



**MEDITERRANEAN ACTION PLAN
MED POL**

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME



FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

**FINAL REPORTS ON RESEARCH PROJECTS DEALING WITH
TOXICITY OF POLLUTANTS ON MARINE ORGANISMS**

**RAPPORTS FINAUX SUR LES PROJETS DE RECHERCHE TRAITANT DE LA
TOXICITE DES POLLUANTS SUR LES ORGANISMES MARINS**

MAP Technical Reports Series No. 79

Note: The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of UNEP or FAO concerning the legal status of any State, Territory, city or area, or of its authorities, or concerning the delimitation of their frontiers or boundaries. The views expressed in the papers of this volume are those of the authors and do not necessarily represent the views of either UNEP or FAO.

Note: Les appellations employées dans ce document et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part du PNUE ou de la FAO, aucune prise de position quant au statut juridique des Etats, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les vues exprimées dans les articles de ce volume sont celles de leurs auteurs et ne représentent pas forcément les vues du PNUE, ou de la FAO.

For bibliographic purposes this volume may be cited as:

UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with toxicity of pollutants on marine organisms. MAP Technical Reports Series No. 79. UNEP, Athens, 1994.

Pour des fins bibliographiques, citer le présent volume comme suit:

PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant de la toxicité des polluants sur les organismes marins. MAP Technical Reports Series No. 79. UNEP, Athens, 1994.

This volume is the seventy-ninth issue of the Mediterranean Action Plan Technical Reports 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 Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean.

Ce volume constitue le soixante dix-neuvième 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 méditerranéen pour l'intervention d'urgence contre la pollution marine accidentelle.

PREFACE

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 and 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 and appropriate allocations of resources.

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.

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.

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);

The Contracting Parties at their 6th Ordinary Meeting (Athens, October 1989) agreed to:

- (a) Re-orient the research activities within MED POL in order to generate information which will also be useful for the technical implementation of the LBS protocol in addition to supporting monitoring activities;

- (b) replace as from 1990 research activities A-L by the following five new research areas:

Research area I - Characterization and measurement

This area will include projects which cover the characterization (identification of chemical or microbiological components) and measurement development and testing of methodologies of specified contaminants;

Research area II - Transport and dispersion

This area will include projects which aim at improving the understanding of the physical, chemical and biological mechanisms that transport potential pollutants from their sources to their ultimate repositories. Typical topics will be atmospheric transport and deposition, water movements and mixing, transport of contaminants by sedimentation and their incorporation in biogeochemical cycles. Priority will be given to the provision of quantitative information ultimately useful for modelling the system and contributing to regional assessments;

Research area III - Effects

This area will include projects relevant to the effects of selected contaminants, listed in Annexes I and II of the LBS and Dumping protocols, to marine organisms, communities and ecosystems or man and human populations. Priority will be given to effects and techniques providing information useful for establishing environmental quality criteria;

Research area IV - Fates/Environmental transformation

This area will include projects studying the fate of contaminants (including microorganisms) in the marine environment such as persistence or survival, degradation, transformation, bioaccumulation etc. but excluding transport and dispersion which is dealt in area II;

Research area V - Prevention and control

This area will include projects dealing with the determination of the factors affecting the efficiency of waste treatment and disposal methods under specific local conditions as well as the development of environmental quality criteria and common measures for pollution abatement;

- (c) define target contaminants or other variables at periodic intervals depending on the progress of implementation of the LBS protocol;

- (d) select project proposals on the basis of their intrinsic scientific validity, their Mediterranean specificity, and encourage whenever possible bilateral and multilateral projects among Mediterranean countries from the north and the south of the basin.

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 present volume includes final reports on research projects dealing with toxicity of pollutants on marine organisms. Final editing and compilation of this volume was done by Mr. G.P. Gabrielides, FAO Senior Fishery Officer (Marine Pollution) while Ms V. Papapanagiotou, FAO Secretary, was responsible for the typing.

PREFACE

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 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.

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) du 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.

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 Barcelone 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.

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 cancérogène 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).

Les Parties contractantes au cours de leur sixième réunion ordinaire (Athènes, octobre 1989) ont convenu de:

- (a) réorienter les activités de recherche menées dans le cadre du MED POL en sorte qu'elles engendrent des informations qui soient également utiles pour l'application technique du Protocole tellurique, en plus de l'appui apporté aux activités de surveillance continue;
- (b) à compter de 1990, remplacer les activités A à L par les cinq nouveaux domaines de recherche ci-après:

Domaine de recherche I - Caractérisation et dosage

Ce domaine englobera des projets de recherche en matière de caractérisation (identification de constituants chimiques ou microbiologiques) et de dosage (mise au point et essai de méthodes) de contaminants donnés;

Domaine de recherche II - Transfert et dispersion

Ce domaine englobera des projets visant à approfondir notre connaissance des mécanismes physiques, chimiques et biologiques qui véhiculent les polluants potentiels de leurs sources à leurs dépôts ultimes. Les sujets étudiés porteront notamment sur le transfert et le dépôt atmosphériques, les mouvements et le brassage des eaux, le transfert des contaminants par sédimentation et leur incorporation dans les cycles biogéochimiques. Priorité sera accordée à l'obtention de données quantitatives servant, en dernier ressort, à la modélisation des systèmes et à l'établissement des évaluations régionales;

Domaine de recherche III - Effets

Ce domaine englobera des projets relatifs aux effets de certains contaminants énumérés aux annexes I et II du Protocole tellurique et du Protocole relatif aux situations critiques: effets sur les organismes, les communautés et les écosystèmes marins, effets chez l'homme et parmi les populations humaines. Priorité sera accordée aux effets et techniques fournissant des données utiles pour établir les critères de qualité du milieu;

Domaine de recherche IV - Destinées/transformation dans l'environnement

Ce domaine englobera des projets portant sur l'étude de la destinée des polluants (micro-organismes y compris), dans le milieu marin, et notamment sur la persistance et la survie, la dégradation, la transformation et la bio-accumulation, etc., mais non sur le transfert et la dispersion qui sont traités dans le domaine II;

Domaine de recherche V - Prévention et lutte antipollution

Ce domaine englobera des projets traitant de la détermination des facteurs conditionnant l'efficacité des méthodes d'épuration et d'élimination des déchets sous des conditions locales spécifiques ainsi que de l'établissement de critères de qualité du milieu et de mesures communes de réduction de la pollution;

- (c) définir des contaminants cibles ou d'autres variables à des intervalles périodiques en fonction de l'état de l'avancement de l'application du Protocole tellurique;
- (d) choisir les propositions de projet sur la base de leur valeur scientifique intrinsèque, leur spécificité méditerranéenne et, chaque fois que possible, encourager les projets bilatéraux et multilatéraux entre les pays méditerranéens du nord et du sud du bassin.

Comme lors de la Phase I du MED POL, la coordination et la direction générales de la Phase II étaient assurées par le PNUÉ, 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.

Le présent volume comprend les rapports finaux sur les projets de recherche traitant de la toxicité des polluants sur les organismes marins. La préparation, l'édition et la compilation de ce volume ont été assurées par M. G.P. Gabrielides, FAO Fonctionnaire Principal des Pêches (Pollution Marine), et Mme V. Papapanagiotou, Secrétaire FAO était chargée de la dactylographie.

TABLE OF CONTENTS/TABLE DES MATIERES

	<u>Page No.</u>
Effects of organophosphorus and carbamate pesticides on mussel (<u>Mytilus galloprovincialis</u> L.) esterases	
by Mirjana OZRETIÆ	1
Effet du selenium sur les algues marines	
par Florence BOISSON, Michèle ROMEO et Mauricette GNASSIA-BARELLI	13
Etude de la bioaccumulation, de la persistance et de la toxicité de l'uranium et du plutonium chez des organismes marins de Méditerranée, consommés par l'homme	
par Colette CHASSARD-BOUCHAUD	33
Study of osmoregulation mechanisms in marine invertebrates under polluted conditions	
by Luisella DALLA VENEZIA	67
Effects of Cd, Hg and Zn on the metabolism of the gastropod <u>Nassarius gibbolosa</u>	
by Lea MIZRAHI and Yair ACHITUV	79
<u>In situ</u> toxicity of dispersants. Controlled environmental pollution experiments	
by Evangelos PAPATHANASSIOU, Urania CHRISTAKI, Epaminondas CHRISTOU and Anastasia MILONA	91
Bioaccumulation studies and physiological and biochemical responses in marine organisms exposed to heavy metals and polychlorinated biphenyls	
by Laura TALLANDINI, Margherita TURCHETTO and Vincenzo ALBERGONI	113

EFFECTS OF ORGANOPHOSPHORUS AND CARBAMATE PESTICIDES
ON MUSSEL (Mytilus galloprovincialis L.) ESTERASES

by

Mirjana OZRETIÆ

Center for Marine Research Rovinj,
"Rudjer Boškoviæ Institute
52210 Rovinj, Croatia

ABSTRACT

The present study contributes to the identification and characterization of mussel (Mytilus galloprovincialis) esterases, so that these enzymes may be used as indicators of organophosphate and carbamate poisoning. Esterases were detected in almost all mussel tissues but the highest activity was found in the hepatopancreas. The existence of esterase isozymes was identified by starch gel electrophoresis. Combining the relative mobility with the substrate specificity and the sensitivity to inhibitors, esterases from the mussel hepatopancreas were classified as carboxylesterases and acetylerases. In vitro studies indicated that organophosphate and carbamate insecticides have distinct effects on different esterase isozymes of mussel. Esterase classified as carboxylesterases were more sensitive to parathion and particularly to paraoxon.

1. INTRODUCTION

Organophosphate and carbamate insecticides can contaminate surface waters through direct application for aquatic insect control, or indirectly through watershed drainage and/or accidental spillage. Aquatic invertebrates living in surface waters can thus be exposed to insecticide levels which range from acutely lethal to sublethal. Several, large scale studies examined the toxic effects of these insecticides on aquatic invertebrates, but approaches to the problem from a physiological and/or biochemical perspective are still rare (Edwards and Fisher, 1991).

The inhibition of acetylcholinesterase activity has been successfully used as a tool for diagnosis of organophosphate and carbamate poisoning in birds and fish (Holland et al., 1967; Coppage, 1972; Hill and Fleming, 1982; Busby et al., 1983; Jarvinen et al., 1983; Lochart et al., 1985; Zinkl et al., 1987). Certain organophosphates and carbamates at low concentrations are also very efficient inhibitors of other serine esterases, such as carboxyl or aliesterase ("B") (Chambers et al., 1989). Since AChE and carboxylesterase exist in various isozyme forms (Bunyan et al., 1968; Booth and Metcalf, 1970; Tripathi and O'Brien, 1973, 1975; Krajnovic-Ozretia and de Ligny, 1978) it may be possible to recognize distinct inhibition patterns peculiar to different insecticides. However, few studies (Karnak and Collins, 1974; Flannagan et al., 1973; Srinivasulu Reddy and Ramana Rao, 1988; Bocquené et al., 1990; Day and Scott, 1990) have examined the effects of organophosphate insecticides on AChE in aquatic invertebrates. Depression of AChE or carboxylesterase activity in benthic invertebrates exposed to organophosphates may be considered as evidence for sublethal toxicity. Additionally, the

specific inhibition of some isozyme forms can provide an early warning for detrimental effects on the population and community level.

Before mussels or any other marine organism could be utilized as indicators of environmental contamination, more data must be acquired on the nature of their enzymes. Although the literature on mammalian esterase and to a lesser extent on avian esterases is quite abundant, very little is known about shellfish esterases. The present paper contributes to the identification and characterization of mussel esterases according to their tissue distribution, physicochemical and biochemical properties and isozyme forms. The potential use of mussel esterases for monitoring purposes was investigated on the basis of their inhibition by various organophosphate and carbamate pesticides in vitro.

2. MATERIALS AND METHODS

Mussels (Mytilus galloprovincialis L.) used in this study were produced in the Limski Kanal mariculture facilities (Centre for Mariculture, Mirna Rovinj). Mussels were about two years old and their size varied between 65 and 75 mm. The tissues were excised and immediately homogenized in a Polytron homogenizer in four volumes of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.8. Homogenates were centrifuged for 30 min. at 27000 g in a Sorvall RC2-B centrifuge. The supernatant was immediately removed and used either fresh or stored at -20°C. The esterase activity and their characteristics were examined in gills, mantle, adductor muscle and ovaria but with particular concern in digestive diverticula (hepatopancreas).

Esterase activity was estimated by the UV method of Mastropaolo and Yourno (1981). Samples of 0.05 ml tissue extracts were introduced into cuvettes containing 0.930 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.8 and 0.02 ml of a 0.3 mM solution of *o*-naphthyl acetate in ethylene glycol monomethyl ether. The formation of naphthol at 25°C was monitored with a spectrophotometer at 235 nm. The optimal pH and substrate concentration were also determined. Electrophoresis was carried out throughout 5 to 6 hours at 50 mA and 280 V on horizontal slabs of 12% hydrolysed starch in Tris-borate buffer at pH 8.6 for gel and pH 9.1 for electrodes.

The esterase activity on starch gels was detected by histochemical methods. After completion of electrophoresis, gels were sliced horizontally and incubated for 45 minutes in a solution of 250 ml 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.8 with 5 ml 1% substrate in acetone and 250 mg of Fast Blue BB salt. After staining, gels were rinsed with distilled water and stored in a methanol/water/acetic acid mixture (45/45/10%). For the qualitative identification of esterases *o*-naphthyl acetate, *m*-naphthyl acetate, *o*-naphthyl butyrate, *o*-naphthyl propionate and acetylcholine iodide (SIGMA, Co.) were used as substrates. According to the staining intensity, the esterase fractions were scored from +++ (dark), ++ (medium), + (weak), +/- (very weak) or - (no staining).

The inhibitory studies were performed by pre-incubation of the gels in solutions containing eserine (10^{-4} M), di-isopropylfluorophosphate (DFP: 10^{-4} M) and parachloromercurybenzoate (pCMB: 10^{-3} M) for 30 min. before the addition of the appropriate

substrates. The classification of the esterase bands was determined according to their sensitivity, to specific substrate and inhibitors (Augustinson, 1961; Holmes *et al.*, 1968 and Hart and Cook, 1976).

Nine pesticides, representing several different chemical classes were used to study their inhibitory effects on the mussel esterases. Dichlorvos, bromphos, phosalone, malathion, guthion, parathion, carbaryl and baygon were applied at a concentration within 10^{-3} M to 10^{-6} M. Paraoxon, the P(O) analog of parathion was also included in this study. The purity of pesticides was about 95-98%.

The inhibition rating was scored by comparing the staining intensity of the control zymograms (gels not treated with inhibitors) with the intensity of the bands in treated gels. The degree of inhibition was ranked as follows: +++ (no inhibition, bands intensity as in control), ++ (slight inhibition), + (moderate inhibition), +/- (strong inhibition, band faintly visible) or - (complete inhibition).

3. RESULTS AND DISCUSSION

As illustrated in Figure 1 the optimum pH range was within 7.0 to 8.5 and hence for routine measurements pH 7.8 was adopted. The optimum esterase activity was obtained with 0.3 mM *á*-naphthyl acetate as substrate (Fig. 2). The richest source of esterase activity was found to be the hepatopancreas (71% of the whole body activity) followed by the gills (8.1%), ovaria (7.5%), adductor muscle (7.4%) and mantle (5.0%).

Electrophoretic separation and histochemical staining exhibited the existence of several esterase isozyme forms (Fig. 3). The number of bands varied from 7 in the ovaria to 15 in the adductor muscle. According to electrophoretic mobility, bands were grouped in 5 anodic zones (A I-V) and one cathodic zone (K-I). Zone A-V was not found in extracts of ovaria, while in the adductor muscle extracts, the K-I zone was missing. Within zones A-I and A-II the isozyme bands were found singly or in pairs. The greatest variations were found in zone A-III, with 2 to 6 bands. Esterases from zone A-IV were usually restricted to only one band resembling broad smears on the starch gel slices. The slowest anodic zone A-V was also very variable. It was missing in the ovarian extracts; gills contained only one band, one to three bands were found in the hepatopancreas and mantle, while from the adductor muscle extracts, 5 to 7 bands were present. In the cathodic zone, mantle extracts contributed to the highest number of bands. In general, the number of bands and their staining intensity was very variable, but the highest activity was observed in extracts from hepatopancreas, and it was therefore used for subsequent analyses concerning the classification of esterases.

The effects of various substrates and inhibitors are summarized in Table 1. Bands from the A-I, A-IV and K-I zones were classified as acetylerases since they were not inhibited by DFP (10^{-4} M), eserine (10^{-4} M) or pCMB (10^{-3} M) and preferentially hydrolysed acetyl ester of naphthol. The activity was higher with *á*-naphthyl acetate, than with *â*-naphthyl acetate, while *á*-esters of propionate and butyrate were not hydrolysed.

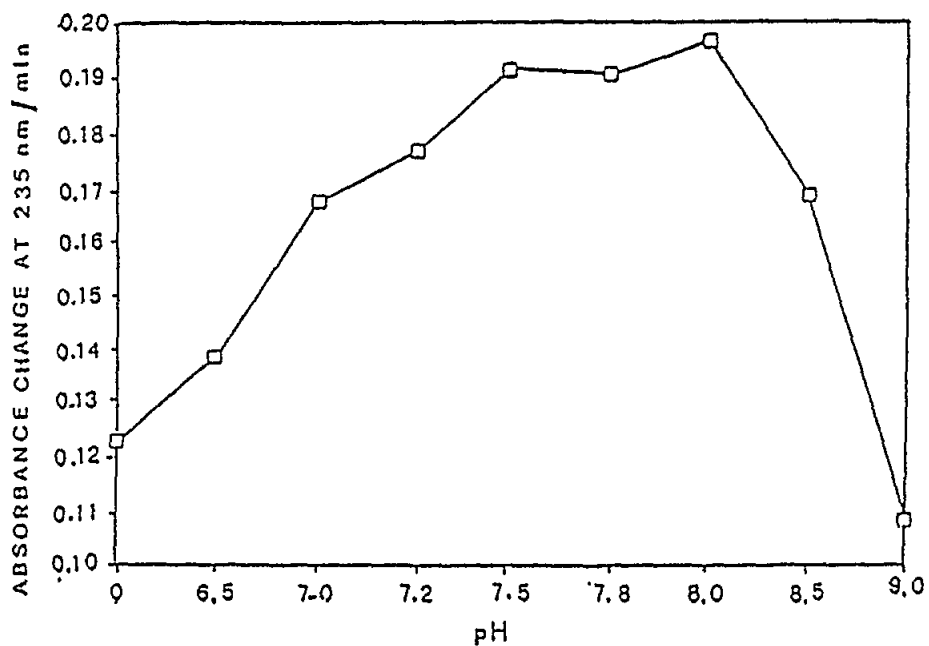


Fig. 1 Effect of pH on esterase activity

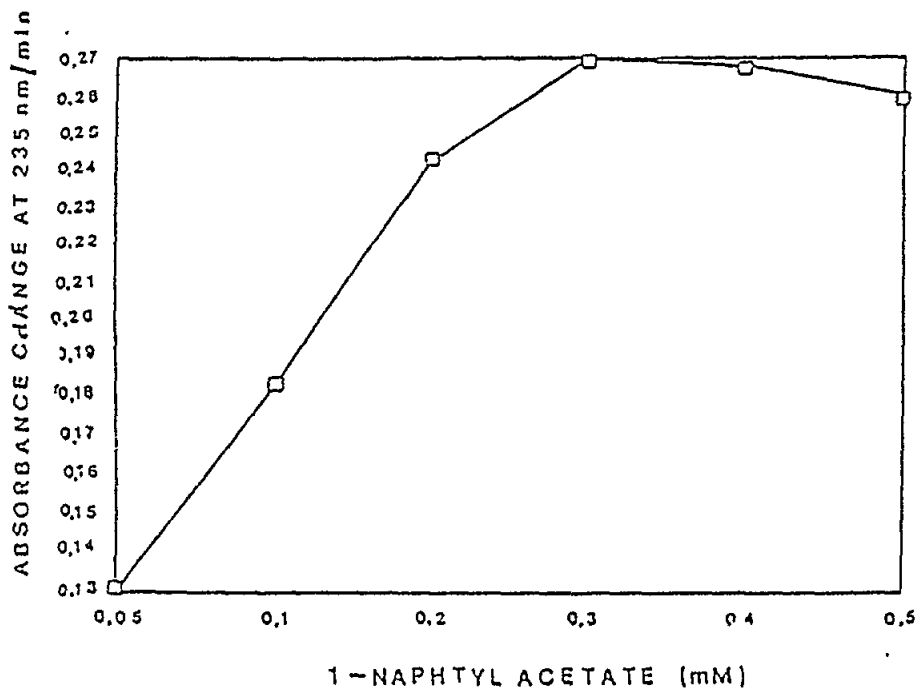


Fig. 2 Effect of substrate concentration on esterase activity

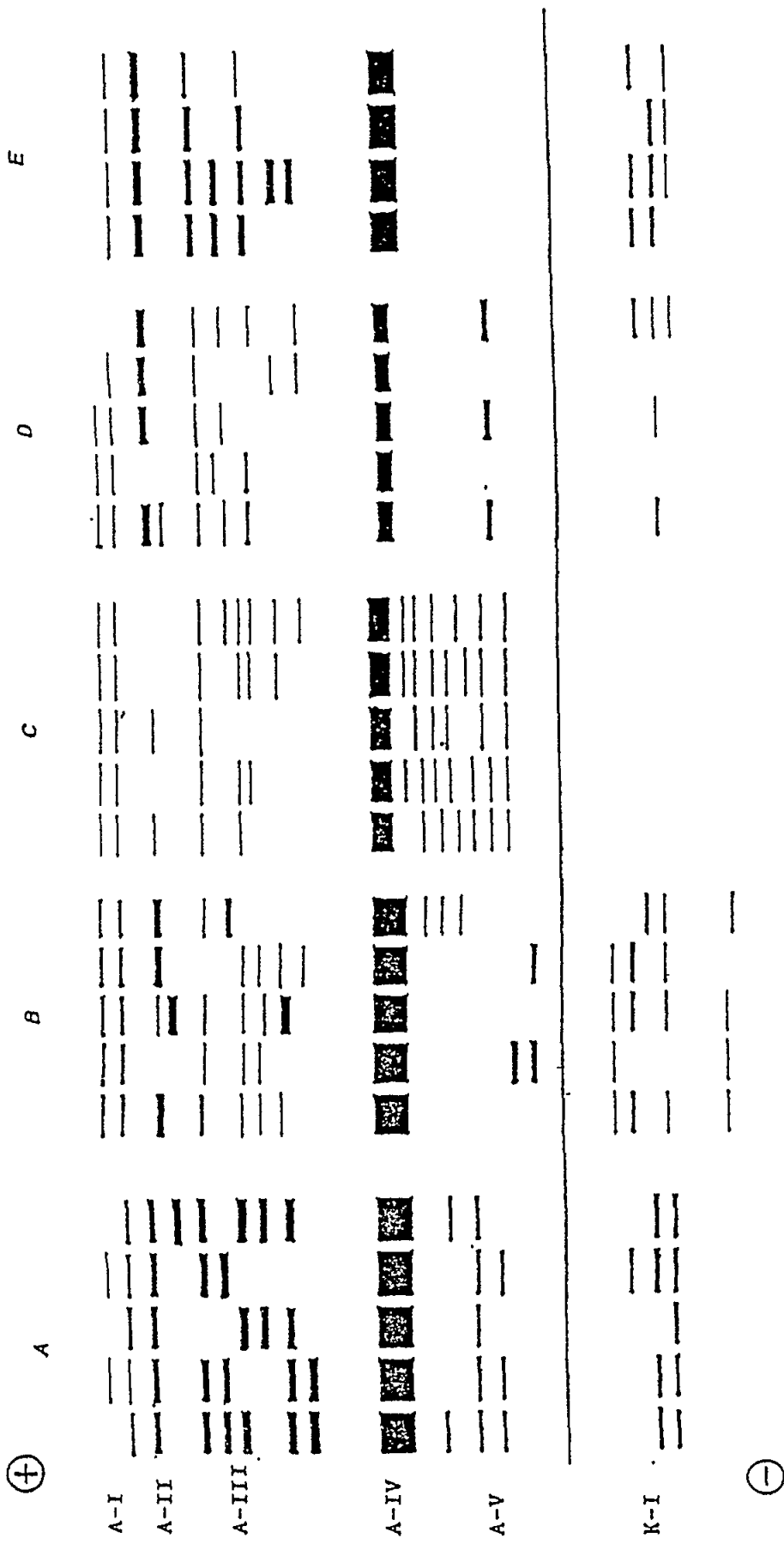


Fig. 3 Electrophoretic patterns of esterases from the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) tissues:
A - hepatopancreas, B - mantle, C - adductor muscle, D - gills and E - ovaria

Table 1

Properties of hepatopancreas esterases of the mussel Mytilus galloprovincialis

ESTERASES	A-I	A-II	A-III	A-IV	A-V	K-I
Substrate specificity ^a						
á-naphthyl acetate	++	+++	+++	++	+	+++
â-naphthyl acetate	+/-	+++	++	++	+	+++
á-naphthyl butyrate	-	+++	+++	+	+	+
â-naphthyl propionate	-	+++	+++	-	+/-	-
acetylthiocholine iodide	-	-	-	-	-	-
Inhibitor specificity ^b						
Eserine sulfate (10 ⁻⁴ M) -	++	+++	+++	+++	+	+++
DFP (10 ⁻⁴ M)	++	-	+	+++	+/-	+++
pCMB (10 ⁻³ M)	++	+++	+++	+++	+	+++
Classification ^c	Ac	Ce	Ce	Ac	Ce	Ac

^a Degree of activity: Activity varies from +++ (high activity) to + or +/- (low activity), and - (absence of activity)

^b The inhibitory effects were scored according to the control zymogram as follows: +++ (no inhibition); ++ and + (slight inhibition); +/- and - (complete inhibition)

^c Ac: acylesterases; Ce: carboxylesterases

All isozyme bands from zones A-II, A-III and A-V were found to hydrolyse α - and β -esters of acetate as well as α -naphthyl esters of propionate and butyrate (Table 1). However, the staining intensity of zone A-III was lower with β -naphthyl acetate. All isozymes were resistant to eserine (10^{-4} M) and to pCMB (10^{-3} M), while DFP (10^{-4} M) totally or partially inhibited the isozymes from these zones. According to the described characteristics these bands were classified as carboxylesterases. In zymograms of the mussel hepatopancreas, acetylcholinesterase and arylesterase were not found. It was supposed that they were not present or due to their very low concentrations did not reach the level necessary for their histochemical demonstration on starch gel slices. In a recent report Bocquené *et al.* (1990) also confirmed the existence of very low acetylcholinesterase activity in the hepatopancreas, mantle, adductor muscle and gills of *Mytilus edulis*. Thus the presence of carboxylesterase in the hepatopancreas gave the opportunity to use this enzyme system as an effective target for monitoring organophosphate and carbamate insecticide poisoning.

The specific inhibition patterns of single pesticides are reviewed in Table 2. The inhibition of esterase activity was investigated *in vitro* by post-electrophoresis incubation with pesticides. Several facts were immediately apparent. First, these results further substantiated the structural similarities within each esterase group responding to single pesticides as independent units. Second, it was very evident that, at least *in vitro*, the esterases from the mussel hepatopancreas were considerably more sensitive to parathion and particularly to phosphate oxon (paraoxon), than to other tested pesticides. Paraoxon, at the highest concentration (10^{-3} M) inhibited all esterase bands but, at lower concentrations, both paraoxon and parathion inhibited the esterases from zones A-II and A-III, which were classified as carboxylesterases. Other pesticides exhibited different inhibition patterns, specific to various esterase fractions and dependent on pesticide concentration. Considerable differences were observed also among pesticides from phosphorothionates; with basic chemical similarity, they showed considerable differences in toxicity. Esterases from zone A-I were particularly sensitive to malathion, while other pesticides produced only slight inhibitory effects. Esterases from zone A-II and A-III were inhibited only with the highest concentrations of all tested pesticides. Zone A-IV consists of esterases particularly sensitive to dichlorvos and to high concentrations of bromphos while other pesticides caused only slight inhibitory effects at the highest concentrations. The most sensitive esterases were found in the A-V zone, and with the exception of parathion and paraoxon they were substantially affected by pesticides. Esterases from region K-I were completely inhibited by higher concentrations of dichlorvos, malathion and baygon, whereas other pesticides displayed only slight inhibitory effects.

Since acetylcholinesterase activity in mussel tissue is very low or even absent, the identification of other esterase classes and their isozyme fractions appeared to be very significant for studying and monitoring organophosphate poisoning. The wide variability of esterase types and isozyme forms, and their distinct sensitivity in relation to specific organophosphates and carbamates may be applied to provide a comprehensive set of selective indicators for the detection of inhibitory and specific toxic effects of different compounds. The selective inhibition of different hepatopancreas esterases by various pesticides can be easily and rapidly surveyed *in vitro* by starch gel electrophoresis. It would also be of interest to examine

the selective inhibition of different organophosphates to various esterase phenotypes in vivo: in the laboratory and in natural populations.

Table 2

Esterase activity in extracts of mussel hepatopancreas and the inhibitory effects of various pesticides.

Pesticide	(M)	A-I	A-II	A-III	A-IV	A-V	K-I
Control	-	++	+++	+++	+++	+	+++
Dichlorvos	10 ⁻³	+	++	++	-	-	-
	10 ⁻⁴	+	++	++	-	-	+
	10 ⁻⁵	+	+++	+++	-	-	++
	10 ⁻⁶	+	+++	+++	+	-	++
Bromphos	10 ⁻³	+	+	+/-	-	-	+
	10 ⁻⁴	+	++	+	-	-	++
	10 ⁻⁵	++	++	++	+	-	++
	10 ⁻⁶	++	+++	+++	++	+/-	+++
Phosalone	10 ⁻³	+	+	+	+	-	++
	10 ⁻⁴	+	+	+	++	-	+++
	10 ⁻⁵	+	++	++	++	+/-	+++
	10 ⁻⁶	+	+++	+++	+++	+/-	+++
Malathion	10 ⁻³	-	+	+	+	-	-
	10 ⁻⁴	-	+	+	+	-	-
	10 ⁻⁵	+	++	++	+		+
	10 ⁻⁶	+	++	++	++	-	++
Guthion	10 ⁻³	+/-	+	+/-	+	-	-
	10 ⁻⁴	+	++	+	+	-	+
	10 ⁻⁵	++	++	++	++	-	++
	10 ⁻⁶	++	+++	+++	+++	+/-	++
Paraoxon	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	+	+/-	++
	10 ⁻⁵	-	-	-	++	+	+++
	10 ⁻⁶	++	-	-	++	+	+++
Parathion	10 ⁻⁴	+	-	-	+	+/-	++
	10 ⁻⁵	+	-	-	++	+	+++
	10 ⁻⁶	+	-	-	++	+	+++
Carbaryl	10 ⁻³	-	-	+/-	+	-	++
	10 ⁻⁴	+/-	+/-	+/-	++	-	++
	10 ⁻⁵	+/-	++	++	++	-	++
	10 ⁻⁶	+	++	++	++	+/-	++
Baygon	10 ⁻³	+	+	+	+	-	-
	10 ⁻⁴	+	+	+	+	-	-
	10 ⁻⁵	+	++	++	+	-	+
	10 ⁻⁶	+	++	++	++	-	++

4. CONCLUSIONS

The esterase isozymes from several tissues of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) have been determined using starch gel electrophoresis followed by histochemical staining. According to the electrophoretic mobility the esterase bands in all examined tissues were grouped in five anodic zones and one cathodic zone. Hepatopancreas in mussel, like liver in vertebrates was found to be particularly rich in esterase activity. Following the application of pertinent substrates and inhibitors two groups of esterase were identified: carboxyl and acetyl esterases. Arylesterases and cholinesterases were not found. The specific inhibitory effects of several organophosphate pesticides on the esterase isozymes were studied in vitro. The obtained results amply demonstrated that, at least in vitro, the esterases from hepatopancreas were substantially more sensitive to parathion and particularly to paraoxon than to other pesticides. Other pesticides exhibited different inhibition patterns, specific to various esterase zones.

5. REFERENCES

- Augustinson, K.B. (1961), Multiple forms of esterases in vertebrate blood plasma. Ann.N.Y.Acad.Sci., 94:844-860
- Bocquené, G., F. Galgani and P. Truquet (1990), Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Mar.Environ.Res., 30:1-15
- Booth, G.M. and R.L. Metcalf (1970), Phenylthioacetate: a useful substrate for the histochemical and colorimetric detection of cholinesterase. Science (Wash.), 170:445-457
- Bunyan, P.J., D.M. Jennings and A. Taylor (1968), Organophosphorus poisoning; some properties of avian esterases. J.Agric.Food.Chem., 16:326-331
- Busby, D.G., P.A. Pearce and N.R. Garritty (1989), Fenitrothion effects on forest songbirds: a critical new look. In: Environmental effects of fenitrothion use in forestry: impacts on insects pollinators, songbirds and aquatic organisms, edited by W.R. Ernst, P.A. Pearce and T.L. Pollock, Environment Canada Publication, no. EN 40-370/1989E: pp.43-108
- Chambers, J.E., C.S. Forsyth and H.W. Chambers (1989), Bioactivation and detoxification of organophosphate insecticides in rat brain. In: Intermediary xenobiotics metabolism: methodology, mechanisms and significance, edited by J. Caldwell, D.H. Huston and G.D. Paulson, Basingstoke, England, Taylor and Francis, pp.95-115
- Coppage, D.L. (1972), Organophosphate pesticides: specific level of brain AChE inhibition related to death in sheepshead minnows. Trans.Amer. Fish.Soc., 101:534-536
- Day, E.K. and I.M. Scott (1990), Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentration of organophosphate insecticides. Aquat.Toxicol., 18:101-104

- Edwards, C.A. and S.W. Fisher (1991), The use of cholinesterase measurements in assessing the impact of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In: Cholinesterase inhibiting insecticides - impacts on wildlife and environment. Chemicals in agriculture series, edited by P. Mineau, Amsterdam, Elsevier Sci.Publ.
- Flannagan, J.F. (1973), Field and laboratory studies on the effect of exposure to fenitrothion and freshwater aquatic invertebrates. Man.Entomol., 7:15-25
- Hart, N.H. and M. Cook (1976), Comparative analysis of tissues esterases of the zebra danio (Brachydanio rerio) and the pearl danio (B. albolineatus) by disc gel electrophoresis. Comp.Biochem.Physiol., 54B:357-364
- Hill, E.F. and W.J. Fleming (1982), Anticholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. Environ.Toxicol. Chem., 1:27-38
- Holland, H.T., D.L. Copping and P.A. Butler (1967), Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorus pesticides. Bull.Environ.Contamin.Toxicol., 2(3):156-162
- Holmes, R.S., C.J. Masters and E. Webb (1968), A comparative study of vertebrate esterase multiplicity. Comp.Biochem.Physiol., 26:837-852
- Jarvinen, A.W., B.R. Nording and M.E. Henry (1983), Chronic toxicity of Dursban (chlorpyrifos) to the fathead minnow (Pimephales promelas) and the resultant acetylcholinesterase inhibition. Ecotoxicol.Environ. Safety, 7:423-443
- Karnak, R.E. and W.J. Collins (1974), The susceptibility to selected insecticides and acetylcholinesterase activity in a laboratory colony of midge larvae, Chironomus tentans (Diptera: Chironomidae). Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 12:62-69
- Krajnović Ozretić M. and W. de Ligny (1978), Effects of organophosphate pesticides on fish esterases; A case for an isozyme approach. In: Marine organisms, edited by B. Battaglia and J. Beardmore, Plenum Publishing Corporation, pp.667-668
- Lochart, W.L., D.A. Metner, F.J. Ward and G.M. Swanson (1985), Population and cholinesterase responses in fish exposed to malathion sprays. Pest. Biochem.Physiol., 24:12-18
- Mastropaolo, W. and J. Yourno (1981), An ultraviolet spectrophotometric assay of α -naphthyl acetate and α -butyrate esterase. Anal.Biochem., 115:188-193
- Srinivasulu Reddy, M. and K.V. Ramana Rao (1988), In vivo recovery of acetylcholinesterase activity from phosphamidon and methylparathion induced inhibition in nervous tissue of penaeid prawn (Metapenaeus monoceros). Bull.Environ.Contamin.Toxicol., 40:752-758

Tripathi, R.K. and R.D. O'Brien (1973), Effect of organophosphates in vivo upon acetylcholinesterase isozymes from housefly head and thorax. Pest.Biochem.Physiol., 2:418-424

Tripathi, R.K. and R.D. O'Brien (1975), The significance of multiple molecular forms of acthylcholinesterase in the sensitivity of houseflies to organophosphorus poisoning. In: Isozymes II:Physiological Function, edited by C.L. Markert, New York, Academic Press, pp.207-220

Zinkl, J.G., P.J. Shea, R.J. Nakamoto and J. Callman (1987), Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. Bull.Environ.Contamin.Toxicol., 38:29-35

EFFET DU SELENIUM SUR LES ALGUES MARINES

par

Florence BOISSON, Michèle ROMEO et Mauricette GNASSIA-BARELLI

INSERM, Unité 303 "Mer et Santé"
B.P. 3 - La Darse,
06230 Villefranche-sur-mer, France

RESUME

Nous avons étudié la toxicité et la bioaccumulation du sélénium (sous forme de sélénite Se^{4+} ou de séléniat Se^{6+}) sur deux algues présentes en Méditerranée: l'une benthique Bryopsis maxima et l'autre planctonique Cricosphaera elongata. Les résultats montrent que, dans les deux cas, le sélénite est plus toxique que le séléniat et qu'il est davantage accumulé que celui-ci. Le sélénite à $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ favorise la croissance de C. elongata. Chez B. maxima, le sélénium à 100 mg l^{-1} provoque l'apparition d'un précipité rouge à l'intérieur de l'algue, probablement dû à la réduction du sélénite en sélénium élémentaire (SeE). Les autres effets physiologiques observés (sur la teneur en protéines intracellulaires et la chlorophylle a) sont moins significatifs. Pour B. maxima, l'accumulation du sélénite augmente linéairement avec le temps et la concentration ($0,1; 1; 10$ et 100 mg l^{-1}) dans le milieu. Le même phénomène est observé dans le cas du séléniat à 10 et 100 mg l^{-1} . Pour C. elongata, l'accumulation du sélénite est un mécanisme biphasique comportant une première étape d'adsorption à la surface de la paroi cellulaire suivie d'une étape de diffusion facilitée à travers la membrane cellulaire. Pour le séléniat, il s'agirait seulement d'une adsorption à la surface de la cellule. Cette algue phytoplanctonique est donc capable de différencier les deux formes chimiques du sélénium. L'effet du sélénium sur l'accumulation du cadmium a été également étudié chez C. elongata. La teneur en cadmium accumulé par l'algue augmente avec la concentration en sélénite du milieu et la durée de la contamination.

1. INTRODUCTION

Le sélénium est un métalloïde essentiel pour les organismes vivants notamment pour les organismes marins (Price et coll., 1987). La concentration dans l'eau de mer est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-9}M (Measures et Burton, 1980; Vandermeulen et Foda, 1988). Cette concentration peut cependant atteindre localement des valeurs de l'ordre du microgramme par litre lors de pollutions d'origine anthropique ou bien par ruissellement d'eau provenant du lessivage de sols riches en sélénium (Phillips, 1987). Des phénomènes de toxicité peuvent alors apparaître, perturbant la croissance et le métabolisme des organismes marins.

Dans le cycle du sélénium en mer, les producteurs primaires et en particulier le phytoplancton jouent un rôle essentiel puisqu'ils sont capables d'utiliser le sélénium inorganique comme nutriment et d'absorber préférentiellement le sélénite au séléniat (Vandermeulen et Foda, 1988) ce qui pourrait créer un déséquilibre en faveur du séléniat lors des poussées printanières.

Le but de cette étude effectuée sur deux algues présentes en Méditerranée: l'une benthique Bryopsis sp. et l'autre planctonique Cricosphaera elongata, a été de caractériser la toxicité et la bioaccumulation du sélénium (sous forme de sélénite ou de séléniate) et de déterminer son effet sur la physiologie (chlorophylle a et protéines) de ces deux algues marines. Nous avons également cherché à mettre en évidence les interactions entre le sélénium et le soufre (sous forme de sulfate de sodium) puis entre le sélénium et le cadmium (sous forme de chlorure de cadmium). En effet le sélénium est un analogue chimique du soufre et il serait incorporé dans les composés organiques par la voie métabolique des sulfates (Wheeler et coll., 1982). Quant au cadmium, c'est un métal polluant qui semblerait entrer en compétition avec le sélénium (Prévoit et Soyer-Gobillard, 1986) et dont la toxicité et l'accumulation ont été étudiées au laboratoire sur Cricosphaera elongata par Gnassia-Barelli et Härdstedt-Roméo (1982).

2. METHODES EXPERIMENTALES

Le matériel biologique utilisé a été le suivant:

Bryopsis sp. est une algue marine coenocytique (Siphonales) de la classe des Chlorophycées et de l'ordre des Caulerpales. La morphologie de cette algue permet de l'assimiler à une algue unicellulaire géante.

Cricosphaera elongata est une algue unicellulaire marine biflagellée, de l'embranchement des Haptophytes, de l'ordre des Prymnésiophyceae et de la classe des Prymnésiales. Cette algue nanoplanctonique côtière peut représenter de 30 à 98% du phytoplancton total (Ehrardt et Seguin, 1978).

Les algues ont été cultivées axéniquement respectivement dans du milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962) préparé à partir de l'eau de mer pour Cricosphaera elongata et dans du milieu synthétique M.S. pour Bryopsis sp. (Sheppard, 1970). Ces algues ont été placées dans une salle thermostatée à une température de $18\text{E}\pm 1\text{EC}$, en lumière artificielle fournie par des tubes fluorescents et dont l'intensité est de $180\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Elles ont été soumises à un rythme de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité pour les études de toxicité et d'accumulation et à un éclairage continu pour l'effet du sélénium sur l'accumulation du cadmium.

Les contaminations ont été faites avec du sélénite de sodium (Na_2SeO_3) ou du séléniate de sodium (Na_2SeO_4). Les échantillons ont été prélevés en triplicats. A la fin de chaque expérience, les cellules phytoplanctoniques ont été collectées par filtration sur filtre Sartorius en acétate de cellulose, de porosité $8\ \mu\text{m}$. Ces filtres ont été stockés au congélateur à -20EC en vue des analyses. Les échantillons de Bryopsis sp. ont été congelés à -20EC et lyophilisés.

L'effet du sélénium sur la physiologie de l'algue a été suivi par dosage de la chlorophylle a selon la méthode de Lorenzen (1962) et celui des protéines selon la méthode de Lowry et coll. (1951).

Pour le dosage du sélénium, les échantillons ont été minéralisés à l'aide d'un four à micro-ondes "Microdigest 300" en présence d'acide nitrique suprapur concentré et d'acide perchlorique, la mise en milieu réducteur se faisant en fin de minéralisation avec de l'acide

chlorhydrique 5N. L'analyse du sélénium a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique couplée à la génération d'hydrures (appareil du type Pye Unicam SP9), la limite de détection étant de $5 \mu\text{g l}^{-1}$. La minéralisation des filtres destinés à l'analyse du cadmium a été effectuée sur plaque chauffante dans des béchers en téflon en présence d'acide nitrique suprapur concentré. Le dosage du cadmium a été fait par spectrophotométrie d'absorption atomique.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Effets du sélénium sur Bryopsis sp.

3.1.1 Toxicité et bioaccumulation

Nous avons étudié l'accumulation du sélénium sous ses deux formes chimiques (sélénite Se^{+4} et séléniat Se^{+6}) en fonction de sa concentration dans le milieu et de son degré d'oxydation.

Les valeurs obtenues sur trois répliquats par échantillon (tableau 1) montrent que le sélénium est accumulé par Bryopsis maxima. Mais cette accumulation sature au bout de trois jours pour les concentrations $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de sélénite ainsi que $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ et 1 mg l^{-1} de séléniat alors que pour les autres concentrations, l'accumulation augmente linéairement dans le temps. Ceci pourrait traduire un effet toxique: l'absence de saturation pouvant en effet être la conséquence d'un dépassement des mécanismes de régulation de l'entrée du sélénium dans l'algue.

Tableau 1

Accumulation du sélénium (SeO_3 , SeO_4) par Bryopsis sp.

	Se ($\mu\text{g mg}^{-1}$ P.S.)		Taux d'absorption: r (% mg^{-1} P.S.)	
	3 jours	10 jours	3 jours	10 jours
Na_2SeO_3 (mg l^{-1})				
0,1	$0,008 \pm 0,002$	$0,007 \pm 0,001$	$32,00 \pm 9,00$	$27,90 \pm 4,00$
1	$0,010 \pm 0,001$	$0,023 \pm 0,010$	$3,80 \pm 0,30$	$9,00 \pm 3,70$
10	$0,438 \pm 0,002$	$1,214 \pm 0,220$	$0,170 \pm 0,070$	$0,480 \pm 0,090$
100	$4,270 \pm 0,700$	$12,99 \pm 1,30$	$0,170 \pm 0,030$	$0,520 \pm 0,050$
Na_2SeO_4 (mg l^{-1})				
0,1	$0,006 \pm 0,002$	$0,005 \pm 0,000$	$24,90 \pm 5,70$	$19,40 \pm 9,60$
1	$0,007 \pm 0,003$	$0,005 \pm 0,001$	$2,70 \pm 1,00$	$1,70 \pm 0,10$
10	$0,007 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$	$0,260 \pm 0,020$	$0,350 \pm 0,020$
100	$0,028 \pm 0,006$	$0,061 \pm 0,002$	$0,110 \pm 0,020$	$0,240 \pm 0,010$

On remarque une différence significative entre l'accumulation du sélénite et celle du séléniate. En effet le taux maximum d'accumulation du sélénite présent dans le milieu est de 32% au bout de trois jours, alors qu'il n'est que de 25% également au bout de trois jours pour le séléniate. Par ailleurs pour des concentrations de 1; 10 et 100 mg l⁻¹ de sélénite ainsi que pour 10 et 100 mg l⁻¹ de séléniate ce taux d'accumulation augmente dans le temps.

