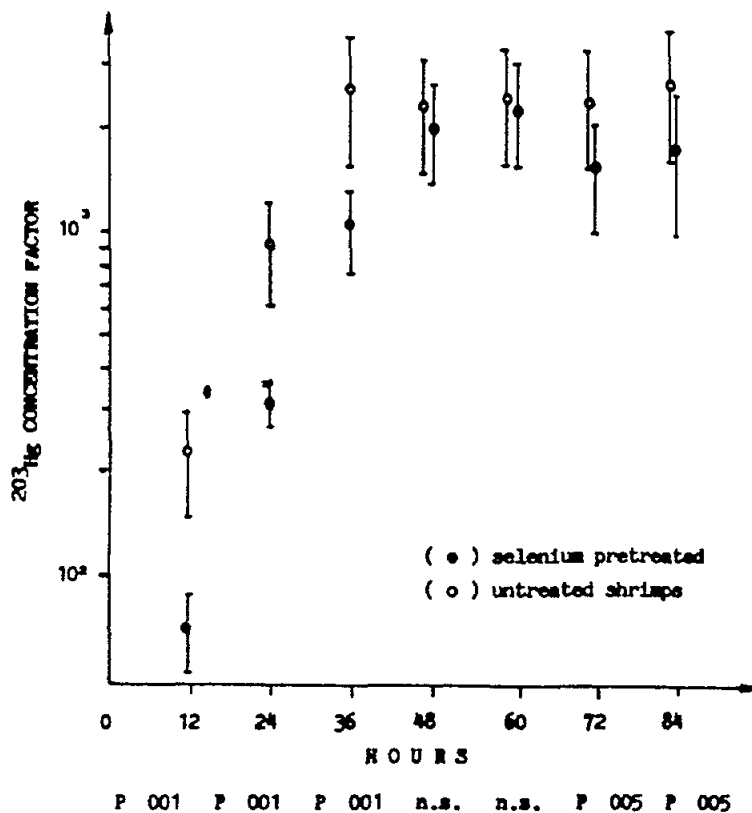


Fig. 5 Accumulation of ^{203}Hg by Palaemon elegans. Points represent a mean $\pm 1\sigma$ of 9 to 12 individuals. Statistical analysis was carried out using Student's t-test or the method by Cochran and Cox

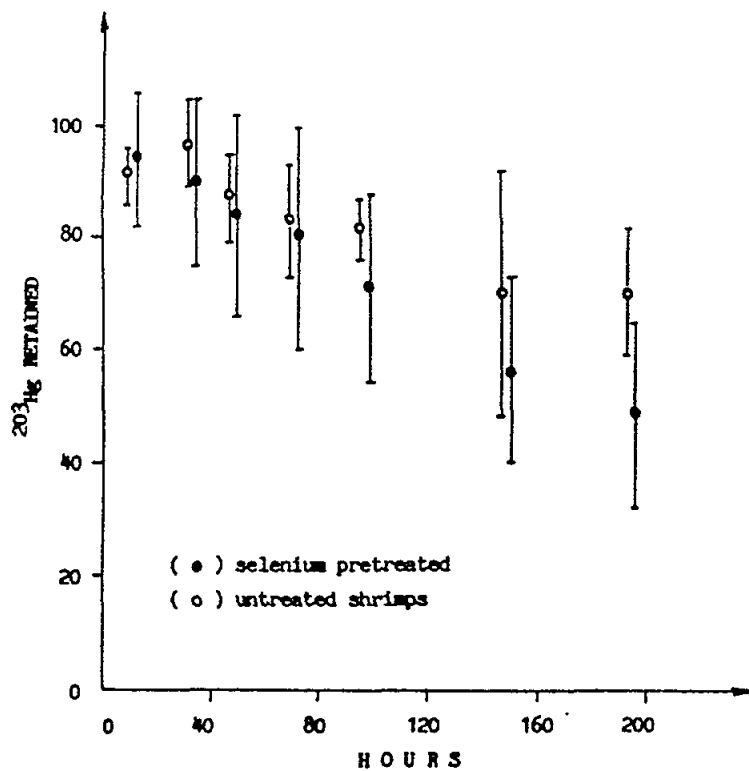


Fig. 6 Elimination of ^{203}Hg from the shrimps Palaemon elegans

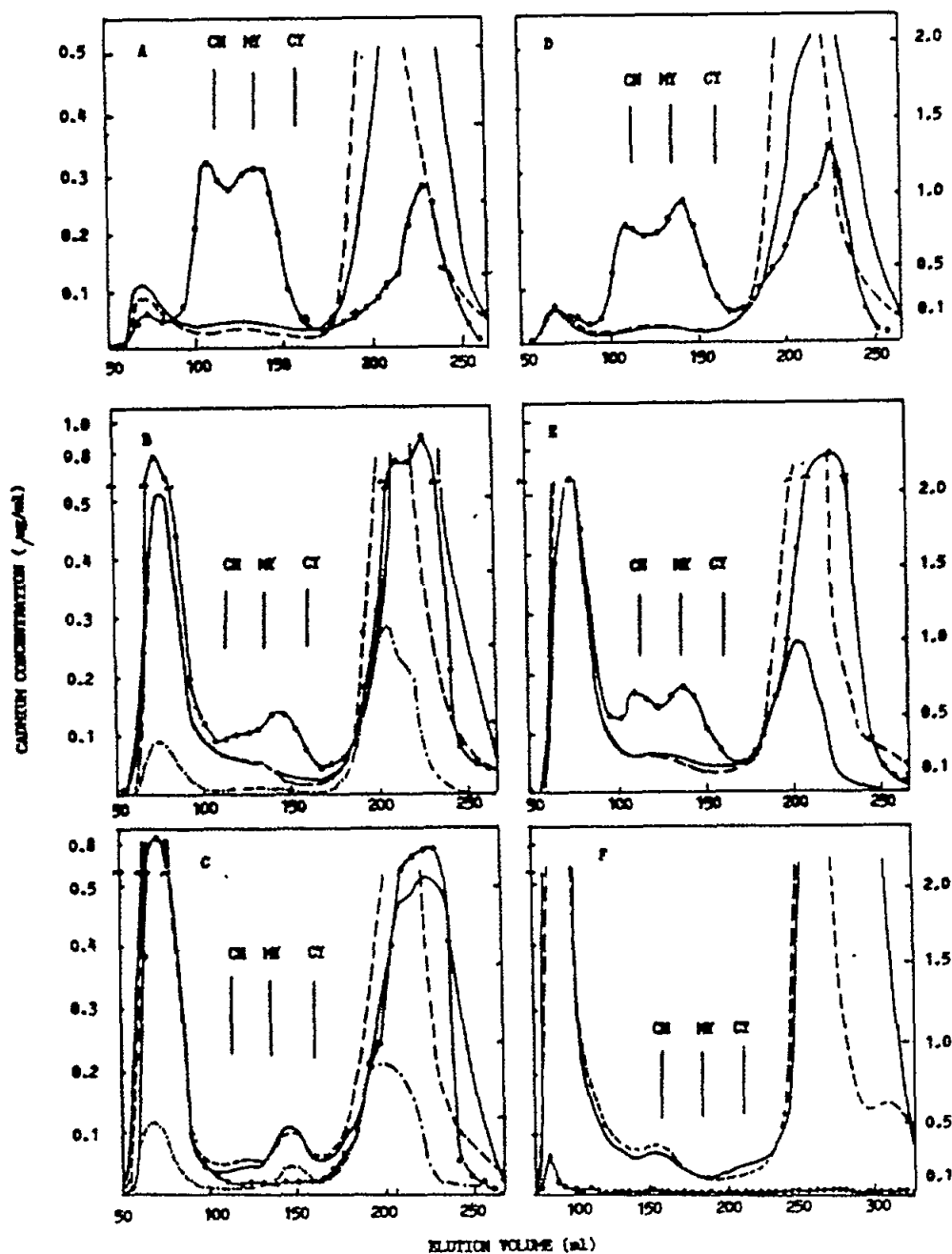


Fig. 7 Sephadex G-75 gel-filtration profiles of 27000 xg supernatants obtained from *M. galloprovincialis* digestive gland following acute exposure to Cd. The different preliminary treatments were applied as indicated on the scheme in Fig. 2:

1. IA, heat-treatment of homogenate (70 °C, 10 min.);
2. IB, untreated;
3. IB-t, denaturation of sample IB at 37 °C, 1 hr;
4. PMSF and heat-treatment of supernatant;
5. PMSF, alone;
6. control sample untreated with Cd.

Distributions of Cd (o o), and absorbances at 250 (---), 280 (....) and 343 nm (—) are presented. The arrows represent the positions of standards used for calibration (CH-Chymotripsinogen A M.W. 25000, MY-Myoglobin M.W. 17800 and Cy-Cytochrome C M.W. 12400)

4. CONCLUSIONS

The sea urchin sperm motility test was elaborated in detail and was successfully used to calculate the effective concentration (EC₅₀) of pentachlorophenol (PCP). The values obtained (0.73 mg PCP l⁻¹) were in agreement with the previously elaborated embryo toxicity tests (0.42 mg PCP l⁻¹). A decreased sperm motility was also demonstrated in relation to the presence of Cd in sea water (10-1000 ug Cd l⁻¹).

