

## M-V3

### Uptake, distribution and biological effects of Cadmium in the unicellular marine Alga *Acetabularia acetabulum*

D. VAN DER BEN\*, C. VANDENHOUTEN\*\*, C. KAREZ\*\*\*,  
S. PUISEUX-DAO\*\*\*, W. BAEYENS\* and S. BONOTTO\*

\* Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, 1040 Bruxelles (Belgium)

\*\* Département de Biologie, Universitaire Instelling Antwerpen, 2610 Wilrijk (Belgium)

\*\*\* INSERM, Unité 303 "Mer et Santé", 06230 Villefranche-sur-Mer (France)

\* Department of Biology, C.E.N.-S.C.K., 2400 Mol (Belgium)

\*\* Laboratoire de Cytophysiologie Végétale et de Toxicologie Cellulaire, Université de Paris VII, 75251 Paris (France)

#### ABSTRACT

Uptake and cellular distribution of cadmium in the green marine alga *Acetabularia acetabulum* (= *A. mediterranea*) were studied by using the gamma emitting isotope Cd109. This radioelement enters the cell, where it binds to organic compounds. Parallel experiments have shown that morphogenesis and cell regeneration are sensitive to cadmium poisoning.

#### 1. INTRODUCTION

It is well known that important amounts (about 10 million kg) of cadmium are annually brought to the oceans from the atmosphere and from the rivers (Seeliger et al., 1988). Since, according to the classification of Förstner and Wittmann (1981), cadmium belongs to the group of very toxic elements, it is of interest to investigate its uptake, distribution and biological effects in marine organisms. *Acetabularia acetabulum* is a giant unicellular marine alga, which is particularly suitable for studying the effects of toxic compounds (Arapis et al., 1988). The large size of the cell (several cm in length) allows a rapid visual screening of inhibitory effects (on growth and cap formation) and of cytotoxicity. In this paper are summarized the main results of recent experiments on the uptake and biological effects of cadmium in this organism.

#### 2. RESULTS AND DISCUSSION

Accumulation and desorption of cadmium in *Acetabularia acetabulum* was studied by using Cd109, a gamma emitting isotope which decays into stable Ag109 with a half-life of 464 days. After short (a few hours), exposures, the release of Cd109 was nearly complete, suggesting that little or no cadmium was fixed by the cell under these conditions. After a 7 days incubation, concentration factors (CFs) comprised between 500 and 800 were found. These values are similar to that reported for *Dunaliella bioculata* (CF = 300) by Saraiva and Fraizier (1975). It was ascertained that Cd109 accumulation is not due to adsorption to the polysaccharidic (mannan) cell wall, by differential centrifugation of labelled homogenates. Column chromatography on Sephacryl S-200 of buffered cell extracts (2 M NaCl, 5 M Urea, 0.02 M Tris HCl, pH = 7.5) has revealed that Cd109 becomes associated with both high (> 50 kdaltons) and low (< 10 kdaltons) molecular weight organic molecules. Enzymatic digestion with proteinase K has shown that the high molecular weight compounds capable of binding Cd109 are mainly constituted by proteins. Early studies have demonstrated that Cd combines with -SH groups, competes with and displaces Zn in a number of Zn-containing metalloenzymes by irreversibly binding to active sites (Förster and Wittmann, 1981). Possibly, a similar process occurs also in *Acetabularia*. The nature of the low molecular weight compounds which bind Cd109 deserves further investigations. Recently, a class of small, cysteine-rich peptides capable of binding heavy metals via thiolate coordination, named phytochelatin, were found in *Euglena gracilis* and *Ochromonas danica* as well as in yeasts and higher plants (Grill et al., 1985, 1986, 1987; Piccinini et al., 1985). It would be worth searching whether phytochelatin are present also in *Acetabularia*. Several experiments on whole and anucleate cells and on regenerating basal fragments have revealed that this alga is sensitive to cadmium poisoning. Inhibitory effects on cell regeneration were observed already at 0.1 mg/l (fig. 1A, arrows). At higher concentrations, inhibition of cell regeneration is stronger and no whorls are formed at the apex of the fragments (fig. 1B). In preliminary experiments, the calculated LD50 for whole and anucleate cells and for regenerating basal fragments, after a 48 hours treatment, were respectively 1, 0.5 and 0.8 mg/l. These results suggest that *Acetabularia* may be useful as test organism for studies on environmental pollution by heavy metals.

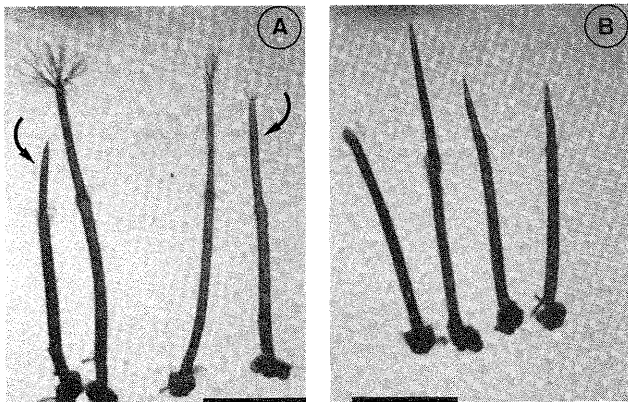


Fig.1. Inhibitory effects of cadmium on the regeneration of *Acetabularia* (basal fragments), after a 11 days treatment. A : 0.1 mg/l ; B : 1 mg/l. Scale = 2.5 mm.

#### 3. ACKNOWLEDGEMENTS

The assistance of Mr. G. Nuys and A. Bossis is acknowledged.