On constate une différence de toxicité entre le sélénite et le séléniate puisqu'une concentration de 100 mg l⁻¹ de séléniate n'entraîne pas de modification de la morphologie de l'algue au bout de dix jours alors que la même concentration en sélénite provoque la mort de l'algue au bout de six jours. Celle-ci présente alors une couleur rouge qui serait due à la réduction *in vivo* du sélénite en sélénium élémentaire lui-même de couleur rouge (Gennity et coll., 1984). Cette réaction pourrait être catalysée par l'acide ascorbique ou le glutathion. Ce phénomène a déjà été observé chez les bactéries qui sont capables de réduire le séléniate en sélénite puis en sélénium élémentaire (Maiers et coll., 1988).

3.1.2 Effets du sélénium sur la physiologie de Bryopsis sp.

3.1.2.1 Effets sur la chlorophylle a

Les résultats obtenus sur les effets du sélénite ou du séléniate sur l'évolution temporelle du contenu en chlorophylle a de Bryopsis sp. sont présentés sur les figures 1 et 2. La présence de sélénite dans le milieu de culture entraîne une augmentation de 33% de la teneur en chlorophylle a par rapport au témoin, au troisième jour. Ceci pourrait traduire une augmentation de l'activité métabolique en réponse à l'apport de sélénite dans le milieu de culture. La teneur en chlorophylle a évolue ensuite de façon similaire dans le témoin comme dans les contaminés jusqu'au 10ème jour où elle est de 20% supérieure dans la culture de Bryopsis sp. contaminée avec 0,1 mg l⁻¹ de sélénite par rapport aux deux autres cultures (témoin et contaminée par 1 mg l⁻¹).

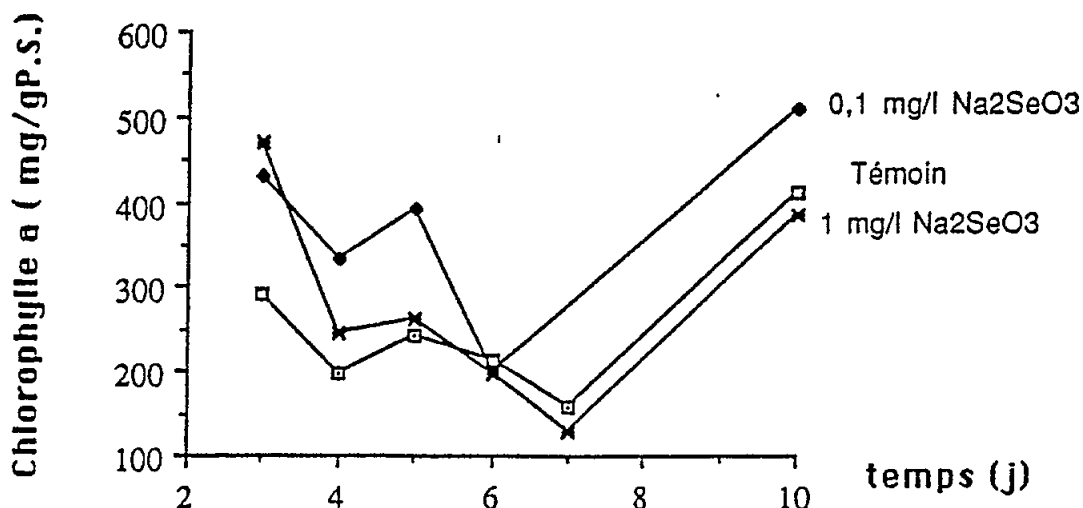


Fig. 1 Effet du sélénite sur la teneur en chlorophylle a de Bryopsis maxima

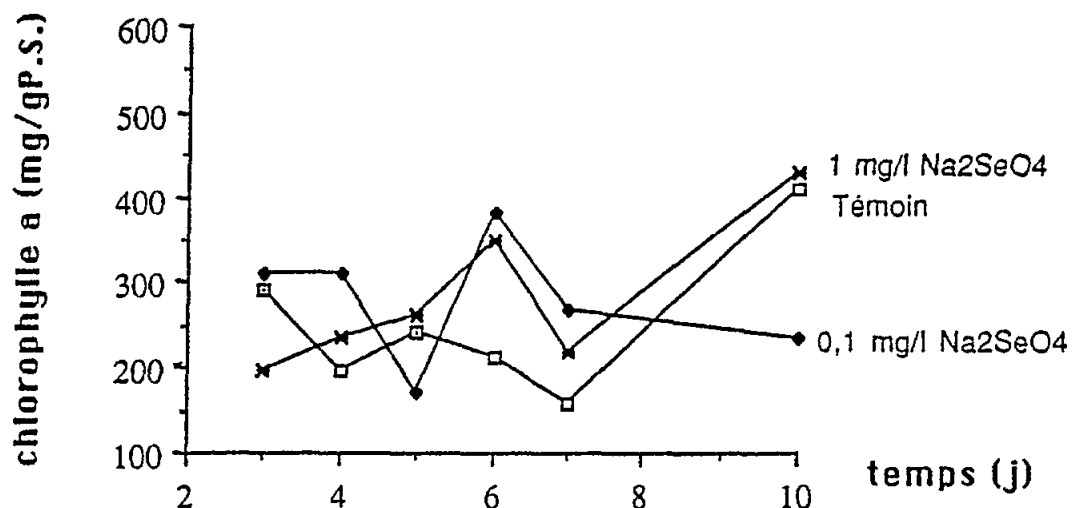


Fig. 2 Effet du séléniate sur la teneur en chlorophylle a de Bryopsis maxima

La présence de 1 mg l^{-1} de séléniate dans le milieu de culture n'entraîne pas de différence évidente par rapport au témoin dans l'évolution de la teneur en chlorophylle a de Bryopsis sp. alors que la culture contaminée par $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de séléniate présente au bout de dix jours une teneur en chlorophylle a abaissée de 42% soit un effet toxique de cette concentration.

C'est à la concentration la plus faible ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$) que le sélénium agit sur la physiologie de Bryopsis sp. de façon soit bénéfique dans le cas du sélénite, soit toxique dans le cas du séléniate. A cette concentration, le sélénium est susceptible d'entrer en compétition avec d'autres métabolites tel que le soufre et ainsi d'intervenir dans le métabolisme de l'algue.

3.1.2.2 Influence de la concentration en sélénite, de la concentration en sulfate et de la durée de l'expérience sur la teneur en protéines intracellulaires de Bryopsis sp.

Les résultats du plan d'expériences destiné à mettre en évidence les effets principaux de la concentration en sélénite Na_2SeO_3 ($0; 0,1; 1 \text{ mg l}^{-1}$), de la concentration en sulfate Na_2SO_4 ($85; 850 \text{ mg l}^{-1}$ représentant la concentration dans l'eau de mer) et du temps d'exposition (3-10 jours) sur le contenu en protéines intracellulaires de l'algue sont présentés dans le tableau 2 ($n=5$).

Lorsque l'on étudie la relation sélénium- temps d'exposition, nous constatons que chez les témoins la concentration en protéines intracellulaires augmente entre 3 et 10 jours lorsque la concentration en sulfate du milieu est égale à celle de l'eau de mer, de même chez les algues intoxiquées par $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de sélénite; mais avec 1 mg l^{-1} on observe un effet toxique qui entraîne la diminution de la concentration en protéines intracellulaires. Par ailleurs,

pour une concentration en sulfate inférieure à celle de l'eau de mer la concentration en protéines diminue dans le temps chez les témoins alors qu'en présence de sélénite on observe une augmentation de la teneur en protéines dans l'algue d'autant plus forte que la concentration en sélénite est faible. Le sélénite tend donc à compenser la déficience en sulfate, il agit de façon bénéfique surtout à faible concentration ce qui rappelle les résultats déjà obtenus sur la chlorophylle a. Le sélénite pourrait être incorporé dans les acides aminés libres et les protéines en remplacement du soufre (Vandermeulen et Foda, 1988) en utilisant la voie métabolique des sulfates (Wheeler et coll., 1982).

Tableau 2

Effet de trois facteurs sur la concentration en protéines intracellulaires de Bryopsis sp.

Na ₂ SeO ₃ (mg l ⁻¹)	Na ₂ SeO ₄ (mg l ⁻¹)	Durée (jours)	Protéines (µg mg ⁻¹ P.S.)
0	85	3	72,3±6,9
0	85	10	67,0±5,8
0	850	3	76,0±5,9
0	850	10	108,5±9,6
0,1	85	3	73,1±5,3
0,1	85	10	79,4±11,1
0,1	850	3	65,3±6,0
0,1	850	10	90,0±9,9
1	85	3	67,8±6,5
1	85	10	72,8±10,9
1	850	3	72,5±5,2
1	850	10	68,0±7,8

Lorsque l'on considère la **relation sélénium- concentration en sulfate**, on constate que la diminution de la concentration en sulfate dans le milieu de culture entraîne au bout de 10 jours une baisse importante chez les témoins de la teneur en protéines intracellulaires (-40%) alors que chez les algues contaminées cette baisse n'est pas significative. Ces résultats montrent donc que l'effet bénéfique de 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₃ sur la concentration en protéines intracellulaires de Bryopsis sp. se fait sentir dès le troisième jour d'exposition.

3.2 Effets du sélénium sur Cricosphaera elongata

3.2.1 Seuil de toxicité du sélénium

Nous avons étudié l'effet de la concentration en sélénite et en séléniate sur l'évolution de la biomasse de Cricosphaera elongata en phase exponentielle de croissance (nombre de cellules par ml avec n=3). Les concentrations 0; 0,1; 1; 10; 100 mg l⁻¹ ont été testées.

Les résultats obtenus quant à l'action du sélénite (fig. 3) montrent qu'il existe un effet significatif au seuil de 0,1% de la concentration 0,1 mg l⁻¹ qui favorise la croissance de *Cricosphaera elongata* par rapport au témoin. D'autre part les concentrations 10 et 100 mg l⁻¹ ont un effet toxique significatif au seuil de 0,1% sur la croissance de l'algue. A la plus forte concentration les cellules sont beaucoup plus grosses, la toxicité se ferait donc par inhibition de la division cellulaire. On n'observe aucun effet significatif (au seuil de 0,1%) de la concentration 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₃. La concentration effective inhibant 50% de la croissance algale par rapport au témoin au bout de 96 heures, CE50 96h = 26.5 mg l⁻¹ Na₂SeO₃.

L'influence du séléniat sur l'évolution de la biomasse de *Cricosphaera elongata* se traduit différemment (fig. 4) puisqu'il existe un effet significatif au seuil de 0,1% de la concentration 100 mg l⁻¹ qui est légèrement toxique pour l'algue mais n'inhibe pas 50% de la croissance par rapport au témoin. En revanche les autres concentrations testées n'ont aucun effet significatif sur la croissance de *Cricosphaera elongata*.

3.2.2 Bioaccumulation du sélénium aux concentrations 0,1 et 1,0 mg l⁻¹

La détermination de la cinétique d'accumulation d'un élément requiert une densité cellulaire aussi constante que possible afin qu'il n'y ait pas de variation dans le nombre de sites de liaison destinés à la prise de cations métalliques et situés à la surface de la cellule. C'est pourquoi le sélénium a été ajouté au milieu d'une culture de *Cricosphaera elongata* en phase stationnaire de croissance (10 jours).

Dans le cas du sélénite (figs 5a et 5b), la forme des courbes obtenues est de type sigmoïde. Cependant aux concentrations testées on n'observe pas de saturation dans l'accumulation du sélénite. L'analyse de régression effectuée sur les données mesurées nous a permis d'ajuster les résultats à une courbe dont l'équation est de la forme: $Y = aX^b$

a: pente de la courbe

b: coefficient de régression

X: temps de contact des cellules avec le sélénite (j)

Y: [Se] (μg g⁻¹ P.S.)

Pour la concentration 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₃, on obtient: $Y = 0,231 X^{0,50}$

ce qui peut s'écrire: $Y = 0,231 \text{ st}$

Le coefficient de corrélation est égal à 0,997 (n=7), il est significatif au seuil de 0,0001.

Pour la concentration 1,0 mg l⁻¹ Na₂SeO₃, on obtient: $Y = 3,096 X^{0,25}$

ce qui peut s'écrire: $Y = 3,096 \text{ sst}$

Le coefficient de corrélation est égal à 0,980 (n=7), il est significatif au seuil de 0,0001.

On constate que la pente de la régression augmente avec la concentration en sélénite dans le milieu, c'est à dire que plus la concentration en sélénite dans le milieu est élevée plus l'accumulation du sélénite par *Cricosphaera elongata* augmente fortement dans le temps.

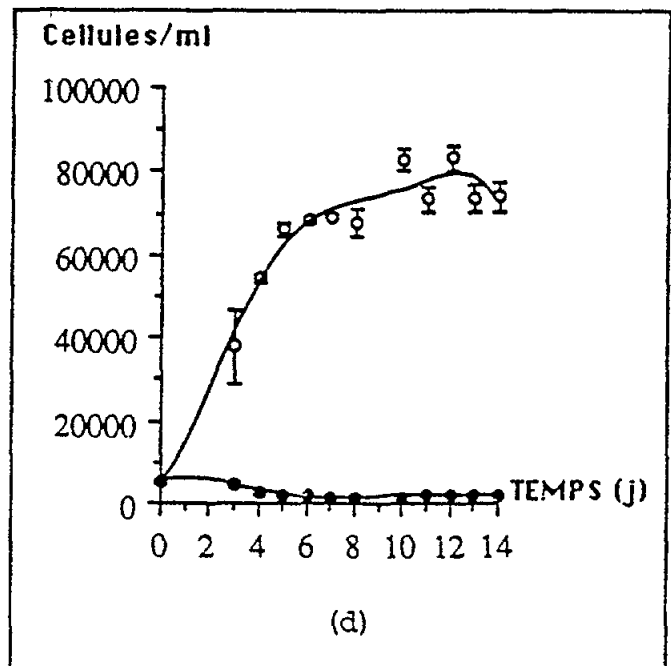
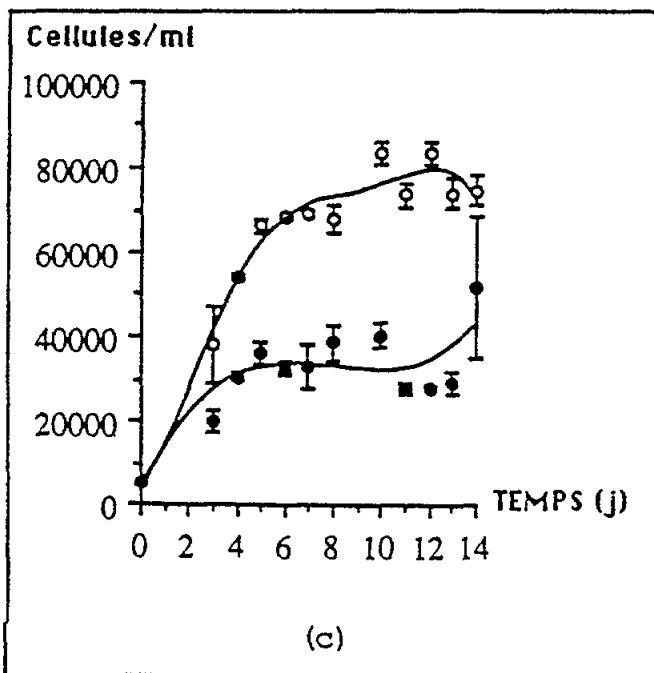
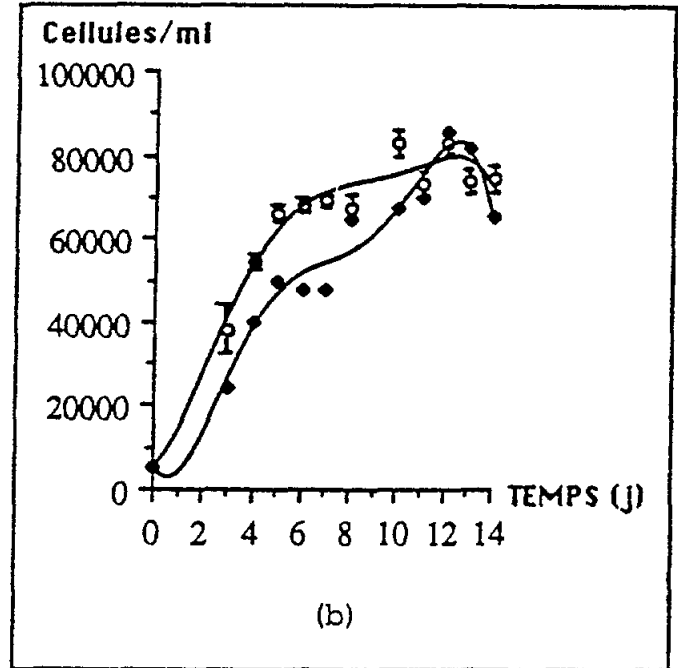
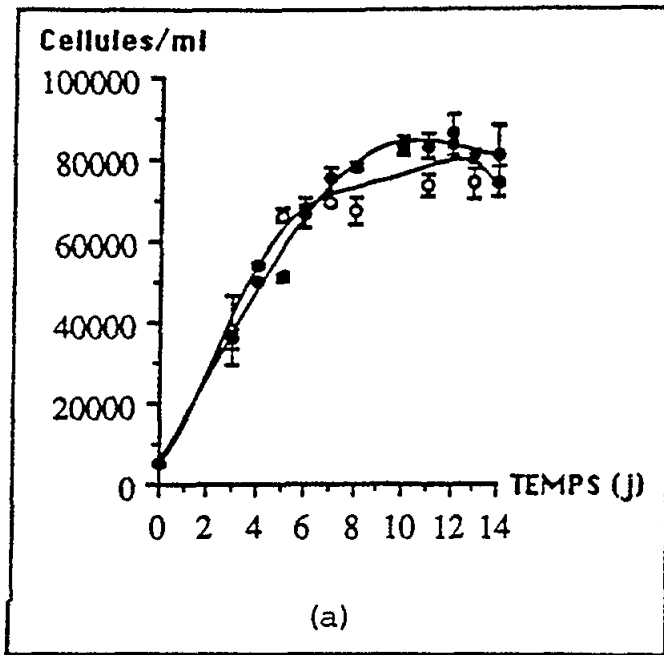


Fig. 3 Croissance d'une culture de *Cricosphaera elongata* témoin (o) et d'une culture contaminée par du sélénite de sodium (●) à la concentration de 0,1 (a), 1 (b), 10 (c) ou 100 mg l⁻¹ (d)

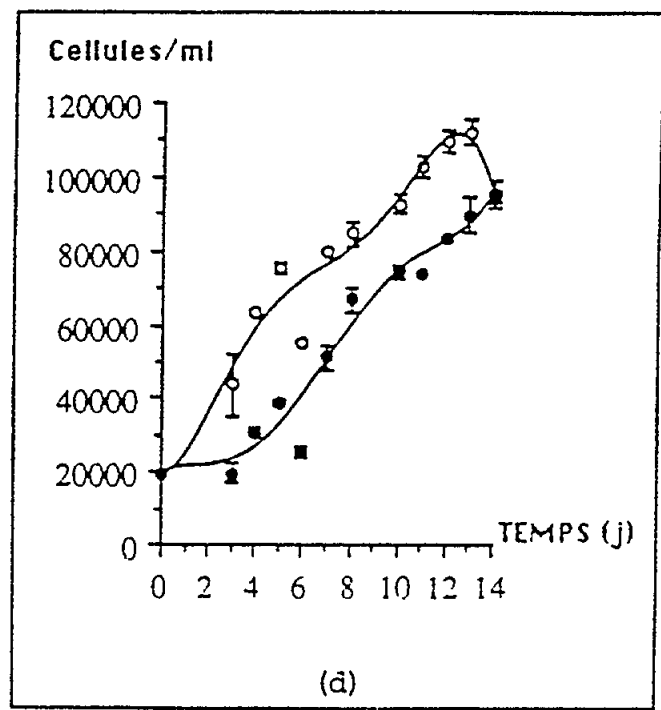
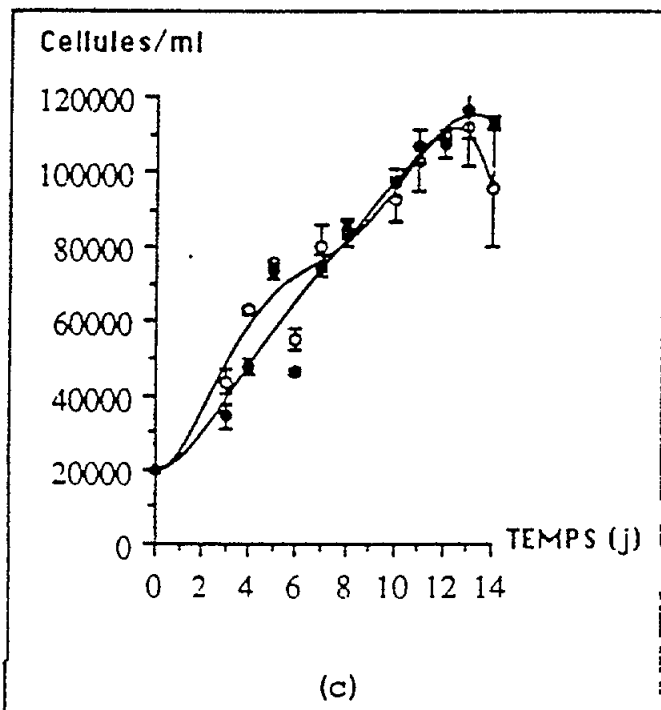
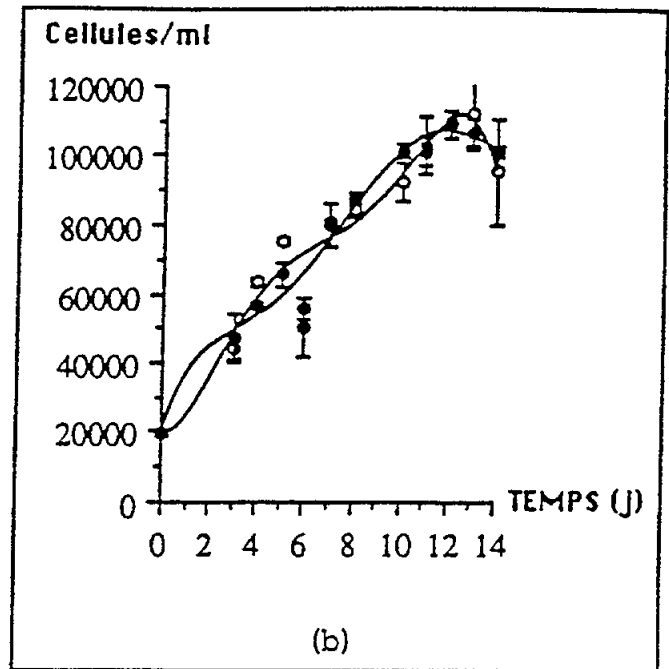
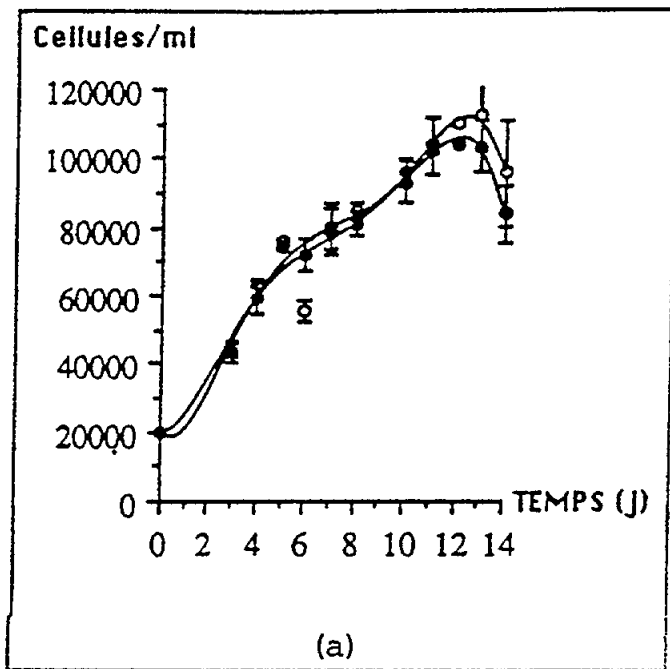


Fig. 4 Croissance d'une culture de *Crivosphaera elongata* témoin (o) et d'une culture contaminée par du séléniate de sodium (●) à la concentration de 0,1 (a), 1 (b), 10 (c) ou 100 mg l⁻¹ (d)

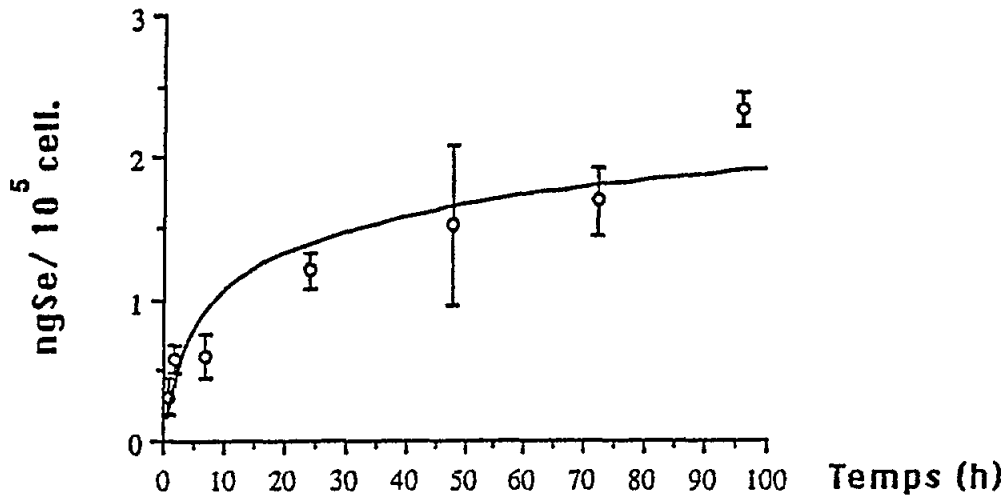


Fig. 5a Cinétique d'accumulation de $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$

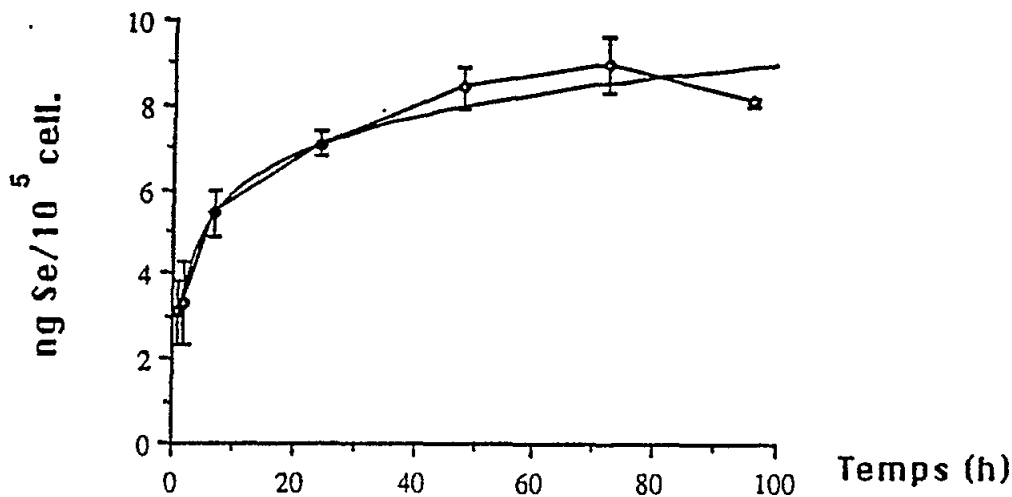


Fig. 5b Cinétique d'accumulation de $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$

La forme sigmoïde de la courbe traduit un transport facilité du sélénite à l'intérieur de la cellule soit par un transporteur soit par un canal protéique (Alberts et coll., 1983). Des expériences complémentaires réalisées à l'obscurité sur des cultures de *Cricosphaera elongata* (figs 6a et 6b) montrent la disparition de cette forme sigmoïde. Cependant, au bout de 2 heures de contamination on observe un taux similaire de sélénium dans l'algue par rapport aux cultures placées à la lumière ($0,3/0,9$ pour $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ et $3,1/2,9$ pour $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$), l'accumulation du sélénite est donc indépendante de la lumière pendant les deux premières heures de contact. Ce qui laisse à penser qu'il existe une première phase d'accumulation du sélénite

(0-2h), indépendante de l'énergie lumineuse correspondant à une adsorption des cations métalliques à la surface de la paroi cellulaire et une seconde phase plus longue de transport facilité à l'intérieur de la cellule phytoplanctonique.

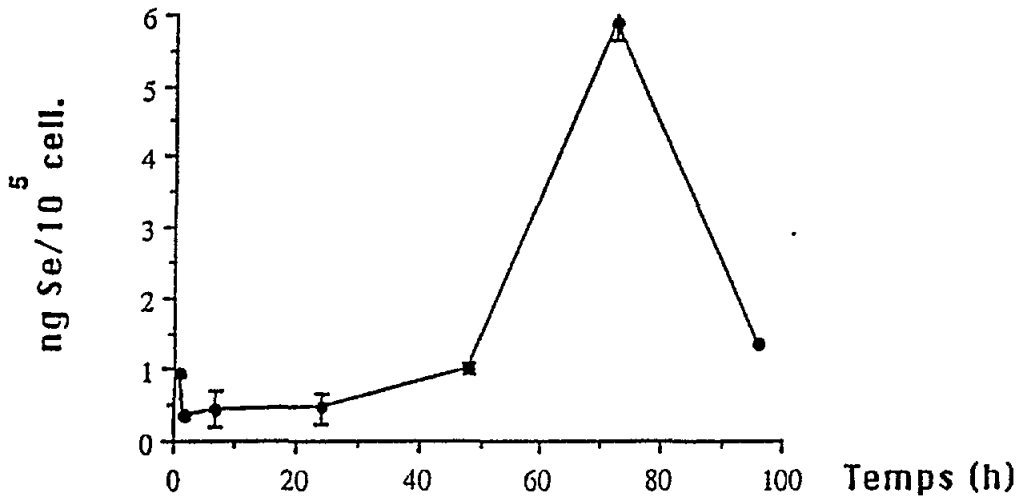


Fig. 6a Cinétique d'accumulation de $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$. Effet de l'obscurité

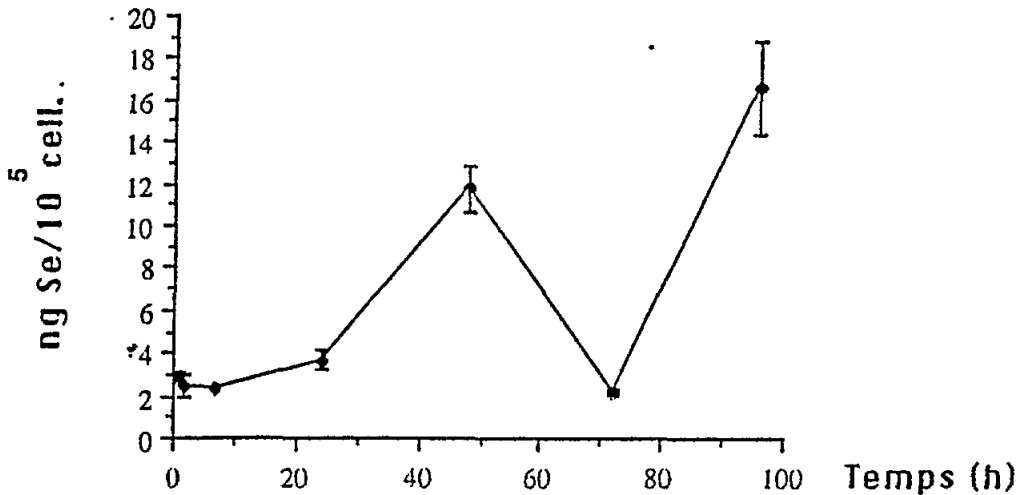


Fig. 6b Cinétique d'accumulation de $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$. Effet de l'obscurité

Dans le cas du séléniate, les cinétiques d'accumulation obtenues (figs 7a et 7b) ne présentent aucune forme particulière modélisable. La quantité de sélénium accumulée est identique au bout d'une heure à celle mesurée au bout de 96 heures ($0,16/0,20$ pour $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ et $1,35/1,36$ pour $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_4$). D'après Vandermeulen et Foda (1988), le séléniate serait expulsé activement de la cellule or des expériences de contamination réalisées à l'obscurité, donc en absence d'énergie lumineuse, (figs 8a et 8b) montrent que les teneurs en sélénium mesurées au bout de 2 heures sont identiques à celles obtenues au bout de 48 heures ($0,32/0,45$ pour $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ et $1,59/1,49$ pour $1,0$

mg l⁻¹ Na₂SeO₄), la cellule n'est donc pas envahie par le séléniate. Il s'agit sans doute uniquement d'un phénomène d'adsorption à la surface de la paroi cellulaire.

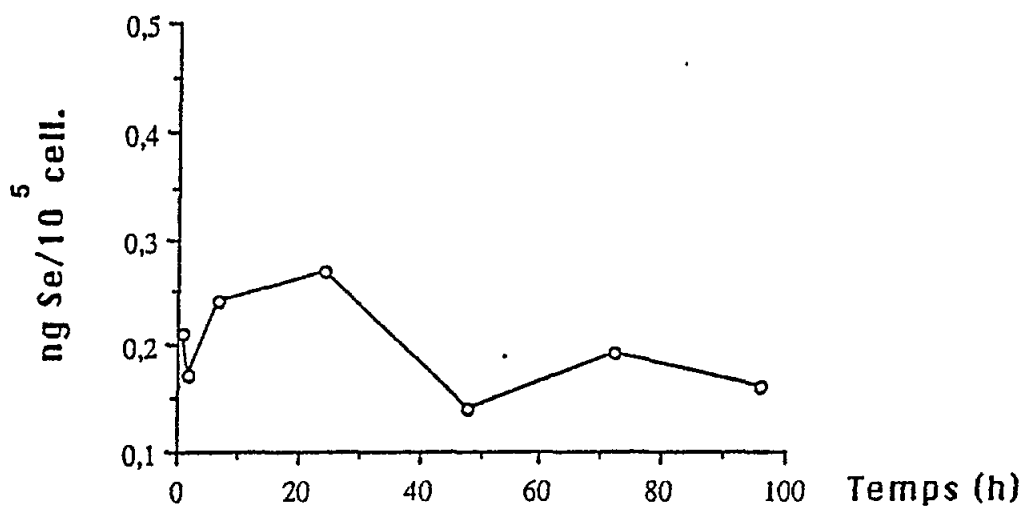


Fig. 7a Cinétique d'accumulation de 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₄

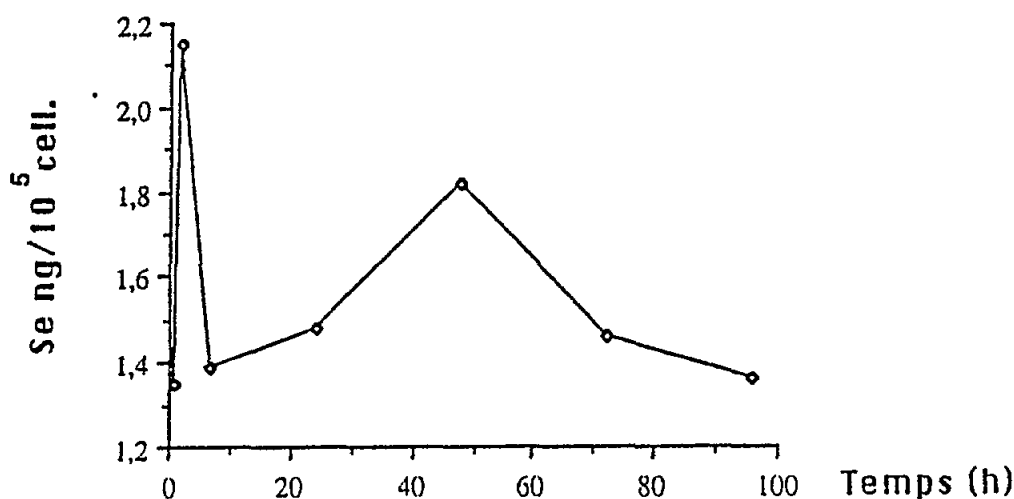


Fig. 7b Cinétique d'accumulation de 1 mg l⁻¹ Na₂SeO₄

3.2.3 Effets du sélénium sur la physiologie de Cricosphaera elongata

La chlorophylle a est un paramètre représentatif de l'état physiologique de l'algue (Neveux, 1982), or des résultats préliminaires (Boisson, 1988) nous ont montré que le sélénite à la concentration de 1 mg l⁻¹ avait un effet négatif significatif au seuil de 0,05 sur la teneur en chlorophylle a de Cricosphaera elongata, c'est pourquoi nous avons testé les concentrations 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₃; 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₄ et 1 mg l⁻¹ Na₂SeO₄.

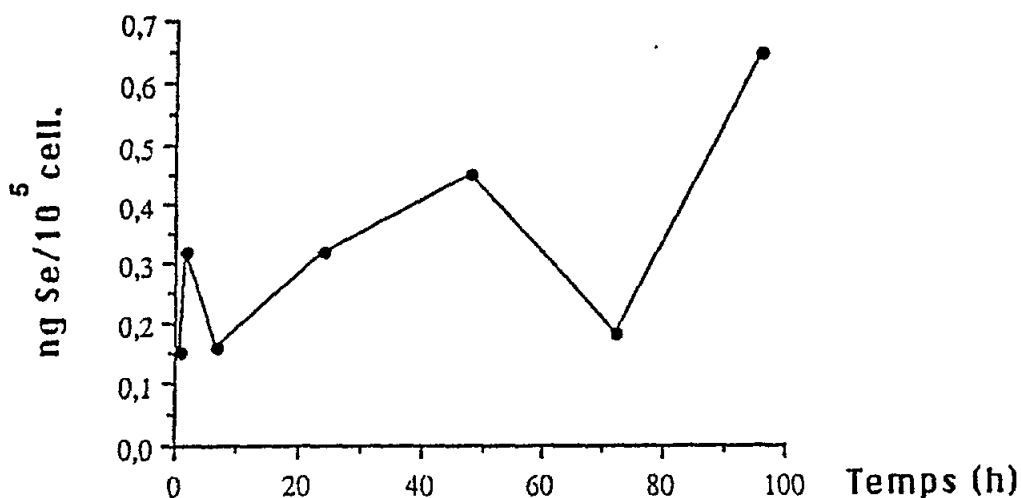


Fig. 8a Cinétique d'accumulation de $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_4$. Effet de l'obscurité

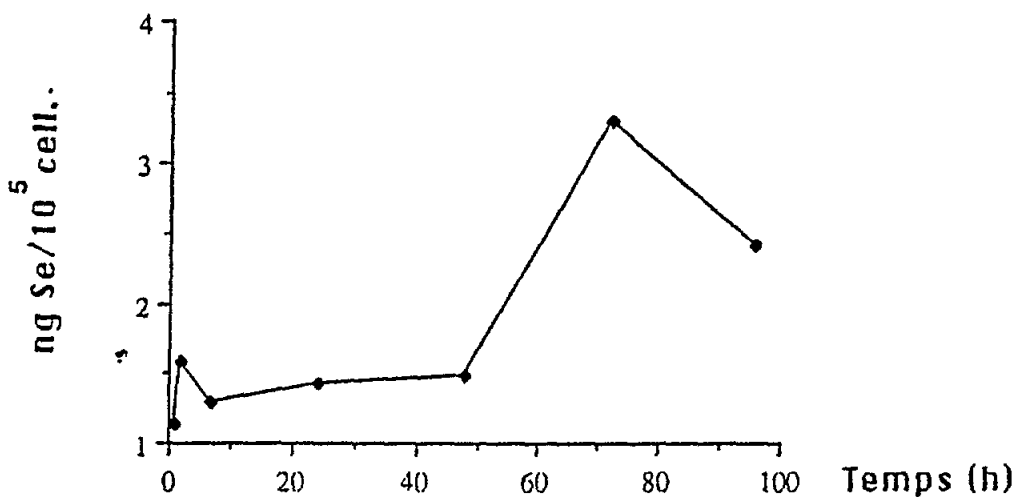


Fig. 8b Cinétique d'accumulation de $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_4$. Effet de l'obscurité

Les résultats obtenus (fig. 9) montrent qu'il n'existe aucun effet toxique du sélénium aux concentrations testées et qu'au contraire, en présence de sélénium on observe un certain effet bénéfique puisqu'il n'y a pas de phase de latence dans l'évolution de la teneur en chlorophylle a de l'algue, comparativement à ce qui se passe chez les témoins. Ainsi, la concentration en chlorophylle a dans l'algue est maximale entre le 4ème et le 5ème jour. Elle augmente avec le degré d'oxydation en sélénium et la concentration testée. Dans ces conditions, le métabolisme photosynthétique de Cricosphaera elongata dans les premiers jours de croissance de la culture semble donc activé par la présence de sélénium dans le milieu. Or pendant la phase de

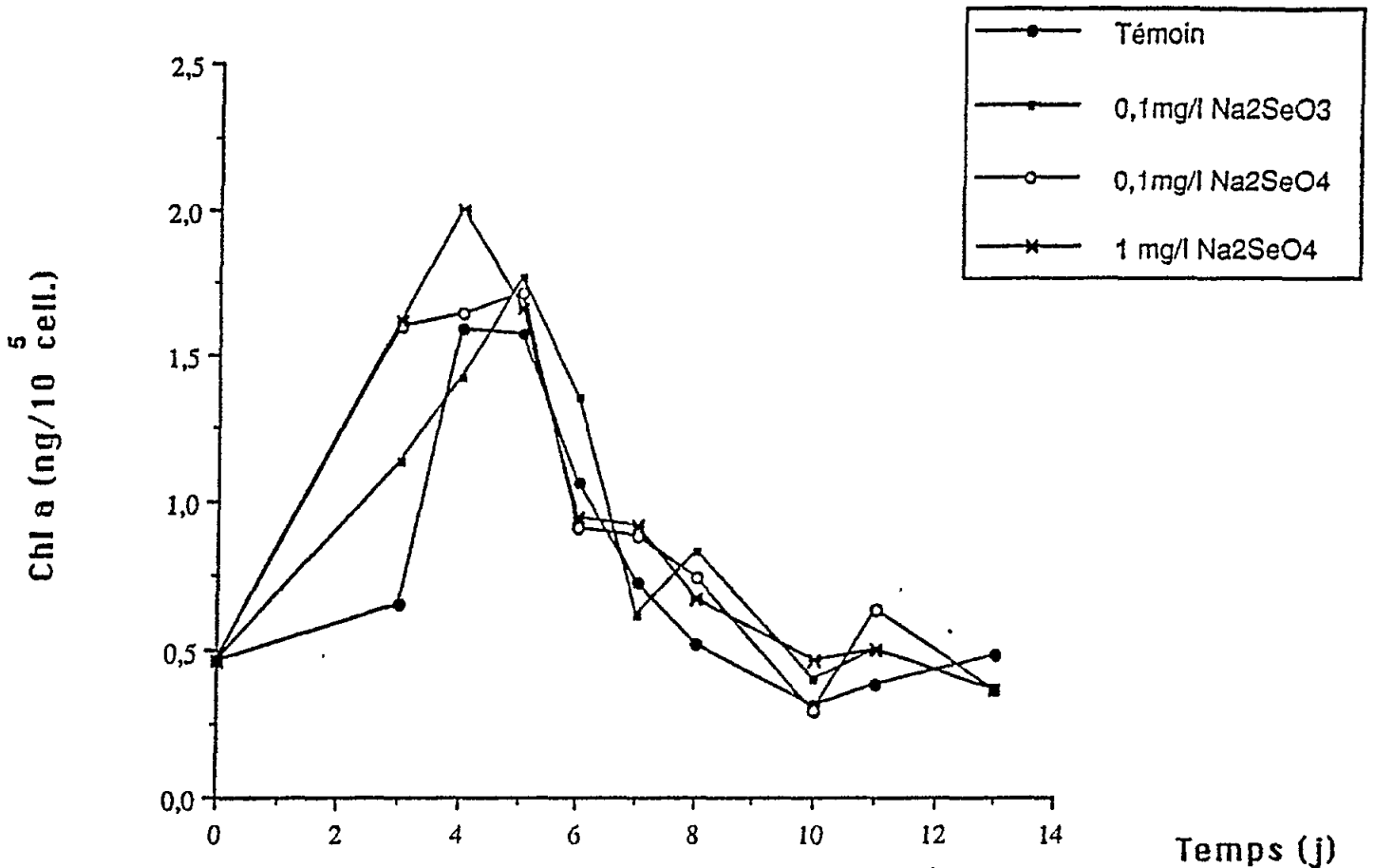


Fig. 9 Effets du sélénium sur la teneur en chlorophylle a de Cricosphaera elongata

latence, il y a production de matériel cellulaire destiné à la division des cellules au cours de la phase exponentielle de croissance. Ce matériel comporte en particulier des protoplastes contenant de la prochlorophylle. Le sélénium semble donc avoir un effet stimulateur sur la biosynthèse de la chlorophylle (ou sur sa régulation) à partir de la prochlorophylle dans les protoplastes de Cricosphaera elongata. Cette interaction entre le sélénium et la biosynthèse de la chlorophylle a été observée chez une légumineuse (Padmaja et coll., 1989), au niveau d'une enzyme connue pour son rôle dans la régulation de la synthèse de la chlorophylle. Dans ce cas cependant, il s'agissait d'un effet négatif du sélénium sur la concentration en chlorophylle.

Par ailleurs, sachant d'après les résultats préliminaires (Boisson, 1988) que $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$ a un effet toxique sur la physiologie de l'algue (diminution significative de la concentration en chlorophylle des algues testées) alors que la même concentration en séléniate entraîne plutôt un effet bénéfique, on peut penser soit que le sélénite est plus réactif que le séléniate, soit qu'il est plus toxique que celui-ci, les deux phénomènes pouvant être liés.