The interaction of Se with Hg was studied in the shrimp Palaemon elegans. The retention of ²⁰³Hg was slightly increased in hepatopancreas of shrimp previously treated with Se.

The bioaccumulation level of selected trace metals in adult and early developmental stages of marine invertebrates was influenced by Se pretreatment (²⁰³Hg in P. elegans) but did not either affect the attained level of ⁶⁵Zn following a pretreatment with Cd or alter the single metal level in simultaneous coaccumulation of ⁶⁵Zn and ¹⁰⁹Cd (M. galloprovincialis, straight-hinge veliger).

The comparison of three different methods of isolation and partial characterization of MLP indicated that even heat treatment of the crude homogenate is the most efficient method for total MLP determination, whereas the application of the protease inhibitor (PMSF) may be more advantageous in physiological studies of a certain metal because of the lower risk of metal redistribution.

5. REFERENCES

- Byrne, A.R. and L. Kosta (1974), Simultaneous neutron activation determination of selenium and mercury in biological samples by volatilization. Talanta, 21, 1083-1090.
- Dunham, P., L. Nelson, L. Voshall and G. Weissmann (1982), Effects of enzymatic and nonenzymatic proteins on Arbacia spermatozoa: Reactivation of aged sperm and the induction of polyspermy. Biol.Bull., 163:420-430.
- Kim, J.M., E. Birks and J.F. Heisinger (1977), Protective action of selenium against mercury in Northern Creek chubs. Bull.Environ.Contam.Toxicol., 17:132-136.
- Nelson, L. (1972), Quantitative evaluation of sperm motility control mechanisms. Biol.Reprod., 6:319-324.
- Olafson, R.W., R. G. Sim and K.G. Boto (1979), Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. Comp.Biochem.Physiol., 62:407-416.
- Ozretic, B. and M. Krajnovic-Ozretic (1984), Sea urchin gametes and their developing embryos in marine toxicology studies. Meeting of the Toxicity and Bioaccumulation of Selected Substances in Marine Organisms, Rovinj, 5-9 November 1984.

Rudd, J.W.M., M.A. Turner, B.E. Townsend, A. Swick and A. Furuntani (1980),
Dynamics of selenium in mercury contaminated experimental freshwater
ecosystems. Can.J.Fish.Aquat.Sci., 37:848-857.

Viarengo, A., M. Pertica, G. Mancinelli, G. Zanicchi and M. Orunesu (1980),
Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed
mussels. Comp.Biochem.Physiol., 67C:215-218.

Webb, M. (1972), Binding of cadmium ions by rat liver and kidney.
Biochem.Pharmacol., 21:2751-2765.

BIOACCUMULATION ET TRANSFERT D'ALTERAGENE
AU LONG D'UN RESEAU TROPHIQUE COURT

par

R.A. KAIM-MALKA

Station Marine d'Endoume, UA 41 CNRS rue Batterie des lions,
13007 Marseille, France

R E S U M E

Les recherches qui font l'objet de la présente étude sont destinées à préciser les mécanismes de la bioaccumulation des détergents sur deux organismes : un Crustacé Isopode : l'idotée, et un poisson Scorpaenidae : la Rascasse, appartenant à un réseau trophique existant dans le milieu naturel.

La contamination se fait soit par échanges avec le milieu, soit par ingestion de proies contaminées. Il est possible de mettre en évidence la présence de détergent dans tous les organes des espèces retenues. Chez le poisson, la voie de pénétration joue un rôle important sur l'ampleur de la contamination: la contamination par échanges avec le milieu est toujours très supérieure à celle par ingestion de proies contaminées (10 à 20 fois en moyenne).

Chez les deux espèces, la cinétique de la bioaccumulation varie avec l'organe considéré. Il existe des sites privilégiés pour le stockage du détergent tels le système nerveux et les gonades qui constituent de véritables organes "cibles" pour ce type d'altéragène et dont l'atteinte peut avoir des conséquences importantes pour l'individu, mais aussi pour la survie de l'espèce.

1. INTRODUCTION

Les effets chroniques des détergents ont été étudiés au cours de travaux antérieurs par Kaim-Malka (1980a, 1980c, 1981, 1983), qui a mis en évidence les conséquences de leurs actions à long terme sur diverses grandes fonctions de l'idotée, et l'influence sur la répartition de cette espèce dans le milieu naturel. Des études similaires sont actuellement en cours sur la rascasse.

En plus des effets provoqués, ces recherches doivent permettre de comprendre les mécanismes de transfert de l'altéragène au long d'un réseau trophique, d'apprécier l'importance relative de chacun des éléments et de voir si les effets produits sont de même nature ou différent en fonction du maillon.

Le présent travail vise à préciser les mécanismes de la contamination par les détergents et à privilégier l'étude de la bioaccumulation de l'altéragène par deux organismes (l'idotée et la rascasse) qui constituent deux étapes d'un réseau trophique court existant dans le milieu naturel. La contamination se fait soit par échanges avec le milieu, soit par l'apport de proies contaminées.

1.1 Choix du matériel biologique

Deux organismes ont été retenus:

- Un Crustacé herbivore: l'Isopode Idotea balthica basteri qui constitue un important maillon car il permet la transformation de la matière végétale en matière animale. De nombreuses études entreprises sur cette espèce en ont fait connaître la biologie et la physiologie. C'est une proie appréciée de la rascasse.
- Un poisson carnivore très commun dans la région marseillaise et présentant un intérêt économique certain. Il s'agit de Scorpaena notata, vulgairement appelée rascasse. C'est une espèce qui peut être facilement maintenue au laboratoire, qui est assez résistante, et qui se prête bien au type d'expériences envisagées.

1.2 Choix de l'altéragène

Le choix s'est porté sur les détergents car ils constituent d'excellents traceurs de pollution d'origine humaine. Il est donc possible à travers cet altéragène d'évaluer l'impact de l'activité humaine sur le milieu marin.

2. ETUDE DE LA CONTAMINATION ET DE LA DECONTAMINATION CHEZ L'IDOTEE

2.1 Matériel et méthodes

Le détergent utilisé pour cette série d'expériences est un acide oléique condensé sur 14 molécules d'oxyde d'éthylène. La chaîne principale est marquée au tritium.

L'expérience a été menée à 17°C. Plusieurs durées d'exposition ont été retenues. Pour chaque durée, 2 mâles et 2 femelles ont été soumis au détergent. A un stade qui se situe entre 12 h et 24 h avant la mue, les animaux sont placés individuellement dans 250 cc de solution de détergent marqué à la concentration de 5 mg l⁻¹. Ils sont laissés de 24 h à 48 h dans cette solution où ils effectuent la mue. Ils ne sont pas nourris pendant cette période. Après quoi, ils sont retirés de la solution. Certains individus sont disséqués, les animaux qui restent sont placés pendant 1, 2, 3, 4 semaines dans des bacs contenant 500 cc d'eau de mer sans détergent pour étudier les phénomènes de décontamination. Pendant cette phase expérimentale, les animaux sont régulièrement nourris et l'eau de mer est renouvelée une fois par semaine. Les idotees ayant séjourné 4 semaines dans l'eau de mer ont effectué une seconde mue. Après ce temps, les animaux sont disséqués, les divers organes prélevés séparément pour les mesures de comptage.

Un second volet de l'expérience a consisté à placer dans le tensio-actif des animaux qui ont déjà effectué la mue, et de les laisser pendant 24 h, 48 h, ou pendant une semaine, dans la solution de détergent marqué puis de les disséquer. Quelques vérifications complémentaires ont été faites en soumettant pendant une durée maximale de dix jours des animaux au détergent, ceux-ci effectuant leur mue dans le détergent.

2.2 Comptage

Les animaux sont disséqués sans fixation préalable. Chaque organe est placé dans une fiole qui contient 0,5 cc de solvène, puis, après 24 h on ajoute 10 cc d'instagel et le tout est conservé à basse température pendant au moins 24h. Les fioles sont passées ensuite au comptage. Les résultats obtenus sont corrigés en fonction des caractéristiques de l'appareil et exprimés en µg de détergent par gramme de poids frais de l'animal.

2.3 Resultats

2.3.1 Contamination chez les animaux n'ayant pas effectué la mue

Mâles (Tableau I)

Chez les animaux placés même pendant une courte période dans une solution de détergent, il est possible de mettre en évidence la présence de ce polluant dans les différents organes. La quantité totale de détergent présente, augmente en fonction de la durée d'exposition. On peut noter deux types d'évolution selon l'organe étudié:

- 1) Pendant 48 h, il y a une augmentation de la quantité de détergent dans l'organe; au-delà, cette quantité diminue. C'est le cas des pléopodes branchiaux, de la tête, de la carapace, des muscles.
La quantité de détergent trouvée dans les pléopodes branchiaux varie peu dans le temps. On peut penser que cet organe, qui constitue une zone d'échanges avec le milieu extérieur, se met en équilibre avec le milieu et les valeurs mesurées reflètent de cet équilibre.
- 2) Il y a une augmentation continue de la quantité de détergent. C'est le cas de la chaîne nerveuse ventrale, du tube digestif, des caecums, des gonades, du coeur. Un stockage s'opère au niveau de ces organes. Tant que l'animal ne mue pas, les quantités présentes ne sont pas susceptibles de diminuer dans la gonade et la chaîne nerveuse ventrale, alors qu'elles peuvent varier dans le tube digestif et les caecums (phénomènes d'osmorégulation, stockage, passage tube digestif-caecums).