L'étude de l'effet du sélénium sur la teneur en chlorophylle a, paramètre représentatif de la physiologie de l'algue, a permis de mettre en évidence la limite entre les deux rôles biologiques possibles du sélénium chez Cricosphaera elongata:

- oligo-élément ayant un effet stimulateur sur la physiologie de l'algue;
- xénobiotique ayant un effet toxique;

la deuxième fonction n'ayant été observée qu'en présence de 1 mg l⁻¹ de sélénite.

3.3 Effets du sélénium sur l'accumulation du cadmium par C. elongata

La possibilité d'interactions entre les contaminants étant la principale source d'incertitudes des programmes de surveillance de l'environnement (Phillips, 1980), nous nous sommes attachés à étudier l'effet du sélénium sur l'accumulation du cadmium par Cricosphaera elongata et cela par la méthodologie des plans factoriels d'expériences.

Les variables considérées ont été: la concentration en cadmium et en sélénite dans le milieu ainsi que la durée de l'expérience (tableau 3). La réponse étudiée a été la concentration en cadmium dans les algues exprimée en nanogrammes pour 10⁶ cellules. Les résultats ont été comparés à des témoins contaminés par du cadmium seul.

Tableau 3

Niveaux	Cd (µM)	Na ₂ SeO ₃ (µM)	Durée (h)
-1	0,5	0,5	1
+1	2	2	25

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 4. Il comprend les coefficients estimés, les valeurs du test t ainsi que le niveau de signification.

Etant donné que seuls sont significatifs les coefficients correspondant à l'action de la concentration en sélénium, de celle du cadmium, de la durée et de l'interaction sélénium-durée, l'évolution de la concentration en cadmium dans l'algue (exprimée en ng 10⁻⁶ cellules) en fonction des concentrations en cadmium (Cd) et en sélénium (Se) dans le milieu ainsi que de la durée de la contamination (D) peut être modélisée par une régression linéaire multiple dont l'équation est:

$$(Cd_{\text{algue}}) = 39 + 6(\text{Se}) + 12(\text{Cd}) + 16D + 8(\text{Se})D$$

Si dans l'équation ci-dessus nous remplaçons la concentration en cadmium par +1 (niveau fort) ou -1 (niveau faible), nous constatons que le cadmium accumulé par C. elongata augmente avec la concentration en sélénite dans le milieu et la durée de la contamination.

Tableau 4

Variabes	Coefficients	Test t	P
Constante	39,4	12,8	<0,03
(Cd)	12,1	3,9	<0,09*
(Se)	6,1	2,0	<0,10*
Durée	16,4	5,3	<0,06*
(Cd) (Se)	0,9	0,3	<0,50
(Cd) Durée	1,6	0,5	<0,40
(Se) Durée	8,1	2,6	<0,10*

Le coefficient de détermination est égal à 0,964

Test F (Fisher): 9,17 (les degrés de liberté sont de 6 et 1)

* niveau de signification du test t est de 0,1

Comparativement aux témoins contaminés par du cadmium seul, la concentration en cadmium accumulé par l'algue au bout d'une heure ne diffère pas et cela quelle que soit la concentration en sélénite dans le milieu. Au contraire au bout de 25 heures de contact, la concentration en cadmium dans la cellule s'accroît significativement avec l'augmentation de la concentration en sélénite dans le milieu.

En présence de sélénite il y a donc une augmentation de l'accumulation du cadmium par l'algue et cet effet est d'autant plus fort que la concentration en sélénite est élevée. Le sélénite pourrait agir en inhibant le flux sortant de cadmium ou en favorisant la complexation du cadmium à l'intérieur de la cellule par des molécules du type métallothionéines, contribuant ainsi à augmenter la concentration en cadmium intracellulaire. Nos résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par Prévot et Soyer-Gobillard (1986) sur la toxicité du cadmium et du sélénium sur deux dinoflagellés marins. Ces auteurs ont en effet montré une action synergique entre le cadmium et une forte concentration en sélénium dans le milieu. Bjerregaard (1988) suggère que l'augmentation de l'accumulation du cadmium par le crabe Carcinus maenas en présence de sélénite dépend de la conversion métabolique du Se (IV) en Se (-II) qui pourrait alors former un complexe protéique stabilisé CdSe avec un rapport molaire Cd:Se proche de 1.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'effet du sélénium sur les algues marines dépend donc de son degré d'oxydation, du temps d'exposition, de la concentration en sulfate du milieu et de l'algue considérée. Les principaux résultats obtenus ont été:

- Le sélénite est plus toxique que le séléniate et il est davantage accumulé que celui-ci;
- A la concentration de 0,1 mg l⁻¹, le sélénite favorise la croissance de Cricosphaera elongata et à la concentration de 100 mg l⁻¹ il provoque chez Bryopsis maxima l'apparition d'un précipité rouge probablement dû à la réduction du sélénite en sélénium élémentaire;

- Pour Bryopsis maxima, l'accumulation sature au bout de trois jours pour les concentrations 0,1 mg l⁻¹ de sélénite ainsi que 0,1 mg l⁻¹ et 1 mg l⁻¹ de séléniate alors que pour les autres concentrations, l'accumulation augmente linéairement dans le temps;
- Pour Cricosphaera elongata, l'accumulation du sélénite est un mécanisme biphasique comportant une première étape d'adsorption à la surface de la paroi cellulaire suivie d'une étape de diffusion facilitée à travers la membrane cellulaire. Pour le séléniate, il s'agirait seulement d'une adsorption à la surface de la cellule. Cette algue phytoplanctonique est donc capable de différencier les deux formes chimiques du sélénium ce qui va dans le sens d'une absorption préférentielle du sélénite par rapport au séléniate (Vandermeulen et Foda, 1988);
- L'effet du sélénium sur la physiologie des algues est observable en particulier à la concentration de 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₃ qui provoque une augmentation de l'activité métabolique de Bryopsis sp. se traduisant par une augmentation des teneurs en chlorophylle a et en protéines alors que pour la concentration 0,1 mg l⁻¹ Na₂SeO₄ on observe un effet toxique sur la teneur en chlorophylle a. Dans le cas de Cricosphaera elongata, l'effet du sélénium se fait sentir dans la phase de latence de la culture car la teneur en chlorophylle a des algues contaminées est supérieure à celle des témoins. Cette teneur augmente avec le degré d'oxydation du sélénium et la concentration testée;
- L'étude de l'interaction cadmium-sélénium a montré qu'il existe une synergie entre ces deux composants, à savoir que la teneur en cadmium accumulé par l'algue augmente avec la concentration en sélénite dans le milieu et la durée de la contamination.

5. REFERENCES

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson (1983), La membrane plasmique. In: Biologie moléculaire de la cellule, par Flammarion Médecine Sciences eds, 1146 p.
- Bjerregaard, P. (1988), Effect of selenium on cadmium uptake in selected benthic invertebrates. Mar.Ecol.Prog.Ser., 48(1):17-28
- Boisson, F. (1988), Optimisation des conditions de culture d'une algue unicellulaire (Prymnésiales) Hymenomonas elongata et d'une algue coenocytique (Siphonales) Bryopsis maxima; effet du sélénium sur la croissance de ces deux algues. D.E.A. Paris VI, 32 p.
- Ehrardt, J.P. et G. Seguin (1978), Le plancton. Composition, écologie, pollution. Collection "Ecologie fondamentale et appliquée". R. Dajoz (ed). Gauthier-Villars, Paris, 120 p.
- Gennity, J.M., N.R. Bottino, R.A. Zingaro, A.E. Wheeler and K.J. Irgolic (1984), The binding of selenium to the lipids of two unicellular marine algae. Biochem.Biophys., 118(1):176-182

- Gnassia-Barelli, M. and M. Härdstedt-Roméo (1982), Short term time series study of Cu and Cd uptake by Cricosphaera elongata (droop) braarud. J.Exp.Mar.Biol., 61:287-298
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther (1962), Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of marine invertebrates, edited by W.L. Smith and M.H. Chanley, New York, Plenum Publishing, pp.29-60
- Lorenzen, C.J. (1962), Determination of chlorophyll and phaeophytin: spectrophotometric equation. Limnol.Oceanogr., 12:343-346
- Lowry, O.H., N.J. Roebrough, L. Farra et R.J. Randall (1951), Protein measurements with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275
- Maiers, D.T., P.L. Wichlacz, D.L. Thompson and D.F. Bruhn (1988), Selenate reduction by a bacteria from a selenium-rich environment. Appl. Environ.Microbiol., 54(10):2591-2593
- Measures, C.J. and J.D. Burton (1980), The vertical distribution and oxidation states of dissolved selenium in the northeast Atlantic ocean and their relationship to biological process. Earth Planet.Sci.Lett., 46:385-396
- Neveux, J. (1982), Pigments du phytoplancton, composition et activité photochimique des chlorophylles. Signification écologique de la fluorescence in vivo de la chlorophylle a. Thèse, Univ. Paris VI, 146 p.
- Padmaja, K., D.D.K. Prasad and A.R.K. Prasad (1989), Effect of selenium on chlorophyll biosynthesis in mung been seedlings. Phytochem., 28(12):3321-3324
- Phillips, D.J.H. (1980), Toxicity and accumulation of cadmium in marine and estuarine biota. In: Cadmium in the environment. I. Ecological cycling, edited by J.D. Nriagu, New York, Pergamon Press, 568 p.
- Phillips, D.J.H. (1987), Toxic contaminants in the San Francisco Bay-Delta and their possible biological effects. Technical Report of the Aquatic Habitat Institute, 1301 South 46th St. Richmond, California 94804, USA
- Prévot, P. and M.O. Soyer-Gobillard (1986), Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, Prorocentrum micans, Ehrbg and Cryptothecocinium cohnii, Beicheler, J.Protozool., 33(1):42-47
- Price, N.M., P.A. Thompson and P.J. Harrison (1987), Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom Thalassiosira pseudonana. J.Phycol., 23:1-9
- Sheppard, D.C. (1970), Axenic culture of Acetabularia synthetic media. In: Methods in cell physiology, edited by D. Prescott, N.Y. London, Academic Press, Vol.4, pp.49-59

Vandermeulen, J.H. and A. Foda (1988), Cycling of selenite and selenate in marine phytoplankton. Mar.Biol., 98:115-123

Wheeler, A.E., R.A. Zingaro, K. Irgolic and N.R. Bottino (1982), The effect of selenate, selenite and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 57:181-194

ETUDE DE LA BIOACCUMULATION, DE LA PERSISTANCE ET DE LA TOXICITE
DE L'URANIUM ET DU PLUTONIUM CHEZ DES ORGANISMES MARINS
DE MEDITERRANEE, CONSOMMES PAR L'HOMME

par

Colette CHASSARD-BOUCHAUD

Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes Marins,
Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu,
75252 Paris Cedex 05, France

Laboratoire de Biophysique de la Faculté de Médecine,
Centre de Microanalyse appliquée à la Biologie du CNRS,
8 rue du Général Sarrail, 94000 Créteil, France

RESUME

Les recherches ont été effectuées sur deux Mollusques Bivalves, la moule Mytilus edulis et l'huître Crassostrea gigas. Les échantillons analysés ont été prélevés in situ, sur le littoral méditerranéen puis ont été soumis à des intoxications expérimentales par l'uranium 238. Pour détecter et visualiser les radioéléments, deux méthodes microanalytiques ont été utilisées: la spectrométrie de masse par émission ionique secondaire à l'aide du microscope ionique et la spectrométrie des rayons X à l'aide d'une microsonde associée à un microscope électronique à transmission. Un système informatisé de traitement d'images est associé au microscope ionique.

Les mécanismes de bioaccumulation de persistance et de toxicité des radionucléides sont étudiés à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Les organes et tissus cibles de concentration sont mis en évidence. Les organites cibles sont les sphérocristaux et les lysosomes dans lesquels les radio-nucléides sont insolubilisés sous forme de phosphate grâce à une activité enzymatique phosphatasique acide.

La cytotoxicité des radionucléides est démontrée: elle se traduit par des altérations nucléaires et un appauvrissement de la population mitochondriale.

Les résultats sont discutés en relation avec le transfert des radionucléides dans les chaînes alimentaires comportant des espèces marines consommées par l'Homme.

1. INTRODUCTION

L'Homme est continuellement exposé aux éléments radioactifs présents dans l'environnement ainsi qu'à ceux existants éventuellement dans la nourriture qu'il consomme, étant lui-même le maillon terminal de nombreuses chaînes alimentaires.

L'océan est, avec l'atmosphère, le plus vaste réservoir qui s'offre à l'éventuelle dispersion, volontaire ou non, des radionucléides qui sont à l'origine de la radioactivité. II

convient de distinguer radioactivité naturelle et radioactivité artificielle. Certains radionucléides existent dans la nature, comme le thorium 232, le carbone 14, le potassium 40, le tritium ou encore l'uranium. D'autres radionucléides sont produits par l'Homme: ce sont les isotopes artificiels obtenus, par exemple, par fission des noyaux d'atomes lourds, tels que les transuraniens comme le plutonium.

L'uranium présent dans le milieu marin a deux origines. La première, naturelle provient des eaux de lessivage des minéraux du sol par les eaux de ruissellement. A proximité des gisements d'uranium les teneurs peuvent être élevées ($8,7 \mu\text{g l}^{-1}$, en moyenne). L'eau de mer a une teneur de $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$ environ. La deuxième origine est anthropogénique et provient des activités nucléaires, industrielles et agronomiques. Citons notamment dans les zones d'estuaires les rejets de phosphogypses (résidus de fabrication d'engrais phosphatés) abondants en Baie de Seine. Ces effluents contiennent en particulier des terres rares et de l'uranium. L'uranium est constitué de 3 isotopes: U-238 (99,3%) isotope majeur, U-235 (0,7%) et U-234 (0,006%). La période radioactive de U-238 est de $4,5 \times 10^9$ ans.

A l'exception de traces existant dans certains minerais uranifères, le plutonium est un élément d'origine artificielle comprenant un ensemble d'isotopes dont le nombre de masse va de 232 à 246. Les isotopes quantitativement les plus importants rencontrés dans le milieu marin sont les suivants Pu-238, Pu-239 et Pu-240. Ces isotopes proviennent principalement des retombées consécutives aux essais nucléaires, des rejets d'usines de retraitement de combustibles irradiés et éventuellement d'accidents aériens ou de désintégrations de satellites. L'isotope Pu-239 qui est le plus abondant a une période de 24400 ans.

Uranium et plutonium ont fait l'objet de recherches relatives à leurs processus de bioaccumulation, de persistance et de toxicité chez divers organismes marins couramment consommés par l'Homme. Citons par exemple nos travaux relatifs aux processus cellulaires et subcellulaires de bioaccumulation de l'uranium chez le crabe Carcinus maenas (Chassard-Bouchaud, 1983), et chez plusieurs Mollusques bivalves: Mytilus edulis, Crassostrea gigas et Cerastoderma edule (Chassard-Bouchaud, 1991a). Chez ces mêmes bivalves ont été étudiés quelques effets biologiques de l'uranium et de transuraniens (Chassard-Bouchaud, 1991a). L'ensemble de ces travaux est effectué grâce aux techniques microanalytiques particulièrement bien adaptées aux études écotoxicologiques de l'environnement marin (Chassard-Bouchaud, 1991b).

L'objectif de notre travail était l'étude de la bioaccumulation, de la persistance et de la toxicité de l'uranium et du plutonium chez la moule commune Mytilus edulis et chez l'huître Crassostrea gigas.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel

Mytilus edulis, la Moule commune a été récoltée en différents points du littoral méditerranéen français, dans les régions de Cannes, Marseille et Fos sur Mer.

Crassostrea gigas, l'Huître la plus couramment consommée, a été récoltée dans les mêmes sites.

Notre étude porte sur deux séries d'échantillons:

- échantillons prélevés in situ
- échantillons expérimentés en laboratoire et soumis à des intoxications par l'uranium.

Les contaminations expérimentales des Moules et des Huîtres sont effectuées de la façon suivante: On utilise du nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à la concentration de 10 PPM. Les élevages sont maintenus à une température de 20°C et les intoxications durent 30 jours.

Les différents organes et tissus de chaque espèce sont disséqués, puis subissent différents traitements en fonction des méthodes d'investigation et de microanalyses choisies.

2.2 Méthodes

2.2.1 Microscopie optique et électronique. Microanalyse.

2.2.1.1 Préparation des échantillons

Microscopie optique:

- fixation au mélange de Carnoy, déshydratation, inclusion à la paraffine et coupe à 5 μ . Les coupes sont étalées sur lame de terphane carboné (pour la microsonde) ou sur lamelle d'or poli (pour l'analyseur ionique) puis déparaffinées.
- fixation à la glutaraldéhyde, rinçage au tampon cacodylate, déshydratation, inclusion dans du Spurr et coupe à 2 μ . Les coupes sont déposées sur lamelle d'or poli (pour l'analyseur ionique).

Microscopie électronique:

- fixation à la glutaraldéhyde, rinçage au tampon cacodylate, déshydratation, inclusion dans du Spurr. Les coupes ultrafines sont recueillies sur des grilles en titane et ne sont pas colorées pour être analysées à la microsonde CAMEBAX.

2.2.1.2 Méthodes de microanalyse

Principe des méthodes (tableau 1)

a) Microanalyse par spectrométrie des rayons X (fig. 1)

La microanalyse par spectrométrie des rayons X, est une méthode par laquelle les éléments constitutifs du tissu biologique sont identifiés par leurs raies X caractéristiques.

Tous les éléments de numéro atomique supérieur à 4 sont détectables. L'information obtenue peut être traitée, soit par des spectromètres sélectifs en énergie (détection par diode), soit par des spectromètres dispersifs en longueur d'onde (détection par

cristal et compteur). Seule cette seconde méthode a été utilisée, elle est légèrement moins sensible mais donne une meilleure résolution en longueur d'onde que la première. Le volume minimum analysable a un diamètre de 1.000 Å. La sensibilité est de l'ordre de 10^{-17} g pour les éléments de numéro atomique supérieur à 10.

Tableau 1

Caractéristiques des méthodes microanalytiques.

Système d'analyse	Type d'appareil utilisé	Visualisation de la coupe	Obtention d'images analytiques	Eléments analysables	Sensibilité	Résolution latérale
Spectrométrie des Rayons X	<u>Microsonde MS 46</u> (CAMECA)	Microscope optique	OUI par balayage uniquement	Eléments de nE atomique > 4	de l'ordre de 10^{-17} g pour les éléments de nE atomique >10	0,05 µm
	<u>Microsonde CAMEBAX</u> (CAMECA)	Microscope Electronique à transmission				
Spectrométrie de Masse	<u>ANALYSEUR IONIQUE SMI 300</u> (CAMECA)	Optique ionique	OUI	Tous les éléments avec distinction entre les isotopes stables ou radioactifs d'un même élément	Atteint 10^{-20} g pour un grand nombre d'éléments	0,5 µm

L'échantillon à analyser, bombardé par un fin faisceau d'électrons (la sonde électronique), émet un spectre de rayons X caractéristique de ses éléments constitutifs; chaque rayonnement X correspondant à un élément peut-être réfléchi sélectivement par un cristal monochromateur orientable. L'intensité de ce rayonnement réfléchi est mesurée par la chaîne d'analyse.

b) Microanalyse par émission ionique secondaire (figs. 2 et 3)

La microanalyse par émission ionique secondaire est une méthode fondée sur l'identification par spectrométrie de masse, des ions secondaires arrachés à l'échantillon par un bombardement d'ions primaires.

Cette méthode permet à la fois d'identifier tous les éléments de la classification périodique avec distinction entre les isotopes stables et radioactifs d'un même élément et d'en obtenir des images de distribution avec une résolution spatiale meilleure que le micromètre.

La sensibilité atteint 10^{-20} g pour un grand nombre d'éléments. Le principe est le suivant: l'échantillon est érodé par un faisceau d'ions primaires (O_2^+) accélérés. Parmi les particules arrachées, celles émises sous forme ionique (les ions secondaires), forment, après passage par la lentille électrostatique, une image globale de la surface de l'échantillon. Cette image globale est

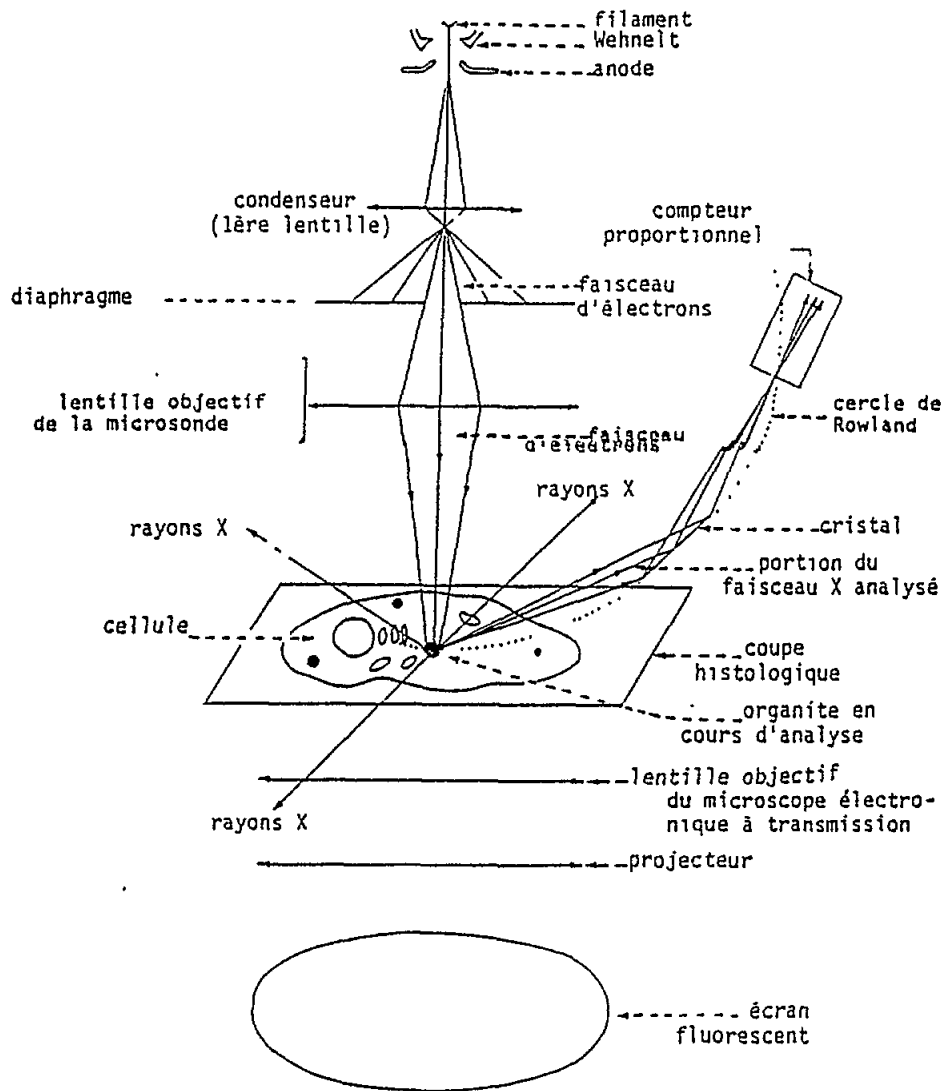


Fig. 1 Schéma de la microsonde électronique à spectromètre de rayons X dispersif en longueur d'ondes. Le microscope électronique à transmission, associé à la platine porte-échantillon, permet l'observation en ultrastructure. Le faisceau est focalisé sur un organite en cours d'analyse

décomposée en différentes images élémentaires par un champ magnétique réglable qui sélectionne les particules. Il est alors possible:

- d'observer et de photographier l'image filtrée de distribution des ions sélectionnés, sur un écran fluorescent;
- de mesurer l'émission ionique correspondant à ces ions.

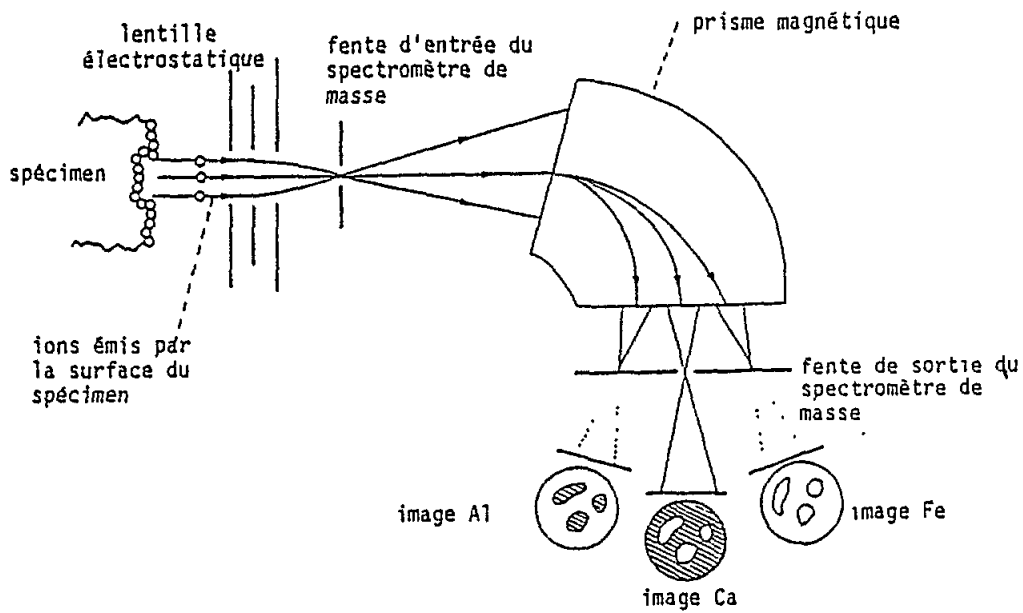


Fig. 2 Schéma de principe de la microscopie ionique

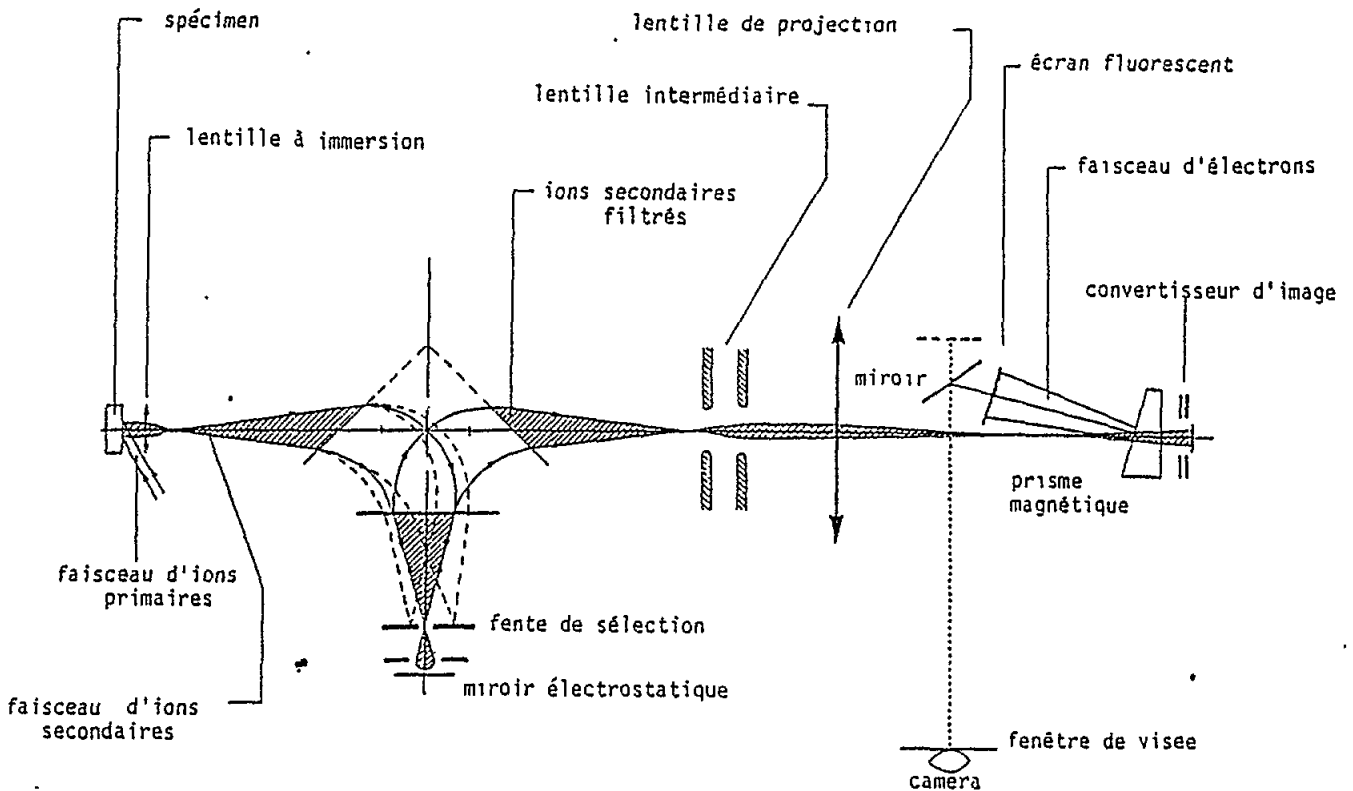


Fig. 3 Schéma du microscope ionique Cameca Smi 300, équipé du secteur électrostatique permettant d'atteindre une haute résolution en masse de 3000 en mode spectral. Le trajet des ions en mode image est différent; il est obtenu en basse résolution en masse

Le mécanisme de l'émission ionique secondaire est le suivant: les ions primaires percutent les atomes de l'échantillon et ceux qui se trouvent au voisinage de la surface sont arrachés; l'échantillon est pulvérisé.

Les particules quittent la cible sous forme neutre ou chargée (positivement ou négativement); ces dernières seulement (ions secondaires) peuvent être récupérées pour l'analyse: elles sont caractérisées par leur masse m , leur charge électrique q , leur vitesse v .

Appareils et conditions d'analyse:

a) Microanalyse par spectrométrie des rayons X

- Camebax: l'observation des coupes s'effectue par microscope électronique à transmission. La haute tension est réglée à 45 kV, le courant de sonde à 150 nA et le diamètre de sonde est de 500 nm. environ. La détection des éléments est réalisée avec des spectromètres du type dispersif en longueur d'onde et équipés de cristaux (PET, TAP, LIF et ODPb).

b) Microanalyse par émission ionique secondaire

L'appareil S M I 300 comprend le canon à ions primaires, la lentille à immersion, le spectromètre de masse, le convertisseur d'images et le secteur électrostatique.

Les conditions d'analyse sont les suivantes: bombardement (O_2^+) (500 à 800 nA); diaphragme de contraste de la lentille à immersion: 200 μm ; résolution sur l'image: 1 μm environ; résolution en masse 300 sur image; champ observé de 250 μm de diamètre; champ de mesure: 60 μm de diamètre. Tension objet: 4,5 kV.

c) Traitement informatisé des images ioniques (fig. 4)

Un système informatisé d'acquisition et de traitement des images ioniques a été mis au point (Cavellier et al., 1989). Ce système utilise l'instrument Numelec Pericolor 2001, associé à une caméra Nocticon branchée sur le microscope ionique. Cette caméra permet de filmer l'écran fluorescent du microscope par une fenêtre de visée en utilisant un objectif de 100 mm (f/2.2). Ce système permet en outre d'obtenir des images codées en couleurs à l'aide desquelles un repérage précis de la cartographie des éléments présents dans une coupe histologique donnée, peut être obtenu.

2.2.2 Analyse quantitative

Compte tenu des faibles niveaux de la radioactivité tant naturelle qu'artificielle des organismes marins, les prélèvements de Mytilus sp. portent sur une quantité minimale de 5 kg d'individus (parties molles). La partie organique est extraite, séchée à l'étuve à 80E, puis réduite en cendres à 280EC.

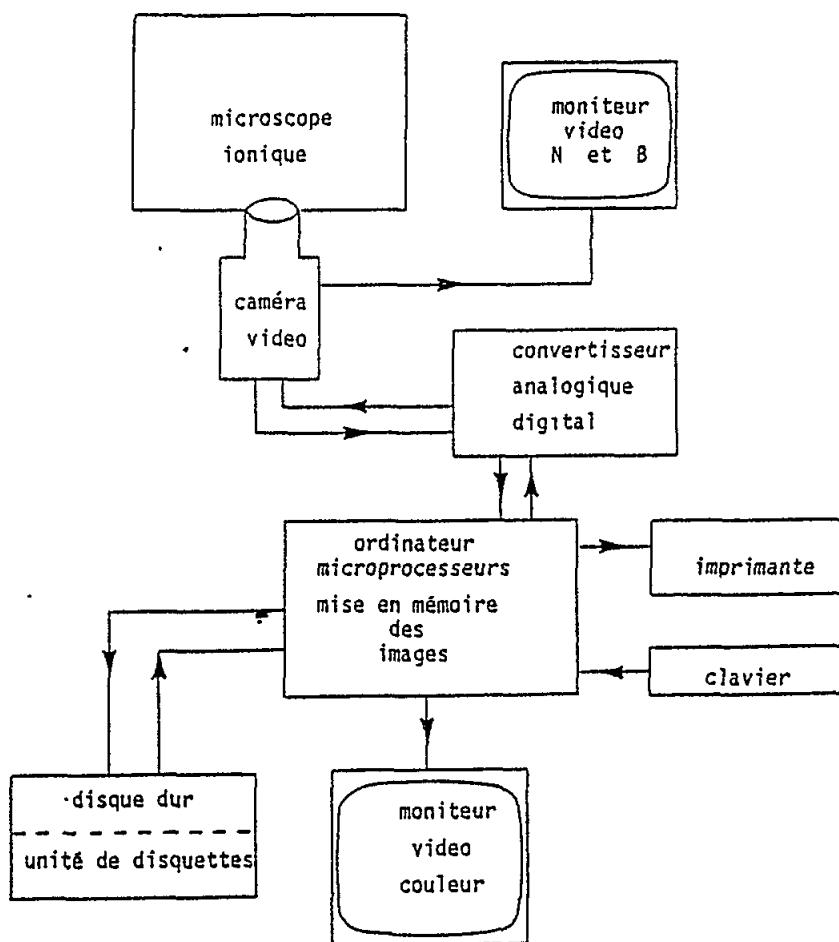


Fig. 4 Schéma du système informatisé de numérisation et de traitement d'images, associé au microscope ionique

Le dosage de l'uranium est réalisé par dosage fluorimétrique. La limite de détection imposée par cette technique est de $0,5 \mu\text{g}$ par g de cendres; les résultats sont exposés en unité pondérale ou en Bq kg^{-1} de cendres.

Le principe de la méthode est le suivant.

Les cendres de moules sont mises en solution dans l'acide chlorhydrique 4N; on prépare ainsi une solution à 1% soit 0,5 g dans 50ml d'acide en portant l'ensemble à ébullition pendant une vingtaine de minutes. Après refroidissement, on sépare la fraction solide de la fraction liquide par filtration. Le filtrat est conservé. Sur ce filtrat on effectue 4 prises de $100 \mu\text{l}$ dont chacune est déposée dans une capsule de platine. Après séchage de ces capsules sous lampe infrarouge, une fraction de fluorure de sodium est déposée dans chacune d'elle et on procède à la fusion de celui-ci par l'emploi du bec Mecker. Au terme des 4 minutes de fusion, les capsules sont mises à refroidir et la fluorescence est lue sur le galvanomètre du fluorimètre une

vingtaine de minutes après le terme de la fusion (moment où la fluorescence est maximale). L'emploi de 2 solutions de titre connu en uranium traitées de façon analogue aux échantillons permet d'établir une gamme et donc de connaître la teneur en uranium des 5 échantillons analysés.

3. RESULTATS

3.1 Mytilus edulis

3.1.1 Etudes in situ

Les récoltes effectuées en différents points du littoral méditerranéen français font apparaître une contamination des moules par l'uranium 238: les teneurs sont comprises entre 20 et 50 Bq kg⁻¹ de cendres. Ces teneurs sont comparables à celles relevées sur des échantillons des côtes de la Manche. Elles sont cependant plus élevées que celles mesurées sur des moules des côtes de l'Atlantique.

Le plutonium 239 a été mis en évidence dans la glande digestive de la moule. La figure 16 présente deux images ioniques, obtenues sur la même coupe histologique. L'image du calcium 40 montre la topographie de la coupe où l'on reconnaît les diverticules de la glande digestive (DGV), des ovocytes (O) et le tractus digestif (TD). L'image du plutonium 239 met en évidence la localisation du plutonium uniquement dans la glande digestive, alors que les ovocytes et le tractus digestif en sont dépourvus. Sur cette même figure sont présentés les spectres d'émission ionique montrant les pics indiquant la présence du plutonium et de l'uranium.

3.2.1 Contaminations expérimentales

3.1.2.1 Résultats microanalytiques: sites cellulaires et subcellulaires

Sites cellulaires: organes cibles

La figure 5 présente les images ioniques obtenues sur la localisation de l'uranium dans les différents tissus et organes de la moule. Les plus fortes intensités sont observées dans la glande digestive.

Les mesures effectuées par spectrométrie de masse, des concentrations en uranium dans chaque tissu donnent les résultats suivants:

manteau	branchie	glande dig.	rein	gonade	byssus	ped	muscle
2.10 ⁻¹	6.10 ⁻²	6.10 ⁻¹	5.10 ⁻¹	2.10 ⁻¹	2.10 ⁻²	L.D.	L.D.

Intensités d'émission ionique de ²³⁸U+ normalisées à ¹²C+ et mesurées dans les différents organes. L.D.: limite de détection.

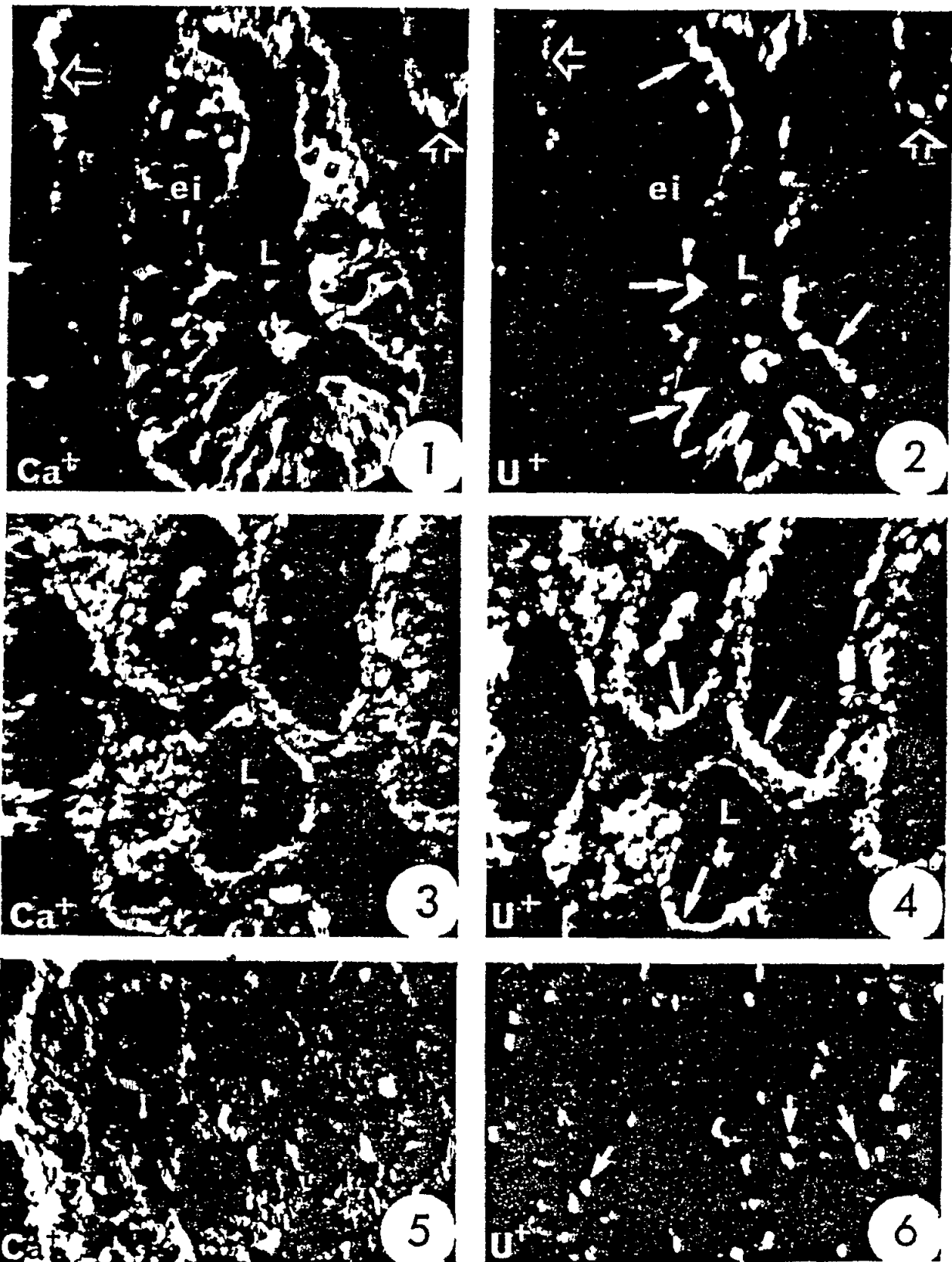


Fig. 5 Images ioniques montrant la localisation de l'uranium dans les différents tissus de la moule *Mytilus edulis*

Fig. 5 (suite)

Les chiffres donnés entre parenthèses correspondent à l'intensité du courant et au temps d'exposition du cliché

- (1) Image ionique de calcium ($^{40}\text{Ca}^+$) obtenue sur une coupe transversale d'intestin montrant la topographie générale, ei: epithelium intestinal, L: lumière. Les flèches creuses montrent des diverticules de la glande digestive ($4,5 \cdot 10^{-14}$ A, 10 s.) (G X 400).
- (2) Image ionique d'uranium ($^{238}\text{U}^+$) obtenue sur la même coupe transversale d'intestin que dans la figure 1 montrant une accumulation du métal au niveau de la bordure absorbante des cellules épithéliales intestinales (ei) (flèches pleines), L: lumière. Les flèches creuses indiquent des diverticules de la glande digestive, riches aussi en uranium. ($2,5 \cdot 10^{-16}$ A, 10 m.) (G X 400).
- (3) Image ionique de calcium ($^{40}\text{Ca}^+$) obtenue sur une coupe de diverticules de la glande digestive montrant la topographie générale, L: lumière. ($4 \cdot 10^{-14}$ A, 10 s.) (G X 400).
- (4) Image ionique d'uranium ($^{238}\text{U}^+$) obtenue sur la même coupe de diverticules de la glande digestive que dans la figure 3, montrant une accumulation du métal dans les cellules (flèches), L: lumière; ($6,5 \cdot 10^{-16}$ A, 10 m.) (G X 400).
- (5) Image ionique de calcium ($^{40}\text{Ca}^+$) obtenue sur une coupe de manteau montrant la topographie générale ($4 \cdot 10^{-14}$ A, 10 s.) (G X 400).
- (6) Image ionique d'uranium ($^{238}\text{U}^+$) obtenue sur la même coupe de manteau que dans la figure 5. Les flèches montrent que le métal est associé à des concrétions calciques ($8,5 \cdot 10^{-17}$ A, 12 m.) (G X 400).

Le tableau ci-dessus montre que les teneurs les plus élevées se situent dans la glande digestive et le rein; elles sont plus faibles dans le manteau et les gonades: elles sont réduites dans la branchie et dans le byssus.

L'uranium est en outre détecté dans les hemocytes macrophages présents dans pratiquement tous les organes.

Sites subcellulaires: organites cibles

Les mesures effectuées par spectrométrie de rayons X (sonde Camebax) donnent les résultats suivants:

Élément	cristal	raie	glande digestive lysosome	rein sphérocrystal
uranium	PET	Má1	1950±240	1840±215
phosphore	TAP	Ká1	2910±265	1945±220

Eléments détectés dans les lysosomes et sphérocristaux.
Les valeurs correspondent au nombre de chocs enregistrés pendant un temps de comptage de 100 sec.

Les lysosomes des diverticules de la glande digestive contiennent des microgranules d'uranium associé à du phosphore: ainsi ces métaux présents dans le milieu extérieur sous forme soluble, sont concentrés et insolubilisés dans les lysosomes sous forme de phosphate d'uranium par une réaction enzymatique (phosphatase acide). Dans le rein, ce sont les sphérocristaux qui concentrent ces métaux: ils se forment dans le cytoplasme à partir du réticulum endoplasmique; puis ils sont ensuite déversés dans le milieu extracellulaire, assurant ainsi la détoxification de l'animal (fig. 6).

Ainsi, lysosomes et sphérocristaux apparaissent comme les organites cibles de bioconcentration de l'uranium; l'analyse des autres organites n'a révélé aucune bioaccumulation métallique.

3.1.2.2 Cytotoxicité

Un certain nombre de tissus ont été étudiés au microscope électronique, sur coupes colorées (acétate d'uranyle - citrate de plomb) pour déterminer les altérations éventuelles induites par l'uranium.

Glande digestive

Une micrographie prise à faible grossissement (fig. 7) montre une vacualisation du cytoplasme et une abondante population lysosomiale. La bordure ciliaire ne semble pas altérée. Sur un autre cliché on constate une altération nucléaire importante (fig. 8); le profil nucléaire est indenté et la chromatine se disloque en mottes hétérogènes. Les mitochondries conservent une matrice dense mais les crêtes sont peu nettes.

Branchie

Une micrographie prise à faible grossissement (fig. 9) permet de constater une vacuolisation générale du cytoplasme, une désorganisation du réticulum et une nécrose nucléaire généralisée. Les noyaux présentent des profils anormaux et la chromatine apparaît dissociée. Une autre micrographie prise à plus fort grossissement (fig. 10) montre une activité golgienne importante. Les mitochondries ont une matrice dense et granuleuse dans laquelle les crêtes ne sont pas visibles.

Pied

L'aspect général (fig. 11) est ici encore, comme dans les deux organes précédents, caractérisé par une vacuolisation du cytoplasme, une nécrose nucléaire (noyaux pycnotiques) et une dissociation du réticulum. Les poches muqueuses sont plus ou moins vidées de leur contenu. La bordure ciliaire ne semble pas altérée. Les mitochondries paraissent conserver leur structure normale tant au niveau des crêtes que de la matrice.