Il importe de noter que les quantités trouvées dans les caecums, et le tube digestif sont égales aux 3/4 de la quantité totale accumulée par les animaux au bout d'une semaine. Après ces organes, c'est dans les gonades que l'on trouve les plus fortes concentrations.

Femelles (Tableau II)

Les quantités trouvées sont très nettement inférieures à celles obtenues chez les mâles. L'évolution en fonction du temps est différente de celle des mâles. Des mesures effectuées sur des femelles en prémue, éprouvées, pendant 48 h, montrent que les quantités fixées sont égales ou supérieures à celles notées pour une semaine d'exposition. Ceci est à mettre en relation avec les échanges qui se produisent à l'approche de la mue. Les mesures faites sur la gonade et les oeufs révèlent qu'il y a peu de détergent. Ceci est remarquable si on le compare au résultat obtenu pour les mâles. Par contre, des mesures faites sur des embryons après 24 h d'exposition montrent qu'il existe une importante fixation.

Tableau I

Quantités de détergent contenues dans les organes d'idotées mâles (en ug g⁻¹) n'ayant pas mué et soumis au détergent.

ORGANES	PLEOPODES BRANCHIAUX	CHAINE NERVEUSE VENTRALE	TUBE DIGESTIF	CAECUMS	GONADES	"COEUR"	TETE	CARAPACE ET MUSCLES
24H	7,37-74,2	3,57- 9,27	3,20- 11,25	9,3- 41,05	6,35-21,72	3,1 - 8,63	5,25-17,35	6,72-26,95
48H	35,42-76,62	9,2 -11,85	9,28- 25,02	87,85-212,37	8,45-48,59	8,9 -22,02	15,38-34,82	26,24-32,77
1 semaine	32,42-33,5	23,55-25,35	186,82-548,50	133,85-400,2	21,17-62,4	30,92-44,42	13,75-20,77	21,4 -26,67

Tableau II

Quantités de détergent contenues dans les organes d'idotées femelles (en ug g⁻¹) n'ayant pas mué et soumises au détergent.

ORGANES	PLEOPODES BRANCHIAUX	CHAINE NERVEUSE VENTRALE	TUBE DIGESTIF	CAECUMS	GONADES	"COEUR"	TETE	CARAPACE ET MUSCLES
ANIMAUX LOIN DE LA MUE								
24H	5,19- 6,95	1,42- 2,25	3,57- 4,07	6,8 -10,35	0,53- 1,1	1,1 -2	2,21- 4,05	9,50-11,05
48H	1,39- 1,59	0,53- 0,61	0,17- 2,92	1,55- 2,61	0,10- 0,25	0,22-0,66	0,71- 0,82	1,32- 1,55
1 semaine	10,3 -11,21	1,87- 5,27	5,34-10,72	17,40-51,25	1,54- 4,9	3,16-5,67	5,25-10,45	11,76-18,9
femelles en prémue								
48H	31,17-65,22	0,95-10,3	8,27-11,35	23,1 -52,65	1,12-14,82	7,12-8,02	18,02-30,47	41,25-50,6

2.3.2 Contamination chez les animaux ayant mué dans la solution de détergent (Tableau III)

Quelques animaux (mâles et femelles) ont été placés pour un maximum de 10 jours dans la solution où ils ont effectué la mue. Les valeurs obtenues sont un peu moins élevées que chez les animaux n'ayant pas mué. La mue a pour effet de diminuer les quantités de détergent présentes dans le corps de l'animal. Cependant, cette élimination est faible si l'animal reste soumis au détergent. La quantité stockée va donc augmenter d'une mue sur l'autre, par augmentation progressive du niveau résiduel (Fig.1), c'est-à-dire de la quantité que l'animal ne peut éliminer. Le comportement de l'animal qui consiste à dévorer l'exuvie ne peut qu'aggraver cette situation (par autostockage). Pour la gonade femelle, les valeurs obtenues sont plus élevées que dans le cas où l'animal n'effectue pas de mue.

2.3.3 Etude de la décontamination (Tableaux IV et V)

Si l'animal mue et si, après la mue, on le place dans un milieu sans détergent, on observe une baisse sensible de la quantité de détergent présente dans l'organisme. Cependant, tant chez le mâle que chez la femelle, la gonade élimine mal ou n'élimine pas le toxique fixé à son niveau. Chez la femelle, les quantités mesurées dans la gonade après 4 semaines de décontamination sont égales ou doubles de celles trouvées initialement après 24h et ceci malgré une nouvelle mue de l'animal. Ce résultat peut trouver une explication dans les observations faites par Donadey (1973) pour qui il existerait un transport de protéines depuis le caecum vers la gonade. Ces observations permettent de comprendre une telle augmentation du détergent dans la gonade, bien que l'animal ne soit plus soumis à l'altéragène. Ceci a des répercussions importantes sur la reproduction de l'espèce, ainsi qu'il a été possible de l'observer : blocage de la division cellulaire, baisse de la fécondité, juvéniles malformés (Kaim-Malka 1980a, 1983; Kaim-Malka et Donadey, 1978).

En dehors des localisations, deux points sont remarquables:

- d'une part le fait que Idotea concentre le détergent; cet aspect du problème est particulièrement important car les dosages effectués uniquement sur des prélèvements d'eau de mer risquent de donner des indications très inférieures aux quantités de détergent se trouvant réellement dans le milieu marin en raison des phénomènes de concentration par les divers organismes marins;
- d'autre part, la rapidité avec laquelle tous les organes sont atteints par le détergent; et l'atteinte n'est pas superficielle, mais au contraire se fait en profondeur ainsi que le révèle l'historiographie (Kaim-Malka 1980a et b; Kaim-Malka et Donadey, 1984).

Une élimination du détergent par certains organes semble possible si les conditions du milieu se modifient, mais les lésions sont-elles réversibles? Cela est moins sûr, et par ailleurs la fonction de reproduction semble quant à elle atteinte d'une manière très importante sinon irréversible.

Tableau III

Quantités de détergent contenues dans les organes d'idotées mâles et femelles (en ug g⁻¹) ayant mué et soumis au détergent.

ORGANES	PLEOPODES BRANCHIAUX	CHAÎNE NERVEUSE VENTRALE	TUBE DIGESTIF	CAECUMS	GONADES	"COEUR"	TÊTE	CARAPACE ET MUSCLES
Mâles								
1 semaine mue début	18,5	8,95	36,82	160,3	24,17	24,07	11,32	22,45
1 semaine mue milieu 10 jours	15,4	6,2	147,85	39,9	11,32	5,8	3,8	4,27
mue milieu	19,77	11,97	253,4	148,15	27,45	15,02	14,97	26,25
Femelles								
6 jours mue fin	7,07-8,25	5,1-5,92	105,4-155,42	37,85-66,45	4,17-36,12	5,12-7,52	3,1-3,37	6-7,15
								-17,7

Tableau IV

Quantités de détergent (en ug g⁻¹) contenues dans les différents organes d'animaux mâles ayant effectué la mue dans le détergent et élevés en eau de mer. Les quantités soulignées et celles figurant en quatrième semaine représentent les valeurs obtenues sur des animaux ayant effectué une deuxième mue.

ORGANES	PLEOPODES BRANCHIAUX	CHAÎNE NERVEUSE VENTRALE	TUBE DIGESTIF	CAECUMS	GONADES	"COEUR"	TÊTE	CARAPACE ET MUSCLES	EXUVIE 1	EXUVIE 2
24H	26,35-29,35	4,77-7,2	18,78-226,27	52,84-130,19	17,03-19,70	5,91-12,20	5,57-6,69	11,57-18,95	28,92-45,07	-
48H	24,8-26,52	6,17-6,94	16,69-61,60	52,64-57,43	11,92-15,11	4,45-7,2	4,74-8,55	10,57-10,82	20-22-35,8	-
1 semaine	3,12-9,23	2,31-4,88	24,13-41,01	18,51-26,44	6,81-8	6,14-7,11	1,87-3,74	4,37-6,65	11,15-18,65	-
2 semaines	3,27-5,8	1,51-2,97	1,56-6,15	3,65-8,62	3,03-5,11	3,68-3,88	1,31-1,74	2,75-3,85	16,3-25,97	-
3 semaines	<u>0,72-9,57</u>	<u>2,2-3,2</u>	<u>2,42-2,54</u>	<u>3,32-8,74</u>	<u>5,18-7,25</u>	<u>2,17-2,94</u>	<u>0,42-3,19</u>	<u>0,42-5,07</u>	<u>14,05-32,3</u>	2,75
4 semaines	0,60-1,35	1,05-3,45	0,67-2,19	1,19-5,21	2,81-7,70	1,25-3,40	0,25-0,87	0,17-0,55	25,35-33,22	1,22-1,8

Tableau V

Quantités de détergents (en ug g⁻¹) contenues dans les différents organes d'animaux femelles ayant effectué la mue dans le détergent et élevées en eau de mer. Les quantités figurant en quatrième semaine représentent les valeurs obtenues sur des animaux ayant effectué une deuxième mue.