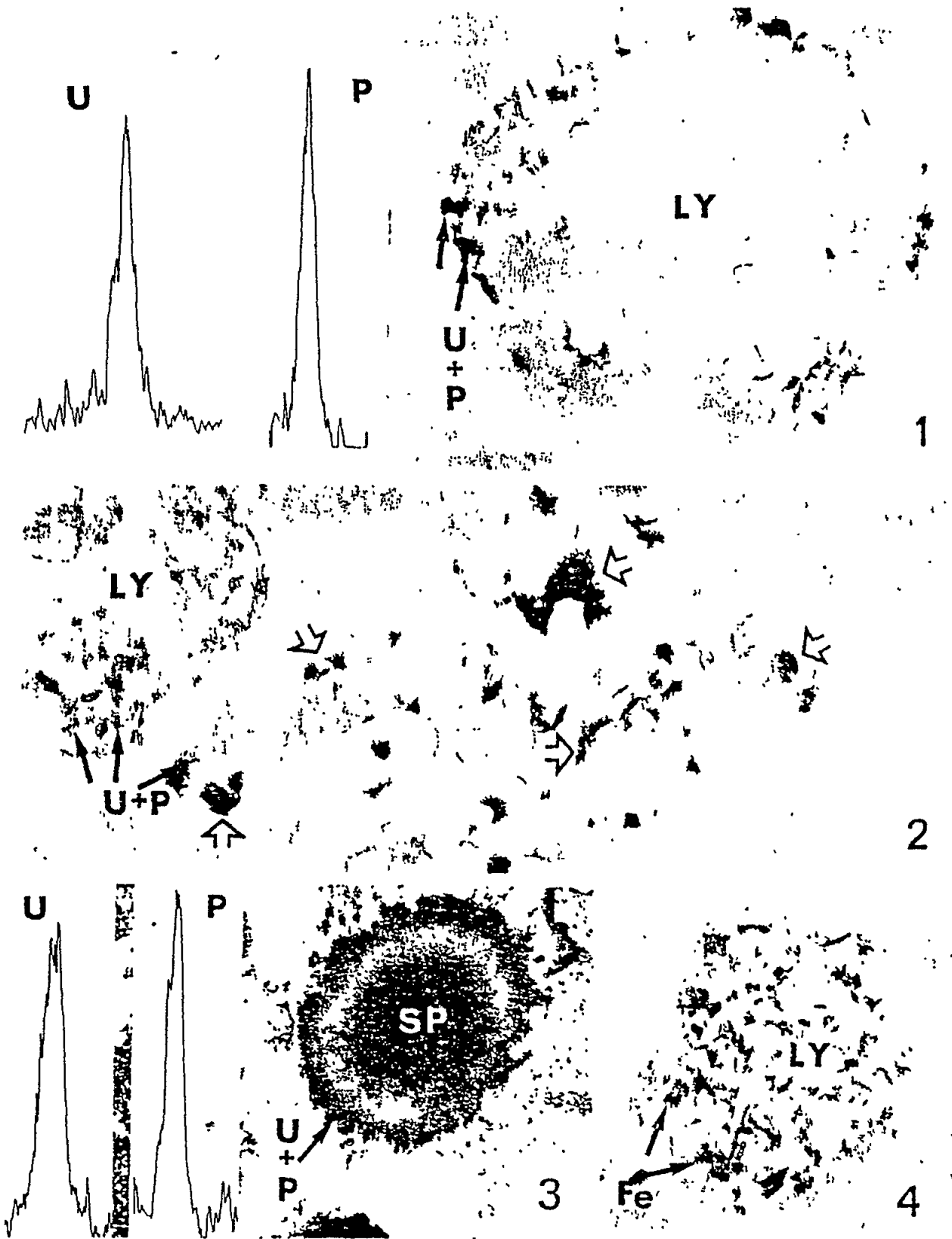


Fig. 6 Organites cibles de bioaccumulation minérale chez la moule

Fig. 6 (suite)

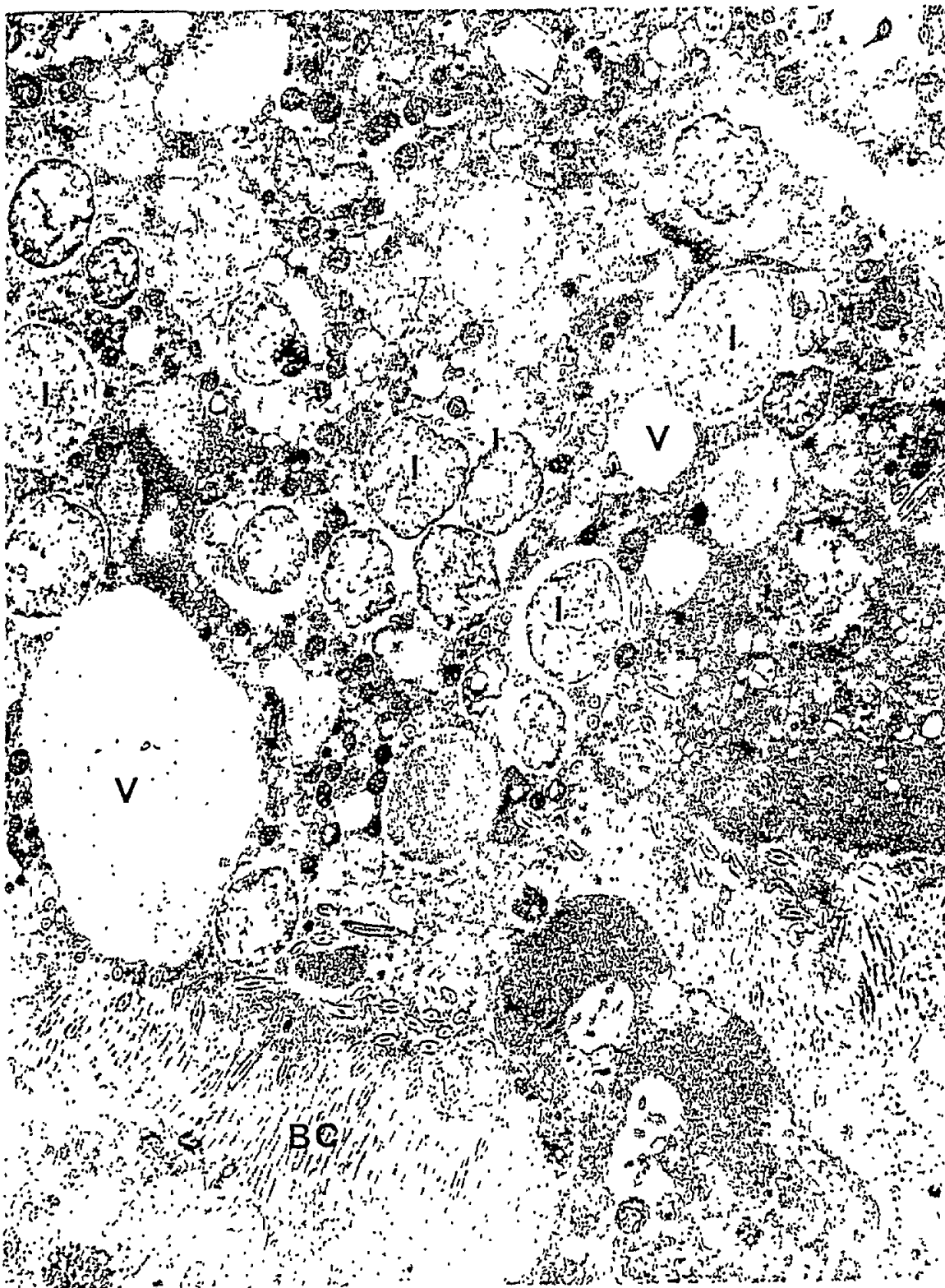
- (1) Glande digestive de M. edulis. Lysosome (LY) contenant des inclusions cristallines en forme de microaiguilles denses et très fines. La microanalyse y détecte la présence d'uranium (U) et de phosphore (P). A gauche, enregistrements de la raie Má1 de l'uranium (cristal PET) et de la raie Ká1 du phosphore (cristal TAP) obtenus sur ces inclusions cristallines. Matériel non osmié, non coloré, photographié à 40 kV. (X 40.000).
 - (2) Glande digestive de M. edulis. Cette micrographie montre un lysosome (LY) contenant des microaiguilles constituées d'uranium (U) et de phosphore (P), ainsi que d'autres lysosomes (flèches creuses) contenant uranium (U) et phosphore (P) et dont la membrane a partiellement ou complètement disparu. Matériel non osmié, non coloré, photographié à 40 kV. (X 40.000).
 - (3) Rein de M. edulis. Sphérocrystal (SP) rejeté dans le milieu extracellulaire et dans lequel la microanalyse montre la présence d'uranium (U) et de phosphore (P). A gauche, enregistrements de la raie Má1 de l'uranium (cristal PET) et de la raie Ká1 du phosphore (cristal TAP) obtenus sur ce sphérocrystal. Matériel non osmié, coloré, photographié à 40 kV. (X 40.000).
 - (4) Glande digestive de M. edulis. Lysosome (LY) contenant des inclusions où on détecte du fer (Fe). Matériel non osmié, non coloré, photographié à 40 kV. (X 10.000)
-

Ovaire

La principale altération est nettement visible au niveau des noyaux des ovocytes (fig. 12). La chromatine présente des densifications anormales. Le réticulum peu dense est normalement envahi de grains de vitellus et de vacuoles lipidiques vidées de leur contenu par les agents fixateurs.

Rein

Ici encore on constate sur une micrographie prise à faible grossissement (fig. 13) les phénomènes généralement observés dans les autres organes. Le réticulum totalement désorganisé est envahi de vacuoles à contenu peu dense. Des vacuoles autophagiques sont bourrées d'inclusions opaques aux électrons. Les noyaux pycnotiques se désagrègent et la chromatine est le plus souvent totalement détruite. Un plus fort grossissement permet de constater l'état des mitochondries: la matrice reste dense mais les crêtes sont peu ou pas visibles (fig. 14). La figure 15 montre l'abondance des sphérocristaux émis dans le milieu extracellulaire.



Les figures 7 à 15 représentent des micrographies électroniques montrant la cytotoxicité de l'uranium.

Fig. 7 Mytilus sp.: Glande digestive (x 11.200). On remarque une vacuolisation du cytoplasme (V) et une abondante population lysosomiale (L). La bordure ciliaire (BC) ne semble pas altérée

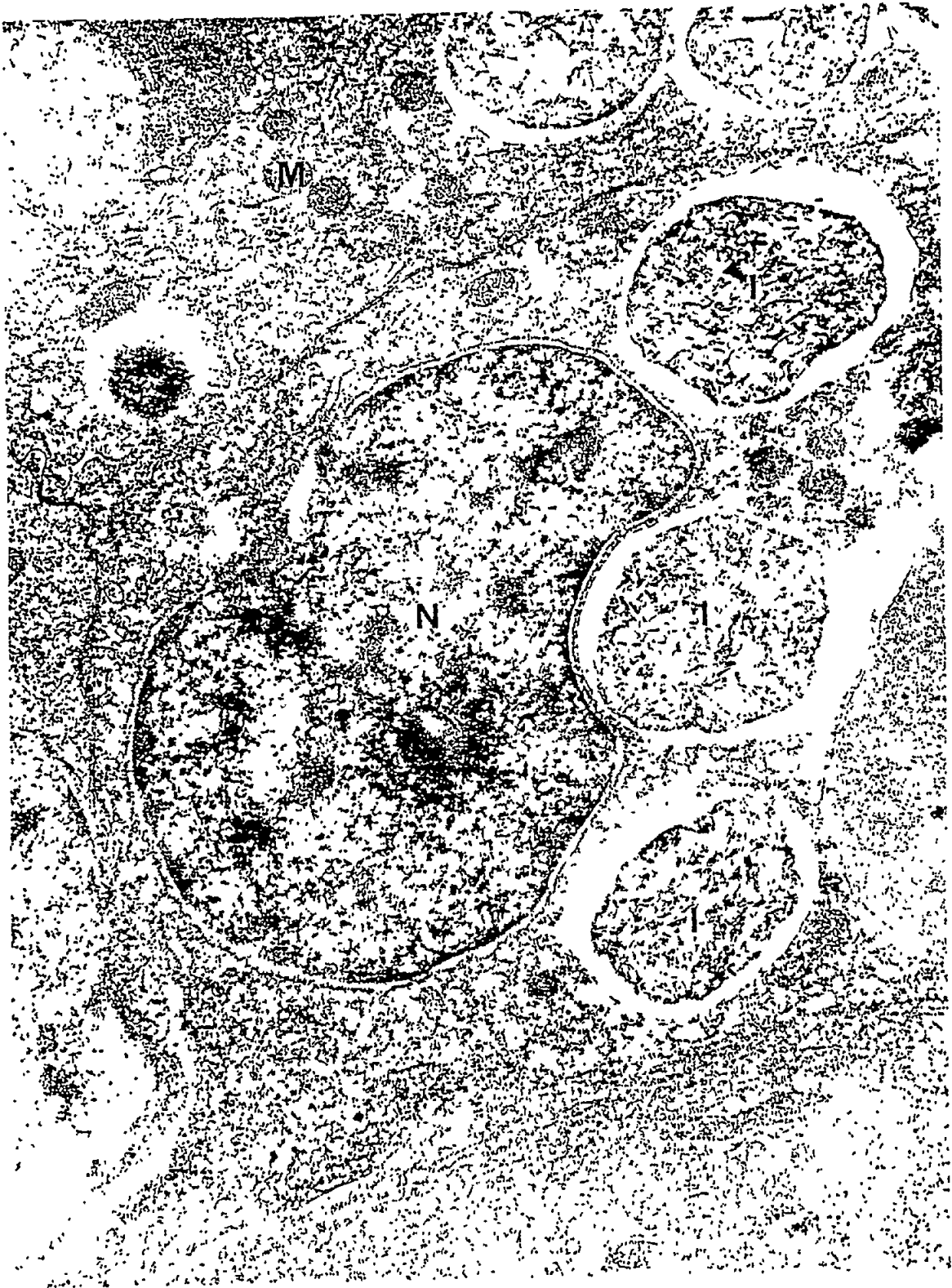


Fig. 8 Mytilus sp.: Glande digestive (x 20.000). Le profil nucléaire est déformé, et la chromatine se disloque en mottes hétérogènes: le noyau (N) est pycnotique. Les mitochondries (M) conservent une matrice dense, mais les crêtes sont peu nettes. Les lysosomes (L) sont remplis de cristaux de phosphate d'uranium



Fig. 9 Mytilus sp.: Branchie (x 9.200). On observe une vacuolisation du cytoplasme (V), une désorganisation du réticulum et une pycnose nucléaire (N). Noter l'altération des profils nucléaires

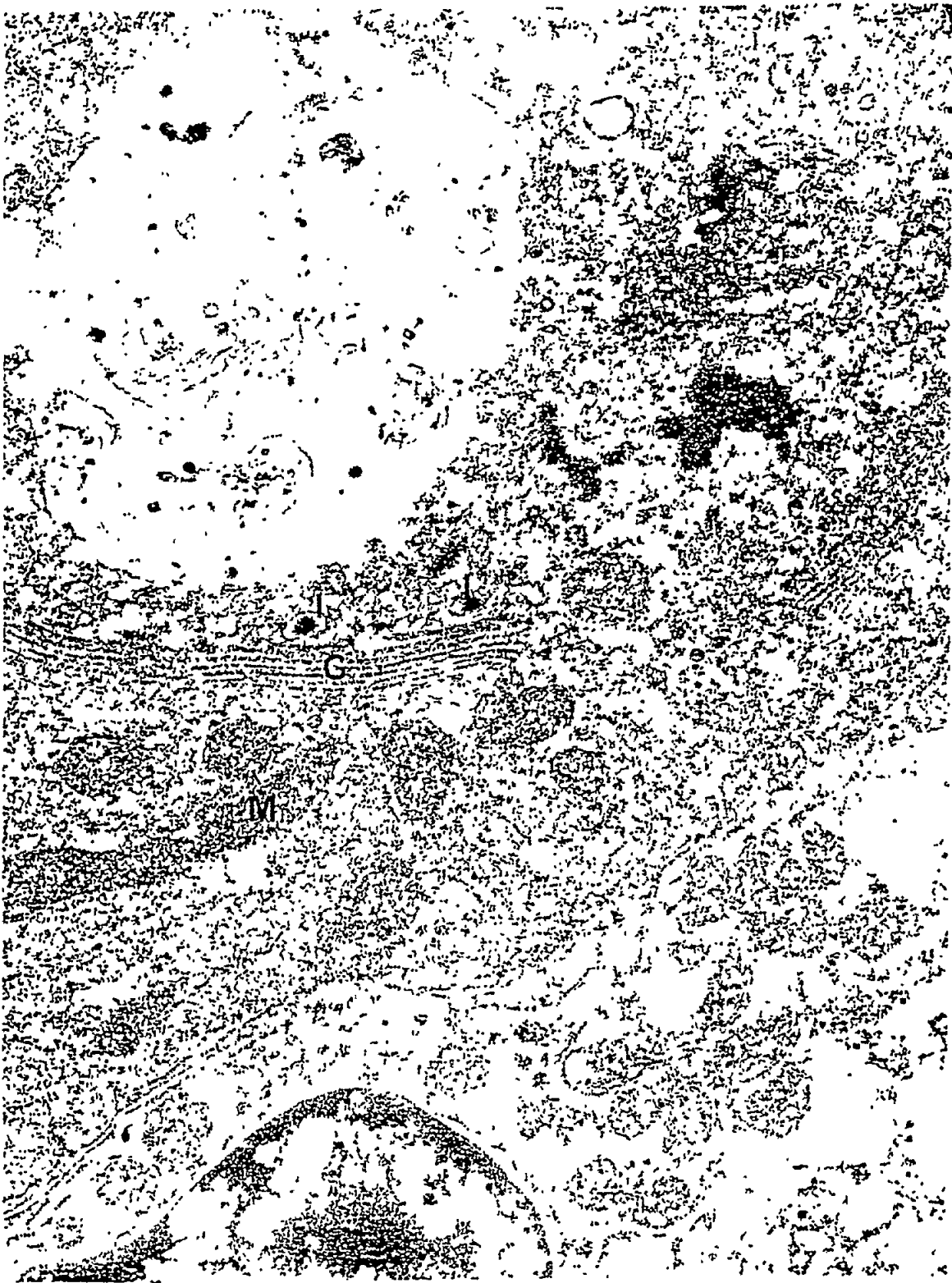


Fig. 10 Mytilus sp.: Branchie (x 54.000). Cette micrographie montre une activité golgienne intense (G) aboutissant à la formation de lysosomes (L). Les mitochondries (M) ont une matrice dense, mais la membrane externe et les crêtes sont altérées



Fig. 11 Mytilus sp.: Pied (x 6.6000). On remarque que les noyaux (N) sont pycnotiques et que le mucus est peu abondant. La bordure ciliaire (BC) et les mitochondries (M) semblent conserver une structure normale

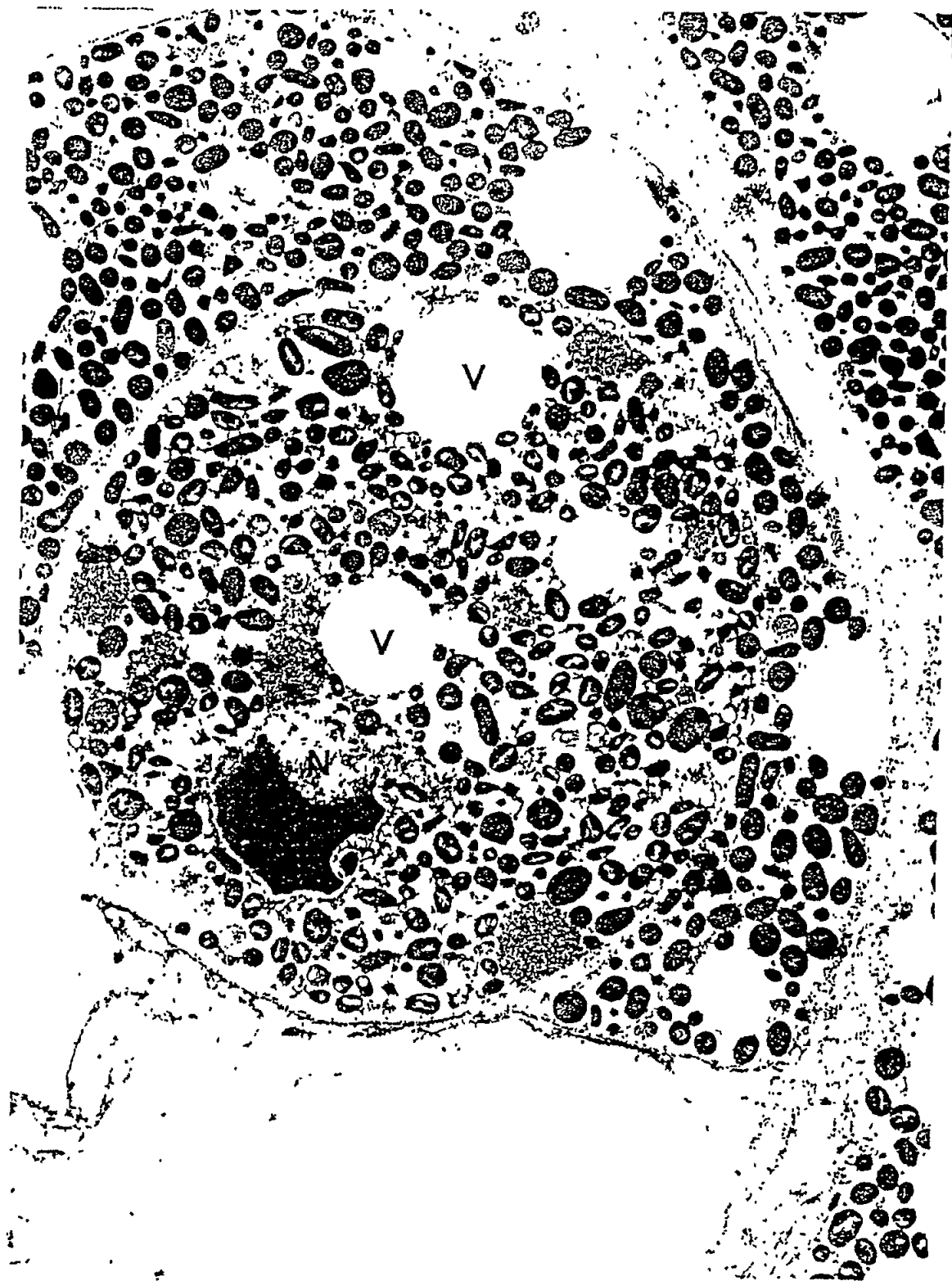


Fig. 12 *Mytilus sp.*: Ovocyte (x 9.200). Dans le noyau (N), la chromatine présente une densification anormale. On note l'abondance de grains de vitellus et de vacuoles lipidiques vidées de leur contenu (V) par les agents fixateurs

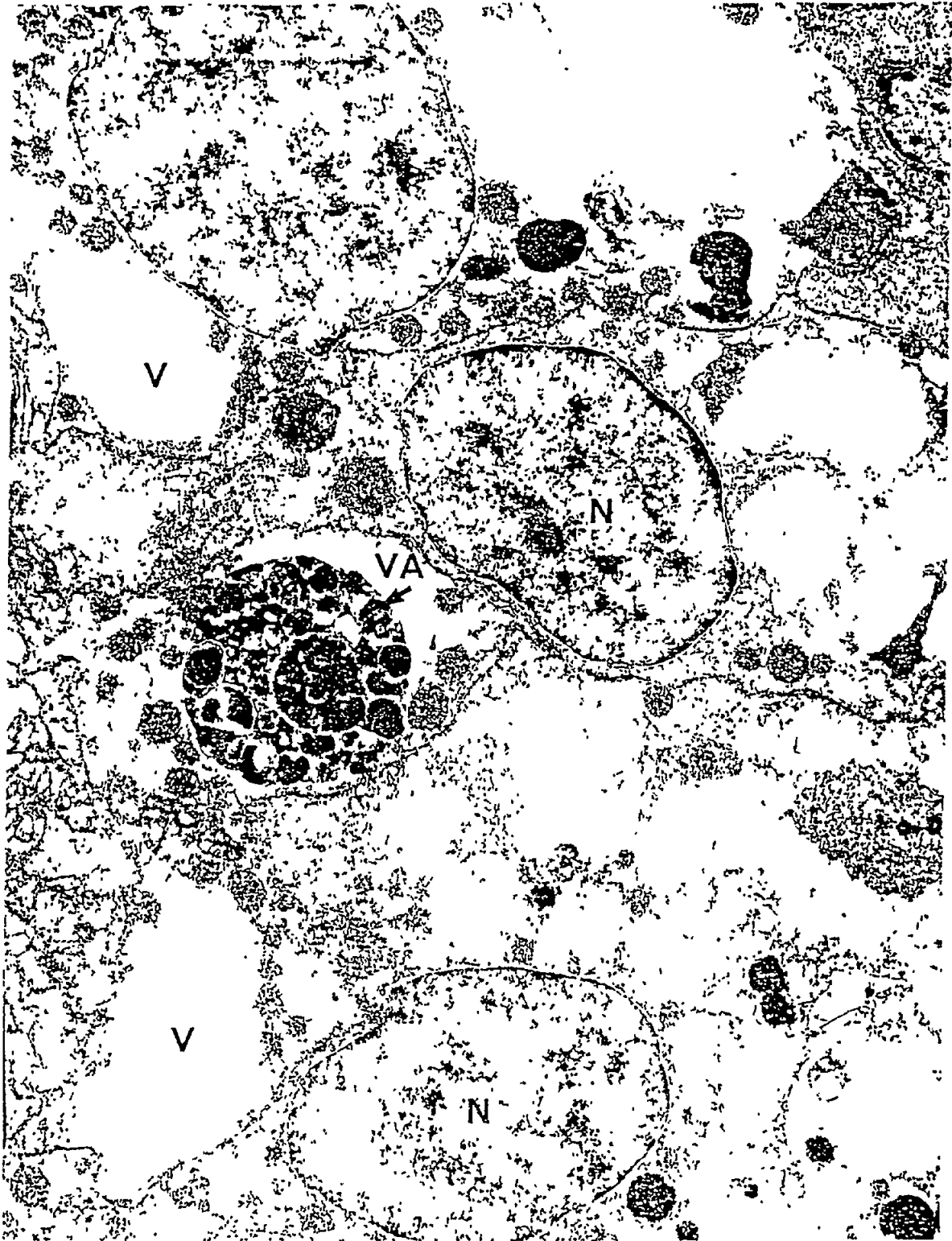


Fig. 13 Mytilus sp.: Rein (x 11.200). Cette micrographie montre une intense vacuolisation du cytoplasme (V), des noyaux pycnotiques (N) et une vacuole autophagique (VA) bourrée d'inclusions denses

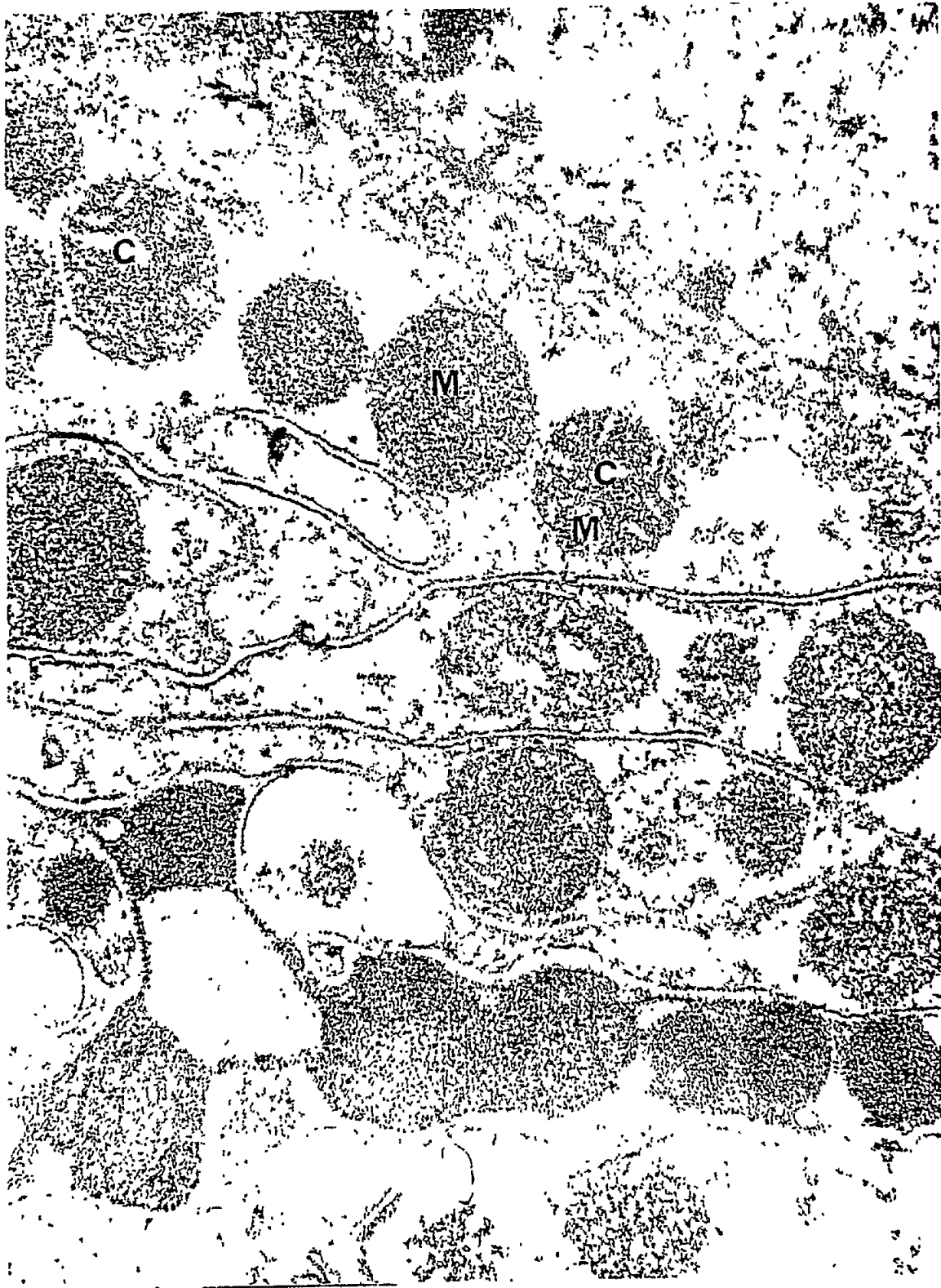


Fig. 14 Mytilus sp.: Rein (x 64.000). Cette micrographie montre que les mitochondries (M) ont des crêtes (C) qui tendent à disparaître; la membrane externe est altérée



Fig. 15 Mytilus sp.: Rein (x 68.800). Micrographie électronique montrant des sphérocristaux constitués de couches concentriques dans lesquelles l'uranium est précipité sous forme de phosphate

Ces observations faites sur différents organes permettent de conclure que la cytotoxicité de l'uranium est importante et que la présence du radionucléide entraîne vraisemblablement des traumatismes le plus souvent irréversibles au niveau cellulaire. Dans le cytoplasme on observe généralement une vacuolisation anormale associée à une désorganisation du réticulum. La population mitochondriale est toujours présente, cependant on

observe fréquemment une disparition des crêtes et une altération des membranes externes. L'activité golgienne est importante: la formation de nombreux lysosomes est une réaction cellulaire normale en réponse à l'agression provoquée par le polluant. Les altérations constatées au niveau des noyaux sont graves: images pycnotiques, profils anormaux, désagrégation de la chromatine; enfin, les images d'altérations nucléaires observées au niveau des noyaux des ovocytes ont vraisemblablement des conséquences négatives sur les phénomènes de reproduction.

3.2 Crassostrea gigas

3.2.1 Etudes in situ

Des récoltes effectuées en différents points du littoral méditerranéen français, font apparaître une contamination des huîtres par l'uranium, dans les régions de Cannes, Marseille et Fos sur Mer: les teneurs sont comprises entre 10 et 30 Bq kg⁻¹ de cendres. Ces teneurs sont plus faibles que celles relevées dans les mêmes sites et aux mêmes périodes, chez la moule Mytilus edulis.

3.2.2 Contaminations expérimentales

3.2.2.1 Résultats microanalytiques: sites cellulaires et subcellulaires

Sites cellulaires: organes cibles

Les mesures, effectuées par spectrométrie de masse en analyse ionique, des concentrations en uranium dans les différents tissus ont donné les résultats suivants:

manteau	branchie	palpe labial	glande digestive	rein	gonade	muscle
2.10 ⁻²	2.10 ⁻²	7.10 ⁻¹	5.10 ⁻¹	9.10 ⁻¹	L.D.	L.D.

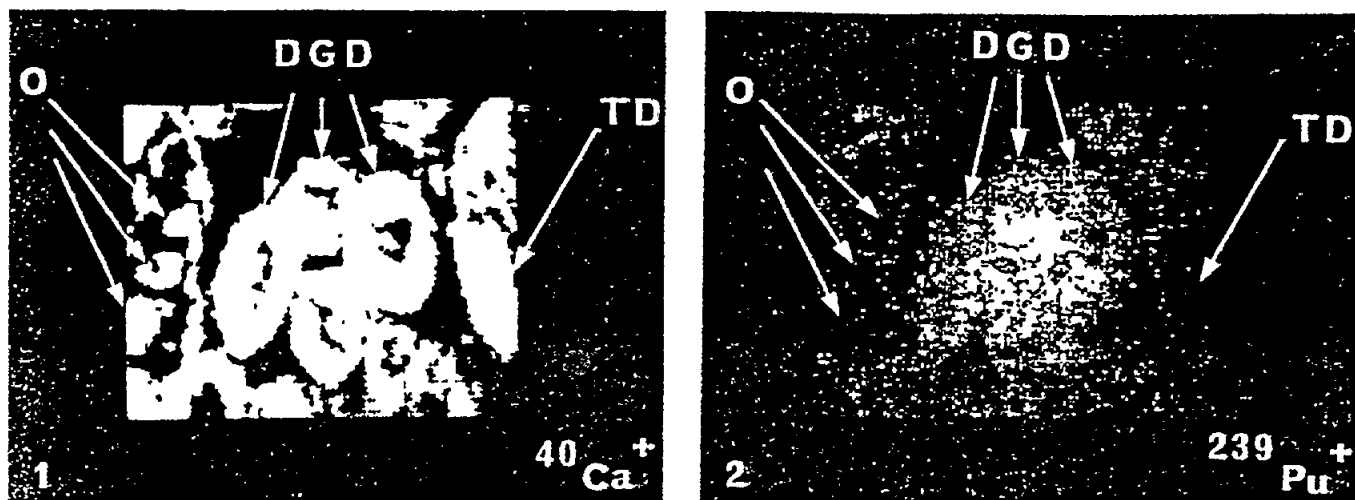
Intensités d'émission ionique de ²³⁸U+ normalisées à ¹²C+ et mesurées dans les différents organes. L.D.: limite de détection.

Ce tableau montre que les teneurs les plus élevées sont mesurées dans le palpe labial et dans le rein, les teneurs sont moins élevées dans la glande digestive, elles sont faibles dans le manteau et la branchie.

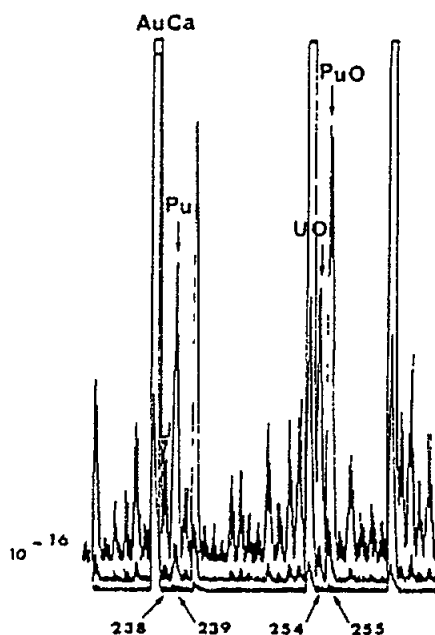
L'uranium est aussi détecté dans les hémocytes macrophages, présents dans la majorité des organes, en abondance plus ou moins grande.

Sites subcellulaires: organites cibles

Notre étude a plus particulièrement porté sur les organes dans lesquels les concentrations les plus élevées en uranium ont été relevées, à savoir, le palpe labial et le rein.



A



B

Fig. 16 Mytilus sp. Bioaccumulation de plutonium dans un échantillon récolté in situ.

A. Images ioniques obtenues sur une coupe histologique. L'image 40Ca^+ montre la topographie de la coupe où on reconnaît les diverticules de la glande digestive (DGD), des ovocytes (O) et le tractus digestif (TD). L'image 239Pu obtenue sur la même coupe que l'image calcium montre la nette localisation du Pu dans la glande digestive, alors que les ovocytes et le tractus digestif en sont pratiquement dépourvus. G X 230

B. Spectres d'émission ionique obtenus sur une coupe de glande digestive: le pic à la masse 239 est celui du plutonium, celui observé à la masse 238 est celui de l'uranium. AuCa correspond à l'or du porte échantillon

Les micrographies électroniques présentées ont été obtenues sur du matériel fixé (glutaraldehyde + acide osmique) mais non coloré, ce qui permet de distinguer parfaitement les particules d'uranium grâce à leur opacité naturelle aux électrons.

Palpe labial

On distingue deux catégories de particules (fig. 17)

- des microaiguilles correspondant à des formations paracrystallines
- des microgranules

Les microgranules sont très abondants et répartis au sein du hyaloplasme. Une micrographie à plus fort grossissement (fig. 18) permet de mieux définir l'ultrastructure des microaiguilles. Les microgranules (fig. 17) sont localisés dans les lysosomes secondaires (=heterophagosomes) formés à partir de lysosomes primaires. Les microanalyses effectuées à la sonde Camebax démontrent que ces particules sont constituées d'uranium associé à du phosphore et les résultats sont les suivants:

Elément	cristal	raie	microaiguilles	microgranules
uranium	PET	Má 1	3080±127	2046±204
phosphore	TAP	Ká 1	2721±219	1733±301

Eléments détectés dans les microaiguilles et les microgranules de l'épithélium du palpe labial.
Les valeurs correspondent au nombre de chocs enregistrés pendant un temps de comptage de 100 sec.

Rein

Les bioaccumulations particulières sont importantes (fig. 19). Il s'agit en majorité de microgranules contenus dans des lysosomes secondaires (=heterophagosomes) formés à partir de lysosomes primaires. Ces lysosomes secondaires sont groupés en amas denses dans le hyaloplasme. Les formations en microaiguilles sont rares (fig. 19). Les micrographies obtenues à un plus fort grossissement montrent en détail l'ultrastructure de ces microgranules (fig. 20) et des lysosomes secondaires (fig. 21) qui les renferment.

Les microanalyses effectuées à la sonde Camebax démontrent que ces particules sont constituées d'uranium associé à du phosphore. Les résultats sont les suivants:

Elément	cristal	raie	microgranules
uranium	PET	Má 1	2046±204
phosphore	TAP	Ká 1	1733±301

Eléments détectés dans les microaiguilles du rein.
Les valeurs correspondent au nombre de chocs enregistrés pendant un temps de comptage de 100 sec.

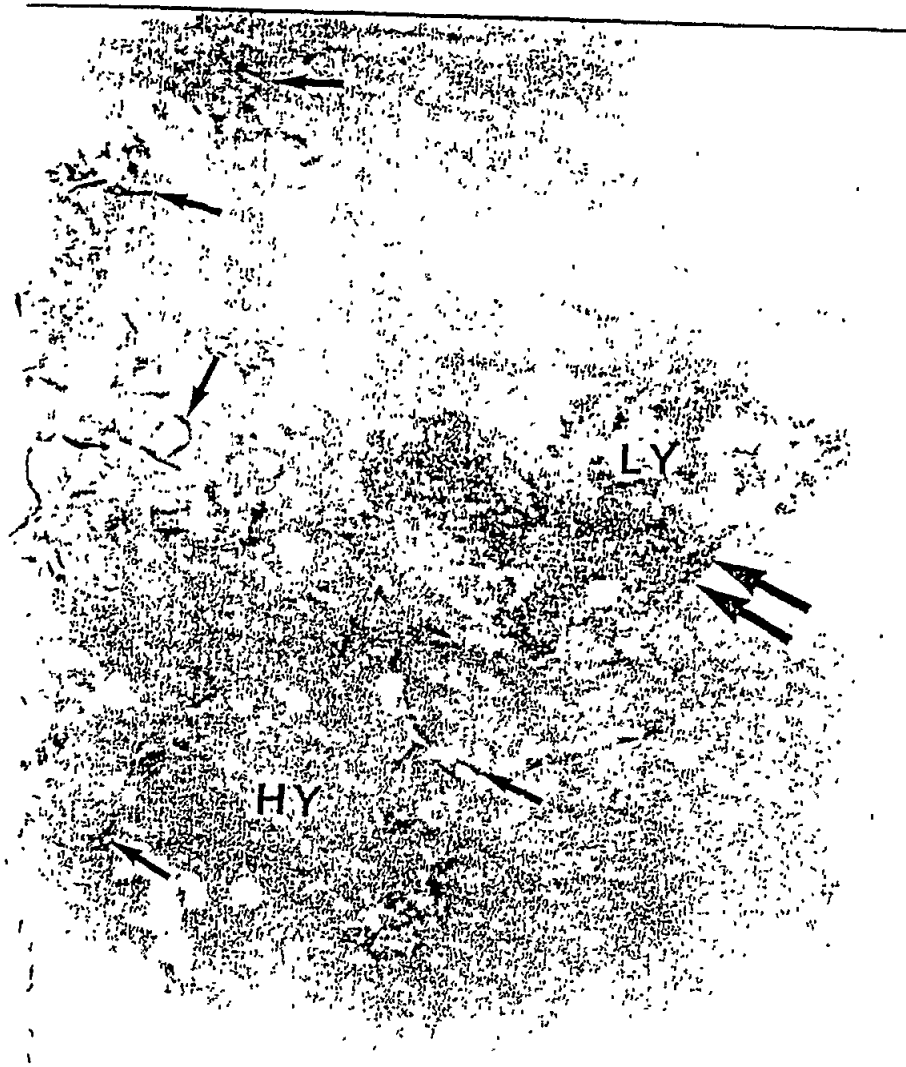


Fig. 17 Crassostrea gigas. Palpe labial.
Micrographie électronique obtenue sur du matériel non coloré. On observe l'existence de deux types de particules:
- des microaiguilles (flèches simples) réparties au sein du hyaloplasme (Hy)
- des microgranules (flèches doubles) contenus dans un lysosome secondaire (Ly).
Ces particules sont constituées du phosphate d'uranium. G X 48000

Autres organes

Branchie: des bioaccumulations particulières des deux types (microaiguilles et microgranules) constituées d'uranium associé à du phosphore, sont présentes, analogues à celles observées dans les palpes labiaux, mais en densité plus faible. Glande digestive: de nombreux lysosomes secondaires contiennent des microgranules d'uranium associé à du phosphore.

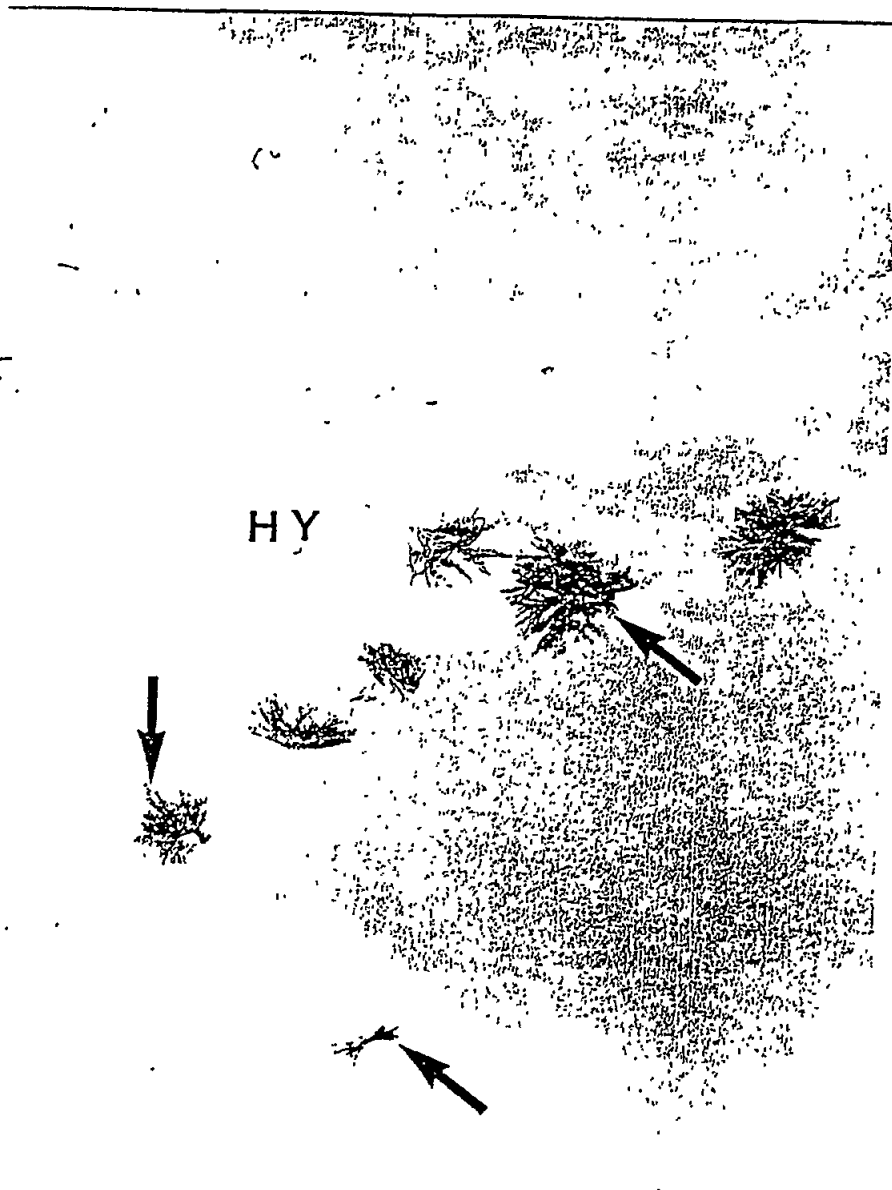


Fig. 18 Crassostrea gigas. Palpe labial.
Micrographie électronique obtenue sur du matériel non coloré. On observe l'existence de microaiguilles constituées de phosphate d'uranium et situées dans le hyaloplasme (Hy). G X 70000

Leur densité est plus faible que dans le rein. L'interprétation générale que l'on peut donner des phénomènes observés est la suivante. L'uranium présent dans le milieu extérieur sous forme soluble, est concentré et insolubilisé sous forme de microaiguilles ou de microgranules, généralement contenus dans des lysosomes secondaires. Dans ces derniers, en effet, se produit une réaction enzymatique (grâce aux phosphatases acides) qui permet l'insolubilisation du métal toxique et son stockage dans les lysosomes sous forme de phosphate d'uranium. Le métal ainsi "piégé" n'est pas dispersé au sein du hyaloplasme. Le phénomène est particulièrement net au niveau du rein où l'importante population lysosomale stocke l'uranium avant de l'éliminer hors de l'organisme.