ORGANES	PLEOPODES BRANCHIAUX	CHAINE NERVEUSE VENTRALE	TUBE DIGESTIF	CAECUMS	GONADES	"COEUR"	TETE	CARAPACE ET MUSCLES	EXUVIE 1	EXUVIE 2
24H	4	-4,67	1,05-1,91	2,27-4,63	3,75-10,12	1,72-2,02	0,64-0,74	2,25- 2,75	4,55- 7,35	-
48H	2,58-5,87	0,76-3,97	0,52-6,46	2,18-36,60	0,40-1,89	0,89-2,90	0,38-2,39	1,61- 6,37	5,7 - 8,52	-
1 semaine	1,5 -4,07	0,82-4,06	4,57-9,09	3,54-32,95	2,24-2,86	0,65-3,13	0,77-2,98	2,57- 5,47	7,61-17,95	-
2 semaines	2,85-3,35	0,94-2,70	1,45-4,14	2,74- 3,94	1,49-3,15	1,68-3,37	1,40-1,50	2,95- 4,35	6,62-14,1	-
3 semaines	1,1 -3,42	0,61-1,25	0,33-4,77	0,33- 8,10	0,40-3,02	0,78-1,20	0,22-1,99	0,6 -10,9	11,37-27,5	-
4 semaines	0,45-0,52	0,5 -1,16	0,20-1,90	0,49- 0,74	1,67-4,19	0,54-2,09	0,18-0,25	0,27- 0,3	11,95-16,02	0,57-0,72

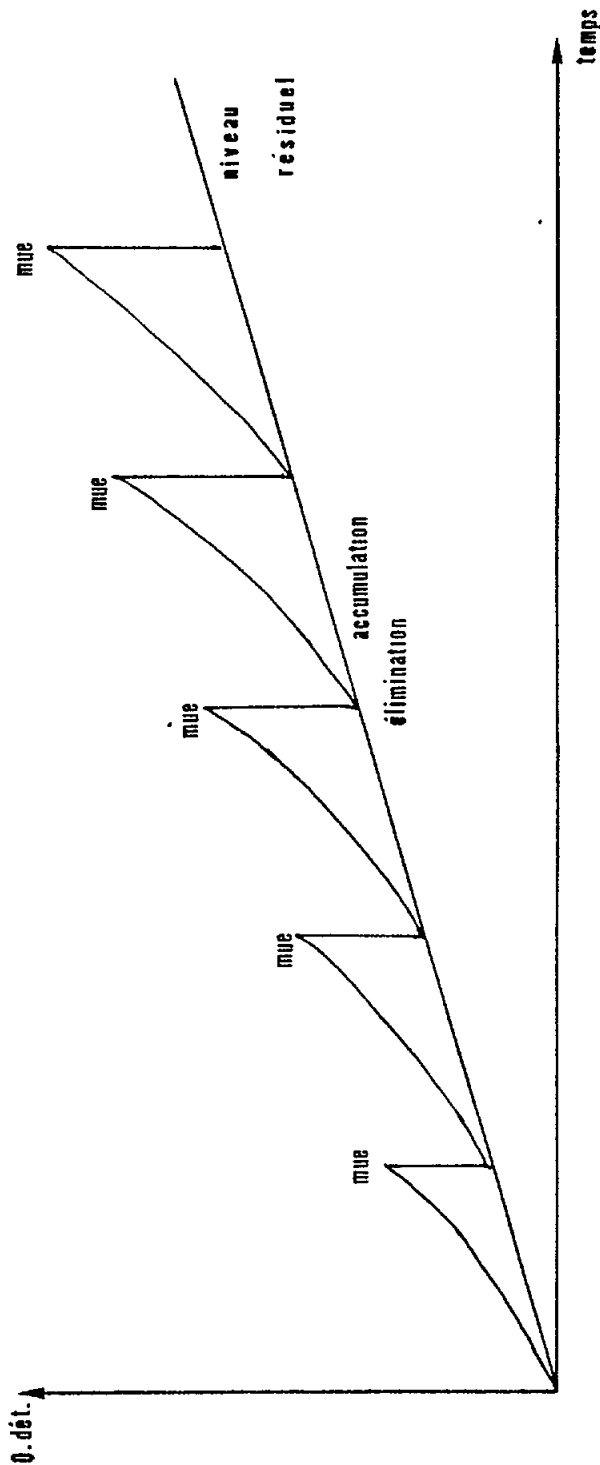


Fig. 1. Processus d'accumulation du détergent en fonction du temps

3. ETUDE DE TRANSFERT DE L'ALTERAGENE CHEZ LA RASCASSE

3.1 Matériel et méthodes

Pour des raisons pratiques, il a été fait appel à un détergent marqué au ^{14}C , dont la formule est très proche de celui utilisé pour les idotées. Il s'agit d'un détergent non ionique polyéthoxylé marqué au ^{14}C sur l'oxyde d'éthylène, ce qui permet de suivre de manière précise le devenir d'un des composants les plus importants des détergents. La concentration choisie (5 mg l^{-1}) est proche des valeurs trouvées pour les détergents dans le milieu naturel.

Dans cette étude deux aspects ont été retenus:

- contamination par proies
- contamination par échanges avec le milieu

Pour chacun des aspects retenus il a été effectué une étude de la contamination et de la décontamination.

3.2 Contamination de la rascasse par ingestion de proies contaminées

Après la capture, les rascasses sont placées dans des bacs d'eau de mer de 15 l, dans une salle à température constante ($17^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) pendant au moins un mois pour s'adapter. Après 10-15 jours de capture, elles commencent à s'alimenter régulièrement. 24 h avant le début de l'expérience, les rascasses sont placées individuellement dans des bacs de 2 l d'eau de mer.

3.2.1 Etude de la contamination

Pendant toute la durée de l'expérience les rascasses ont été nourries chaque jour. La nourriture est composée d'une idotée par jour et qui, au préalable, a séjourné 24 h dans 100 ml d'une solution de détergent marquée à la concentration de 5 mg l^{-1} . Les proies sont fournies pendant 3 à 30 jours. Pour chaque période de temps envisagée, deux poissons ont été mis en expérience.

3.2.2 Etude de la décontamination

Le deuxième aspect de cette étude est constitué par le processus de la décontamination. La première phase de l'expérience est identique à la phase de la contamination par proies. Par la suite, à la fin de la période de contamination, les animaux sont nourris uniquement avec des proies non contaminées pendant une durée de 30 jours. Ici aussi, pour chaque période de temps envisagée, deux poissons ont été mis en expérience.

A la fin de chaque expérience, les animaux sont sacrifiés, mesurés, disséqués et les principaux organes ou tissus sont prélevés pour le comptage. Les organes ou tissus prélevés sont les suivants: le tube digestif, le foie, la rate, la vésicule biliaire, les gonades, le rein, la vessie, le coeur, les branchies, le système nerveux, les capsules nasales, les caecums digestifs, la chair.

3.2.3 Comptage

Les organes prélevés sont placés séparément dans des fioles à scintillation. Les mesures sont faites au moyen d'un compteur à scintillation Intertechnique SL 3000.

3.2.4 Resultats (Tableaux VI et VII)

Pour la majorité des organes prélevés, on observe que les quantités de détergent mesurées à ce niveau sont inférieures à 1 ug g^{-1} . Toutefois, on peut distinguer deux cas:

- indépendamment du facteur temps, les valeurs moyennes des mesures restent plus ou moins stables pendant toute la durée de l'expérience. C'est le cas du tube digestif ($Q < 0,4 \text{ ug g}^{-1}$), des branchies ($Q < 0,3 \text{ ug g}^{-1}$), du système nerveux ($Q < 0,2 \text{ ug g}^{-1}$), de l'oeil ($Q < 0,3 \text{ ug g}^{-1}$), des capsules nasales ($Q < 0,1 \text{ ug g}^{-1}$), de la chair ($Q < 0,1 \text{ ug g}^{-1}$). (Tableau IV).
- En fonction du temps, dans la limite de la durée de l'expérience, on observe une augmentation de la quantité de détergent présent, mais les valeurs moyennes sont inférieures ou proches de 1 ug g^{-1} . C'est le cas de:
 - . la vessie $0,689 \text{ ug g}^{-1}$ en 3 jours \longrightarrow $1,344 \text{ ug g}^{-1}$ en 30 jours
 - . le coeur $0,104 \text{ ug g}^{-1}$ en 3 jours \longrightarrow $0,404 \text{ ug g}^{-1}$ en 30 jours

D'autres organes étudiés présentent des réactions plus spécifiques, à savoir que jusqu'au 12ème jour les quantités de détergent présentes sont faibles et inférieures à 1 ug g^{-1} . Au-delà de ce laps de temps, il y a accroissement de l'altéragène qui peut atteindre des valeurs relativement importantes. C'est ainsi que l'on observe les résultats suivants: caecums 5 ug g^{-1} , rate: $2,6 \text{ ug g}^{-1}$, gonades: 4 ug g^{-1} , vésicule biliaire: $8,9 \text{ ug g}^{-1}$. Ce sont les sites où l'on trouve les plus fortes concentrations de détergent.