Fig. 19 Crassostrea gigas. Rein.
Micrographie électronique obtenue sur du matériel non coloré. On observe l'existence des deux types de bioaccumulations particulières de phosphate d'uranium: des microgranules (flèches simples) contenus dans des lysosomes (Ly), très abondants. Les microaiguilles (flèches doubles) contenues dans des lysosomes (Ly) sont peu représentées. Hy:hyaloplasme; N:noyau; V:vacuole.
G X 10000

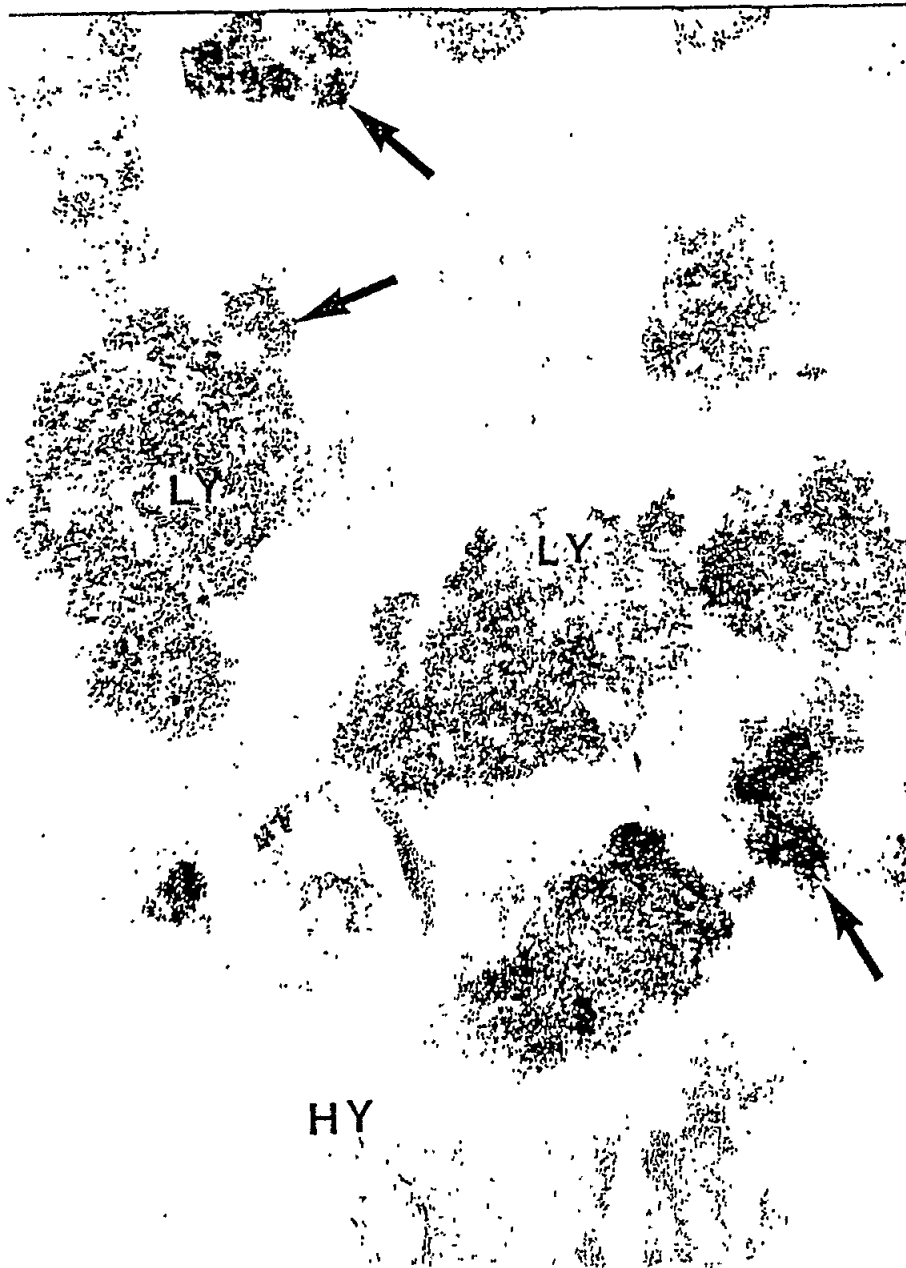


Fig. 20 Crassostrea gigas. Rein.
Micrographie électronique obtenue sur du matériel non coloré. On observe l'existence de microgranules de phosphate d'uranium (flèches simples) contenus dans des lysosomes (Ly) dont la membrane est peu visible. Hy:hyaloplasme. G X 48000

3.2.2.2 Cytotoxicité

La cytotoxicité de l'uranium chez Crassostrea gigas est comparable à celle observée et précédemment décrite chez la moule Mytilus edulis.

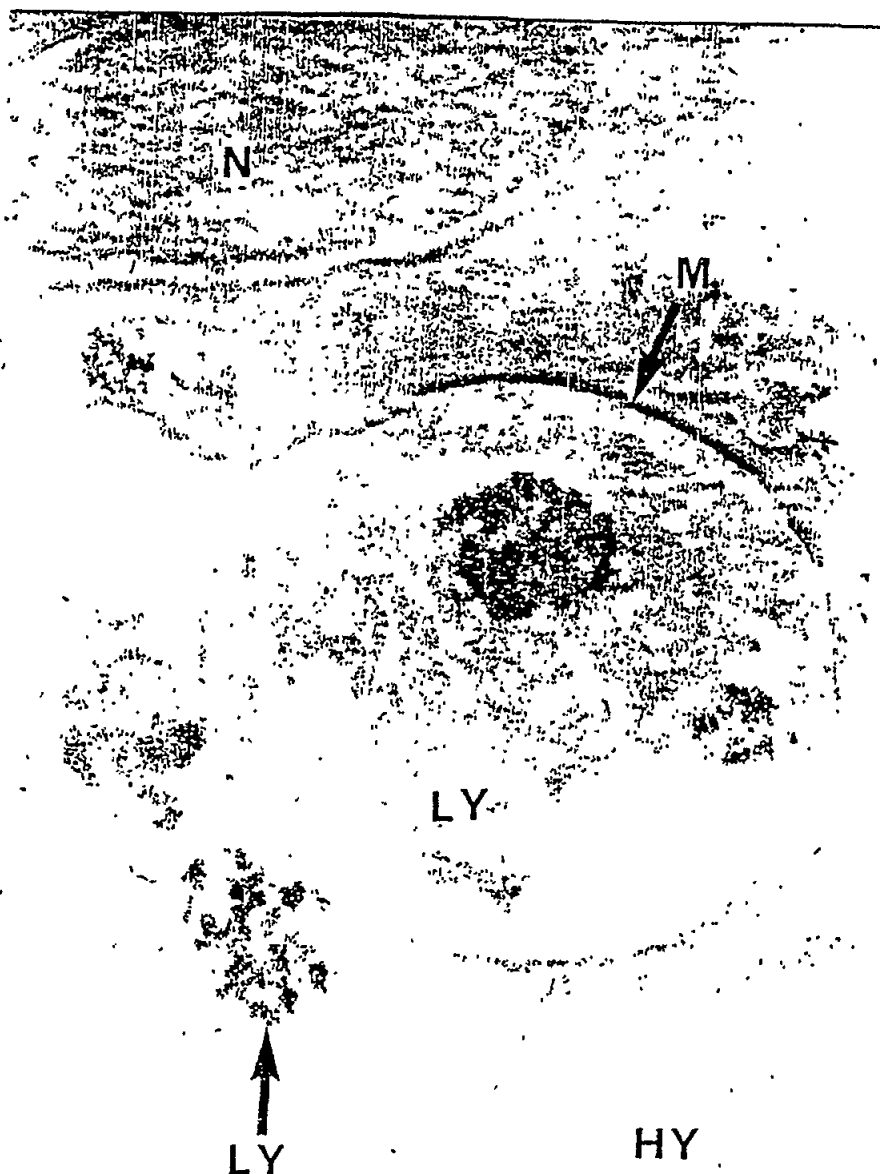


Fig. 21 Crassostrea gigas. Rein.
Micrographie électronique obtenue sur du matériel non coloré. On observe la présence de plusieurs lysosomes (Ly) secondaires renfermant des microgranules de phosphate d'uranium. Hy:hyaloplasme; m:membrane lysosomale; N:noyau entouré de sa double membrane. G X 24000

En résumé, chez l'huître, les traumatismes cellulaires sont constatés au niveau du réticulum endoplasmique (vacuolisation, désorganisation), des mitochondries (disparition des crêtes et altération de la membrane externe) et des noyaux (pycnose et désagrégation de la chromatine). Comme chez la

moule, les dictyosomes sont abondants: ceci est normal et s'explique par le fait que l'appareil de Golgi doit assurer la formation de lysosomes primaires destinés à former des lysosomes secondaires qui "piègent" le métal toxique.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus par les différentes méthodes de microanalyse, de microscopie électronique et de radiométrie permettent de tirer un certain nombre de conclusions relatives au métabolisme et à la cytotoxicité de l'uranium chez la moule Mytilus sp. et chez l'huître Crassostrea gigas.

Chez la moule, la microanalyse par émission ionique secondaire permet d'émettre des hypothèses relatives au métabolisme de l'uranium. L'eau chargée en uranium pénètre dans la cavité palléale, atteint les lamelles branchiales puis les palpes labiaux qui en régularisent l'entrée dans la bouche. La faible quantité ou même l'absence du radionucléide constatée au niveau des branchies, s'explique par le fait que les battements ciliaires provoquent un nettoyage constant de la surface épithéliale. Puis l'eau est dirigée dans le tube digestif vers l'intestin et les diverticules de la glande digestive où a lieu la digestion ainsi qu'un stockage et une régularisation de transport vers les autres tissus. Ainsi, l'absorption a lieu par la voie épithéliale des branchies et du manteau ainsi que par la voie digestive. La présence du métal dans les gonades est un fait inquiétant, étant données les conséquences éventuelles sur la gamétogénèse. L'excrétion de l'uranium se fait essentiellement par la voie rénale.

Les hémocytes jouent un rôle fondamental dans l'ingestion par phagocytose, le transport, le stockage et l'excrétion de l'uranium.

La microanalyse par spectrométrie des rayons X effectuée en microscopie électronique permet d'établir que les lysosomes présents dans divers tissus, notamment la branchie et la glande digestive, ainsi que les sphérocristaux abondants dans le rein, sont des organites cibles de concentration et de stockage de l'uranium. Le mécanisme par lequel ce métal précipite au sein des lysosomes sous forme de phosphate, est lié à l'existence dans ces organites, d'une forte activité phosphatasique acide, réalisant ainsi une réaction de Gomori "in vivo". Les sphérocristaux surchargés en métal toxique sont rejetés par le rein dans le milieu extracellulaire et contribuent ainsi à la détoxification de l'animal.

Chez l'huître, le métabolisme de l'uranium peut être ainsi résumé. L'eau chargée d'uranium pénètre dans la cavité palléale, atteint les lamelles branchiales qui dirigent le courant vers les palpes labiaux où une importante capture du radionucléide a lieu; ce dernier est alors précipité et insolubilisé, en partie, sous forme de microaiguilles et de microgranules de phosphate d'uranium. Puis l'eau contaminée et encore chargée en uranium soluble, est dirigée dans le tube digestif vers l'intestin et la glande digestive où l'on constate un stockage du métal. Enfin, dans le rein, on observe d'importantes populations lysosomales (lysosomes secondaires = heterophagosomes) qui assurent le "piegagem" et l'excrétion du métal toxique, réalisant ainsi la détoxification de l'organisme.

Si l'on compare les résultats obtenus chez l'huître, avec ceux obtenus chez la moule, les différences suivantes sont constatées:

- rôle prépondérant du palpe labial chez l'huître, pour la capture du métal, alors que ce rôle, bien que faible, était plutôt dévolu à la branchie, chez la moule.
- mise en évidence chez l'huître, de deux types de particules subcellulaires de concentration du métal, sans formation de sphérocristaux (présents chez la moule). Nul doute que ces différences doivent être liées, en partie, au mode de vie et aux habitudes trophiques différentes de ces deux genres de Bivalves. Ainsi, il apparaît que les mécanismes intervenant dans la bioaccumulation de l'uranium sont comparables, avec cependant des différences à l'échelle subcellulaire.

En fait, nous avons mis en évidence deux processus de bioconcentration. Quand l'élément toxique est piégé dans un organite, lysosome ou sphérocrystal, il n'engendre généralement pas de dommage cellulaire et est généralement rejeté à l'extérieur. Quand l'élément toxique se trouve dispersé dans le cytoplasme, sans capture dans un organite limité par une membrane, il est alors à même de produire des altérations cellulaires.

Nous avons aussi démontré la cytotoxicité des radionucléides: altérations nucléaires et appauvrissement de la population mitochondriale. L'action toxique agissant au niveau de l'acide désoxyribonucléique a d'ailleurs été démontrée (Zahn, 1991) comme étant provoquée par la pollution du milieu marin.

Les problèmes posés par l'émission d'éléments radioactifs dans l'environnement aquatique sont multiples. Citons en particulier le rôle joué par les "fruits de mer" auxquels appartiennent les Bivalves étudiés, dans les chaînes alimentaires d'autant plus que l'assimilation du plutonium a été démontrée chez l'Homme (Hunt et al., 1986): le radionucléide passe à travers la barrière intestinale. Ces faits ont été constatés chez des sujets ayant consommé des "coquillages" contaminés. Cet exemple met en évidence l'intérêt des études ayant pour but de mieux comprendre les mécanismes de bioaccumulation des radionucléides chez les organismes marins.

5. REMERCIEMENTS

Ces recherches ont été effectuées dans le cadre du programme MED POL et une contribution du MED TRUST FUND a été reçue par l'intermédiaire de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (contrat FRA/39-G). Elles ont bénéficié de la collaboration scientifique et technique des ingénieurs du Centre de Microanalyse Appliquée à la Biologie du CNRS à Créteil.

6. REFERENCES

- Cavellier, J.F., J.P. Berry, F. Escaig, P. Boumati and P. Gaume (1989), Processing of secondary ion microscope images: an example of application to the thyroid. J.Microsc., 154:31-38
- Chassard-Bouchaud, C. (1983), Cellular and subcellular localisation of uranium in the crab Carcinus maenas: a microanalytical study. Mar.Pollut.Bull., 14(4):133-136

- Chassard-Bouchaud, C. (1991a), Biological effects of uranium and transuranium nuclides on marine bivalves: Mytilus edulis, Crassostrea gigas and Cerastoderma edule. Microanalysis at the cellular and subcellular levels. In: Proceedings of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms (Malta, 10-14 September 1991) edited by G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 69, UNEP, Athens, pp.123-134
- Chassard-Bouchaud, C. (1991b), Microanalytical techniques in toxicological investigations. In: Ecotoxicology and the marine environment, edited by P.D. Abel and V. Axiak, New York, Ellis Horwood, pp.176-200
- Hunt, G.J., D.R.P. Leonard and M.B. Lovett (1986), Transfer of environmental plutonium and americium across the human gut. The Lancet, 22:439-440
- Zahn, R.K. (1991), Primary deoxyribonucleic acid damage produced in the marine environment by pollution: assessment and possible consequences. In: Ecotoxicology and the marine environment, edited by P.D. Abel and V. Axiak, New York, Ellis Horwood, pp.202-218

STUDY OF OSMOREGULATION MECHANISMS IN MARINE INVERTEBRATES UNDER POLLUTED CONDITIONS

by

Luisella DALLA VENEZIA

Institute of Marine Biology, CNR
Riva Sette Martiri 1364/A, Venezia 30122

ABSTRACT

It is confirmed that Carcinus mediterraneus hyperregulates better in diluted (17‰S) sea water dosed with LAS (3 to 6 mg l⁻¹) than in clean sea water. Analyses of serum protein and free amino acids (FAA) have been performed in order to investigate any possible physiological effect of LAS, correlated with the osmoregulation. Results show that the increase in non-synthesizable amino acids and the contemporary reduction in protein, in the serum of crabs treated with LAS, could indicate the mechanism which enables the hyperregulation to improve.

1. INTRODUCTION

The anionic detergent LAS (linear alkyl benzene sulphonate) is the major component of all laundry products, and for this reason it is present worldwide in polluted waters. Its concentration in the harbours and coastal waters ranges from 0.1 to 3 mg l⁻¹ (Provvionato and Malavasi, 1968; Majori *et al.*, 1969; Fosvick *et al.*, 1983; 1985). Recent data regarding the open Adriatic sea (Bregant and Catalano, 1989) indicate that the concentration of anionic detergents is of the order of 1 µg l⁻¹.

The study of its action on marine or brackish water organisms has partly been the purpose of our research activity. Our previous papers have shown the effect of LAS on experimental populations of both the benthic copepod Tisbe sp. (Fava and Dalla Venezia, 1976; Dalla Venezia *et al.*, 1980), and the diatom Skeletonema costatum (Dalla Venezia *et al.*, 1989). Our research results on the osmoregulation capability of the crustacean Carcinus mediterraneus exposed to different concentrations of LAS (Dalla Venezia *et al.*, 1988), triggered the following question: "Why and how does Carcinus mediterraneus hyperregulate better, when exposed to solutions of LAS?"

2. MATERIALS AND METHODS

Adult male crabs were collected in the lagoon of Venice near the port of Lido (Adriatic Sea), where salinity is 33 ± 2‰S. After acclimation in the laboratory, groups of five crabs, randomly chosen, were distributed in different 18 l aquaria, containing diluted sea water of 17‰S, and different concentrations of LAS, ranging from 1.5 to 9 mg l⁻¹. These concentrations are of the same order of magnitude as those determined in the most polluted aquatic environments.

Aquaria were equipped with biological filters, made up of thick layers of shell fragments, through which water continuously flowed. Crabs were fed with small pieces of bovine heart. Samples of haemolymph were withdrawn from the back of each carapax, by means of a plastic syringe. The osmolality of serum was determined in individual crabs by means of a Gonotec Osmometer mod. 030 in 15 μ l samples.

As in the previous paper (Dalla Venezia *et al.*, 1988), the concentration both of protein and free amino acid (FAA) in the serum of crabs was determined after a 9-day exposure to 0, 3, 4.5 mg l^{-1} LAS. Proteins have been determined using the Lowry *et al.* (1951) method. FAA were measured using the Olson *et al.* (1979) method, utilising High Performance Liquid Chromatography.

3. RESULTS

As it was already shown in our above cited paper (Dalla Venezia *et al.*, 1988), the serum osmolality in crabs exposed to LAS concentrations ranging from 3 mg l^{-1} up to 6 mg l^{-1} in diluted water (17‰S), is higher in comparison with the osmolality of controls.

The histograms in Fig. 1 show the decrease of the serum osmolality in five individual crabs, transferred from 34‰S to 17‰S, and then maintained at this latter salinity for seven days: in clean sea water (on the left) and in 6 mg l^{-1} LAS (on the right). Fig. 2 and Fig. 3 show the trend of protein and free amino acid concentration in the serum of five individual crabs kept in clean sea water or exposed to 4.5 mg l^{-1} LAS for nine days. The initial concentration both of protein and of FAA reported in the graphs has been calculated from a pool of serums taken from five crabs: the final concentrations represent the values determined for each single crab. The individual variability is evident.

The results of FAA analyses obtained by HPLC are summarized in Tables 1, 2, and 3; the initial concentration of each amino acid in a pool of serums of the five crabs (t_0), the final concentration (t_9) for each of the five crabs and the difference $\Delta = t_9 - t_0$.

4. DISCUSSION

Also in the present investigation, as in Dalla Venezia *et al.* (1988), *Carcinus mediterraneus* seems to hyperregulate better in diluted sea water dosed with LAS (3 to 6 mg l^{-1}), than in control water.

In order to understand this mechanism, the concentrations of protein and of FAA in serum haemolymph were determined.

Literature data (Siebers *et al.*, 1972; Siebers and Lucu, 1973; Siebers, 1974; Zatta, 1987) report for *Carcinus maenas* some contrasting conclusions. For serum proteins we mention only the following: "the rapid reduction in the concentration of haemolymph protein after transfer of decapods from lower to higher salinities..." (Siebers *et al.*, 1972; Siebers and Lucu, 1973), and also "when animals are transferred from 100% sea water to 50% sea water, protein levels drop for at least seven hours and then rise to values about 10% less than the control" (Zatta, 1987).

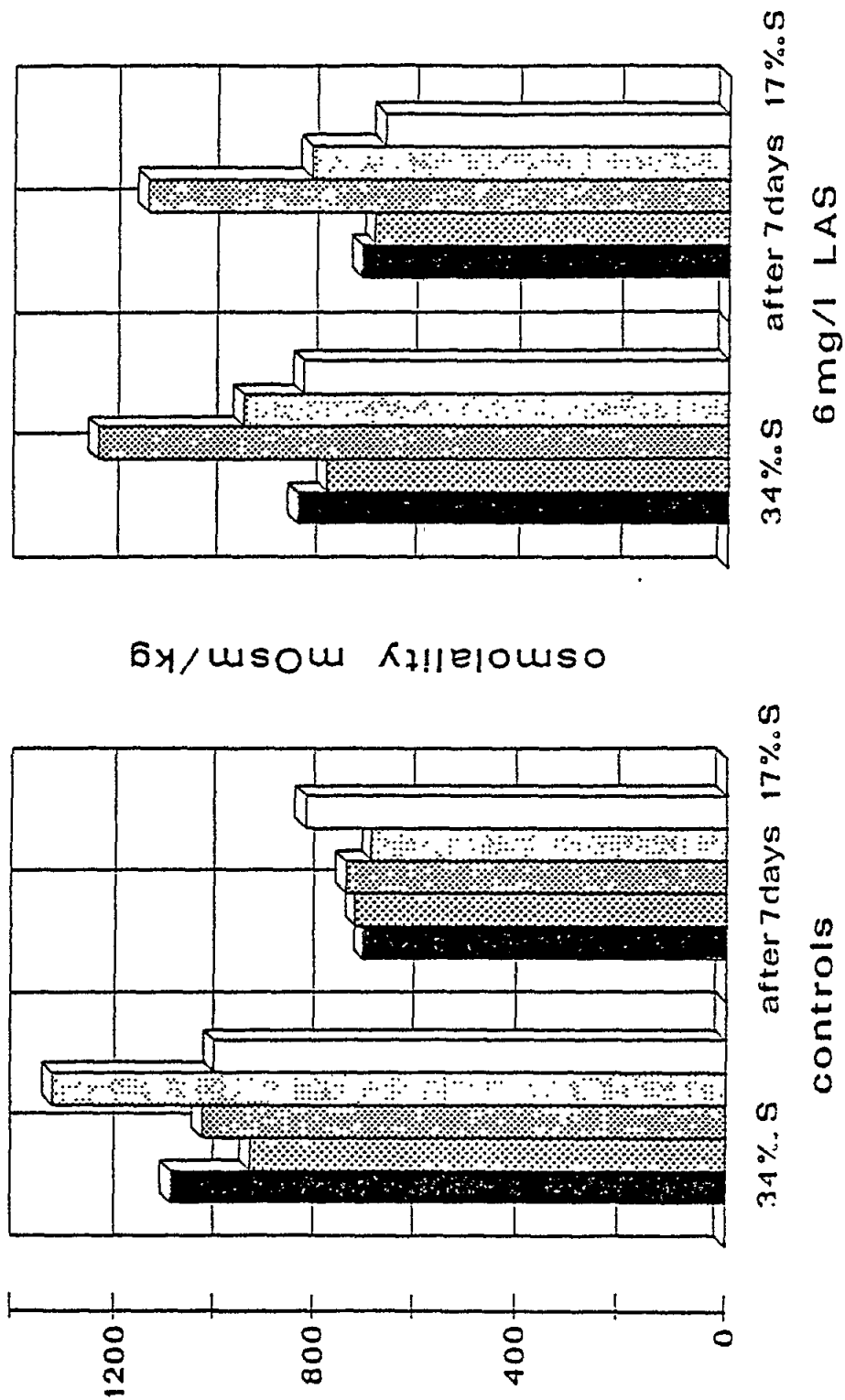


Fig. 1 *Carcinus mediterraneus*. Osmolality of serums of five individual crabs coming from sea water of 34‰ and kept for 7 days at 17‰. Left: controls; right: 6 mg l⁻¹ LAS

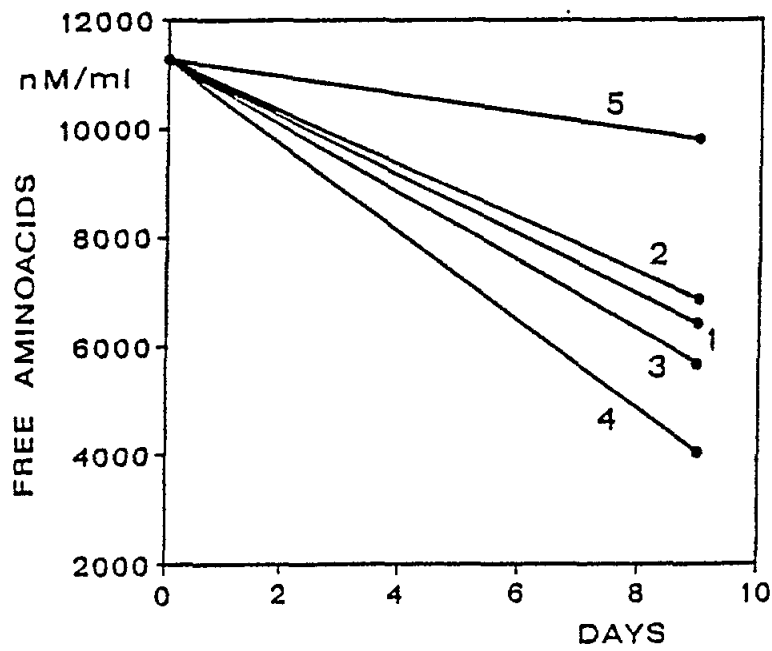
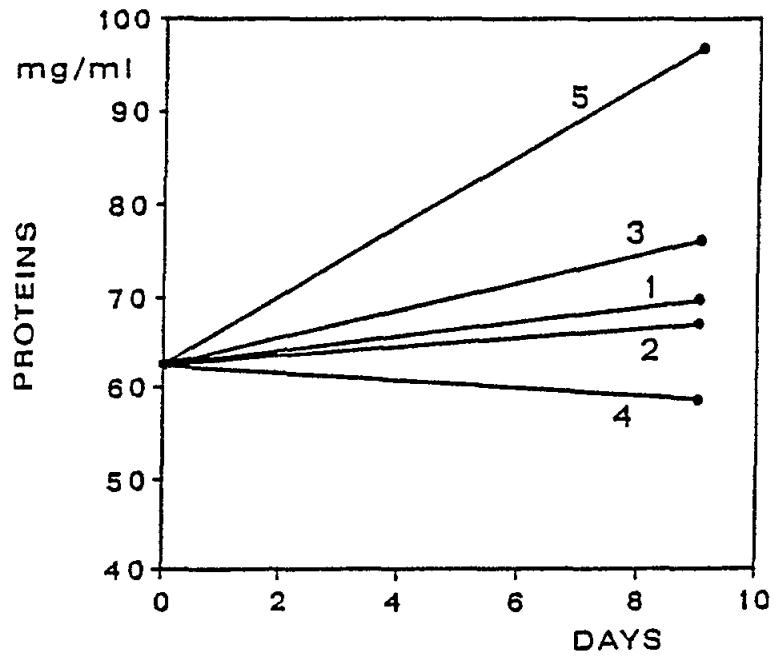


Fig. 2 Carcinus mediterraneus. Protein and free amino acid concentrations in the haemolymph serums of five crabs transferred from clean sea water of 34‰S and kept in clean sea water of 17‰S for nine days

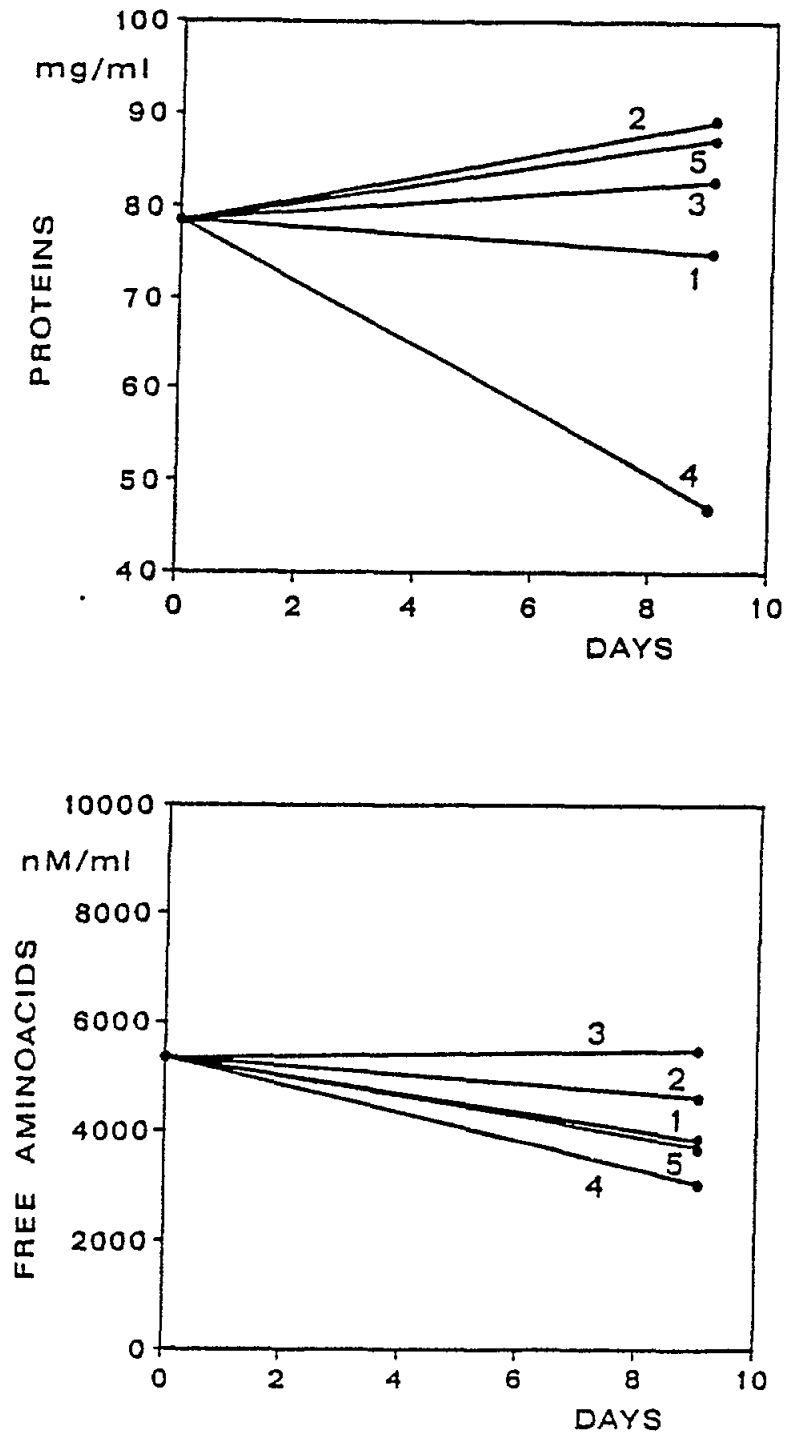


Fig. 3 Carcinus mediterraneus. Protein and free amino acid concentrations in the haemolymph serums of five crabs transferred from clean sea water of 34‰S and kept in 4.5 mg l⁻¹ LAS and 17‰S for nine days

Moreover, as for FAA we find "the osmolarity of the extracellular fluids in almost totally accounted for by inorganic ions, while the osmotic pressure of the intracellular fluids is, to a considerable degree caused by osmotically active low molecular organic substances, such as amino acids" (Siebers *et al.*, 1972) and again "haemolymph proteins participate in the increase of intracellular FAA during isosmotic intracellular regulation" (Siebers and Lucu, 1973).

After a wide survey of literature data, Zatta (1987) finally summarizes: "Haemolymph FAA vary inversely with salinity during acclimation to a more diluted as well as a more concentrated medium".

The results reported in Table 1 show the concentration of FAA in serum haemolymph after a 9-day exposure, that is clearly over the acclimation period to 17‰S: the FAA concentration decreases by 42% of the initial value.

Tables 2 and 3 report the values for crabs kept at 3 and 4.5 mg l⁻¹ LAS, respectively, at the same salinity. In these latter cases the percentage of decrease is only 22%, that is about half of the percentage calculated for controls.

In our experiments serum protein concentration decreases, or at least does not increase as much as in the controls, in the animals kept in the LAS solutions. Siebers (1974) affirms that his "experimental results do not enable to distinguish clearly between hydrolysis of serum proteins and their resynthesis from FAA". According to Verma *et al.* (1979), LAS produces inhibition of alkaline phosphatase and consequently alterations in protein synthesis.

Even if we have no data for the whole animal, but only for the serum haemolymph, we can make the following observations: the non-essential amino acids, glycine, alanine and proline which can be synthesized, do not increase in general; otherwise, the essential amino acids, such as threonine, hystidine, and also leucine and lysine, which cannot be synthesized, increase in the serum of treated crabs. At 3 mg l⁻¹ LAS we see an increase of 519.36 nM ml⁻¹, due to threonine + hystidine; at 4.5 mg l⁻¹ LAS we see an increase of 562.47 nM ml⁻¹, due to threonine + hystidine + leucine + lysine. The analogous value for controls is 295.31 nM ml⁻¹ due to valine + leucine.

In general, the increased essential amino acids can only be derived from protein, which, in this case, probably cannot be resynthesized because of the presence of LAS.

The resulting higher concentration of FAA in the serum haemolymph of crabs kept in 3 to 4.5 mg l⁻¹ LAS (and probably 6 mg l⁻¹, but we have no data) could represent one of the physiological effects of this product, and could partially explain the reason why Carcinus mediterraneus hyperregulate better in these conditions.

5. REFERENCES

- Bregant, D. and G. Catalano (1989), Misure di detergenti anionici in Adriatico Settentrionale e Centrale. Boll.Oceanol.Teor.Appl., Num. speciale, pp.241-244
- Æosoviæ B., V. Žutiæ V. Vojvodiaæ and T. Novakoviæ (1983), Determination of surface active substances and anionic detergents in sea water and sea surface microlayer in the Mediterranean. Journ.Etud.Pollut.CIESM, 6(1982):519-524
- Æosoviæ B., V. Žutiæ V. Vojvodiaæ and T. Plese (1985), Determination of surfactants activity and anionic detergents in sea water and sea surface microlayer in the Mediterranean. Mar.Chem., 17:127-139
- Dalla Venezia, L., V. Fossato and S. Scarfi (1980), Combined effects of dodecyl benzene sulfonate and low salinities on Tisbe bulbisetosa. Progr.Wat.Technol., 12:109-117
- Dalla Venezia, L., G. Campesan and A. Menetto (1988), Experimental model for testing the action of LAS on osmoregulation activity of Carcinus mediterraneus. Rapp.P.-V.Réun.CIESM, 31(2):153
- Dalla Venezia, L., G. Socal and A. Menetto (1989), Effetti di un detergente anionico (LAS) sull'accrescimento di una popolazione sperimentale di Skeletonema costatum (Grev.) Cl. Nova Thalassia, 10:279-285
- Fava, G. and L. Dalla Venezia (1976), Effetti di un detersivo commerciale in copepodi del genere Tisbe (Copepoda Harpacticoida). Atti Istituto Veneto Sci., 134:221-237
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L.A. Farr and R.J. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275
- Majori, L., G. Rausa, M.L. Morelli, L. Diana and V. Gasparini (1969), L'inquinamento delle acque del mare nell'Alto Adriatico. Igiene moderna, 62:715-749
- Olson, D.C., G.J. Schmidt and W. Slavin (1979), The determination of amino acids in physiological fluids using liquid chromatography and fluorescence detection. Chromat.Newslett., 7(2):22-25
- Provisionato, C.A. and L. Malavasi (1968), Lo stato di contaminazione dell'acqua di mare prospiciente Rimini, valutato mediante la determinazione del grado di inquinamento da detergenti anionici. Riv.Ital.Igiene, 28(1-2):66-85
- Siebers, D. (1974), Mechanisms of intracellular isosmotic regulation: Fate of ¹⁴C-labeled serum proteins in the shore crab Carcinus maenas after changed environmental salinity. Helgol.Meeresunters, 26:375-381
- Siebers, D. and C. Lucu (1973), Mechanisms of intracellular isosmotic regulation: Extracellular space of the shore crab Carcinus maenas in relation to environmental salinity. Helgol.Meeresunters, 25:199-205

- Siebers, D., C. Lucu, K.R. Sperling and K. Eberlein (1972), Kinetics of osmoregulation in the crab Carcinus maenas. Mar.Biol., 17:291-303
- Verma, S.R., N. Pal, A.K. Tyagi and R.C. Dalela (1979), Toxicity of Swascolp (SLS) to Channa punctatus and Cirrhina mrigala: Biochemical alterations. Bull.Environ.Contam.Toxicol., 21:711-718
- Zatta, P. (1987), The relationship between plasma proteins and intracellular free amino acids during osmotic regulation in Carcinus maenas. J.Exp.Zool., 242:131-136

EFFECTS OF Cd, Hg AND Zn ON THE METABOLISM OF THE
GASTROPOD Nassarius gibbolosa

by

Lea MIZRAHI and Yair ACHITUV

Department of Life Sciences,
Bar-Ilan University, 52900 Israel

ABSTRACT

Oxygen consumption and ammonium excretion responses of the gastropod Nassarius gibbolosa on exposure to 0.1 and 1 ppm of cadmium, mercury and zinc ions were studied. Respiratory and ammonium excretory rates were both lowered by these contaminants. The respiratory rate was affected more than the ammonium excretion rate and the O:N ratio was lowered. An O:N value of 50 was found in unstressed gastropods, whereas values of 30 and below were found in the exposed animals, which indicate a stressed condition. There was a correlation between the concentration of metal, duration of exposure and these physiological responses. The higher the concentration (1 ppm) and the longer the duration (96 hours), the more pronounced the decrease of the examined responses. A decrease in the enzymatic activities of cytochrome oxidase, a respiratory enzyme, and of glutamate dehydrogenase, an enzyme responsible for amino acid catabolism, under the same conditions, was also observed.

1. INTRODUCTION

The physiological and biochemical effects of heavy metals on marine organisms have been reviewed by Bryan (1979), Waldichuk (1974), Coombs (1980) and Widdows (1985). Tissue respiration is seriously impaired on exposure to cadmium and mercury (Dawson et al., 1977). Zinc has also been proven to reduce respiratory processes (Sellers et al., 1975).

Heavy metal ions are strongly bound by sulfhydryl groups of proteins (Viarengo, 1985). Sulfhydryl groups are important in both the structure and the enzymatic activities of proteins. Changes in these groups will usually inhibit enzymatic activity and affect the organism as a whole (Hodson, 1988; Srivastava and Jaiswal, 1989).

Hornung et al. (1989) reported that Haifa Bay is subjected to a moderate to low contamination by mercury (Hg<0.8 ppm), derived from the output of a chloro-alkali plant. Contamination by cadmium and zinc was only found at one station in Haifa Bay (Zn<22 ppm and Cd<0.18 ppm) (Hornung et al., 1989). Cuthbert et al. (1976) pointed out that the levels of cadmium in the sea are rising continuously.

The objective of the present study was to measure the physiological effects of the heavy metals, cadmium, mercury and zinc on Nassarius gibbolosa, a common gastropod in the shallow water of Haifa Bay (Hornung et al., 1984). Such effects may render the population more vulnerable to further environmental changes and decrease the chances of survival of the population in the field (Bayne, 1975).

2. MATERIALS AND METHODS

Individuals of Nassarius gibbolosa (18 mm shell length), were collected at Hof Ha'argaman near Akko (Acre) and kept at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ in an aquarium with locally collected seawater.

Twenty four specimens of Nassarius gibbolosa were placed in a container with 1 liter of aerated seawater and were exposed separately to 0.1 and 1 ppm of Hg, Zn and Cd (added as chloride salts). The animals were kept without feeding in the solution for 96 hours or until death was recorded. Approaching death involved complete paralysis of the foot (Cuthbert et al., 1976).

These concentrations and durations of exposure were chosen in order to facilitate comparison with other results reported in the literature. All the experiments were carried out at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. The water and the test solutions were renewed every 24 hours. Six animals from each container were removed at 24 hour intervals for measurement of physiological responses.

Oxygen consumption was determined in a closed system using a Clark type O_2 electrode (YSI 5331). The respiratory rates of the individual animals were determined separately by introducing each animal into a closed chamber containing seawater and the contaminant; the water was stirred gently. In each case the animal was allowed to settle for 30 minutes. The oxygen concentration was then monitored over a period of 20 minutes. The rate of oxygen consumption was calculated from the rate of oxygen depletion in the seawater. Two measurements of oxygen consumption were made for each individual and the mean rate of oxygen consumption was then calculated.

For the determination of ammonium excretion the animals were placed in 50 ml of filtered seawater containing the contaminant for 3 hours and then ammonium levels were determined by the phenol-hydrochlorite method (Solorzano, 1969). Two measurements were made for each individual.

The rates of respiration and excretion were normalized to a standard body weight of 0.1 g dry tissue, which is the mean dry weight of the animals used in this study. The O:N ratio (in atomic equivalents) was calculated for individual gastropods, as described by Widdows (1978). The results were analyzed statistically using a two-way ANOVA based on Duncan's multiple test.

At the end of the experiments of ammonium excretion and oxygen consumption, the animals' shells were broken and their tissues homogenized (10%; w:v) in a solution containing 0.2% (v:v) tritonX-100. Homogenization was carried out at 0°C by exposing the suspension to an ultrasonic vibrator for 30 seconds. Animal homogenates were centrifuged for 10 minutes at 15000 g. The supernatant was assayed for glutamate dehydrogenase activity, by the method of Bidigare and King (1981) where enzyme activity was determined by measuring spectrophotometrically the reduction of NAD^+ at 340 nm. Enzyme activity was expressed as $\mu\text{g NH}_4^+ \text{mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$ (Bidigare and King, 1981).

The cytochrome oxidase was measured by following the oxidation of reduced cytochrome C at 550 nm, by the method of Cooperstein and Lazarow (1951). The results are expressed as activity units. An activity unit is defined as the oxidation of cytochrome C at the

rate of 1 μM per min mg^{-1} protein. A solution of 17 μM cytochrome C was reduced with a minimum of sodium dithionite. The solution was shaken until a decrease in the absorption at 550 nm indicated that all the dithionite was oxidized (Freeman, 1965). Two measurements were made for each individual.

The supernatant of the protein was measured by the method used by Lowry et al. (1951).

The correlations between cytochrome oxidase activity and oxygen consumption and between glutamate dehydrogenase activity and ammonium excretion were examined.

3. RESULTS

Figures 1 to 3 summarize the effect of the three metals Cd, Hg and Zn on oxygen consumption and ammonium excretion in Nassarius gibbolosa. The concentration of 1 ppm Hg caused total mortality after 72 h. Cadmium, mercury and zinc inhibited both oxygen consumption and ammonium excretion. There was a direct relationship between the concentration of the pollutant and the decrease in oxygen consumption and ammonium excretion. The metals were arranged in order of toxicity from Hg, which was the most potent, to Zn which, at the examined concentrations, only slightly affected oxygen consumption and nitrogen excretion. No ill effects were observed at a zinc concentration of 0.1 ppm. There was a correlation between the duration of exposure and the decrease in physiological responses.

A two-way analysis of variance (ANOVA) indicated that there was a statistically significant difference ($P < 0.001$) between oxygen consumption rates of control animals and of animals exposed to each heavy metal (Cd, Hg and Zn) except at 0.1 ppm of Zn where no significant difference was observed between control and exposed animals. There was no significant correlation between type of exposure and time effects, indicating that the excretory rates and the oxygen consumption rates were influenced within the first 24 hours of the experiment with no further signs of recovery or deterioration.

Figures 4 and 5 show the effect of the three metals on the activity of cytochrome oxidase and glutamate dehydrogenase. Cadmium and mercury were found to be high inhibitors of these two enzymes. Under exposure to Zn, only a slight inhibition in the activity of these enzymes was recorded. A correlation was found between cytochrome oxidase activity and oxygen consumption and between glutamate dehydrogenase activity and ammonium excretion.