Il semble qu'une durée de contamination supérieure à 12 jours constitue une période critique au-delà de laquelle le contrôle que pourrait exercer l'organe ou l'organisme sur l'accumulation de l'altéragène perd de son efficacité, ce qui faciliterait alors son stockage (ex : foie, rein, rate, gonades). L'élimination de l'altéragène est importante dans les fèces ($1 \text{ à } 5 \text{ ug g}^{-1}$) aussi longtemps que sont fournies les proies contaminées. Au-delà les quantités présentes mesurées sont faibles (Fig.2). Elles passent à moins de $0,5 \text{ ug g}^{-1}$ dans les deux jours qui suivent l'arrêt de la fourniture de proies contaminées. Au-delà, cette baisse ne cesse de s'accroître jusqu'à la fin de l'expérience où les quantités détectées sont alors presque nulles. L'effet d'une décontamination est variable suivant l'organe étudié. Pour certains, la période de décontamination est sans effets (ex : système nerveux, chair). Pour d'autres, on observe une élimination plus ou moins marquée du détergent (ex : tube digestif, foie, rate, rein, coeur). Pour d'autres enfin, on peut mettre en évidence une importante diminution de l'altéragène présent (ex : vésicule biliaire, gonades).

3.3 Contamination de la rascasse par échanges avec le milieu extérieur

Pour des raisons pratiques, on prépare une solution partiellement marquée (au 1/10).

3.3.1 Etude de la contamination

Les animaux sont placés séparément, pour des périodes déterminées, dans des bacs contenant 200 ml de solution de détergent marqué. Au bout de ce temps, ils sont sacrifiés, mesurés, pesés, disséqués et les différents organes prélevés pour le comptage.

3.3.2 Etude de la décontamination

Le protocole de la phase de contamination est le même que précédemment. A la fin de la période de contamination retenue, les animaux sont placés pendant 30 jours dans des bacs contenant 200 ml d'eau de mer non contaminée. Après quoi ils sont sacrifiés et les différents organes prélevés pour le comptage. Cette étude a été complétée par quelques expériences ponctuelles permettant d'apprécier la décontamination en fonction du temps.

3.3.3 Résultats

Pour l'ensemble des organes liés à l'appareil digestif (tube digestif, caecums, foie, vésicule biliaire), on observe en fonction du temps une augmentation continue du détergent présent (Tableau VIII). Si dans le tube digestif l'accroissement reste relativement faible, pour les autres organes il est beaucoup plus important (5 à 30 fois plus). Cependant, il est vraisemblable qu'à partir du tube digestif, un stockage du détergent s'opère dans les caecums, le foie et la vésicule biliaire. Pour l'ensemble des organes ou tissus étudiés, c'est dans la vésicule biliaire que l'on trouve les plus fortes concentrations de détergents. Cette dernière pourrait faire office de voie d'élimination de l'altéragène pour cet ensemble, mais il est possible qu'elle provoque une autocontamination du fait de son déversement dans le tube digestif. Le détergent se trouverait alors piégé dans une boucle.

Certains organes qui stockent le détergent (caecums, foie, vésicule biliaire, rein, vessie) montrent l'existence d'une période critique se situant au 15ème jour de l'expérience (Fig.3). Elle se traduit par une brusque et importante élévation de la concentration en détergent. Toutefois, on peut attribuer deux causes différentes à ce phénomène unique:

- Pour les organes liés à l'appareil digestif, tel le foie, on peut penser que pendant les 15 premiers jours, l'organe peut contrôler l'altéragène en limitant son entrée ou en l'éliminant, l'entrée et la sortie s'équilibrant. Au-delà des 15 jours, l'équilibre serait rompu, les processus d'élimination étant dépassés. Il se produit alors une accumulation de l'altéragène. Ceci n'implique pas que l'élimination ne se fasse plus, mais simplement que le phénomène est plus important dans un sens que dans l'autre. Le stockage se fait par augmentation progressive du niveau résiduel avec des relargages possibles (phénomène en dent de scie).

- Pour les organes appartenant à l'appareil excréteur (rein, vessie), on peut envisager un processus identique au précédent. De plus, les mesures effectuées dans le rein et la vessie pendant les deux phases expérimentales, montrent que les valeurs obtenues sont proches, ce qui laisserait à penser que la décontamination est sans effet. En fait, les valeurs élevées trouvées pourraient traduire l'activité du rein qui serait sollicité au maximum pour épurer la circulation de toute trace de détergent. Cette augmentation du détergent dans le rein pourrait être liée directement à une élimination de l'altéragène par les organes où il s'est accumulé. Du fait du stockage dans les différents organes, il se produirait un renouvellement permanent du détergent présent dans la circulation. Le rein et la vessie n'éliminant pas assez vite, le rein retiendrait et stockerait provisoirement ce détergent. Son élimination aurait lieu en permanence au cours des deux phases expérimentales, mais à une vitesse inférieure à celle du stockage. Dans cette hypothèse, il y aurait donc accumulation en apparence.

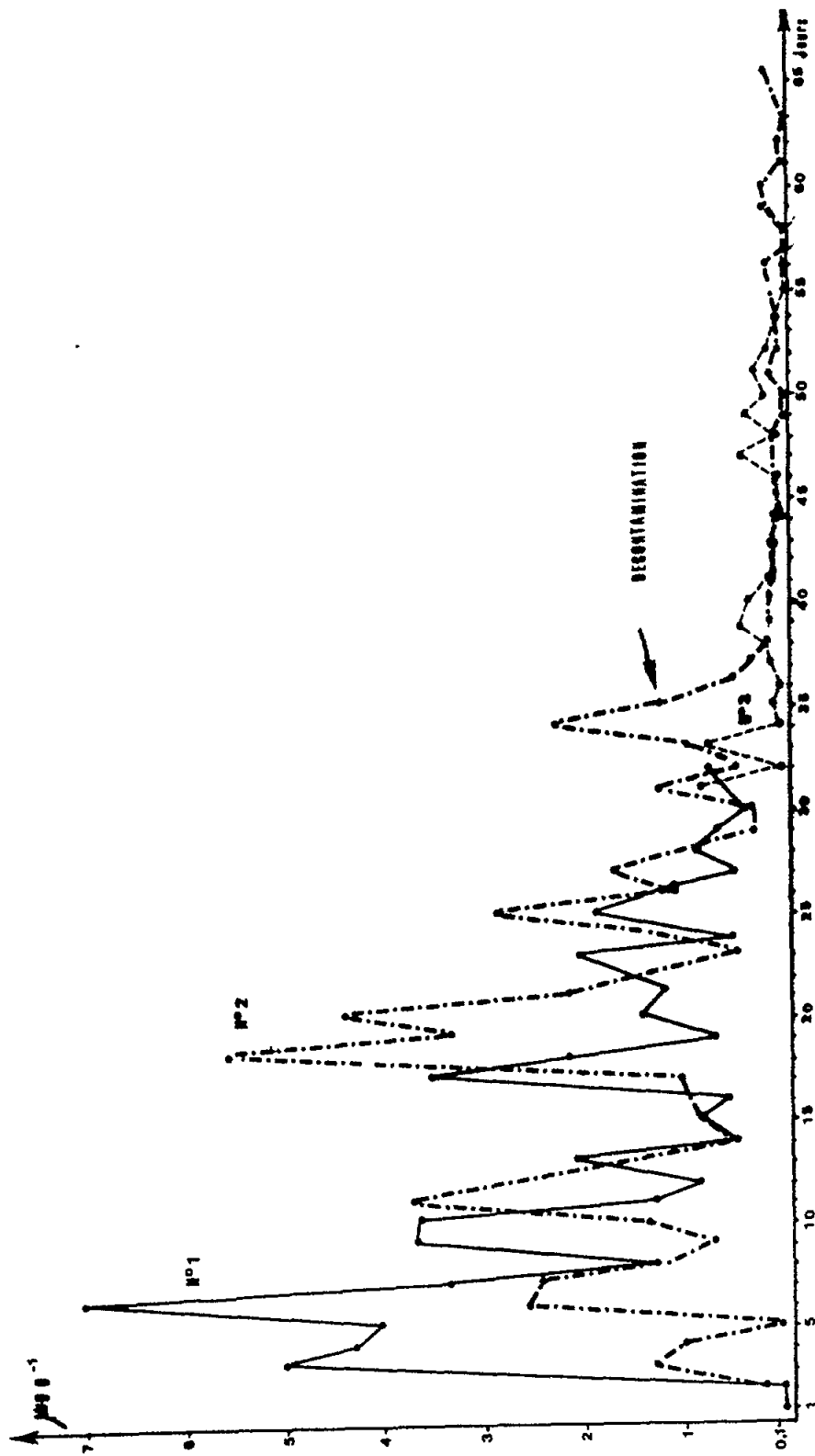


Fig. 2 Quantités de détergent présentes dans les fèces de la rascasse (en $\mu\text{g g}^{-1}$)
No 1: Contamination par ingestion de proies contaminées
No 2: Contamination par ingestion de proies contaminées et décontamination
No 3: Contamination par échanges avec le milieu (phase de décontamination)

Tableau VIII

Contamination par échanges avec le milieu. Quantités de détergent présentes dans les divers organes de la rascasse (en $\mu\text{g g}^{-1}$). Moyennes.