4. DISCUSSION

In general, pollutants lower the metabolic rate. Stress symptoms observed in the present study were similar for Cd, Hg and Zn. The most drastic effect was the reduction of the oxygen consumption rate. The results on Nassarius gibbolosa compare closely with those of MacInnes and Thurberg (1973), who assessed the effects of various metals on the behavior and oxygen consumption of Nassarius obsoletus. The physiological responses of Nassarius gibbolosa in the present study are similar to those found by Brown (1982) for Bullia. This applies to Zn and Hg. Cadmium reduces the respiratory rate at high concentrations. In the present study gastropods treated with 0.1 ppm of

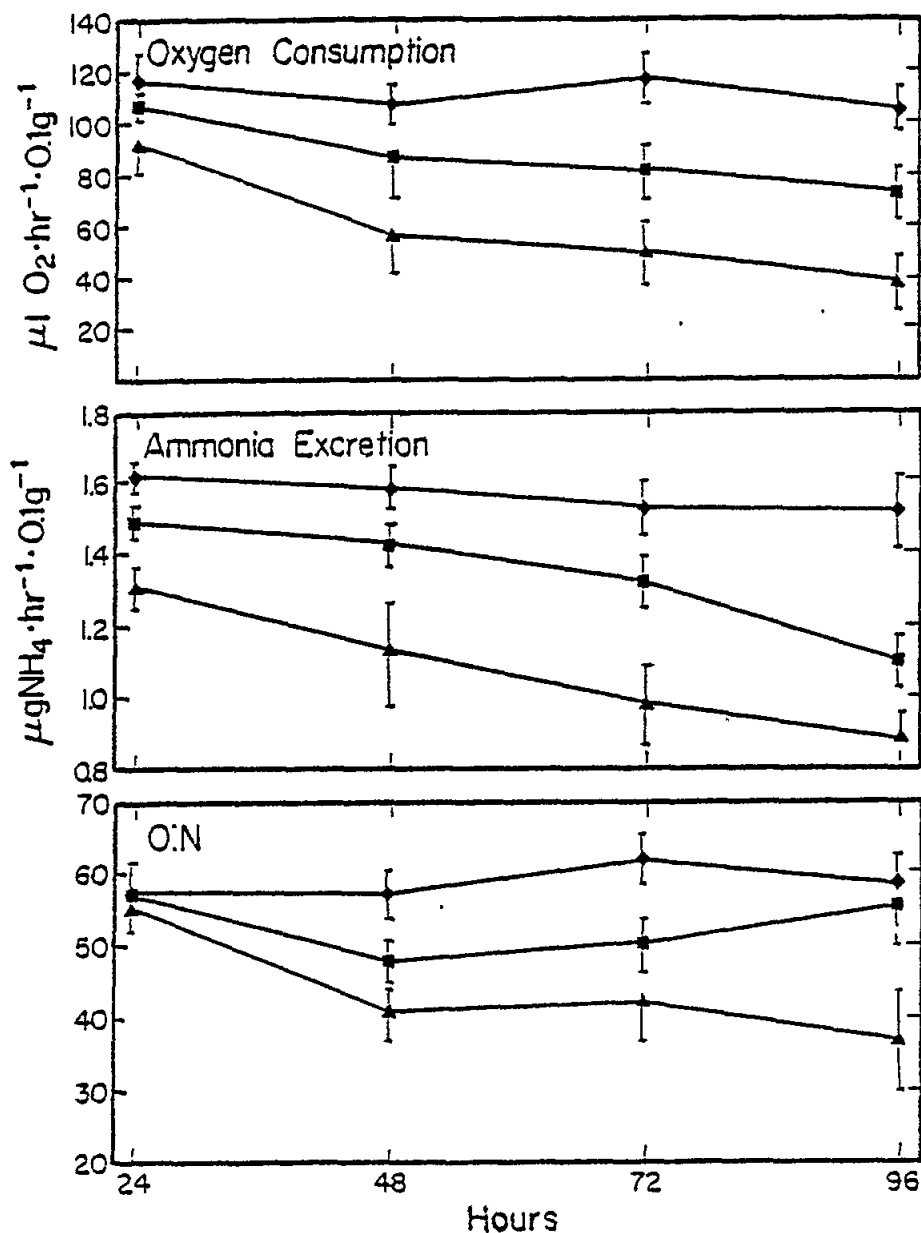


Fig. 1 Effect of Cd ion on the rates of oxygen consumption, ammonium excretion and on the O:N ratio. Control \blacklozenge , 0.1 ppm \blacksquare , 1.0 ppm \blacktriangle . Bars = \pm S.E. (in cases where bars overlap only one side is shown)

Cd showed a slight inhibition (8%) of respiration after 24 hours of exposure, and a further inhibition of 31% after 96 hours of exposure. At a Hg concentration of 0.1 ppm, the oxygen uptake of the animals showed a decrease of approximately 50% of the control values after 24 hours of exposure and an inhibition of 85% after 96 hours. It was found that the higher the metal concentration in the external medium, the greater the inhibition of respiration. Increased duration of exposure also increased the inhibition. These results are in agreement with those of Dawson *et al.* (1977) for organisms exposed to Cd and Hg.

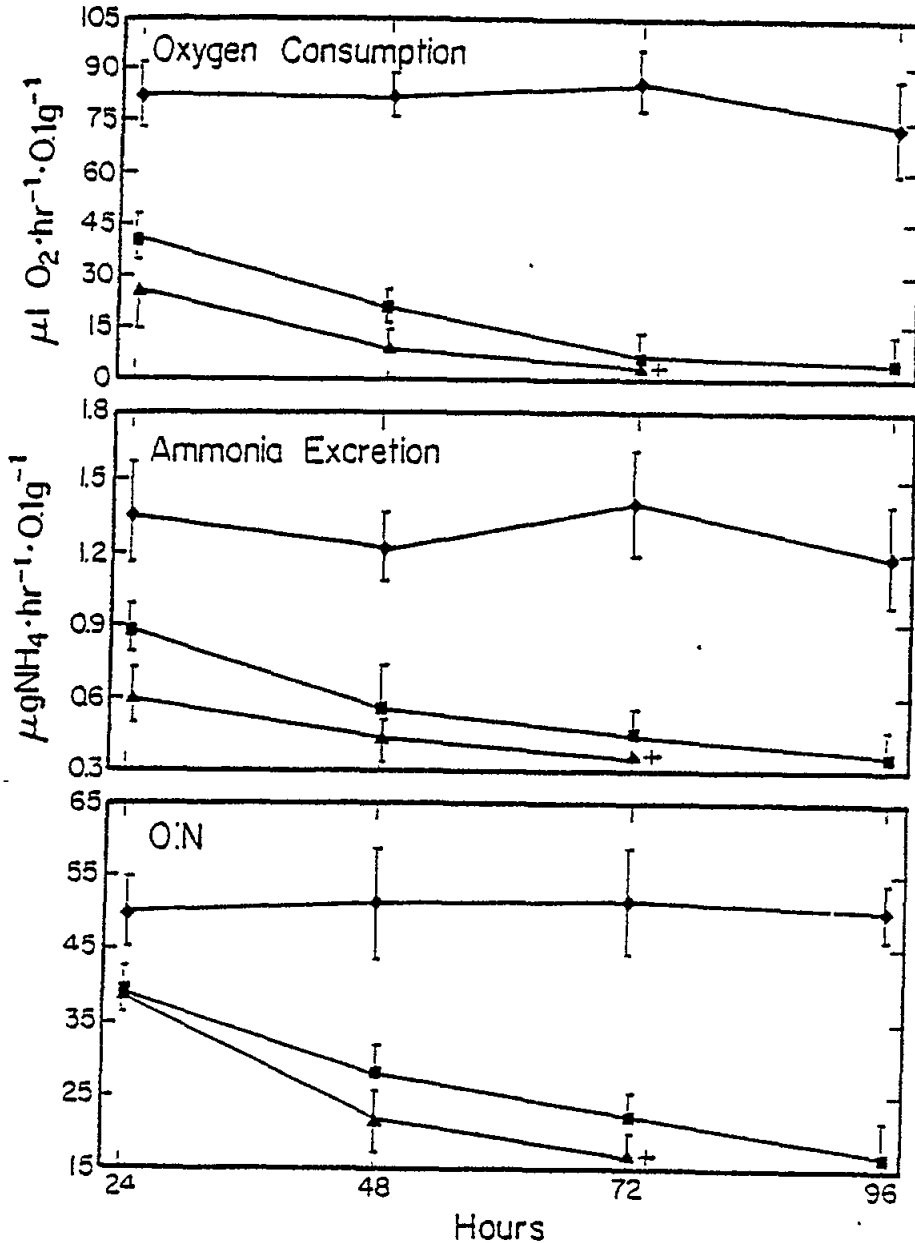


Fig. 2 Effect of Hg ion on the rates of oxygen consumption, ammonium excretion and on the O:N ratio. Control \blacklozenge , 0.1 ppm \blacksquare , 1.0 ppm \blacktriangle . Bars = \pm S.E. (in cases where bars overlap only one side is shown)

Zinc only slightly affected oxygen uptake. A two-way ANOVA showed that exposure of 48 hours and above, to 0.1 ppm Zn had no significant effect on the oxygen uptake. These results agree with the data of Tort *et al.* (1982) and MacInnes and Thurberg (1973).

The mechanism by which these metals affected respiration was not determined.

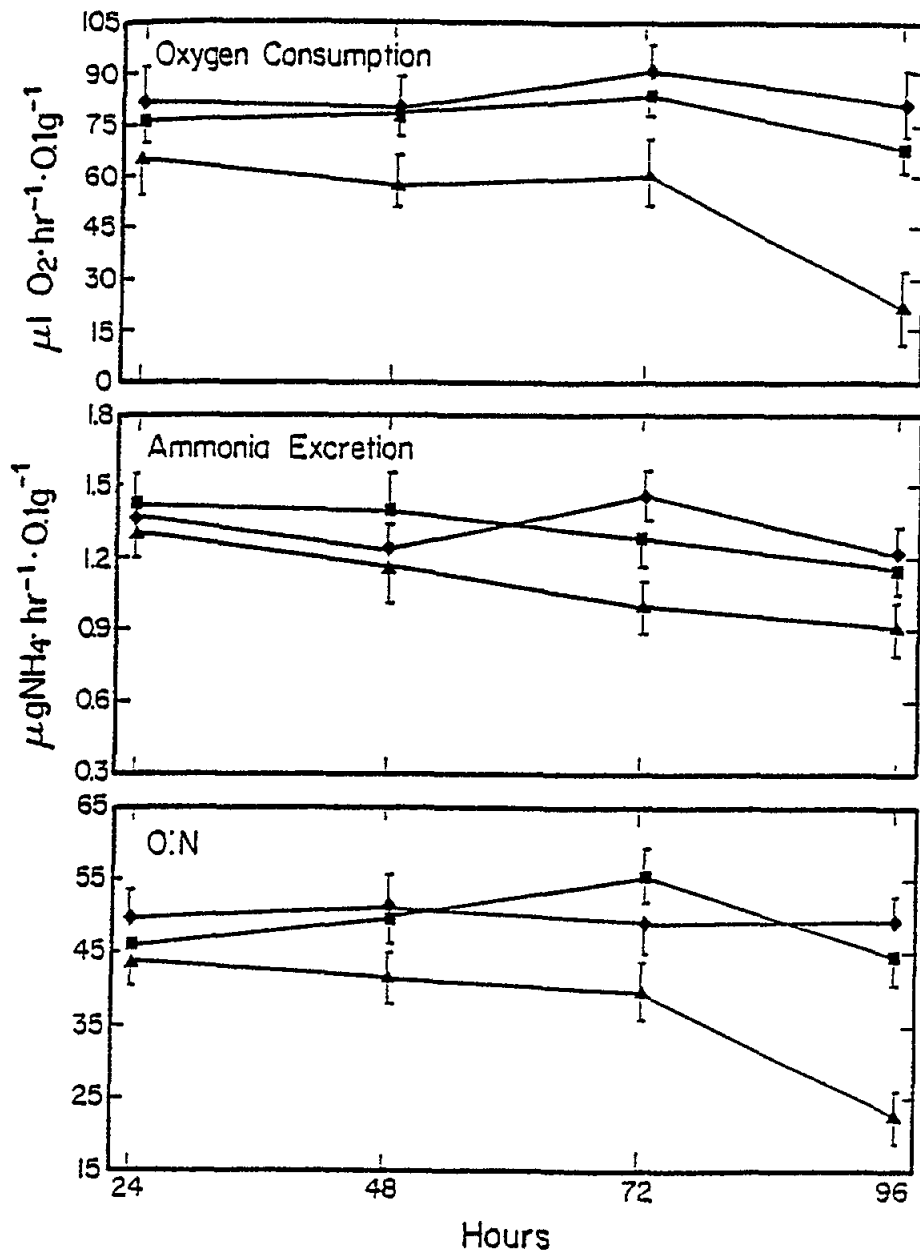


Fig. 3 Effect of Zn ion on the rates of oxygen consumption, ammonium excretion and on the O:N ratio. Control ♦, 0.1 ppm ■, 1.0 ppm ▲. Bars = ± S.E. (in cases where bars overlap only one side is shown)

A trend of decreasing physiological activity, similar to that recorded for oxygen consumption, was found for ammonium excretion, but inhibition of excretion after exposure to pollutants was less drastic. After exposing the animals to 0.1 ppm Hg for 24 hours and 96 hours, a 37% and 69% inhibition of ammonium excretion respectively, was observed. Under exposure to Cd there was only an 8% inhibition after 24 hours of exposure to 0.1 ppm solution and 18% inhibition after 96 hours. Higher metal concentrations in the external media caused greater inhibition of ammonium excretion. Increased duration of

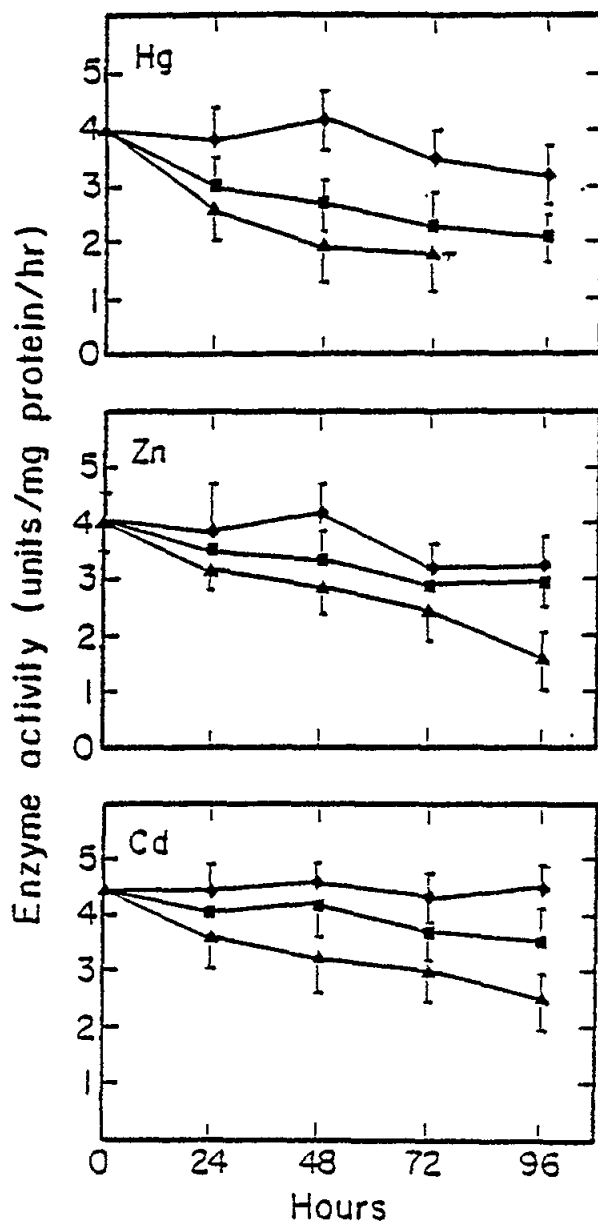


Fig. 4 Effect of Cd, Hg and Zn on cytochrome oxidase activity. Control ♦, 0.1 ppm ■, 1.0 ppm ▲. Bars = ± S.E. (in cases where bars overlap only one side is shown)

exposure also increased the inhibition. Zinc had a much lower effect on ammonium excretion. A 0.1 ppm solution of Zn did not result in any inhibition after 96 hours of exposure. A 1 ppm solution of Zn did not cause any inhibition after 24 hours exposure, but did cause 35% inhibition after 96 hours of exposure.

The use of the O:N ratio as an index of stress has been discussed by Bayne and Widdows (1978). Exposure to heavy metal ions decreased the O:N ratio of *Nassarius gibbosa* to less than 30. There was a linear correlation between decrease of the O:N ratio and increase of the pollutant concentration

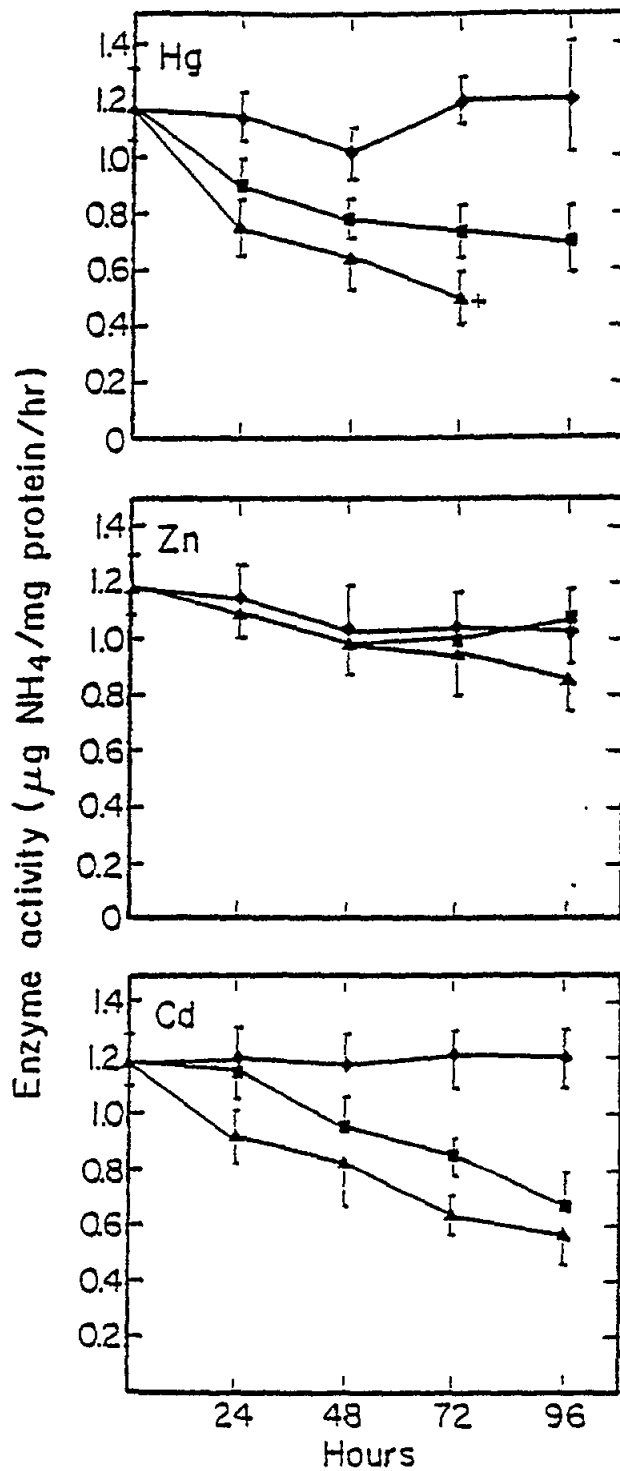


Fig. 5 Effect of Cd, Hg and Zn on glutamate dehydrogenase activity Control ♦, 0.1 ppm ■, 1.0 ppm ▲. Bars = ± S.E. (in cases where bars overlap only one side is shown)

and/or duration of exposure. Similar decreases in the O:N ratio in Mytilus edulis were reported by Widdows (1978) and in Venus verrucosa by Axiak and George (1987). While other studies found that the decrease in the O:N ratio was mainly caused by elevated ammonium levels, the present study shows that exposure to heavy metals caused a general decrease in the metabolic activity of the animals. This is expressed by a decrease in both oxygen consumption and ammonium excretion.

Experimental exposures to Cd, Hg and Zn were of short durations while relatively high concentrations were used. The results were statistically significant ($P < 0.001$) as tested by Duncan's multiple test. Poulson *et al.* (1982) reported that the respiratory rate of Mytilus edulis was not influenced by a 17-day exposure to a Cd concentration of less than 0.1 ppm. Axiak and George (1987) found that when Venus verrucosa was exposed to 0.1 ppm of petroleum hydrocarbons, physiological effects were noted only after 30 days.

Pringle *et al.*, 1968 stated that it is most probable that the toxicity and the decrease in metabolic activity is due to an inhibition of the enzyme system. The effect of Cd, Hg and Zn on the enzyme activities of cytochrome oxidase, a respiratory enzyme and on glutamate dehydrogenase (GDH), which has been found to be primarily responsible for amino acid catabolism and ammonium production, was therefore examined.

Cadmium and Hg were found to inhibit cytochrome oxidase activity in Nassarius gibbosa. Exposure to 0.1 ppm Hg caused a slight inhibition, 12%, after 24 hours. A 33% inhibition occurred after 96 hours of exposure. Cadmium and mercury were also found to invoke high inhibitions of cytochrome oxidase in Donax trunculus (Mizrahi and Aчитuv, 1989). Zinc caused less than 10% inhibition in the activity of the respiratory enzyme. A higher metal concentration in the external medium caused a higher inhibition in the activity of cytochrome oxidase. There is a correlation between cytochrome oxidase activity and oxygen consumption. The correlation coefficient values for Hg, Cd and Zn were 0.890, 0.729 and 0.767, respectively ($n=48$).

A direct relationship between GDH activity and ammonium excretion was also found. Correlation coefficient values for Hg, Cd and Zn were 0.835, 0.815 and 0.816, respectively ($n=48$). This is in agreement with Bidigare and King (1981), who stated that glutamic dehydrogenase activity is highly correlated to ammonium excretion. Park *et al.* (1986) found a high correlation between macrozooplankton GDH activities and ammonium excretion rates. The conclusion of their study was that the determination of macrozooplankton GDH activity can be useful in predicting ammonium excretion rates. GDH activity decreased after exposure to heavy metal ions. 96 hours exposure to 0.1 ppm of Hg inhibited GDH activity by 33%; 0.1 ppm of Cd caused a 40% inhibition; a 0.1 ppm solution of Zn did not inhibit the activity of glutamic dehydrogenase after 96 hours. There was a linear relationship between the reduction in oxygen consumption, reduction in ammonium excretion rates and increase in metal concentration, and the duration of exposure. A two-way ANOVA indicated that there was no significant difference between the cytochrome oxidase activity and glutamate activity of control animals and animals exposed to zinc.

It is concluded that changes in the O:N ratio are attributed to changes in enzyme activity, and a decrease in enzyme activity can be a useful tool for monitoring stress under pollution conditions.

5. REFERENCES

- Axiak, V. and J.J. George (1987), Bioenergetic responses of the marine bivalve Venus verrucosa on long term exposure to petroleum hydrocarbons. Mar. Environ. Res., 23:33-47

- Bayne, B.L. (1975), Aspects of physiological condition in Mytilus edulis (L), with special reference to the effects of oxygen tension and salinity. In: Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium, edited by H. Barnes, Aberdeen, Aberdeen University Press, pp.213-238
- Bayne, B.L. and J. Widdows (1978), Physiological ecology of two populations of Mytilus edulis L. Oecologia, 37:137-162
- Bidigare, R.R. and F.D. King (1981), The measurement of glutamate dehydrogenase activity in Praunus flexuosus and its role in the regulation of ammonia excretion. Comp.Biochem.Physiol., 70B:409-413
- Brown, A.C. (1982), The biology of sandy-beach whelks of the genus Bullia (Nassariidae). Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev., 20:309-361
- Bryan, G.W. (1979), Bioaccumulation of marine pollutants. Phil.Trans.R.Soc.Lond.B, 286:483-505
- Coombs, T.L. (1980), Heavy metal pollutants in the aquatic environment fitness, edited by R. Gilles, Oxford, Pergamon Press, pp.283-302
- Cooperstein, S.J. and A. Lazarow (1951), A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. J.Biol.Chem., 189:665-670
- Cuthbert, K.C., A.C. Brown and M.J. Orren (1976), Toxicity of cadmium to Bullia digitalis (Prosobranchiata:Nassaridae). Trans.Roy.Soc.S.Afr., 42:203-208
- Dawson, M.A., E. Gould, F.P. Thurberg and A. Calabrese (1977), Physiological response of juvenile striped bass Morone saxatilis, to low levels of cadmium and mercury. Chesapeake Sci., 18:353-359
- Freeman, K.B. (1965), Preparation and properties of mitochondria from Krebs II mouse ascites tumor cells. Biochem.J. 94:494-499
- Hodson, P.V. (1988), The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. Aquat.Toxicol., 11:3-18
- Hornung, H., B.S. Krumgalz and Y. Cohen (1984), Mercury pollution in sediments, benthic organisms and inshore fishes of Haifa Bay, Israel. Mar.Environ.Res., 12:191-208
- Hornung, H., M.D. Krom and Y. Cohen (1989), Trace metal distribution in sediments and benthic fauna of Haifa Bay, Israel. Est.Coast.Shelf Sci., 29:43-50
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275
- MacInnes, J.R. and F.P. Thurberg (1973), Effects of metals on the behavior and oxygen consumption of the mud snail. Mar.Pollut.Bull., 4:185-186
- Mizrahi, M. and Y. Achituv (1989), Effect of heavy metals ions on enzyme activity in the Mediterranean mussel, Donax trunculus. Bull.Environ. Contam.Toxicol., 42:854-859

- Park, Y.C., E.J. Carpenter and P.G. Falkowski (1986), Ammonium excretion and glutamate dehydrogenase activity of zooplankton in Great South bay, New York. J.Plank.Res., 8:489-503
- Pringle, B.H., D.E. Hissong, E. Katz and S. Mulawka (1968), Trace metal accumulation by estuarine molluscs. J.Sanit.Eng.Div.Am.Soc.Civil Engrs., 94:455-475
- Poulson, E., H.U. Riisgard and F. Mohlenberg (1982), Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel Mytilus edulis. Mar.Biol., 68:25-29
- Sellers, C.M., A.G. Heath and M.L. Bass (1975), The effect of sublethal concentration of copper and zinc on ventilatory activity, blood O₂ and pH in rainbow trout Salmo gairdneri. Water Res., 9:401-408
- Solorzano, L. (1969), Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. Limnol.Oceanogr., 14:799-801
- Srivastava, A. and V.S. Jaiswal (1989), Biochemical changes in duck weed after cadmium treatment. Enhancement in senescence. Water, Air and Soil Poll., 50:163-170
- Tort, L., S. Crespo and J. Balasch (1982), Oxygen consumption of the dogfish gill tissue following zinc treatment. Comp.Biochem.Physiol., 72C:145-148
- Viarengo, A. (1985), Biochemical effects of trace metals. Mar.Pollut.Bull., 16:153-158
- Waldichuk, M. (1974), Some biological concerns in heavy metal pollution. In: Pollution and physiology of marine organisms, edited by J.F. Vernberg and W.B. Vernberg, New York, Academic Press, pp.1-57
- Widdows, J. (1978), Physiological indices of stress in Mytilus edulis. J.Mar. Biol.Assoc.U.K., 58:125-142
- Widdows, J. (1985), Physiological responses to pollution. Mar.Pollut.Bull., 16:129-134

IN SITU TOXICITY OF DISPERSANTS.
CONTROLLED ENVIRONMENTAL POLLUTION EXPERIMENTS

by

Evangelos PAPATHANASSIOU, Urania CHRISTAKI,
Epaminondas CHRISTOU and Anastasia MILONA

National Centre for Marine Research,
Ag. Kosmas, Hellinikon 16604,
Athens, Greece

ABSTRACT

Natural plankton communities in two plastic enclosures (1.3 m³) were treated with oil and oil+dispersant (mixture ratio: 1:10). A third enclosure served as a control. Two main experiments were carried out in the coastal area of Agios Kosmas, Saronikos gulf: one during May 1990 and the other during June 1990. Based on previous trials, each one of these experiments lasted for two weeks.

Physical parameters, chlorophyll, phytoplankton and zooplankton distribution as well as the oil concentration in water were measured.

The oil and the mixture of oil plus dispersant had an effect on phytoplankton and zooplankton communities.

The most interesting feature of phytoplankton succession in the enclosures was the shifting of the population towards monospecific blooms which was evident and was more pronounced in the oil+dispersant mixture. Generally μ -flagellates predominated the phytoplankton population; other flagellates (e.g. Cryptomonas sp.) and dinoflagellates (e.g. Gymnodinium spp.) were among the dominant species. Chlorophyll-a concentration did not follow high cell concentration.

Regarding zooplankton communities, the effects on planktonic copepods were more pronounced in comparison to the benthic copepods.

Finally no signs of recovery were observed in the bags where the oil was completely dispersed. The mixing of the water by the wind seems to be the key factor of this process.

1. INTRODUCTION

Oil related activities have increased continuously during the last decade throughout the world, and large amounts of oil, dispersants and other refined products have drawn the attention of the scientific community and the public due to pollution effects. Increasing oil related activities in Greek waters illustrate part of the problem regarding environmental pollution resulting from these activities.

Most ecotoxicological studies quantify the effects of oil dispersants performing comparative tests with one or several individual species in the laboratory. The extrapolation of

the results from the laboratory to the actual field situation is often based on misleading results. Interactions at higher levels of organisation in the ecosystem, such as between and within trophic levels, will sometimes amplify, sometimes dampen or even totally reverse the direct effect of the environmental factor of interest, giving ecosystem effects that could not have been predicted from single species laboratory studies. In addition it is generally impossible to carry out long term ecotoxicological studies under laboratory conditions (Kuiper *et al.*, 1984). This study, taking into account the model of a coastal ecosystem, evaluates the effects of oil and oil dispersants under the actual conditions of a real Mediterranean ecosystem.

The experiment took place in the coastal area of Agios Kosmas (West Saronikos Gulf). The area lies approximately six miles from the central sewage outfall of Athens and it is affected only indirectly from it, when meteorological phenomena favour the movement of surface water from the polluted area.

Controlled Environmental Pollution Experiments (CEPEX) allow experimental manipulations and replication, not possible in the natural ecosystem, thus retaining some of the analytical advantages of simpler laboratory experiments, while still providing much of the complexity of nature (Grassle *et al.*, 1981).

2. MATERIALS AND METHODS

Two main sets of experiments were carried out. The first phase lasted 15 days (from 9 to 23 May 1990) and the second one 16 days (from 7 to 22 June 1990).

The experiments were carried out from a small wooden platform at a depth of 4.4 m near the National Centre for Marine Research. Three CEPEX bags were installed in order to perform three separate experiments, one as a control, one with oil and one with oil plus added dispersant (Fig. 1).

The depth of each enclosure was 3.5 m and its diameter 1.2 m giving a total estimated volume of water of about 3.1 m³. The flexible plastic enclosures used in this experiment were designed to receive natural light and temperature conditions and have also been used to simulate the processes in pelagic ecosystems in other parts of the world (Skjoldal *et al.*, 1982; Kuiper *et al.*, 1982; Kattner *et al.*, 1983; Kuiper and Hanstveit, 1984; Andersen *et al.*, 1987). The general method of Kuiper (1984), using plastic enclosures, has been adapted for Mediterranean waters.

Experiments were carried out firstly over an extended period in order to determine the optimum retention period of communities in the control bags. Thus, several experiments carried out with control model ecosystems were prior to the initiation of the actual experiment, in different time periods. The results from these experiments revealed that the optimum period for retaining natural plankton populations is approximately 2.5 weeks.

For each experiment seawater was pumped from the surroundings to the enclosure bags using a 12 V pump for at least 20 minutes and until the bags were full.

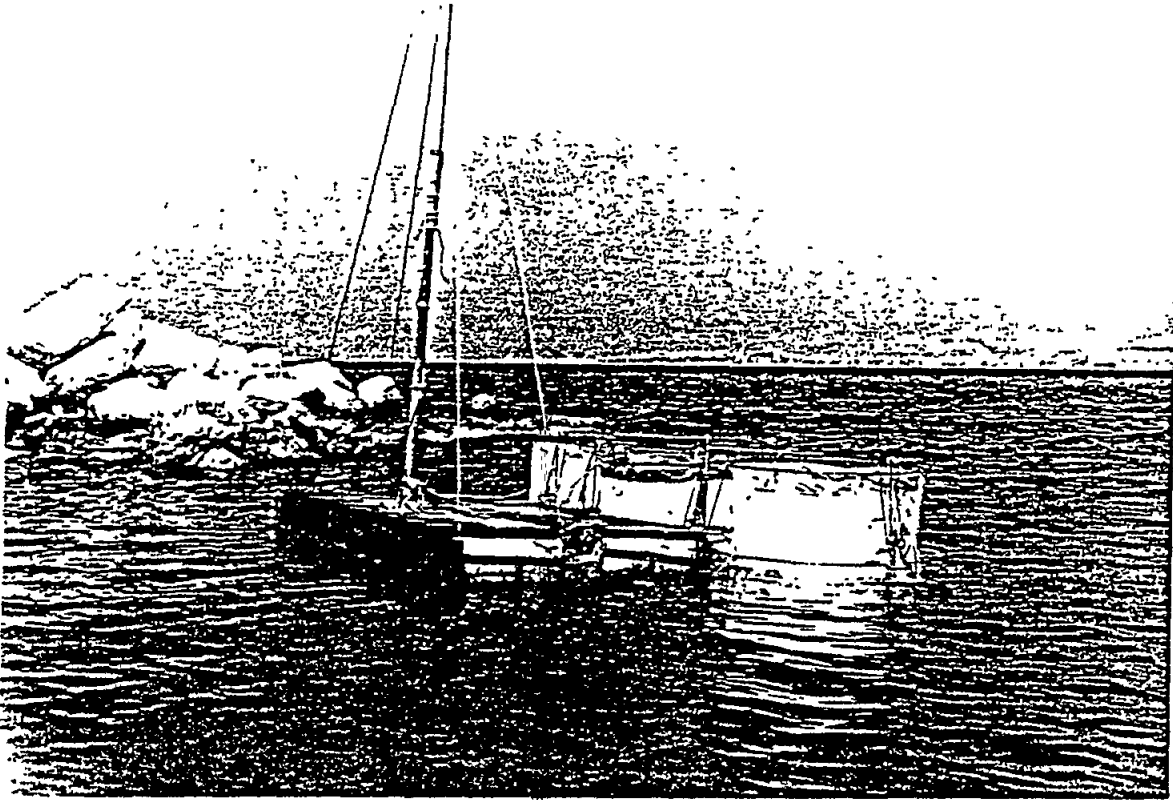


Fig. 1 Arrangement of the CEPEX enclosures in the coastal area

Sampling of model ecosystems was performed every other day for phytoplankton and after the end of the experiment for zooplankton in May. Sampling of zooplankton at the end of the June experiment was not accomplished as the enclosures had been destroyed. Physical and chemical parameters were also sampled every other day and/or on the days that experimental procedures were carried out for the sampling of biological parameters.

2.1 Selection of oil and dispersant

The selection of oil was made from the variety of oils that are most frequently found in Mediterranean waters. From this list the most common is Arabian light which was provided by the PETROLA Ltd. Petroleum Company, Elefsis, Athens, Greece. A total of 500 ml were added to the enclosures in order to simulate an oil spill which is not large but sufficiently evident. These figures were calculated after having carried out several experiments and measurements with respect to the oil.

The selection of dispersant was made from the National Centre for Marine Research list of most widely used non toxic dispersants. BP-1100X was selected as one of the dispersants which best complied with the above

characteristics. This oil dispersant was approved for use in Greek coastal waters (depth more than 20m) following toxicity experiments carried out under laboratory conditions at the installations of the National Centre for Marine Research.

After pumping the water in the three bags the oil was added slowly on the top of the water column. The concentration of the oil-dispersant mixture was approximately 1:10, which is the normal ratio when treating oil spills. Mechanical agitation has been applied to the oil+dispersant mixture immediately after the addition of the dispersant. Sampling for biological and physicochemical parameters was carried out in the nearby environment to estimate the conditions of the seawater enclosed in the bags.

2.2 Methodology used

The water in the plastic bags during the experimental period was not artificially mixed. Turbulence was transmitted from the exterior through the flexible walls of the enclosures.

Regarding the environmental parameters, temperature and dissolved oxygen were determined in situ every other day using the HYDROBIOS thermometer of the sample bottle and a Yellow Spring (YSI) oxygen meter respectively. Salinity was measured using the AUTOSAL salinometer from Guidline.

Phytoplankton species enumeration and identification was carried out under a NIKON inverted microscope. A 100 ml sub-sample was used in 1% lugol solution, for phytoplankton species composition determination (Utermohl, 1958). Diversity (Margalef, 1958) and dominance (McNaughton, 1967) indices were calculated. Sampling was made using a 2 l specially designed water sampler from HYDROBIOS.

A volume of 1.2 l of seawater was filtered through Whatman GF/C filters for chlorophyll-a determinations; the filters were then transferred to 5 ml of 90% acetone, homogenised and analyzed spectrophotometrically (UNESCO/SCOR, 1966). Two replicate samples from each bag were taken for chlorophyll-a measurements. Chlorophyll-a samples were taken every second or third day. Chlorophyll-a, Chlorophyll-b, Chlorophyll-c and carotenoids were measured and the pigment index described by Margalef (1965) was calculated from the corrected extinctions at 663 and 430 nm (index A430-A750/A663-A750).

Zooplankton samples were collected after 8 or more days by emptying the contents of the model enclosure bags using a pump and filtering the seawater through a mesh size of 200 μ m. The contents of the bags were fixed and preserved in a 4% buffered formalin solution. This was made due to the low zooplankton population encountered in the nearby seawater. In several attempts, zooplankton was stained with rose bengal solution to identify possible dead individuals, but results were the same.

Oil concentrations were determined using the fluorometric method of monitoring polyaromatic hydrocarbons. Oil in water was determined by taking samples of 2.5 l of the seawater with oil from the three enclosures on several successive days during the May and June experiments. Three replicate samples were taken each day at a 1 m depth in dark glass bottles which were used as samplers and the water samples were extracted with 2X50 ml twice-distilled n-hexane. The organic extracts were then dried over anhydrous Na₂SO₄.

concentrated to a small standard volume and fluorescence emission was measured at λ_{excit} : 310 nm and λ_{em} : 360 nm. Synchronous scanning was also recorded at $\Delta\lambda = 4$ nm and compared with the corresponding synchronous spectrum of Arabian light crude oil.

The concentration of oil of each sample was determined through the method of standard additions of a standard solution of Arabian light crude oil. External standards of chrysene were used for the correlation of Arabian light crude oil and chrysene concentrations. Results are expressed as "chrysene equivalents" in $mg\ l^{-1}$.

Data treatment included multivariate statistical analysis (cluster and MDS) using the Bray-Curtis similarity index (Bray and Curtis, 1957), univariate analysis (Analysis of Variance) and descriptive plotting (k-dominance curves).

The control, oil and oil plus dispersant enclosure bags for convenient reading are referred to as CEPEX 1, CEPEX 2 and CEPEX 3 respectively.

3. RESULTS

3.1 Visual observations

3.1.1 May

After five days of good weather, with calm sea, most of the oil (in CEPEX 2) was converted to tar and descended to the bottom of the plastic enclosure. Some of the oil had stuck onto the walls of the enclosure. The water body in the oil bag was almost clear. In CEPEX 3, polluted with both oil and dispersant, the water body was turbid but a considerable amount of oil was stuck onto the walls of the enclosure obviously due to the lack of mixing.

3.1.2 June

During the second part of the experiment, the sea was rough due to strong northwest winds. The water in the plastic enclosures was well mixed; the oil in CEPEX 2 and the oil-dispersant in CEPEX 3, remained in the water body during the entire period of the experiment; the oil had only partially been converted into tar.

3.2 Physical parameters

The salinity was almost stable in the environment ranging from 38.566 to 38.837. In the enclosure bags, however, a slight increase was observed (Table 1).

The mean temperature during the first phase of the experiment (from 9 to 23 May 1990) was 18.9EC while during the second phase (from 7 to 22 June 1990) it was 22.27EC. (Table 1). Oxygen measurements on selected days showed that the concentration was always near saturation level.

3.3 Oil concentrations in water

Oil concentrations in water are given in Table 2 for the three enclosure bags. The final concentration of oil in water of the the two

Table 1

Physical Parameters.

Date	Temperature EC Environment	Salinity Environment	Salinity Control
9-5-90	18.68	38.837	
11-5-90	17.2		
13-5-90	18.62		39.169
15-5-90	19.65		39.234
17-5-90	18.0		
19-5-90	19.95		39.695
23-5-90	20.2	38.712	40.070
7-6-90	20.9	38.579	
9-6-90	22.82		38.618
11-6-90	21.95		39.048
13-6-90	22.0	38.566	39.294
15-6-90	22.02	39.670	39.616
18-6-90	22.0		
20-6-90	22.3	38.732	40.179
22-6-90	22.85	38.669	40.394

polluted enclosures, starting from a nominal one of 795 mg l⁻¹, was estimated to be 392.7 and 395.1 mg l⁻¹ in CEPEX 2 and CEPEX 3 respectively. For the control bag (CEPEX 1) the results showed that the concentration of oil was within the range of two to three orders of magnitude less than that of the other two bags (CEPEX 2 and CEPEX 3). A significant difference in concentration was observed between CEPEX 2 and CEPEX 3 in both experiments with higher values found in CEPEX 3. Results also showed that there is a decrease of the amount of oil in water in CEPEX 2 especially during May; some extremely high values have been observed during the same month in CEPEX 3. During June, when agitation occurred, most of the suspended oil remained in the water column in both polluted bags and there is no real trend for a decrease.

3.4 Zooplankton

Copepods were the most important group of zooplankton in the enclosures. The sampling of 9 May showed that other groups were also present in great abundance in the environment (Table 3). However, the abundance of copepods in the area is evident during spring (Christou, 1990). The zooplankton composition (in percentages) in the environment, control and polluted enclosures on 9 and 23 May 1990 is given in Table 3.

3.5 Phytoplankton

Chlorophyll-a during May ranged between 0.112 µg l⁻¹ (CEPEX 3, 17/5/90) and 0.535 µg l⁻¹ (environment, 15/5/90).

Chlorophyll-a during the second experiment in June ranged between 0.144 µg l⁻¹ (CEPEX 2, 13/6/90) and 0.588 µg l⁻¹ (environment, 15/6/90). The mean value of the two replicate measurements of chlorophyll-a were used.

Table 2

Oil concentrations in water of the three enclosures.

MAY	Total Polyaromatic Hydrocarbons, in Chrysene equivalents (ppm)		
	CEPEX 1	CEPEX 2	CEPEX 3
9/5/90	0.07	14.8	43.1
11/5/90	0.09	17.5	67.2
13/5/90	0.03	18.2	112.4
15/5/90	0.03	14.2	88.9
19/5/90	0.01	12.2	102.1
22/5/90	0.02	11.3	77.8
JUNE	Total Polyaromatic Hydrocarbons, in Chrysene equivalents (ppm)		
	CEPEX 1	CEPEX 2	CEPEX 3
9/6/90	0.03	6.1	62.9
11/6/90	0.05	5.3	47.9
13/6/90	0.10	4.8	51.2
15/6/90	0.02	5.7	58.4
17/6/90	0.03	7.2	64.0
18/6/90	0.07	4.9	43.9
20/6/90	0.04	5.2	30.0
22/6/90	0.12	3.8	24.5

Chlorophyll-b and Chlorophyll-c values fluctuated proportionally to those of chlorophyll-a; Chlorophyll-b ranged from 0.101 $\mu\text{g l}^{-1}$ (CEPEX 2, 11/5/90) to 0.808 $\mu\text{g l}^{-1}$ (CEPEX 3, 22/6/90); Chlorophyll-c ranged from 0.104 $\mu\text{g l}^{-1}$ (CEPEX 2, 9/6/90) to 0.955 $\mu\text{g l}^{-1}$ (CEPEX 3, 11/5/90).

The pigment index in polluted enclosures showed some extremely high values ranging from 1.33 to 23.91 in the CEPEX 2 and from 1.44 to 83.41, in the CEPEX 3. These high values can be attributed to the high concentrations of oil in the samples.

The analysis of variance of chlorophyll-a values for the four series of samples (Environment, CEPEX 1, CEPEX 2, CEPEX 3) showed that there was no significant difference between the control, polluted and environment samples (Fig. 2).

Diversity indices ranged from 0.532 (CEPEX 1, 15/5/90) to 3.245 (CEPEX 1, 11/5/90) in May and from 0 (CEPEX 3, 13/6/90) to 3.096 (CEPEX 1, 20/6/90) in June. Dominance values ranged from 43.54 (CEPEX 2, 19/5/90) to 95.08 (CEPEX 1, 15/5/90) and from 41.55 (Environment, 9/6/90) to 100 (CEPEX 3, 13/6/90, 22/6/90). The very high/low dominance/diversity values in the June experiment were due to a coccolithophore bloom that was observed during this period.

One way analysis of variance for the above results showed that there was no significant difference between the control, polluted and environment samples of the May experiment. The same analysis for June diversity and

Table 3

Zooplankton composition (in percentages) at the beginning and the end of the experiment during May.

GROUPS/SPECIES	9 May 1990	23 May 1990		
	Environment	CEPEX 1	CEPEX 2	CEPEX 3
COPEPODS				
<u>Acartia clausi</u>	9.72	25.19	3.13	
<u>Calocalanus pavoninus</u>	0.46			
<u>Centropages typicus</u>	0.93	0.74		
<u>Clausocalanus spp.</u>		1.11		
<u>Oithona spp.</u>	5.09			
<u>Corycella rostrata</u>	1.39			
<u>Cymbasoma sp.</u>	18.98			
Harpacticoida	0.93	60.37	78.13	80.00
<u>Oithona nana</u>	0.46			
<u>Oncaea media</u>		1.11		
<u>Paracalanus parvus</u>			3.13	
OTHERS				
Amphipods		2.22	12.50	20.00
Cirripedia nauplii	14.35	4.44		
Crustacea larvae	37.04			
Gastropod larvae	3.24			
Ichthyoplankton	2.78			
Medusae	1.85			
Ostracods		4.81		
Polychaete larvae	2.78		3.13	

dominance values showed that there was a significant difference between the samples (Fig. 3).

Phytoplankton abundance fluctuated within a wide range from some thousands (2.8×10^3 cells l^{-1}) to some millions (12.4×10^6 cells l^{-1}) (Fig. 4).

Micro-flagellates were the most abundant group ranging from 266.40×10^3 to 22910.4×10^3 cells l^{-1} . However, they were not included in total phytoplankton abundance since with the methods used it was not possible to discriminate between heterotrophic and autotrophic flagellates.