DUREE	TD	FOIE	RATE	VESICULE BILIAIRE	GONADES REIN	VESSIE COEUR BRANCHIES	SN	OEIL	CAPSULES NASALES	CAECUMS	CHAIR			
24H	2,19	5,31	7,10	14,80	1,75	5,51	3,26	3,25	1,68	0,63	4,85	0,68	3,46	0,49
48H	2,46	3,67	4,16	8,46	0,43	3,47	3,47	1,00	3,73	1,02	10,01	0,93	6,71	0,62
3j.	2,30	7,54	9,55	36,87	4,45	4,24	4,84	4,68	5,50	2,34	7,37	1,97	13,54	1,40
6j.	1,55	4,79	3,72	24,28	1,25	4,45	3,14	2,03	2,65	0,94	8,22	1,71	2,11	0,64
9j.	3,06	8,27	6,38	34,55	8,79	4,37	4,31	2,58	2,73	2,45	12,27	2,07	6,19	1,85
12j.	2,42	5,69	9,45	29,78	0,89	3,69	8,90	1,77	4,54	1,69	15,20	4,23	3,58	0,72
15j.	3,81	22,58	9,14	124,86	0,82	12,44	25,37	4,52	4,32	1,91	9,15	1,86	14,39	1,02
21j.	2,70	12,96	7,86	25,75	1,00	7,86	3,43	1,63	2,95	3,22	10,62	1,12	8,09	0,86
30j.	4,86	48,41	8,96	36,54	21,79	23,11	19,12	5,71	1,36	5,04	5,77	1,30	21,36	0,93

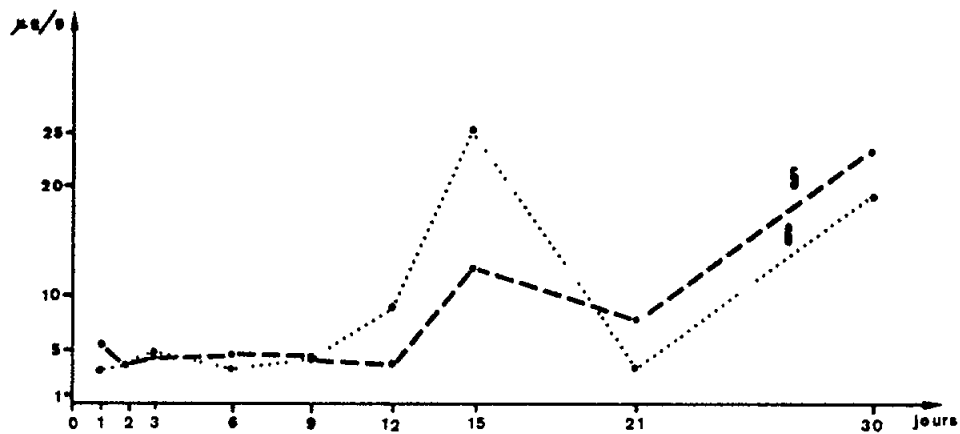
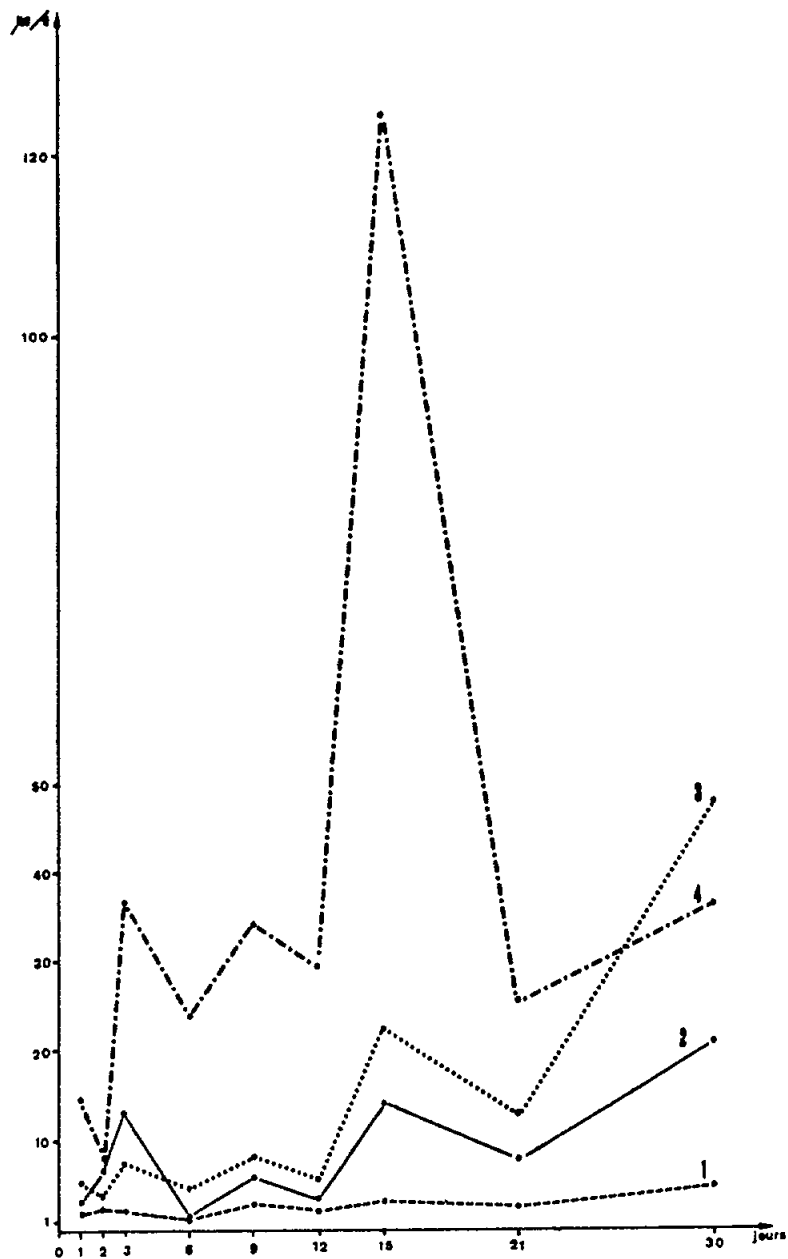


Fig. 3 Contamination par échanges avec le milieu. Courbes représentant l'évolution des quantités de détergent présentes dans différents organes (en $\mu\text{g g}^{-1}$). 1: Tube digestif, 2: Caecums, 3: Foie, 4: Vésicule biliaire, 5: Rein, 6: Vessie.

- Pour les autres organes ou tissus étudiés, les quantités mesurées peuvent être faibles et plus ou moins constantes pendant toute la durée de l'expérience : c'est le cas des capsules nasales et de la chair dont les valeurs sont de l'ordre du $\mu\text{g g}^{-1}$. Les branchies, la rate, le coeur, l'oeil, présentent des quantités de l'ordre de quelques $\mu\text{g g}^{-1}$ et qui varient dans un rapport de 1 à 3 pendant la durée de l'expérience. On peut penser que les branchies, qui constituent une zone d'échanges avec le milieu extérieur, tendent à se mettre en équilibre avec lui; les valeurs trouvées représentent la résultante de cet équilibre. Le système nerveux et la gonade présentent un phénomène d'accumulation lent et progressif. Dans le cas de la gonade, le phénomène est très tardif par rapport à l'ensemble des organes où l'on observe un stockage, mais les valeurs obtenues sont très élevées (plus de 10 fois celles du début de l'expérience).

Les essais de décontamination montrent qu'il existe des possibilités d'élimination du détergent.

Durée de contamination variable

Si on compare les résultats obtenus à la suite d'une durée de décontamination fixe (30j) (Tableau IX) à ceux obtenus à la suite d'une simple contamination (Tableau VIII), on observe que:

- pour un certain nombre d'organes, les quantités mesurées sont proches de celles obtenues après la phase de contamination (foie, rein, rate, chair). On peut penser a priori que la décontamination est sans effet et qu'une accumulation de détergent a lieu. Cependant, pour le foie et le rein on peut évoquer un stockage provisoire.
- pour d'autres organes, on observe une baisse des quantités présentes (tube digestif, caecums, branchies, capsules nasales).
- pour un troisième groupe d'organes, on note, à la fin de la période de décontamination, la présence de quantités de détergent supérieures à celles d'une simple contamination. On peut dans ce cas parler d'un phénomène d'accumulation. C'est le cas de la vésicule biliaire et de la vessie (explication en tant que voies d'élimination au foie et au rein), le coeur (le stockage pourrait être alimenté par la circulation qui drainerait plus ou moins le détergent localisé dans d'autres parties de l'organisme), le système nerveux (le phénomène est faible), les gonades.

Durée de décontamination variable

Des essais de décontamination avec des temps variables ont été tentés (Tableau X). La durée de contamination retenue est de 9 jours (temps inférieur au seuil critique). Il existe une possibilité d'élimination du détergent par certains organes (tube digestif, foie, rein, vessie, système nerveux, oeil, gonades, chair), mais celle-ci reste limitée. En effet, les quantités présentes tendent vers une limite relativement basse au-delà de laquelle:

- soit l'élimination est très ralentie. Un équilibre s'établit entre l'accumulation et l'élimination. Le détergent reste à un niveau constant.
- soit l'élimination cesse de se produire. Le détergent présent se trouve à un niveau de concentration tolérable par l'organisme.

Tableau IX

Décontamination après contamination par échanges avec le milieu. Durée de contamination variable. Décontamination fixe. Quantités de détergent présentes dans les divers organes de la rascasse. Moyennes (en ug g⁻¹).

DUREE	TD	FOIE	RATE	VESICULE BILIAIRE	GONADES	REIN	VESSIE	COEUR	BRANCHIES	SN	OEIL	CAPSULES NASALES	CAECUMS	CHAIR
24H. +30j.	0,35	5,88	5,32	24,16	6,33	5,07	3,93	2,84	0,50	0,42	3,81	0,33	2,71	0,75
48H. +30j.	0,47	5,60	0,68	48,21	5,55	3,20	2,92	4,94	0,81	1,12	4,01	0,39	5,94	0,41
3j. +30j.	0,49	7,30	14,43	16,22	8,43	9,67	8,91	6,25	0,64	1,58	2,41	0,48	7,28	0,38
6j. +30j.	0,31	5,36	2,02	8,32	18,98	10,80	27,95	1,52	0,34	1,34	4,32	0,26	6,42	0,46
9j. +30j.	0,39	3,28	5,73	70,10	0,46	2,93	2,91	1,25	2,06	1,24	7,71	0,94	3,57	0,46
12j. +30j.	0,30	4,35	4,11	32,71	5,72	4,04	6,97	4,27	1,27	1,38	5,26	1,17	2,03	0,59
15j. +30j.	0,43	9,66	10,76	27,69	0,85	11,74	6,13	11,93	0,61	1,77	4,11	0,47	4,02	0,40
21j. +30j.	0,78	21,36	10,54	47,70	-	11,50	9,09	6,18	0,68	1,74	3,34	0,56	6,13	0,41
30j. +30j.	0,76	19,85	5,78	71,66	5,38	16,31	43,87	11,66	0,64	2,29	4,10	0,32	8,79	0,75

Pour d'autres organes, on n'observe pas d'élimination, soit que la quantité d'altéragène reste constante, soit qu'il se produit une élévation de l'altéragène présent, ce qui implique un stockage.

A la suite de ces résultats il apparaît qu'une élimination du détergent est possible, mais qu'elle dépend de la durée d'exposition. Si cette durée est inférieure au seuil critique (15 jours), l'élimination est possible pour un grand nombre d'organes. Au-delà de ce seuil, les organes réagissent différemment, la décontamination ne se produit plus pour un certain nombre d'entre eux, et à la place on observe un phénomène de bioaccumulation.

Il apparaît également que les faibles quantités de détergent fixées en peu de temps sont plus difficiles à éliminer que des quantités élevées. Ceci pourrait accréditer l'existence dans l'organisme ou l'organe d'un seuil de tolérance à la bioaccumulation. Au-dessous de ce seuil l'altéragène fixé serait difficilement éliminé.

Dans certains cas cependant, plus que de stockage ou d'accumulation, il conviendrait de parler de piégeage dans un site particulier (sans possibilité d'en repartir).

3.4 Comparaison entre les deux modes de contamination chez la rascasse

Si on compare les résultats obtenus par les différents modes de contamination, on observe:

- qu'il existe dans les deux cas, une période critique pour les organes qui se situe entre le 12ème et le 15ème jour.
- l'importance de la contamination est fonction de la voie empruntée par le détergent pour pénétrer dans l'organisme. La contamination par échange avec le milieu est toujours très supérieure à la contamination par proies. Elle est très importante dans les premiers jours et s'atténue un peu par la suite. C'est ainsi qu'après 3 jours d'exposition les quantités de détergent trouvées dans les organes pour une contamination par échanges avec le milieu, sont en moyenne de 15 à 20 fois supérieures à la contamination par proies. Il existe cependant quelques exceptions pour lesquelles les valeurs sont plus élevées: les caecums (x67), les gonades (x58), le coeur (x45), la vésicule biliaire (x44), la chair (x35).

Au 30ème jour d'exposition, bien qu'une différence persiste entre les deux voies, son importance est moindre. Les valeurs restent en moyenne 10 fois supérieures à la contamination par proies, quelques exceptions pouvant atteindre 35-42 fois plus (foie : x42).

L'élimination du détergent peut se faire aussi par les fèces:

- lors d'ingestion de proies contaminées, d'importantes quantités sont éliminées par cette voie.
- au cours des phases de décontamination (quand cesse l'ingestion de proies, ou quand cesse l'exposition au milieu contaminé), on observe dans tous les cas que les quantités présentes dans les fèces diminuent pour atteindre des valeurs très faibles et proches les unes des autres.

Tableau X

Décontamination après contamination par échanges avec le milieu. Durée de contamination fixe
 Décontamination variable. Quantités de détergent présentes dans les divers
 organes de la rascasse. Moyennes (en ug g⁻¹)

DUREE	TD	FOIE	RATE	VESICULE BILIAIRE	GONADES	REIN	VESSIE	COEUR	BRANCHIES	SN	OEIL	CAPSULES NASALES	CAECUMS	CHAIR
9j.	3,06	8,27	6,38	34,55	8,79	4,37	4,31	2,58	2,73	2,45	12,27	2,07	6,19	1,85
9j. + 7j.	0,52	5,45	1,89	85,69	0,72	4,90	10,49	3,03	3,40	1,37	7,92	0,93	1,66	0,41
9j. +14j.	0,56	3,48	4,52	10,73	0,38	1,37	3,22	1,59	3,41	0,61	50,20	1,89	0,46	0,32
9j. +21j.	0,45	4,49	2,24	119,22	0,93	2,63	3,95	3,43	3,66	1,56	8,14	1,36	2,19	0,27
9j. +30j.	0,39	3,28	5,73	70,18	0,46	2,93	2,91	1,25	2,06	1,24	7,71	0,94	3,57	0,46

4. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS POUR L'IDOTEE AVEC CEUX OBTENUS POUR LA RASCASSE

Il est certain que les deux espèces animales qui font l'objet de cette étude sont très différentes dans leur organisation (invertébré - vertébré), comme pour leur biologie: existence d'un cycle de mue chez l'idotée, absence chez la rascasse.

Toutefois, il est possible de comparer, pour ces deux espèces, le phénomène de contamination par échanges avec le milieu. On observe un certain nombre de points communs:

- la vitesse de contamination est rapide et les quantités qui pénètrent sont importantes
- le processus d'accumulation du détergent se faisant par augmentation du niveau de base, le stockage a un caractère de réversibilité qui diminue avec le temps
- au niveau de l'appareil respiratoire, on retrouve chez les deux espèces le même phénomène paradoxal, à savoir que le niveau est constant et peu élevé (paradoxal car les branchies constituent une importante voie d'échange)
- on retrouve également le même type de stockage se produisant dans le tube digestif et les caecums, ainsi que pour le système nerveux et les gonades.

Au total donc, on retrouve pour les deux espèces un certain nombre de points communs quant à la cinétique de l'altéragène et la bioaccumulation dans l'organisme. On retrouve également les mêmes organes cibles pour un type d'altéragène donné (détergent).

5. CONCLUSIONS

Ce travail a permis d'étudier la localisation d'un altéragène (détergent) dans deux organismes marins appartenant à un réseau trophique existant dans le milieu naturel et composé de l'isopode herbivore Idotea balthica basteri et du poisson carnivore Scorpaena notata. Il a également été possible de suivre le transfert du polluant à partir de l'idotée vers la rascasse. Des recherches, actuellement en cours, permettront de suivre ce transfert à chaque étape d'une chaîne alimentaire courte, depuis le végétal jusqu'au poisson, et ainsi d'évaluer l'impact du détergent sur chacun des éléments.