During the May experiment, the species composition in the enclosures was similar to that of the environment. In polluted bags (CEPEX 2 and CEPEX 3) there was a decline of phytoplankton population (Fig. 4a). On May 15, a phytoplankton bloom was observed in the environment; Cryptomonas sp. and various flagellates (Prasinophyceae) dominated the population. On the same day a high phytoplankton density also occurred in the control bag (CEPEX 1) which was attributed to the opportunistic flagellate Phaeocystis pouchetii and a small dinoflagellate (Gymnodinium sp.) (Fig. 5).

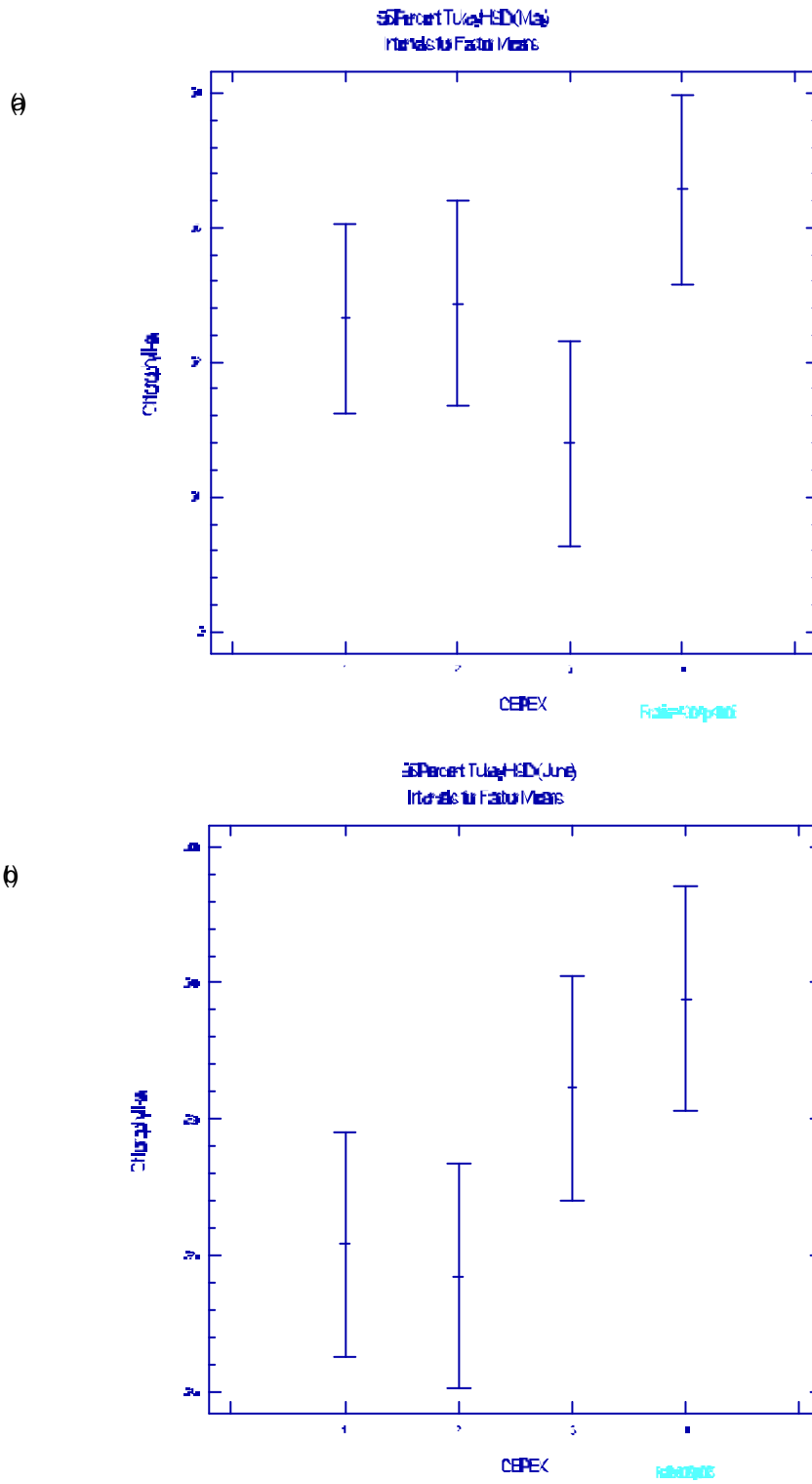


Fig. 2. ANOVA for Chl a values in the CEPEX 1,2,3 and 4 (environment)

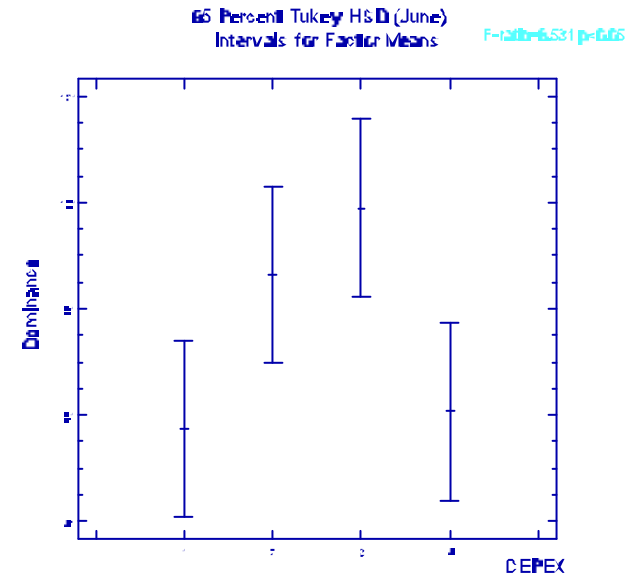
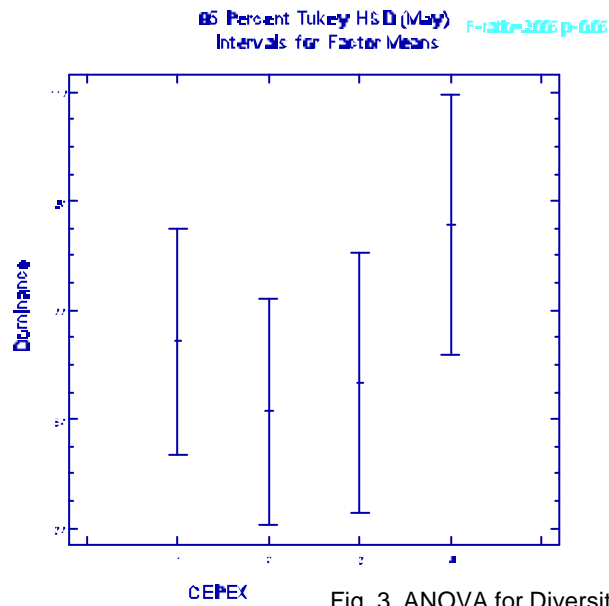
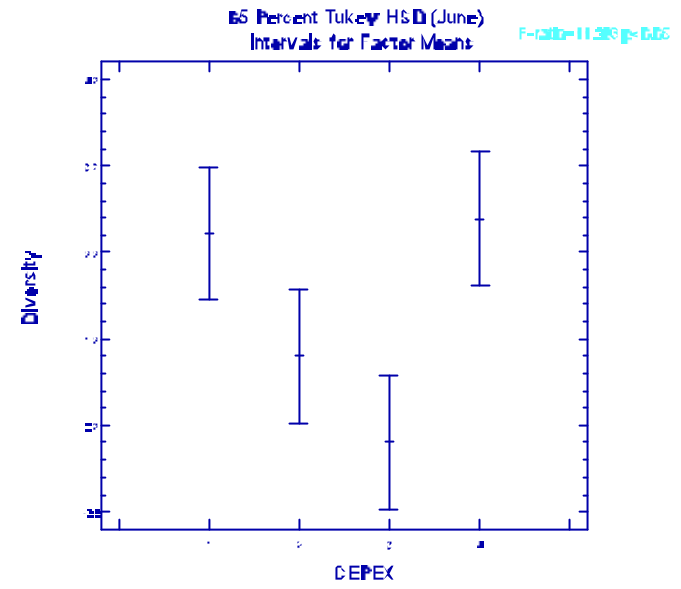
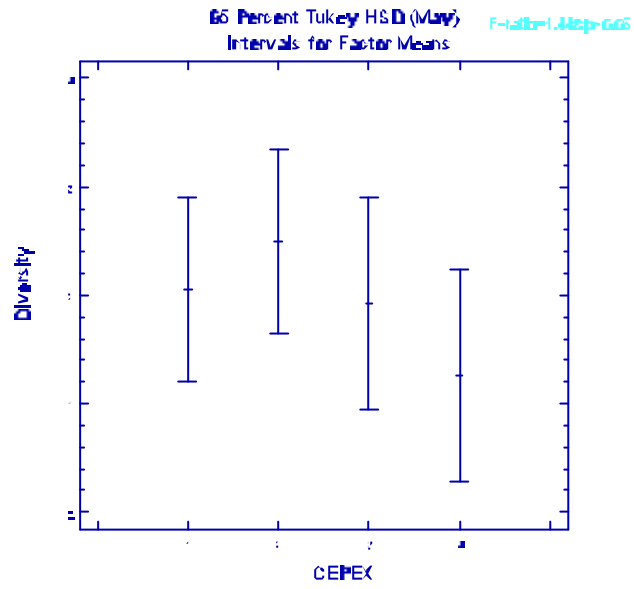


Fig. 3. ANOVA for Diversity and Dominance index values in the CEPEX 1, 2, 3 and 4 (environment)

In June, CEPEX 3 was strongly differentiated. A monospecific coccolithophore bloom (*Coccolithophore* sp.) was observed on the second day after the addition of oil and dispersant and persisted during the whole experimental period (Fig. 6). This species was also present in CEPEX 2, but did not dominate the population. In CEPEX 1 *Cryptomonas* sp., *Gymnodinium* spp. and flagellates were among the dominant species.

A phytoplankton bloom occurred in the region of Ag. Kosmas on 13 June 1990. Flagellates (*Cryptomonas* sp., Prasinophyceae) and *Leptocylindrus danicus* dominated the population. The enclosure bags did not follow this bloom. However, during the same day in CEPEX 1 a *Gymnodinium* sp. massive production occurred accompanied by flagellates (Fig. 6). Few large phytoplankton species were observed in the CEPEX samples. Most of the dominant species found in the enclosures measured between 5 and 10 μ .

The descriptive plotting of the k-dominance curves (Figs. 5, 6) showed that in CEPEX 2 and CEPEX 3 the number of species decreased. Signs of recovery are evident in CEPEX 2, 10 days after the addition of oil, when most of the oil became tar and descended to the bottom of the enclosure (Figs. 4a, 5).

In June, CEPEX 2 does not seem to be affected while CEPEX 3 is dominated by one species; two days later a considerable decrease in species number was observed in CEPEX 2 while the situation in CEPEX 3 remained the same (Figs. 4b, 6).

The dendrogram for the May experiment showed that environment, control (CEPEX 1) and oil polluted (CEPEX 2) samples are grouped together at a 50% similarity level (Fig. 7a). The CEPEX 3 polluted samples were not grouped with the above, moreover they did not show any significant similarity between them (Fig. 7a).

In June the environment and control samples gave a distinct cluster at a 48% similarity level; samples from CEPEX 3 were grouped at a 56% similarity level while two samples from CEPEX 2 were grouped at 59%. The 13 June sample from CEPEX 2 remained alone (Fig. 8a).

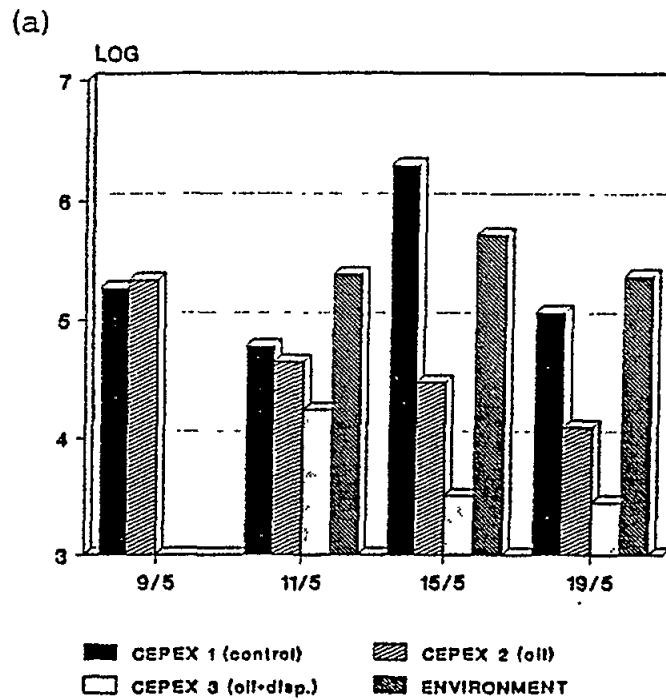
The MDS in both cases gave analogous groupings (Figs. 7b, 8b).

4. DISCUSSION

Oil and oil plus dispersant mixture had an effect on both phytoplankton and zooplankton populations. The difference in zooplankton composition between environment and control enclosure should be mainly attributed to the different sampling methods (tow-pump). Hence, harpacticoids dominate in the control enclosure.

Planktonic copepods are almost absent from polluted enclosures after 14 days of exposure, indicating the severe effect of the pollutants on this group. An interesting point is that harpacticoids (benthic copepods) and amphipods to a lesser degree, were encountered in the polluted bags at the end of the experiment. This fact may indicate the better tolerance of these organisms.

TOTAL PHYTOPLANKTON FROM 9-5-90. TO 19-5-90



TOTAL PHYTOPLANKTON FROM 9/6/90 TO 22/6/90

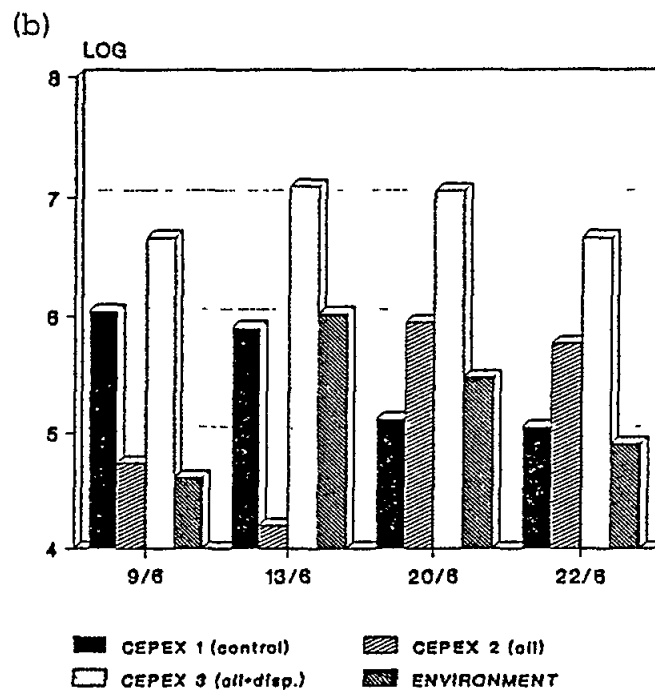


Fig. 4 Total number of phytoplankton cells l^{-1} (log) in the two experiments

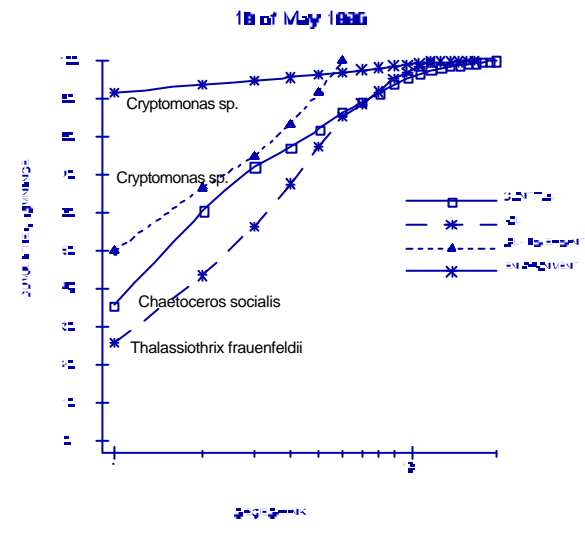
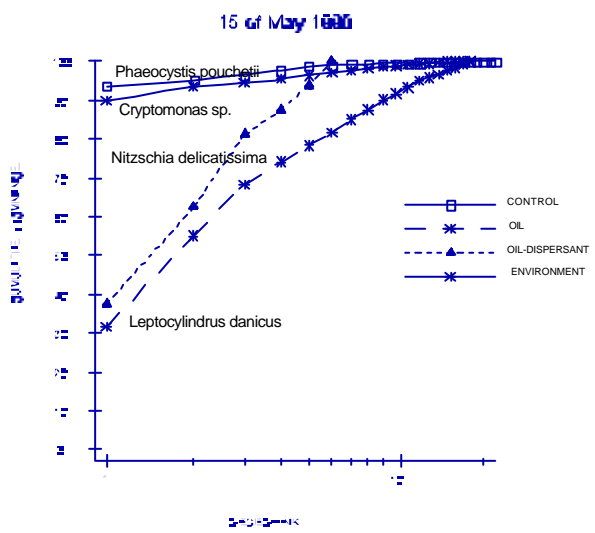
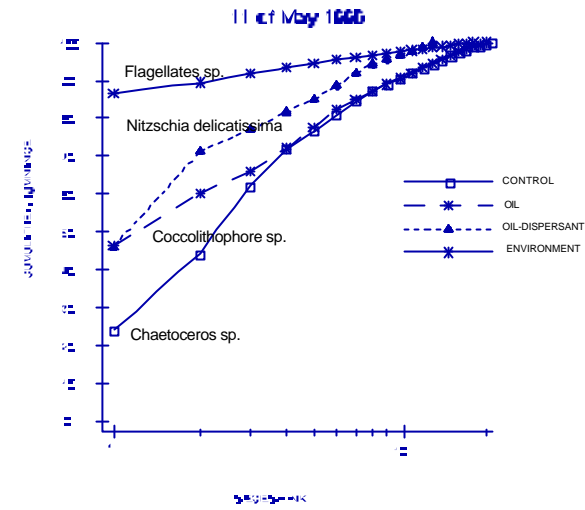
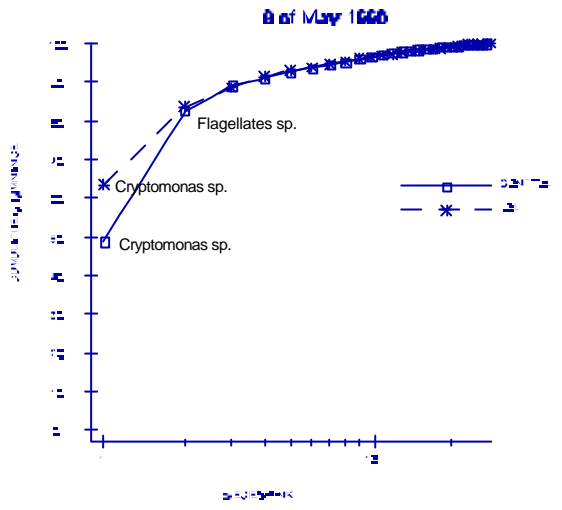


Fig. 5. Plot of k-dominance curves for abundance during May. The dominant species are indicated at each curve.

Fig. 4

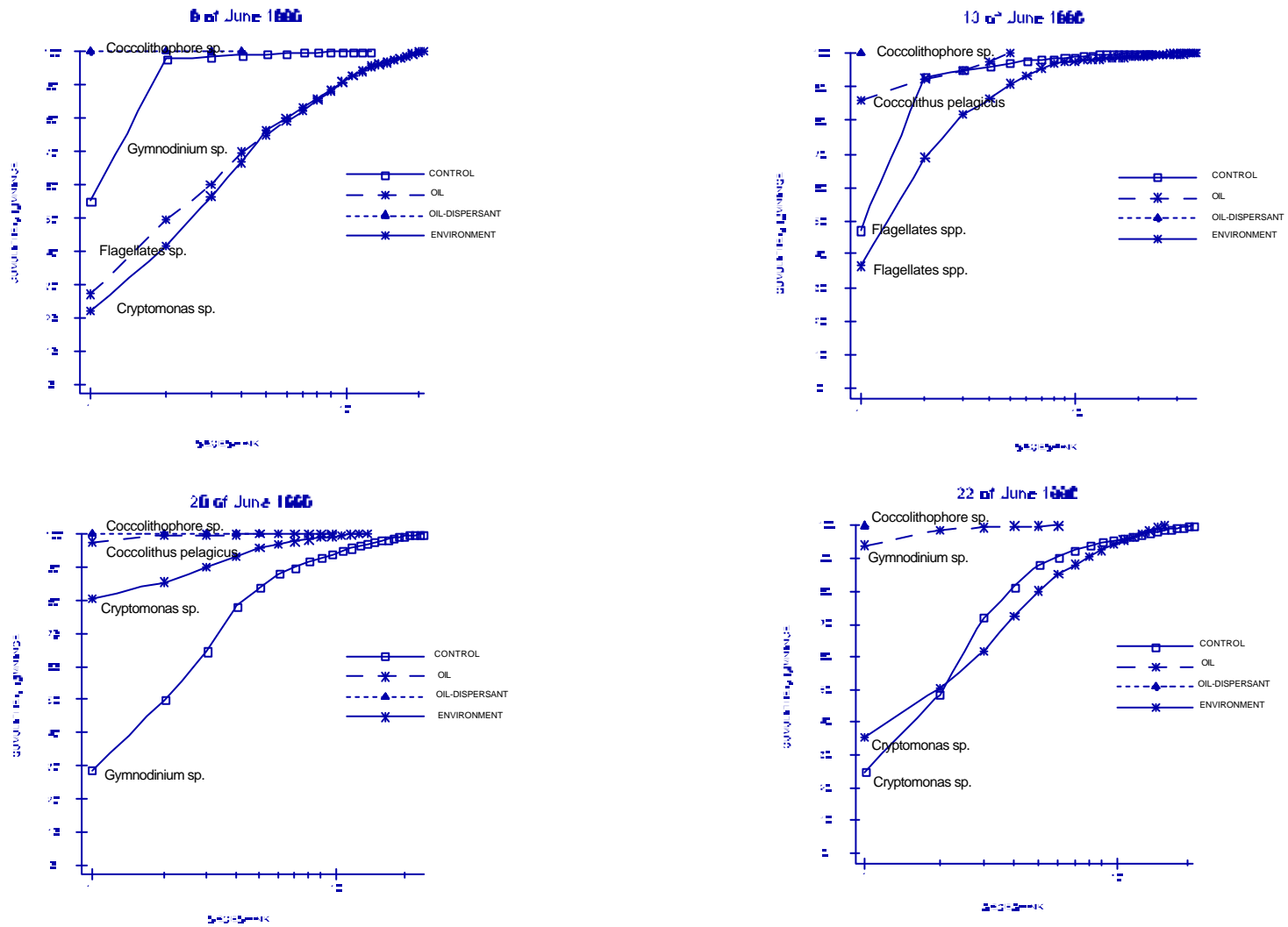


Fig. 6. Plot of k-dominance curves for abundance during June. The dominant species are indicated at each curve

Fig. 6

Fig. 6 Plot of k-dominance curves for abundance during June. The dominant species are indicated curve

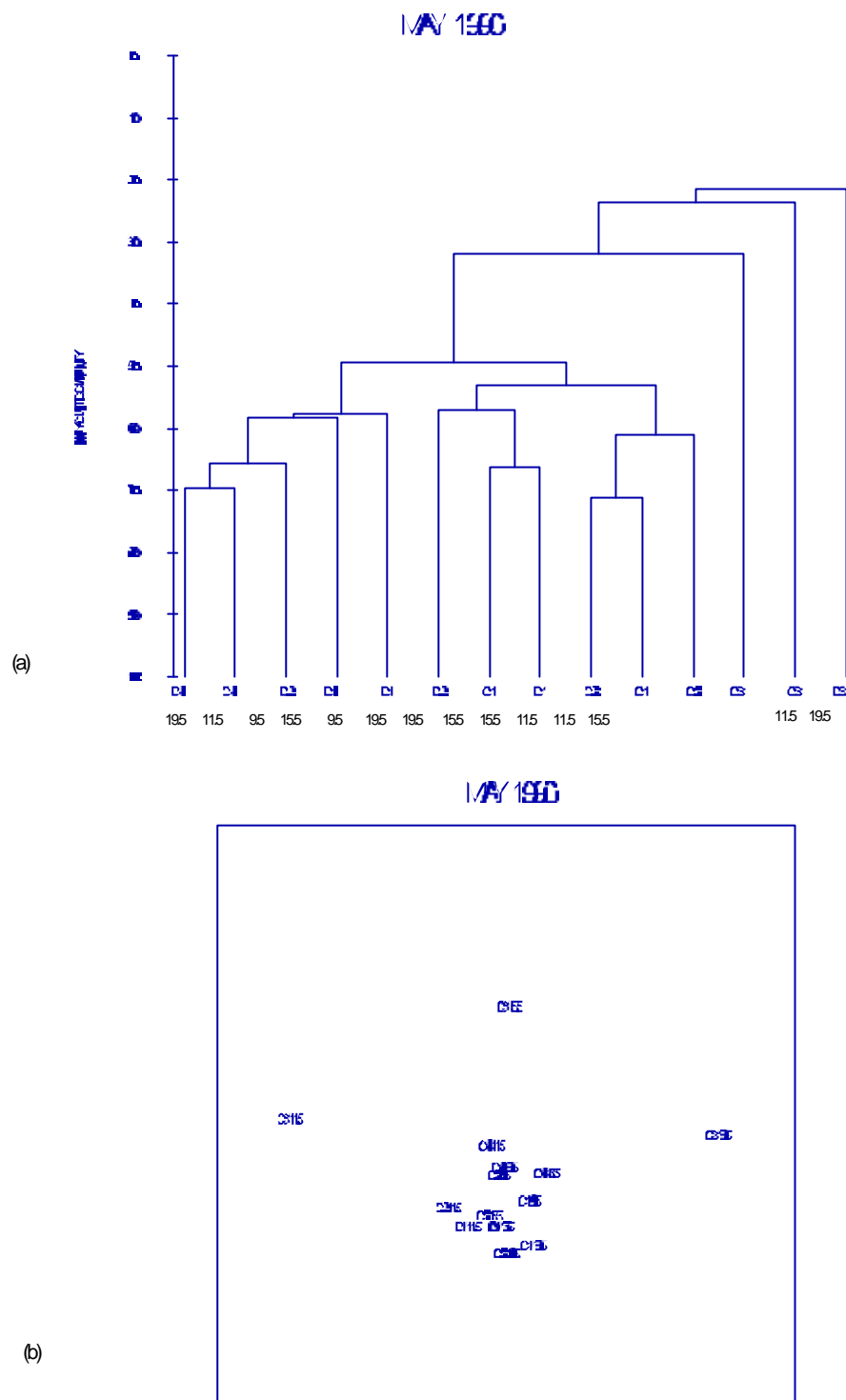


Fig. 7. Dendrogram and MDS plots based on Bray-Curtis similarity index

Fig. 7

It should also be mentioned that zooplankton abundance in the enclosures was 87 individuals m^{-3} for the CEPEX 1 and 10, and 5 ind. m^{-3} respectively, for the polluted enclosures (CEPEX 2 and CEPEX 3), showing the severe effect on zooplankton communities. The oil/dispersant mixture seems to be more toxic than oil.

Chlorophyll-a values fluctuated within a quite narrow range (from 0.1 to 0.58 $\mu g\ l^{-1}$), which suggests that heterotrophic forms (nanoflagellates, bacteria) apparently dominated the population; Vargo et al. (1982) in similar experiments observed that chlorophyll-a concentrations did not follow high cell concentrations. The above observation is more pronounced in the case of CEPEX 3 during the June experiment, when cell concentrations of 12×10^6 cells l^{-1} gave low chlorophyll-a values (0.365 $\mu g\ l^{-1}$). The pigment index in polluted enclosures showed some extremely high values which can be attributed to the presence of oil in the samples in connection with species poor in chlorophyll-a (coccolithophores) which dominated the population.

Previous experiments on the effects of oil on phytoplankton showed that water soluble fractions of crude oil, had no or little effect on the growth of phytoplankton populations (Bate and Crafford, 1985). Similar experiments using low concentrations of oil in mesocosms on a long term basis revealed that chlorophyll-a values initially decline, but later increased several times over the control (Elmgren et al., 1980; Elmgren and Frithsen, 1982). Similarly, measurements in the field showed that the phytoplankton biomass and primary production increased after an accidental oil spill (Lannergren, 1978; Linden et al., 1979; Elmgren and Frithsen, 1982). In addition, aromatic hydrocarbons proved to inhibit the photosynthetic capability of various phytoplankton species in laboratory experiments (Jensen et al., 1984; Bate and Crafford, 1985). In earlier studies, when most of the work dealt with the toxic effects, a concentration of 10^4 $\mu g\ l^{-1}$ appeared to be toxic for phytoplankton cultures (Dunstan et al., 1975). While this threshold level might be interesting physiologically, it is unlikely that such concentrations could ever occur in the sea, except possibly over a very short period.

In the experimental design of the present study, chlorophyll-a concentrations showed a relatively narrow range, and this could be attributed not only to the duration of the experiment (short-term) but also to the low chlorophyll-a values present in the environment (Christaki, 1990). Many investigators attributed the increased density of phytoplankton during oil spills to reduced zooplankton grazing (Lannergren, 1978; Elmgren and Frithsen, 1980; Kuiper, 1984). In the present study the increased phytoplankton density could not be attributed to the decrease in zooplankton grazing but to the interactions of different parameters in an oligotrophic environment. In addition, CEPEX 3 possibly bears the main responsibility for the differences observed for both months as it is shown in Figs. 2a and 2b. Differences in chlorophyll-a values were encountered during May and June. During May, CEPEX 3 had lower chlorophyll-a concentrations related to decreased population possibly due to toxic effects on the phytoplankton population in the beginning of the experiment and also due to the meteorological conditions. During June, chlorophyll-a values in CEPEX 3 were similar to the values found in the environment. However, these chlorophyll-a values did not follow the high phytoplankton density in CEPEX 3, which implies that heterotrophic forms and species poor in chlorophyll-a (coccolithophores) predominated the population.

During May the phytoplankton population showed a decrease which could be due to an adverse effect on the enclosure and/or the effect of the oil and the oil plus dispersant (CEPEX 2 and CEPEX 3 respectively). This phenomenon is explained clearly by analysis of variance (ANOVA). Statistical analysis, showed that there was no significant difference between the control, polluted and environment samples for the May experiment. During June, diversity and dominance values showed that there was a significant difference mainly between polluted and control samples. This could be partially attributed to the pollution effects in combination with the physical parameters (wind, seawater temperature), which triggered the population towards monospecific blooms. A significant environmental effect of oil on marine primary production could be the growth stimulation of particular species by low molecular weight aromatic compounds resulting in an alternation of the natural phytoplankton community structures and their trophic relationships (Dunstan et al., 1975).

Furthermore, phytoplankton diversity and species composition changed, in oil mesocosms, immediately after the start of oil additions; an increase of temperature also caused a parallel increase of phytoplankton biomass (Elmgren et al., 1980). It should be mentioned, however, that relevant experiments in the North Sea and the Baltic may give different results. This is expected since different environmental factors exist between northern and southern European seas.

The phytoplankton succession in control bags has been studied by numerous investigators and has given varied results (McAllister, et al., 1961; Antia et al., 1963; Takahashi et al., 1972; Brockmann et al., 1977; Kattner et al., 1983). However in most cases the results show that developments in enclosures and in the surrounding environment are comparable.

During the May experiment a decline of the phytoplankton population was observed in the polluted bags. However, species composition in the enclosures was similar to that of the environment. During June, CEPEX 3 was strongly differentiated due to a coccolithophore bloom. Similarity of the species composition, during May, between control, polluted and environmental samples was observed. However, since there was a decline of the number of species present in CEPEX 3, it seems that the susceptible species were eliminated by the pollution and/or depletion of nutrients. Reduced competition after the elimination of susceptible species was considered to enable tolerant organisms to maximize their reproductive potential (McCauley, 1966; Bate and Crafford, 1985). In addition a large number of bacteria was observed in the phytoplankton samples mainly from the CEPEX 2 and CEPEX 3 enclosures.

From the results that have been presented it appears that the decrease of the number of species observed in CEPEX 3 was more pronounced than in CEPEX 2 and CEPEX 1. Although species number remained low after the first 6 days of the experiment in CEPEX 3, the differentiation observed in CEPEX 1, in the middle of the experiment, should be attributed to the bloom of Phaeocystis puchetii. In CEPEX 1 and CEPEX 2 the number of species was similar. On the other hand the number of phytoplankton cells in CEPEX 2 was constantly decreasing. This was expected because of the short term effects (toxic effects and inhibition of growth) of the oil, since it was later transformed to tar (Elmgren et al., 1980; Grice and Reeve, 1982). To strengthen the above statement of the toxic effects it should be mentioned that the treatment of the oil with dispersant resulted immediately in very strong effects on all components of the ecosystem. Treatment therefore adds a possible toxic factor to the ecosystem (Kuiper, 1984).

During this experiment a high density of flagellate populations was observed in the environment, control and polluted samples in different instances, including a massive flagellate bloom which occurred in the coastal area on May 15.

In the June experiments the shifting of the phytoplankton population towards monospecific blooms was observed in the polluted bags and as it was mentioned above it could be attributed to pollution effects in combination with the environmental factors and the prevailing winds. No signs of recovery were evident, in contrast to the observations by Elmgren *et al.* (1980) and Grice and Reeve (1982), who reported indistinguishable phytoplankton communities after 3-4 weeks. Probably the duration of the present experiment did not allow any recovery within the limited period that the experiment took place. The phytoplankton cells in CEPEX 1 decreased with time, which is characteristic of a confined population (Brockmann *et al.*, 1977; Kattner *et al.*, 1983). As in the May experiment, in the environment, a flagellate bloom was observed but could not be correlated with any other bloom in the polluted bags. Similar results with the May experiments have also been observed for the number of species present in the enclosure bags, which may suggest that no differences occurred with respect to the different physical phenomena.

Results from Controlled Environmental Pollution Experiments (CEPEX) (Menzel and Case, 1977) have suggested that the presence of low concentrations of petroleum hydrocarbons in seawater may cause a shift from a phytoplankton community dominated by diatoms to one dominated by nanoflagellates (Vargo *et al.*, 1982). Such a shift may have severe consequences for higher trophic levels, affecting the composition of zooplankton and ultimately fish populations (Lannergren, 1978). K-dominance curves confirm these results. Phytoplankton abundance seems not to be much affected, regardless of whether the number of species in polluted bags decreased. Furthermore, k-dominance curves reveal the instability of this coastal environment (Christaki, 1990).

Flagellates are relatively more tolerant to oil (Bate and Crafford, 1985) in comparison to diatoms which are considered to be more sensitive (Hsaio, 1978).

Cluster analysis for the experiment conducted during May, revealed a group of environment, control and oil samples, while oil plus dispersant samples were not grouped with the above. Moreover they did not show a similarity between them. This must be attributed mainly to the quantitative differences of these samples. In June, three distinct clusters were formed. It was assumed that a higher temperature and mixing of the water by the wind were the main causes of these results. The mixing of the water by the wind seems to be the key factor of these processes. An explanation for the 13 June sample remaining alone, could be attributed to the results of oil on phytoplankton caused by mixing which occurred after this date. In the bags where the oil was completely dispersed, no signs of recovery were found during the experiment. This is in agreement with the findings of Kuiper (1984). Visual observations after treatment of the oil with dispersant showed that turbulence was the key factor in the dispersion procedure.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our thanks to Mr. K. Akepsimaidis, Mr. S. Christianidis, Mr.

P. Kiougioufas, Dr. K. Pagou and Dr. G. Verriopoulos for their help in the execution of this research project. Finally, we would like to mention that the project was implemented in the framework of the MED POL programme and that an MTF contribution was received through FAO.

6. REFERENCES

- Andersen, V., P. Nival and R.P. Harris (1987), Modelling of a planktonic ecosystem in an enclosed water column. J.Mar.Biol.Assoc.U.K., 67:404-30
- Antia, N.J., C.D. McAllister, T.R. Parsons, K. Stephens and J.D.H. Strickland (1963), Further measurements of primary production using a large-volume plastic sphere. Limnol.Oceanogr., 8:166-175
- Bate, G.C and S.D. Crafford (1985), Inhibition of phytoplankton photosynthesis by the WSF of used lubrication oil. Mar.Pollut.Bull., 16(10):401-404
- Bray, J.R. and J.T. Curtis (1957), An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. Ecol.Monogr., 27:325-349
- Brockmann, U.H., K. Eberlein, P. Hosumbek, H. Tageser, E. Maier-Reimer, H.K. Schone and H.D. Junge (1977), The development of a natural plankton population in an outdoor tank with nutrient-poor seawater. I. Phytoplankton succession. Mar.Biol., 43:1-17
- Christaki, U. (1990), Annual cycle of phytoplankton in a coastal area of Saronikos gulf. M.Sc. Thesis, University of Athens, 143 p.
- Christou E.D. (1990), Fluctuations of zooplankton during spring and summer in a coastal area of Saronikos gulf. In: Proceedings of the 3rd Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries, May 1990, Athens pp.513-520
- Dunstan, W.M., L.P. Atkinson and J. Natoli (1975), Stimulation and inhibition of phytoplankton growth by low molecular weight hydrocarbons. Mar.Biol., 31:305-310
- Elmgren, R. and J.B. Friithsen (1982), The use of experimental ecosystems for evaluating the environmental impact of pollutants: A comparison of an oil spill in the Baltic Sea and two long term low level addition experiments in mesocosms. In: Marine mesocosms: Biological and chemical research in experimental ecosystems, edited by G.D. Grice and M.R. Reeve, New York, Springer-Verlag Inc., pp.153-166
- Elmgren, R., G.A. Vargo, J.F. Grassle, J.P. Grassle, D.R. Heinle, G. Langlois and S.L. Vargo (1980), Trophic interactions in experimental marine ecosystems perturbed by oil. In: Microcosms in ecological research, edited by J.P. Giesy, Jr., Published by U.S. Technical Information Center, U.S. Department of energy, Symposium series 52 (CONF-781101) pp.779-800
- Grassle, J.F., R. Elmgren and J.P. Grassle (1981), Response of benthic communities in MERL experimental ecosystems to low level chronic additions of No.2 fuel oil. Mar.Environ.Res., 4:279-297

- Grice, G.D. and M.R. Reeve, eds (1982), Marine mesocosms: Biological and chemical research in experimental ecosystems. New York, Springer-Verlag Inc.
- Hsaio, S.I.C. (1978), Effects of crude oils on the growth of arctic marine phytoplankton. Environ.Pollut., 13:109-118
- Jensen, K., S.M. Pedersen and G.A. Nielsen (1984), The effect of aromatic hydrocarbons on the productivity of various marine planktonic algae. Limnologica, (Berlin) 15(2):581-584
- Kattner, G., K.D. Hammer, K. Eberlein, U.H. Brockmann, J. Jahnke and M. Krause (1983), Nutrient and plankton development in Rosfjorden and enclosed ecosystem captured from changing water bodies during POSER. Mar.Ecol.Prog.Ser., 14:29-43
- Kuiper, J. (1984), The fate and effects of dispersants and dispersant-treated crude oil in marine model ecosystems with different mixing regimes. Report R84/167 of TNO for the Commission of the European Communities, Directorate General for Environment, Consumer protection and Nuclear safety 79 p.
- Kuiper, J. and A.O. Hanstveit (1984), Fate and effects of 3,4-dichloroaniline (DCA) in marine plankton communities in experimental enclosures. Ecotoxicol.Environ.Safety, 8:34-54
- Kuiper, J., H. Van het Groenewoud and G. Hoornsman (1982), Diurnal variations of some plankton parameters in an enclosed marine community. Neth.J.Sea Res., 16:345-352
- Kuiper, J., P.A.W.J. de Wilde and W.J. Wolff (1984), Effects of an oil spill in outdoor model tidal flat ecosystems. Mar.Pollut.Bull., 15:102-106
- Lannergren, C. (1978), Net- and nanoplankton: Effects of an oil spill in the North Sea. Bot.Mar., 21:353-356
- Linden, O., R. Elmgren, and P. Boehm (1979), The Tsesis oil spill: Its Impact on the coastal ecosystem of the Baltic sea. Ambio, 8:244-253
- Margalef, R. (1958), Information theory in ecology. General Systems, 3:36-71
- Margalef, R. (1965), Ecological correlations and the relationship between primary productivity and community structure. Mem.Ist.Ital.Idrobiol., 18:355-364 (suppl.)
- McAllister, C.D., T.R. Parsons, K. Stephens and J.D.H. Strickland (1961), Measurements of primary production in a coastal seawater using a large volume plastic sphere. Limnol.Oceanogr., 6:237-258
- McCauley, R.N. (1966), The biological effects of oil pollution in a river. Limnol.Oceanogr., 1:475-486
- McNaughton, S.J. (1967), Relationships among functional properties of California grassland, Nature (Lond.), 216:168-169

- Menzel, D.W. and J. Case (1977), Concept and design: Controlled Ecosystem Pollution Experiment. Bull.Mar.Sci., 27:1-7
- Skjoldal, H.R., T. Dale, H. Haldorsen, B. Pengerud, T.F. Thingstad, K. Tjessem and A. Aaberg (1982), Oil pollution and plankton dynamics. 1. Controlled ecosystem experiment during the 1980 spring bloom in Lindaspollene, Norway. Neth.J.Sea Res., 16:511-523
- Takahashi, M., W.H. Thomas, D.L.R. Seibert, J. Beers, P. Koeller and T.R. Parsons (1972), The replication of biological events in enclosed water columns. Arch.Hydrobiol., 76:5-23
- UNESCO/SCOR (1966), Determination of photosynthetic pigments in seawater. Report of UNESCO-SCOR Working group 17, UNESCO, Paris, 69 p.
- Utermohl, H. (1958), Neue Wege in der Erfassung der Planctons. Vehr.Int.Ver. Theor.Angew.Limnol., 5:567-596
- Vargo, G.A., M. Hutchins and G. Almquist (1982), The effect of low, chronic levels of No.2 fuel oil on natural phytoplankton assemblages in microcosms: 1. Species composition and seasonal succession. Mar. Environ.Res., 6:245-264

BIOACCUMULATION STUDIES AND PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
RESPONSES IN MARINE ORGANISMS EXPOSED TO HEAVY METALS AND
POLYCHLORINATED BIPHENYLS

by

Laura TALLANDINI, Margherita TURCHETTO and Vincenzo ALBERGONI

Department of Biology
University of Padova, Italy

ABSTRACT

This paper reports some data regarding the experimental exposure of Zosterisessor ophiocephalus to different PCB or Cd levels. As for PCB exposure, the survival and the hepatic sufference index, the PCB uptake and Cyt. P-450 levels were estimated. As for Cd exposure, the metal uptake in the liver and gill in different seasons was measured and the rate correlated both to GPX Se-dependent and Se-non dependent actiity, and to Cyt. P-450 levels. The presence of Cd-protein complexes is also reported.

1. INTRODUCTION

The work was focused on heavy metal and PCB metabolism, with an aim to study toxicity mechanisms and regulative abilities of marine organisms. Simultaneous exposure to more than one xenobiotic, which is the situation encountered in the environment, can induce complex, antagonistic or synergistic effects in these organisms.

It is well known that in many polluted areas, including the Venice lagoon in the northern Adriatic sea, there are high levels of both metals and PCBs.

In order to study the effects of these xenobiotics on marine organisms, a large number of experiments have been carried out exposing marine fish, Zosterisessor ophiocephalus, *in vivo* to Cd and PCB. It was of interest to study pollutant effects not only as regards the direct effects, but also with regard to the levels and activities of biological compounds and enzymes, which are essential in the metabolism of natural and xenobiotic substances.

The aim of this proejct was, therefore, to study Cd and PCB levels and uptake in Zosterisessor ophiocephalus, the effects on Cyt. P-450, Glutathione Peroxidase (GPX) activity, Glutathione (as GSH and GSSG) concentrations and Cd binding complex induction.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Selection of the experimental species

Zosterisessor ophiocephalus Pall., a teleostean fish, whose biology is well known, was selected due to the fact that it lives in both polluted and unpolluted lagoons and coastal areas of

the Adriatic sea. It could therefore be possible to extend studies on pollutant effects from the laboratory to the field. Specimens were collected from a relatively unpolluted area in the Venice lagoon. The PCB and Cd content was measured in the organisms before experimental exposure and was found to be reasonably low.

Fish were kept at 20 to 22°C in glass tanks containing 100 l sea water (salinity 35‰), provided with a continuously filtered and aerated recirculating water system. The water volume to organism number ratio was 6:1. Fish were acclimated for two weeks before exposure. During the experiments xenobiotic levels were continuously monitored and adjusted.

For each series of experiments, fish specimens were kept in clean water for control purposes. All fish were fed with mussel tissue.

2.2 Exposure to PCB

Fish were exposed to PCB (Aroclor 1254) at a nominal level of 10 ppb (actual 2.4 ppb) for 15 days and at a nominal 1 ppb (actual 0.1 ppb) for 30 days. PCB was administered either in the water or in both the water and the food (mussels) which had previously been contaminated with PCB. The PCB levels in contaminated mussels were respectively $3.1 \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight in the 10 ppb exposure and $0.32 \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight in the 1 ppb exposure. After 0, 7, 15, 30 and 45 days fish were removed for the assays.

The survival and hepatic sufficiency index (SLI) were estimated; PCB uptake was assayed by ECD gas chromatography; Cd, Cu and Zn tissue concentration was measured by Atomic Absorption Spectroscopy. The Cytochrome P-450 concentration was determined by the Estabrook and Werringloer (1978) method.

2.3 Exposure to Cd

In the Cd exposure experiments, about 100 specimens of Z. ophiocephalus for each experiment were exposed to Cd as CdCl_2 ; experiments were repeated in different periods of the year, namely in spring and in autumn. Cd exposure took place either by direct uptake from the water (contact exposure) or by intraperitoneal injection (i.p.). Subacute Cd concentrations (0.1 ppm for the contact exposure) or doses (0.7 mg kg^{-1} ww, total dose for i.p. administration) were used. After contact treatment, fish were sacrificed and examined after 0, 7, 15, 30, 45 and 60 days of exposure; in the i.p. exposure, the total Cd dose was administered by three distinct injections and the fish were sacrificed after one, two or three injections.

The concentration of Cd, Cu and Zn, was measured in the liver and in the gills. Hepatic Glutathione (GSH+GSSG) levels were determined according to Anderson (1985). GPX activity both Se and not Se dependent, was measured according to Gunzler et al. (1974). The Cyt. P-450 concentration was also determined in the liver.

Cd binding complexes were studied in liver postmicrosomal supernatant in the presence of phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), through classic gel chromatography (Sephadex G 75) and ionic exchange (DEAE DE Cellulose, DEAE Sephacel, FPLC).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Exposure to PCB

Exposure to PCB at an effective concentration of 2.4 ppb produced after 15 days a significant accumulation of PCB in the liver, while exposure for 30 days to 0.1 ppb did not show any significant accumulation (Fig. 1). The Somatic Liver Index (SLI) showed little difference between treated and control specimens. The liver concentration of PCB was found to be related to Cyt. P-450 levels ($P < 0.01$) even at the lower PCB concentrations observed (Fig. 2).

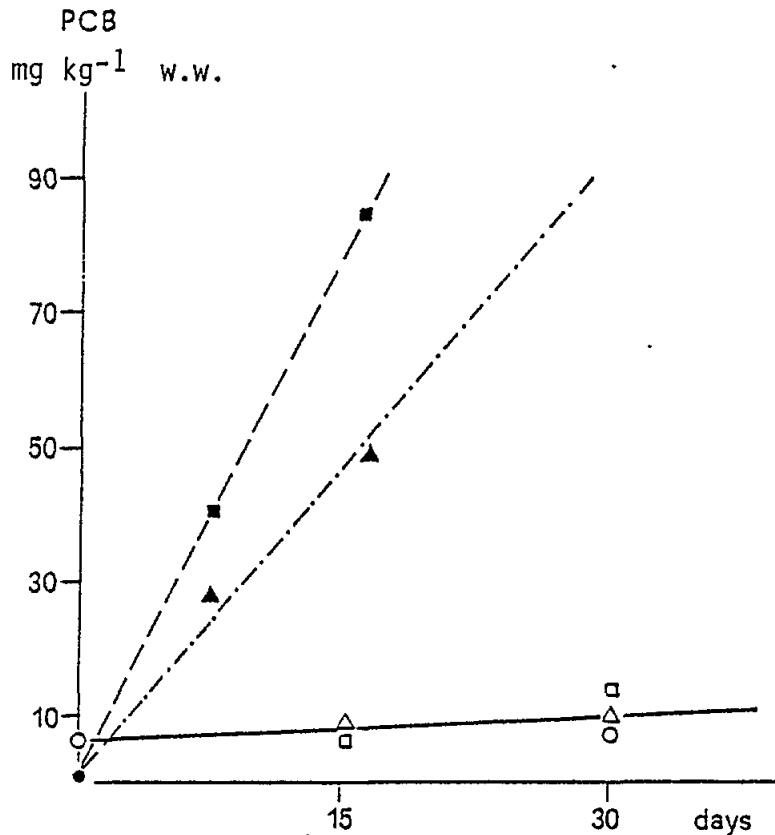


Fig. 1 PCB levels in the liver as a result of: (a) exposure to PCB 1 ppb nominal concentration (0.1 ppb actual concentration) O = control, Δ = PCB in water, □ = PCB in water and food; (b) exposure to PCB 10 ppb nominal concentration (2.4 ppb actual concentration) ● = control, ▲ = PCB in water, ■ = PCB in water and food

From these experiments it appears that up to certain PCB concentrations the mixed function oxidase (MFO) system is able to metabolize the xenobiotic so that a control of the PCB concentration is achieved.

The experimental model in this study was chosen with the intention to simulate the natural situation as closely as possible. Fish living in contaminated marine waters generally receive small continuous doses of PCBs through the water and/or their diet; thus, in the experiments described, fish were exposed to low levels of PCB in water and were fed on mussel tissues having a PCB concentration which reflects actual environmental levels. PCB residues from 0.06 to 0.12 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet wt. were reported in mussel tissues from the lagoon of Venice (Fossato and Craboleda, 1979).

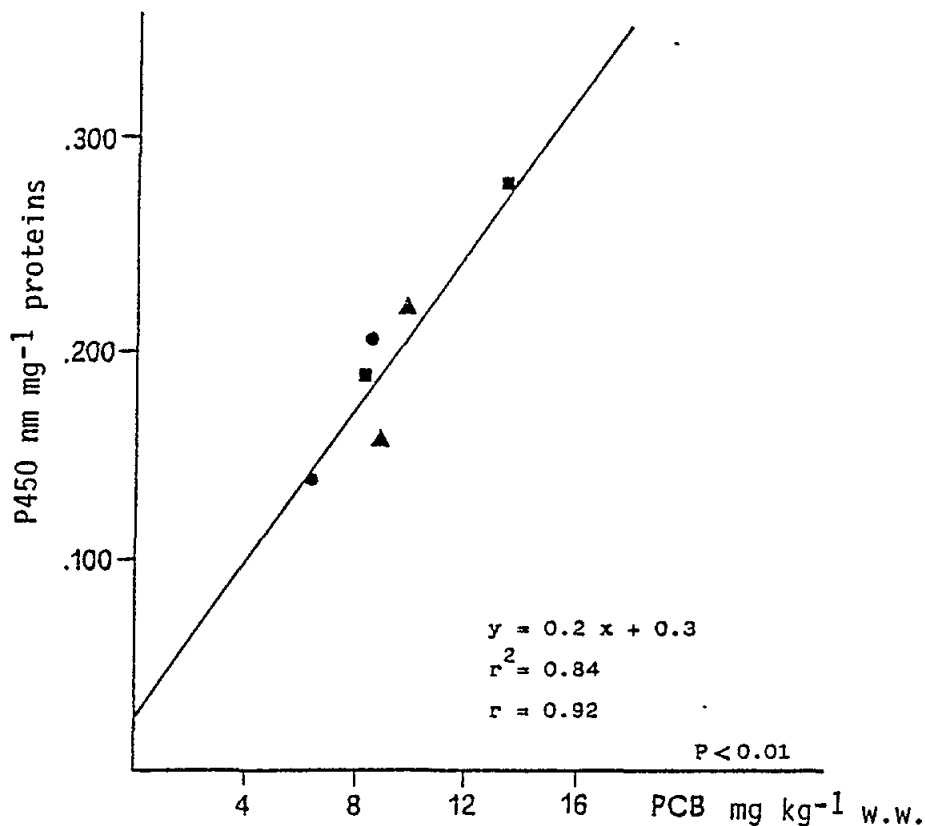


Fig. 2 Correlation between PCB levels and P-450 induction after exposure to PCB 1 ppb nominal concentration (0.1 ppb actual concentration)
● = controls, ▲ = PCB in water, ■ = PCB in water and food

Laboratory conditions quite different from those which the fish would encounter in nature (high dosage levels of pollutant injected intra-peritoneally in fish or administered through food), were adopted by Melancon and Lech (1983) and Hung Stahl *et al.* (1984). These studies established that PCBs are effective in inducing MFO enzymatic activity in the liver of marine fish and dose-response relationships were found when fish were injected or administered via food with high doses of PCBs (Addison *et al.*, 1978; Hansen *et al.*, 1982; Nasci *et al.*, 1991). However, it is generally recognized that further studies are necessary before accurate estimations can be made of the extent of MFO induction in fish caused by exposure to PCBs in the environment; in particular it is of interest to determine the liver levels of PCBs which are effective in causing an induction of hepatic MFO activity.

3.2 Exposure to cadmium

The hepatic Cd concentration increased remarkably with exposure to the metal both by contact exposure and by i.p. injection. Exposure to 0.1 ppm Cd for up to 45 days lead to a continuous uptake of the metal in the liver.

Cd uptake in the liver was different between spring and autumn. In spring the Cd concentration in the liver was for both modes of exposure higher than in autumn. The mean weight of the liver was also different in the two

seasons, due to lipid accumulation in the autumn, which can be related to winter metabolic requirements. In spring, the liver weight and lipid content was lower than in the autumn. The Cd hepatic content after Cd contact exposure was $10 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. in spring and about $2 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. in autumn. After i.p. injection the Cd concentration was about $40 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. in spring and $12 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. in autumn. It seems therefore that Cd uptake in the liver is not increased by lipid enrichment.

The Cd levels in the gill and liver for the two modes of exposure, performed in autumn are shown in Fig. 3. After 60 days of exposure to the metal in water the maximum Cd content was $2 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. in the liver and $1.75 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. in the gill. After i.p. injections, up to $1 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. of Cd was measured in the gill, i.e. 1% of the total administered metal, while up to $12 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w., i.e. 70% out of the total injected Cd was measured in the liver.

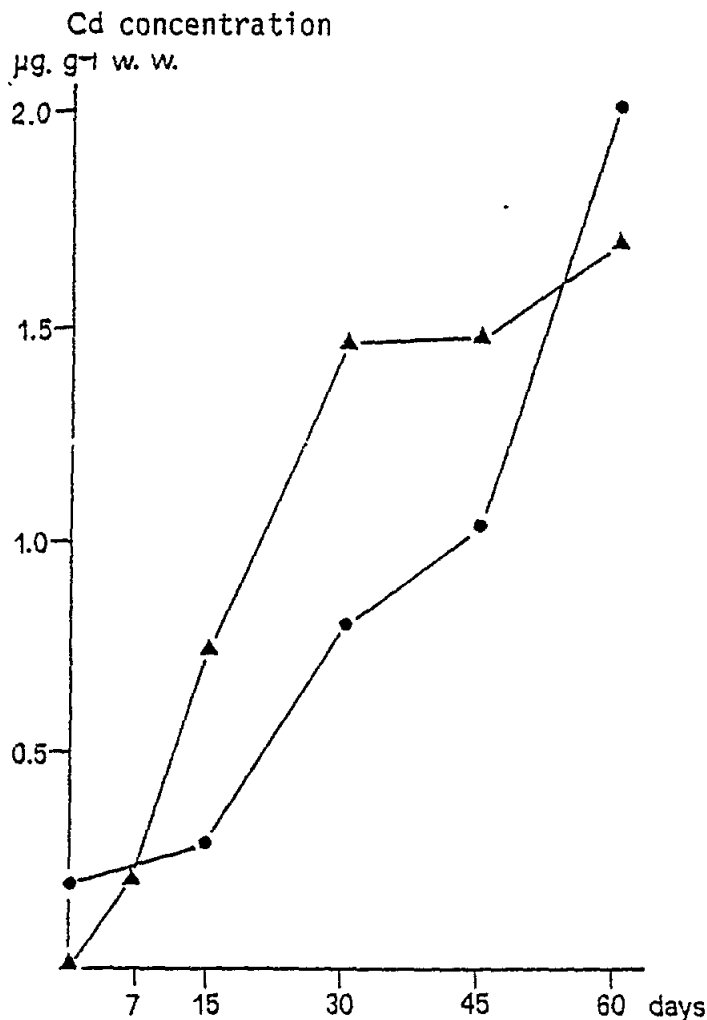


Fig. 3 Cd accumulation in the liver (- ● -) and gills (- ▲ -) after exposure to Cd in water (Cd concentration: 0.1 ppm)

It can therefore be concluded that the fate of the metal in the two modes of exposure is not equivalent. The relative ratios of the recovered metal in the two examined organs were in fact quite distinct. It seems that by contact

exposure the organism has the ability to partially regulate Cd uptake, through the gill and the other involved epithelia, while, in the second mode of exposure, in which Cd uptake can not be avoided, it appears that the liver acts as a detoxifying sink for the metal. A similar situation was reported for rainbow trout, Salmo gairdneri (Kay et al., 1986) in spite of the great difference of the environmental conditions in which S. gairdneri and Z. ophiocephalus live. The response to Cd exposure, by contact or i.p. injection was similar in both studies; after Cd environmental exposure the gill and liver play comparable roles in Cd uptake. On the contrary, the liver appeared to be the main acceptor site after i.p. injection, sequestering up to 90% out of total administered metal. This fact confirms the observation made on Zosterisessor, involving the possibility that in fish the liver plays a detoxication role in the presence of Cd.

As previously reported (Tallandini et al., 1987; Tallandini et al., 1989a, b), the levels of Cytochrome P-450 decreased during contact Cd exposure and the inverse correlation between Cd concentration and Cyt. P-450 levels was very significant ($P < 0.01$) (Fig. 4). The enzyme concentration also decreased sharply, down to 50% of control values, after Cd i.p. injection (Table 1).

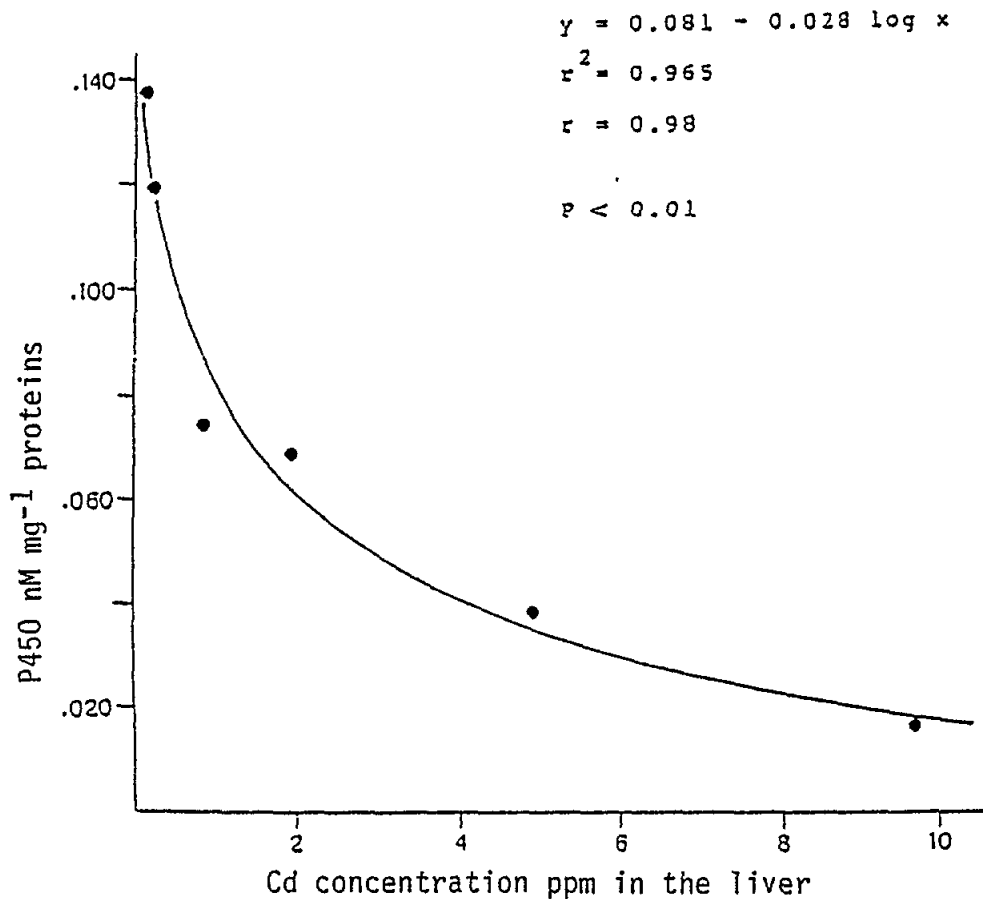


Fig. 4 Correlation between P-450 levels and Cd accumulation in the liver after contact exposure to Cd (Cd concentration in water: 0.1 ppm). Samples collected at different time intervals

Table 1

Cd i.p. injection. Cd and Cyt. P-450 hepatic levels. In C, only physiological saline solution was injected.

a = fish treated with this dose died

nd = not determined

CdCl ₂ Doses (µg g ⁻¹)	INJECTIONS			Cd (µg g ⁻¹)	Cyt. P-450 (nM mg ⁻¹ prot.)
	1	2	3		
C	+	+	+	-	.184
0.22	+	+	+	13.5	.084
0.45	+	+	-	nd	nd
0.90	+	-a	-a	nd	nd
	hr 0	72	144		

Cd microsomal levels did not increase in relation to metal exposure; it seems therefore that Cd does not have a direct effect on the enzyme molecule, but that, more generally, the enzyme turnover is altered inside the cell. Xenobiotic accumulation could result from the lowering of the MFO system concentration.

GPX Se dependent and non-dependent activities decreased by about 10% after Cd i.p. injection (Table 2). After contact exposure statistically significant results were not detected. An inhibitory effect on GPX by Cd, both *in vitro* and *in vivo*, has also been reported for mammalian tissues (Omaye and Tappel, 1975; Flohè *et al.*, 1976; Splittgerber and Tappel, 1979); the data presented in this study confirm these indications. It seems therefore that after contact exposure the Cd level in the liver is not high enough to be effective. Hepatic glutathione levels increased sharply, up to six-fold, with respect to the controls, after i.p. injection, while after 60 days of contact exposure a two-fold slow increase, from 60 µg g⁻¹ w.w. to 110 µg g⁻¹ w.w., was

Table 2

GPX activity (nM min⁻¹ mg⁻¹ protein) after Cd exposure by i.p. injection.

		C	1st inj.	2nd inj.	3rd inj.	mean	
CHP	Controls	1008	1062	1041	1141	1063±14.1	p<0.01
	Treated		939	911	950	933±6.7	
H ₂ O ₂	Controls	428	388	382	437	409±6.9	P<0.01
	Treated		371	358	360	362±2.6	

detected. As previously reported, during contact exposure, hepatic Cd levels increase very slowly in comparison to i.p. injection exposure. A strict correlation between Cd content and GSH levels can therefore be suggested. The sharp difference observed in the GSH levels for the two distinct modes of exposure can thus be explained on the basis of the first line defense role against Cd, attributed to GSH (Higashi *et al.*, 1977; Tallandini *et al.*, 1989a, b).

Cd-protein complexes, with an apparent molecular weight of 10,000 were increasingly induced in both modes of exposure. These complexes constituted the major Cd ligand fractions, which were initiated after 15 days of contact exposure or after the second i.p. injection. The 10,000 peak from both modes of exposure was resolved after ionic exchange into two isomeric components. The FPLC elution profile of the first of the two isomers appears almost devoid of aromatic amino acids (Figs. 5 and 6) (Tallandini *et al.*, 1990).

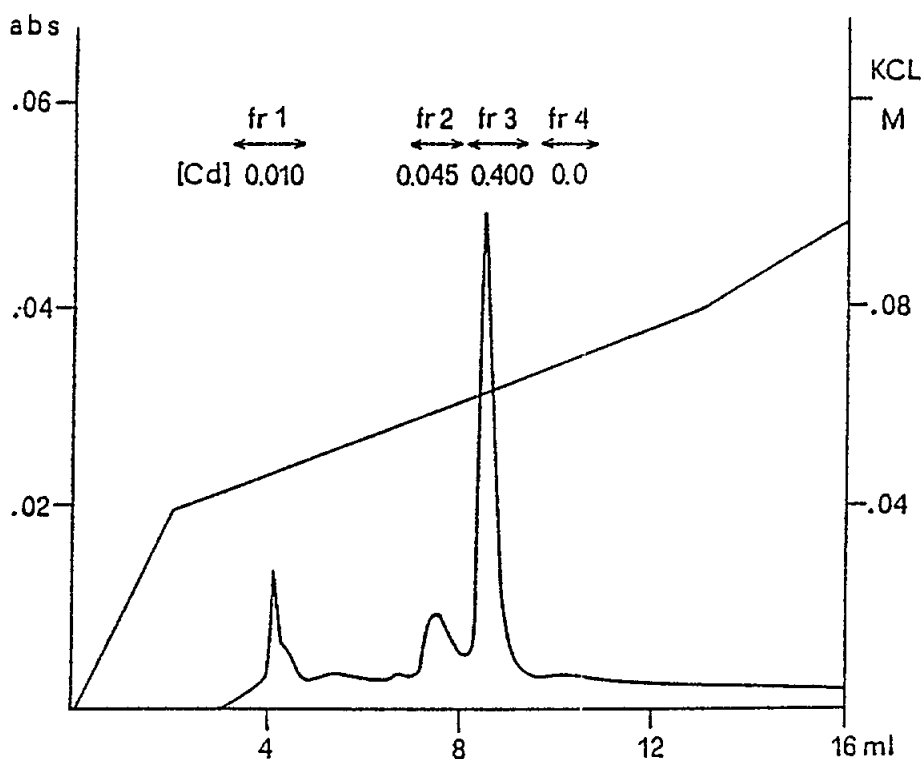


Fig. 5 FPLC elution profile of fraction I of Cd binding proteins from DEAE-DE 52 cellulose. Tris-HCl 10 mM pH 8.6 buffer, 0-0.4 KCl gradient. Cd concentration expressed as $\mu\text{g ml}^{-1}$

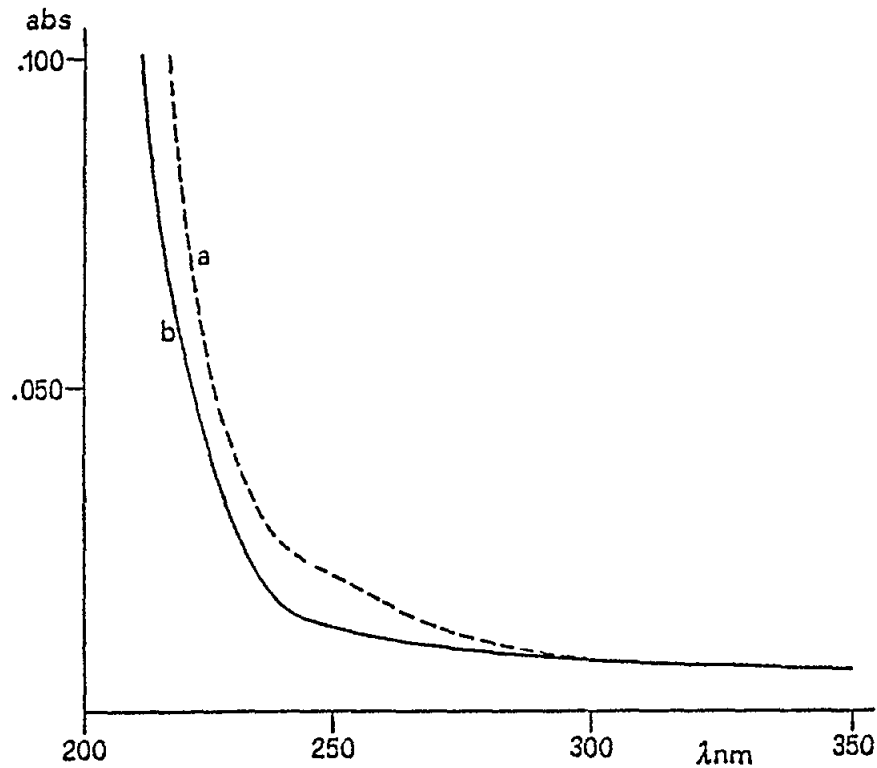


Fig. 6 Absorption spectrum of Cd binding protein fraction 3 after FPLC elution, at pH. 8.6 (a) and after acidification (b)

4. REFERENCES

- Addison, R.F., M.E. Zinck and D.E. Willis (1978), Induction of hepatic mixed function oxidase (MFO) enzyme in trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding Arochlor 1254 or 3-methylcholantrene. Comp.Biochem.Physiol., 61C:323-325
- Anderson, M.E. (1985), Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol., 113:548-555
- Estabrook, E.W. and J. Werringloer (1978), The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. Methods Enzymol., LII:212-220
- Flohè, L.Z., W.A. Gunzler and R. Ladenstein (1976), Glutathione peroxidase. In: Glutathione: Metabolism and function, edited by I.M. Arias and W.B. Jakoby, New York, Raven Press, pp.115-138
- Fossato, V.U. and L. Craboleda (1979), Chlorinated hydrocarbons in mussels *Mytilus sp.* from the laguna Venta. Arch.Oceanogr.Limnol., 19:169-178
- Gunzler, W.A., H. Kremers and L.Z. Flohè (1974), An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. Z.Klin.Chem. Klin.Biochem., 12:444-448

- Hansen, P.D., R.F. Addison and D.E. Willis (1982), Hepatic microsomal O-deethylases in cod (Gadus morhua). Their induction of Roachlor 1254 but not by Arochlor 1016. Comp.Biochem.Physiol., 74C:173-175
- Higashi, T., N. Tateishi, A. Naruse and Y. Sakamoto (1977), A novel physiological role of liver glutathione as a reservoir of L-cysteine. J.Biochem., 82:117-124
- Hung Stahl, C., C.L. Sultatos and C.S. Hacker (1984), Mixed function oxidase studies in the redfish Sciaenops ocellata, from Galveston Bay, Texas. Comp.Biochem.Physiol., 79C:177-182
- Kay, J., D.G. Thomas, M.W. Brown, A. Cryer, D. Shubern, J.F. Solbe and J.S. Garvey (1986), Cadmium accumulation and protein binding patterns in tissue of the rainbow trout, Salmo gairdneri. Environ.Health Persp., 65:133-139
- Melancon, M.J. and J.J. Lech (1983), Dose effect relationship for induction of hepatic monooxygenase activity in rainbow trout and carp by Arochlor 1254. Aquat.Toxicol., 4:51-61
- Nasci, C., G. Campesan, U.V. Fossato, L. Tallandini and M. Turchetto (1991), Induction of cytochrome P-450 and mixed function oxygenase activity by low concentrations of polychlorinated biphenyls in marine fish Zosterisessor ophiocephalus (Pall.). Aquat.Toxicol., 19:281-290
- Omaye, S.T. and A.L. Tappel (1975), Effect of cadmium chloride on the rat testicular soluble selenoenzyme, glutathione peroxidase. Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol., 12:695-711
- Splittgerber, A.G. and A.L. Tappel (1979), Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. Arch.Biochem.Biophysiol., 197:534-542
- Tallandini, L., M. Turchetto, G. Campesan and C. Nasci (1987), Interaction between heavy metals and organic pollutants: effects on enzymatic systems. In: Meccanismi di attivazione e tossicit  degli xenobiotici, I.S.S., Roma, 14 p.
- Tallandini, L., M. Turchetto, G. Campesan and C. Nasci (1989a), Uptake and distribution of cadmium in fish: Effects and metabolism. In: Current trends in trace element research, edited by Chazot, Abdulla and Arnaud, London, Smith Gordon and Co., pp.47-48
- Tallandini, L., M. Turchetto, O. Coppellotti and C. Marcassa (1989b), Response to cadmium in fish (Zosterisessor ophiocephalus Pall.) by different routes: intracellular interaction. In: Heavy metals in the environment, edited by J.P. Vernet, Edinburgh, C.E.P. Consultants Ltd., 1:487-490
- Tallandini, L., M. Turchetto, O. Coppellotti and C. Marcassa (1990), Cadmium uptake in fish. Metabolic effects and cadmium complexes. Mar.Environ.Res., 28:222-224

PUBLICATIONS OF THE MAP TECHNICAL REPORTS SERIES

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 (96 pages) (parts in English, French or Spanish only).
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 (220 pages) (parts in English, French or Spanish only).
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 (128 pages) (parts in English, French or Spanish only).
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 (118 pages) (parts in English, French or Spanish only).
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 (146 pages) (parts in English or French only).
6. UNEP/IOC: Problems of coastal transport of pollutants (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (English only).
7. UNEP/WHO: Coastal water quality control (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parts in English or French only).
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 (42 pages) (parts in English or French only).
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 (66 pages) (English only).
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 (276 pages) (English only).
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 (118 pages) (English only).
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 (158 pages) (parts in English or French only).
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 (162 pages) (parts in English or French only).

13. UNEP: Specific topics related to water resources development of large Mediterranean 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 (162 pages) (parts in English or French only).
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 (500 pages) (parts in English or French only).
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 (101 pages) (English only).
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 (424 pages) (parts in English or French only).
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 (247 pages) (parts in English or French only).
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 (354 pages) (English and French).
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 (130 pages) (English and French).
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 (156 pages) (English only).
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 (200 pages) (parts in English or French only).
22. UNEP/FAO: Study of ecosystem modifications in areas influenced by pollutants (Activity I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parts in English or French only).
23. UNEP: National monitoring programme of Yugoslavia, Report for 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (English only).
24. UNEP/FAO: Toxicity, persistence and bioaccumulation of selected substances to marine organisms (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parts in English or French only).

25. UNEP: The Mediterranean Action Plan in a functional perspective: A quest for law and policy. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (English only).
26. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean Region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (English only).
27. UNEP: Implications of expected climate changes in the Mediterranean Region: An overview. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (English only).
28. UNEP: State of the Mediterranean marine environment. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (English only).
29. UNEP: Bibliography on effects of climatic change and related topics. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (English only).
30. UNEP: Meteorological and climatological data from surface and upper measurements for the assessment of atmospheric transport and deposition of pollutants in the Mediterranean Basin: A review. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (English only).
31. UNEP/WMO: Airborne pollution of the Mediterranean Sea. Report and proceedings of a WMO/UNEP Workshop. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parts in English or French only).
32. UNEP/FAO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parts in English or French only).
33. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of organotin compounds as marine pollutants in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (English and French).
34. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by cadmium and cadmium compounds. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (English and French).
35. UNEP: Bibliography on marine pollution by organotin compounds. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (English only).
36. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (French only).
37. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with eutrophication and plankton blooms (Activity H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parts in English or French only).
38. UNEP: Common measures adopted by the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (English, French, Spanish and Arabic).
39. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organohalogen compounds. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (English and French).

40. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activities H,I and J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (English and French).
41. UNEP: Wastewater reuse for irrigation in the Mediterranean region. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (English and French).
42. UNEP/IUCN: Report on the status of Mediterranean marine turtles. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (English and French).
43. UNEP/IUCN/GIS Posidonia: Red Book "Gérard Vuignier", marine plants, populations and landscapes threatened in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (French only).
44. UNEP: Bibliography on aquatic pollution by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (English only).
45. UNEP/IAEA: Transport of pollutants by sedimentation: Collected papers from the first Mediterranean Workshop (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 December 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (English only).
46. 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 rotavirus-induced gastroenteritis among bathers (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46, UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (English only).
47. UNEP: Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II workshop on jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parts in English or French only).
48. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parts in English or French only).
49. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants. Survival of pathogens. Final reports on research projects (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991 (71 pages) (parts in English or French only).
50. UNEP: Bibliography on marine litter. MAP Technical Reports Series No. 50. UNEP, Athens, 1991 (62 pages) (English only).
51. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with mercury, toxicity and analytical techniques. MAP Technical Reports Series No. 51. UNEP, Athens, 1991 (166 pages) (parts in English or French only).
52. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with bioaccumulation and toxicity of chemical pollutants. MAP Technical Reports Series No. 52. UNEP, Athens, 1991 (86 pages) (parts in English or French only).
53. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on epidemiological study on bathers from selected beaches in Malaga, Spain (1988-1989). MAP Technical Reports Series No. 53. UNEP, Athens, 1991 (127 pages) (English only).

54. UNEP/WHO: Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants (Activity A): Final reports on selected microbiological projects. MAP Technical Reports Series No. 54. UNEP, Athens, 1991 (83 pages) (English only).
55. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K): Final report on project on survival of pathogenic organisms in seawater. MAP Technical Reports Series No. 55. UNEP, Athens, 1991 (95 pages) (English only).
56. UNEP/IOC/FAO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by persistent synthetic materials which may float, sink or remain in suspension. MAP Technical Reports Series No. 56. UNEP, Athens, 1991 (113 pages) (English and French).
57. UNEP/WHO: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G): Final reports on projects dealing with carcinogenicity and mutagenicity. MAP Technical Reports Series No. 57. UNEP, Athens, 1991 (59 pages) (English only).
58. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 58. UNEP, Athens, 1991 (122 pages) (English and French).
59. UNEP/FAO/IAEA: Proceedings of the FAO/UNEP/IAEA Consultation Meeting on the Accumulation and Transformation of Chemical contaminants by Biotic and Abiotic Processes in the Marine Environment (La Spezia, Italy, 24-28 September 1990), edited by G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 59. UNEP, Athens, 1991 (392 pages) (English only).
60. UNEP/WHO: Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants (Activity A): Final reports on selected microbiological projects (1987-1990). MAP Technical Reports Series No. 60. UNEP, Athens, 1991 (76 pages) (parts in English or French only).
61. UNEP: Integrated Planning and Management of the Mediterranean Coastal Zones. Documents produced in the first and second stage of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 61. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1991 (437 pages) (parts in English or French only).
62. UNEP/IAEA: Assessment of the State of Pollution of the Mediterranean Sea by Radioactive Substances. MAP Technical Reports Series No. 62, UNEP, Athens, 1992 (133 pages) (English and French).
63. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K) - Survival of Pathogens - Final reports on Research Projects (1989-1991). MAP Technical Reports Series No. 63, UNEP, Athens, 1992 (86 pages) (French only).
64. UNEP/WMO: Airborne Pollution of the Mediterranean Sea. Report and Proceedings of the Second WMO/UNEP Workshop. MAP Technical Reports Series No. 64, UNEP, Athens, 1992 (246 pages) (English only).
65. UNEP: Directory of Mediterranean Marine Environmental Centres. MAP Technical Reports Series No. 65, UNEP, Athens, 1992 (351 pages) (English and French).
66. UNEP/CRU: Regional Changes in Climate in the Mediterranean Basin Due to Global Greenhouse Gas Warming. MAP Technical Reports Series No. 66, UNEP, Athens, 1992 (172 pages) (English only).

67. UNEP/IOC: Applicability of Remote Sensing for Survey of Water Quality Parameters in the Mediterranean. Final Report of the Research Project. MAP Technical Reports Series No. 67, UNEP, Athens, 1992 (142 pages) (English only).
68. UNEP/FAO/IOC: Evaluation of the Training Workshops on the Statistical Treatment and Interpretation of Marine Community Data. MAP Technical Reports Series No. 68. UNEP, Athens, 1992 (221 pages) (English only).
69. UNEP/FAO/IOC: Proceedings of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms (Malta, 10-14 September 1991), edited by G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 69. UNEP, Athens, 1992 (287 pages) (English only).
70. UNEP/IAEA/IOC/FAO: Organohalogen Compounds in the Marine Environment: A Review. MAP Technical Reports Series No. 70. UNEP, Athens, 1992 (49 pages) (English only).
71. UNEP/FAO/IOC: Selected techniques for monitoring biological effects of pollutants in marine organisms. MAP Technical Reports Series No. 71. UNEP, Athens, 1993 (189 pages) (English only).
72. UNEP: Costs and Benefits of Measures for the Reduction of Degradation of the Environment from Land-based Sources of Pollution in Coastal Areas. A - Case Study of the Bay of Izmir. B - Case Study of the Island of Rhodes. MAP Technical Reports Series No. 72. UNEP, Athens, 1993 (64 pages) (English only).
73. UNEP/FAO: Final Reports on Research Projects Dealing with the Effects of Pollutants on Marine Communities and Organisms. MAP Technical Reports Series No. 73. UNEP, Athens, 1993 (186 pages) (English and French).
74. UNEP/FIS: Report of the Training Workshop on Aspects of Marine Documentation in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 74. UNEP, Athens, 1993 (38 pages) (English only).
75. UNEP/WHO: Development and Testing of Sampling and Analytical Techniques for Monitoring of Marine Pollutants (Activity A). MAP Technical Reports Series No. 75. UNEP, Athens, 1993 (90 pages) (English only).
76. UNEP/WHO: Biogeochemical Cycles of Specific Pollutants (Activity K): Survival of Pathogens. MAP Technical Reports Series No. 76. UNEP, Athens, 1993 (68 pages) (English and French).
77. UNEP/FAO/IAEA: Designing of monitoring programmes and management of data concerning chemical contaminants in marine organisms. MAP Technical Reports Series No. 77. UNEP, Athens, 1993 (236 pages) (English only).
78. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with eutrophication problems. MAP Technical Reports Series No. 78. UNEP, Athens, 1994 (139 pages) (English only).

PUBLICATIONS "MAP TECHNICAL REPORTS SERIES"

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 (96 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
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 (220 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
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 (128 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
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 (118 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
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 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
6. PNUE/COI: Problèmes du transfert des polluants le long des côtes (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (anglais seulement).
7. PNUE/OMS: Contrôle de la qualité des eaux côtières (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parties en anglais ou français seulement).
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 (42 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. PNUE: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED Add. POL VIII). Addendum, Croisière Océanographique de la Grèce 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (anglais seulement).
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 (276 pages) (anglais seulement).
10. PNUE: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de 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 (118 pages) (anglais seulement).
11. PNUE: Réhabilitation 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 (158 pages) (parties en anglais ou français seulement).
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 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).

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 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).
14. PNUE: L'expérience des villes historiques de la Méditerranée dans le processus intégré de réhabilitation 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 (500 pages) (parties en anglais ou français seulement).
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 (101 pages) (anglais seulement).
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 (424 pages) (parties en anglais ou français seulement).
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 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
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 (354 pages) (anglais et français).
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 (130 pages) (anglais et français).
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 (156 pages) (anglais seulement).
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 (200 pages) (parties en anglais ou français seulement).
22. PNUE/FAO: Etude des modifications de l'écosystème dans les zones soumises à l'influence des polluants (Activité I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
23. PNUE: Programme national de surveillance continue pour la Yougoslavie, Rapport pour 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (anglais seulement).

24. PNUE/FAO: Toxicité, persistance et bioaccumulation de certaines substances vis-à-vis des organismes marins (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parties en anglais ou français seulement).
25. PNUE: Le Plan d'action pour la Méditerranée, perspective fonctionnelle; une recherche juridique et politique. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (anglais seulement).
26. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (anglais seulement).
27. PNUE: Implications des modifications climatiques prévues dans la région méditerranéenne: une vue d'ensemble. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (anglais seulement).
28. PNUE: Etat du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (anglais seulement).
29. PNUE: Bibliographie sur les effets des modifications climatiques et sujets connexes. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (anglais seulement).
30. PNUE: Données météorologiques et climatologiques provenant de mesures effectuées dans l'air en surface et en altitude en vue de l'évaluation du transfert et du dépôt atmosphériques des polluants dans le bassin méditerranéen: un compte rendu. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (anglais seulement).
31. PNUE/OMM: Pollution par voie atmosphérique de la mer Méditerranée. Rapport et actes des Journées d'étude OMM/PNUE. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
32. PNUE/FAO: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parties en anglais ou français seulement).
33. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation des composés organostanniques en tant que polluants du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (anglais et français).
34. PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le cadmium et les composés de cadmium. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (anglais et français).
35. PNUE: Bibliographie sur la pollution marine par les composés organostanniques. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (anglais seulement).
36. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (français seulement).
37. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche consacrés à l'eutrophisation et aux efflorescences de plancton (Activité H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parties en anglais ou français seulement).

38. PNUE: Mesures communes adoptées par les Parties Contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (anglais, français, espagnol et arabe).
39. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution par les composés organohalogénés. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (anglais et français).
40. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activités H, I et J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (anglais et français).
41. PNUE: Réutilisation agricole des eaux usées dans la région méditerranéenne. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (anglais et français).
42. PNUE/UICN: Rapport sur le statut des tortues marines de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (anglais et français).
43. PNUE/UICN/GIS Posidonie: Livre rouge "Gérard Vuignier" des végétaux, peuplements et paysages marins menacés de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (français seulement).
44. PNUE: Bibliographie sur la pollution aquatique par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (anglais seulement).
45. PNUE/AIEA: Transfert des polluants par sédimentation: Recueil des communications présentées aux premières journées d'études méditerranéennes (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 décembre 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (anglais seulement).
46. 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 la gastroentérite provoquée par le rotavirus entre les baigneurs (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46. UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (anglais seulement).
47. PNUE: Les proliférations de méduses en Méditerranée. Actes des 11èmes journées d'étude sur les méduses en mer Méditerranée. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parties en anglais ou français seulement).
48. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parties en anglais ou français seulement).
49. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques. Survie des Pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche (activité K). MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991 (71 pages) (parties en anglais ou français seulement).
50. PNUE: Bibliographie sur les déchets marins. MAP Technical Reports Series No. 50. UNEP, Athens, 1991 (62 pages) (anglais seulement).

51. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant du mercure, de la toxicité et des techniques analytiques. MAP Technical Reports Series No. 51. UNEP, Athens, 1991 (166 pages) (parties en anglais ou français seulement).
52. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant de la bioaccumulation et de la toxicité des polluants chimiques. MAP Technical Reports Series No. 52. UNEP, Athens, 1991 (86 pages) (parties en anglais ou français seulement).
53. 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 l'étude épidémiologique menée parmi les baigneurs de certaines plages à Malaga, Espagne (1988-1989). MAP Technical Reports Series No. 53. UNEP, Athens, 1991 (127 pages) (anglais seulement).
54. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continue des polluants marins (Activité A): Rapports finaux sur certains projets de nature microbiologique. MAP Technical Reports Series No. 54. UNEP, Athens, 1991 (83 pages) (anglais seulement).
55. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Rapport final sur le projet sur la survie des microorganismes pathogènes dans l'eau de mer. MAP Technical Reports Series No. 55. UNEP, Athens, 1991 (95 pages) (anglais seulement).
56. PNUE/COI/FAO: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les matières synthétiques persistantes qui peuvent flotter, couler ou rester en suspension. MAP Technical Reports Series No. 56. UNEP, Athens, 1991 (113 pages) (anglais et français).
57. PNUE/OMS: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la cancérogénicité et la mutagénicité. MAP Technical Reports Series No. 57. UNEP, Athens, 1991 (59 pages) (anglais seulement).
58. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 58. UNEP, Athens, 1991 (122 pages) (anglais et français).
59. PNUE/FAO/AIEA: Actes de la réunion consultative FAO/PNUE/AIEA sur l'accumulation et la transformation des contaminants chimiques par les processus biotiques et abiotiques dans le milieu marin (La Spezia, Italie, 24-28 septembre 1990), publié sous la direction de G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 59. UNEP, Athens, 1991 (392 pages) (anglais seulement).
60. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continue des polluants marins (Activité A): Rapports finaux sur certains projets de nature microbiologique (1987-1990). MAP Technical Reports Series No. 60. UNEP, Athens, 1991 (76 pages) (parties en anglais ou français seulement).
61. PNUE: Planification intégrée et gestion des zones côtières méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première et de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 61. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1991 (437 pages) (parties en anglais ou français seulement).

62. PNUE/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les substances radioactives. MAP Technical Reports Series No. 62, UNEP, Athens, 1992 (133 pages) (anglais et français).
63. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K) - Survie des pathogènes - Rapports finaux sur les projets de recherche (1989-1991). MAP Technical Reports Series No. 63, UNEP, Athens, 1992 (86 pages) (français seulement).
64. PNUE/OMM: Pollution par voie atmosphérique de la mer Méditerranée. Rapport et actes des deuxièmes journées d'études OMM/PNUE. MAP Technical Reports Series No. 64, UNEP, Athens, 1992 (246 pages) (anglais seulement).
65. PNUE: Répertoire des centres relatifs au milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 65, UNEP, Athens, 1992 (351 pages) (anglais et français).
66. PNUE/CRU: Modifications régionales du climat dans le bassin méditerranéen résultant du réchauffement global dû aux gaz à effet de serre. MAP Technical Reports Series No. 66, UNEP, Athens, 1992 (172 pages) (anglais seulement).
67. PNUE/COI: Applicabilité de la télédétection à l'étude des paramètres de la qualité de l'eau en Méditerranée. Rapport final du projet de recherche. MAP Technical Reports Series No. 67, UNEP, Athens, 1992 (142 pages) (anglais seulement).
68. PNUE/FAO/COI: Evaluation des ateliers de formation sur le traitement statistique et l'interprétation des données relatives aux communautés marines. MAP Technical Reports Series No. 68. UNEP, Athens, 1992 (221 pages) (anglais seulement).
69. PNUE/FAO/COI: Actes de l'Atelier FAO/PNUE/COI sur les effets biologiques des polluants sur les organismes marins (Malte, 10-14 septembre 1991), publié sous la direction de G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 69. UNEP, Athens, 1992 (287 pages) (anglais seulement).
70. PNUE/AIEA/COI/FAO: Composés organohalogénés dans le milieu marin: Une synthèse. MAP Technical Reports Series No. 70. UNEP, Athens, 1992 (49 pages) (anglais seulement).
71. PNUE/FAO/COI: Techniques sélectionnées de surveillance continue des effets biologiques des polluants sur les organismes marins. MAP Technical Reports Series No. 71. UNEP, Athens, 1993 (189 pages) (anglais seulement).
72. PNUE: Coûts et bénéfices des mesures pour la réduction de la dégradation de l'environnement des sources de pollution d'origine tellurique dans les zones côtières. A -Etude de cas de la baie d'Izmir. B - Etude de cas de l'île de Rhodes. MAP Technical Reports Series No. 72. UNEP, Athens, 1993 (64 pages) (anglais seulement).
73. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant des effets de polluants sur les communautés et les organismes marins. MAP Technical Reports Series No. 73. UNEP, Athens, 1993 (186 pages) (anglais et français).
74. PNUE/FIS: Rapport de l'Atelier de formation sur les aspects de la documentation marine en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 74. UNEP, Athens, 1993 (38 pages) (anglais seulement).
75. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continué des polluants marins (Activité A). MAP Technical Reports Series No. 75. UNEP, Athens, 1993 (90 pages) (anglais seulement).
76. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogènes. MAP Technical Reports Series No. 76. UNEP, Athens, 1993 (68 pages) (anglais et français).

77. PNUE/FAO/AIEA: Conception des programmes de surveillance continue et de gestion des données concernant les contaminants chimiques dans les organismes marins. MAP Technical Reports Series No. 77. UNEP, Athens, 1993 (236 pages) (anglais seulement).
78. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant des problèmes de l'eutrophisation. MAP Technical Reports Series No. 78. UNEP, Athens, 1994 (139 pages) (anglais seulement).



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:

Coordinating 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 PNUE 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