Quand les organismes sont soumis à l'altéragène, même pour une courte période, la contamination par le détergent est rapide, et il est possible de la mettre en évidence dans l'ensemble des organes. Le processus d'accumulation du détergent se fait par augmentation progressive du niveau résiduel. Chez la rascasse, la contamination par échanges avec le milieu est toujours très supérieure à la contamination par proies (10 à 20 fois en moyenne).

Pour les deux espèces, la fixation dans certains tissus est définitive ou faiblement réversible. Pour d'autres organes, l'élimination semble possible, mais souvent elle tend vers une limite au-delà de laquelle, soit elle est très ralentie, soit elle cesse de se produire (ceci en particulier chez la rascasse). L'existence d'un seuil critique d'exposition peut influencer le phénomène d'élimination chez la rascasse. Il existe des sites privilégiés pour le stockage, tels le système nerveux ou les gonades, qui constituent de véritables organes cibles pour ce type d'altéragène. Certaines lésions observées dans les organes et provoquées à la suite de ces atteintes, semblent plus ou moins réversibles. Pour d'autres, les effets sont beaucoup plus discrets (au niveau biochimique par exemple), mais il peuvent avoir des répercussions importantes sur la biologie et le devenir de l'individu, de la population, voire même de l'écosystème.

6. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le CNEXO qui a contribué en partie au financement de ce travail (Contrat 83/7169).

7. REFERENCES

- Donadey, C. (1973), Contribution à l'étude ultrastructurale et histophysiologique des caecums digestifs des Crustacés Isopodes. Thèse Doct. Etat, Univ. de Provence : 157 p., 40 pl.
- Kaim-Malka, R.A. (1980a), Action d'altéragènes sur des fonctions biologiques et écologiques d'un maillon d'écosystème. (Action de détergents sur Idotea balthica basteri), Thèse Doctorat d'Etat, Univ. Aix-Marseille II : 165 p. + Annexe.
- Kaim-Malka, R.A. (1980b), Localisation d'un détergent dans les divers organes de Idotea balthica basteri (Crustacea, Isopoda). Investigations au moyen d'un détergent marqué. Journ. Etud. Pollut. CIESM, 5(1980):293-300.
- Kaim-Malka, R.A. (1980c), Altération du rythme de mue chez l'Isopode valvifère Idotea balthica basteri soumis en permanence à un détergent non ionique. J. Fr. Hydrol., 11(3):189-202.
- Kaim-Malka, R.A. (1981), Altérations biologiques chez Idotea balthica basteri (Isopoda). Rapp. P.-V. Réun. CIESM., 27(2):209-210.
- Kaim-Malka, R.A. (1983), Altération de la fonction de reproduction chez Idotea balthica basteri (Crustacea, Isopoda) soumis à l'effet chronique d'un détergent non ionique. Mar. Environ. Res., 8(1):41-62.
- Kaim-Malka, R.A., et C. Donadey (1978), Etude histologique et cytologique de gonades d'Idotea balthica basteri (Crustacea, Isopoda) soumis à des détergents, Rev. Int. Océanogr. Méd., 49:55-59.
- Kaim-Malka, R.A., et C. Donadey (1984), Histological alterations observed in Idotea balthica basteri Audouin 1827 (Crustacea, Isopoda) exposed to the chronic effect of non-ionic detergent. Mar. Environ. Res., 12:143-160.

PUBLICATIONS IN THE MAP TECHNICAL REPORTS SERIES

- No. 1 UNEP/IOC/WMO: Baseline studies and monitoring of oil and petroleum hydrocarbons in marine waters (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens 1986.
- No. 2 UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of metals, particularly mercury and cadmium, in marine organisms (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens 1986.
- No. 3 UNEP/FAO: baseline studies and monitoring of DDT, PCBs and other chlorinated hydrocarbons in marine organisms (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens 1986.
- No. 4 UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine organisms and their populations (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens 1986.
- No. 5 UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine communities and ecosystems (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens 1986.
- No. 6 UNEP/IOC: Problems of coastal transport of pollutants (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens 1986.
- No. 7 UNEP/WHO: Coastal water quality control (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens 1986.
- No. 8 UNEP/IAEA/IOC: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens 1986.
- No. 8 Add. UNEP: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). Addendum, Greek Oceanographic Cruise 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens 1986.
- No. 9 UNEP: Co-ordinated mediterranean pollution monitoring and research programme (MED POL - PHASE I). Final report. 1975 - 1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986.
- No.10 UNEP: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G). Final reports on projects dealing with toxicity (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987.
- No.11 UNEP: Rehabilitation and reconstruction of Mediterranean historic settlements. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986.
- No.12 UNEP: Water resources development of small Mediterranean islands and isolated coastal areas. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.

- No.13 UNEP: Specific topics related to water resources development of large Meiterranean islands. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.14 UNEP: Experience of Mediterranean historic towns in the integrated process of rehabilitation of urban and architectural heritage. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987
- No.15 UNEP: Environmental aspects of aquaculture development in the Mediterranean region. Documents produced in the period 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.16 UNEP: Promotion of soil protection as an essential component of environmental protection in Mediterranean coastal zones. Selected documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.17 UNEP: Seismic risk reduction in the Mediterranean region. Selected studies and documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.18 UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by mercury and mercury compounds. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987.
- No.19 UNEP/IOC: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by petroleum hydrocarbons. MAP Technical Reports Series No. 19, UNEP, Athens, 1988.
- No.20 UNEP/WHO: Epidemiological studies related to Environmental Quality Criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and health effects (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988.
- No.21 UNEP/UNESCO/FAO: Eutrophication in the Mediterranean Sea: Receiving Capacity and Monitoring of Long term Effects. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988.
- No.22 UNEP/FAO: Study of ecosystem modifications in areas influenced by pollutants (Activity I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988.
- No.23 UNEP: National Monitoring Programme of Yugoslavia, Report for 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988.

PUBLICATIONS "MAP TECHNICAL REPORTS SERIES"

- No. 1 PNUE/COI/OMM: Etudes de base et surveillance continue du pétrole et des hydrocarbures contenus dans les eaux de la mer (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens 1986.
- No. 2 PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue des métaux, notamment du mercure et du cadmium, dans les organismes marins (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens 1986.
- No. 3 PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue du DDT, des PCB et des autres hydrocarbures chlorés contenus dans les organismes marins (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens 1986.
- No. 4 PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les organismes marins et leurs peuplements (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens 1986.
- No. 5 PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les communautés et écosystèmes marins (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens 1986.
- No. 6 PNUE/COI: Problèmes du transfert des polluants le long des côtes (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens 1986.
- No. 7 PNUE/OMS: Contrôle de la qualité des eaux côtières (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens 1986.
- No. 8 PNUE/AIEA/COI: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens 1986.
- No. 8 PNUE: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED POL VIII). Addendum, Croisière Océanographique de la Grèce 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens 1986.
- No. 9 PNUE: Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée (MED POL - PHASE I). Rapport final. 1975 - 1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens 1986.
- No.10 PNUE: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagenicité des certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la toxicité (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987.
- No.11 PNUE: Rehabilitation et reconstruction des établissements historiques méditerranéens. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series, No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986.

- No.12 PNUE: Développement des ressources en eau des petites îles et des zones côtières isolées méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series, No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.13 PNUE: Thèmes spécifiques concernant le développement des ressources en eau des grandes îles méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.14 PNUE: L'expérience des villes historiques de la Méditerranée dans le processus intégré de rehabilitation du patrimoine urbain et architectural. Documents établis lors de la seconde phase de l'Action prioritaire (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987
- No.15 PNUE: Aspects environnementaux du développement de l'aquaculture dans la région méditerranéenne. Documents établis pendant la période 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.16 PNUE: Promotion de la protection des sols comme élément essentiel de la protection de l'environnement dans les zones côtières méditerranéennes. Documents sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.17 PNUE: Réduction des risques sismiques dans la région méditerranéenne. Documents et études sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987.
- No.18 PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le mercure et les composés mercuriels. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987.
- No.19 PNUE/COI: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures de pétrole. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988.
- No.20 PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et les effets sur la santé (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988.
- No.21 PNUE/UNESCO/FAO: Eutrophisation dans la mer Méditerranée: capacité réceptrice et surveillance continue des effets à long terme. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988.
- No.22 PNUE/FAO: Etude des modifications de l'écosystème dans les zones soumises à l'influence des polluants (Activité I). MAP Technical Reports Series, UNEP, Athens, 1988.
- No.23 Programme National de Surveillance Continue pour la Yougoslavie, Rapport pour 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988.

Issued and printed by:



Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme

Additional copies of this and other publications issued by
the Mediterranean Action Plan of UNEP can be obtained from:

Co-ordinating Unit for the Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
P.O. Box 18019
11610 Athens
GREECE

Publié et imprimé par:



Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l' Environnement

Des exemplaires de ce document ainsi que d'autres
publications du Plan d'action pour la Méditerranée
du PNUÉ peuvent être obtenus de:

Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l' Environnement
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
B.P. 18019
11610 Athènes
GRECE