#### 4. REFERENCES

- Arapis G., Puisseux-Dao S., Baeyens W. and Bonotto S. (1988). XXXIst Congress and Plenary Assembly of I.C.S.E.M.  
Förstner U. and Wittmann G.T.W. (1981). Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-486.  
Grill E., Winnacker E.L. and Zenk M.H. (1985). Science, 230, 674-676.  
Grill E., Winnacker E.L. and Zenk M.H. (1986). FEBS Lett., 197, 115-120.  
Grill E., Winnacker E.L. and Zenk M.H. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 439-443.  
Piccinini E., Coppelotti O. and Guidolin L. (1985). Comp. Biochem. Physiol., 82C, 29-36.  
Saraiva M.C. and Fraizier A. (1975). Mar. Biol., 29, 343-350.  
Seeliger U., de Lacerda L.D. and Patchineelam S.R. (1988). Metals in coastal environments of Latin America. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-297.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 31, 2 (1988).

## M-VI1

### Bactéries associées à la surface d'Éponges d'eau douce

Z. MOUREAU\*, E. RICHELLE\*\* et J. HUYSSECOM\*\*

\* Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles (Belgique)

\*\* Laboratoire de Biologie Animale et Cellulaire, Université Libre de Bruxelles, (Belgique)

Bacteria associated with the surface of freshwater sponges reflect the environmental microflora.

Les mécanismes de capture des bactéries par les éponges sont relativement bien connus. Il n'existe cependant que peu de travaux d'identification des germes associés *in situ* à leur surface. En outre ces recherches n'ont porté que sur des espèces marines.

On sait notamment que de nombreuses éponges contiennent des bactéries intra- ou extracellulaires, symbiotiques ou non, soit dispersées dans la masse de tissus, soit situées à leur surface (VACELET et DONADEY 1977, WILKINSON 1978, WILKINSON *et al.* 1981 et 1984).

VAN WEEL (1949) suppose que la "propreté" de l'épithélium des spongiaires est due à la capacité phagocytaire des cellules épithéliales tandis que GILBERT et ALLEN (1973) incriminent la sécrétion d'antibiotiques par l'éponge. Leurs hypothèses ont été vérifiées par FROST (1976) et WILLENZ et VAN DE VYVER (1982). VACELET (1975) suggère que les substances antibiotiques pourraient être synthétisées par les bactéries associées, bien que des éponges sans microflore possèdent une activité antibiotique.

MADRI *et al.* (1967) font état d'une flore indigène chez *Microciona prolifera*, constituée de pseudomonadacées, corynébactéries, flavobactéries et entérobactéries. Leur densité est plus élevée que dans le milieu environnant. BERTRAND et VACELET (1971) ont identifié des *Pseudomonas* et des *Aeromonas* associés à des éponges cornées de Méditerranée. WILKINSON (1978) a réalisé une classification de bactéries par taxonomie numérique. Trois éponges marines taxonomiquement différentes contenaient des symbiontes bactériens phénotypiquement assez semblables mais différents du milieu. Une quatrième contenait une population mixte semblable à celle de l'eau ambiante.

Au cours de ce travail, nous avons entrepris d'identifier les bactéries associées à la surface de trois espèces d'éponges d'eau douce de Belgique: *Ephydatia fluviatilis* (étang de Linkebeek), *Ephydatia mülleri* et *Spongilla lacustris* (étang de Virelles).

Des boîtes de Pétri remplies d'un milieu de culture solide (EMB, TGE, KING et PSEUDOMONAS AGAR) sont appliquées sur la surface de l'éponge, celle-ci restant liée à son support : branchage, caillou ou mur de soutènement. Conjointement, de l'eau de l'étang est ensemencée sur une autre série de boîtes.

Les boîtes sont ramenées au laboratoire et incubées à différentes températures selon le milieu d'isolement. Les colonies qui en résultent sont isolées puis soumises aux tests permettant leur identification : coloration de Gram, morphologie, mobilité, oxydase, catalase, croissance sur milieu Mac Conkey, pour terminer par la gamme de tests des galeries API (20 E, 20 NE, CHB). Par cette méthode, on n'isole évidemment que les bactéries hétérotrophes aérobies.

Les bactéries associées aux éponges appartiennent à deux groupes : 1) les *Bacillus*, Gram positifs, sporulés; 2) les bâtonnets Gram négatifs, pouvant eux-mêmes être partagés en deux sous-groupes : les "oxydase plus" et les "oxydase moins".

Parmi les "oxydase moins", nous trouvons des *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*), des *Vibrionaceae* (*Aeromonas*), un *Pasteurella* et un *Acinetobacter*. Parmi les "oxydase plus", nous trouvons des *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* et *Achromobacter*). Les deux groupes et sous-groupes contiennent des germes couramment rencontrés dans les eaux à l'exception de *Pasteurella haemolytica* qui est en principe un pathogène de mammifères et d'oiseaux.

Sur les cinquante six souches isolées, neuf n'ont pu être identifiées. Il s'agit de bâtonnets Gram négatifs aérobies. Cinq ont un métabolisme diversifié mais qui ne répond pas aux critères habituels de détermination. Quatre ne métabolisent pratiquement aucune des substances qui leur ont été fournies.

D'une manière générale, les bactéries retrouvées à la surface de ces éponges dulcicoles correspondent aux groupes présents dans les eaux d'où elles proviennent. Elles sont donc un reflet des bactéries de l'environnement. Il ne s'agit pas ici de bactéries symbiotiques mais de représentants de la flore microbienne servant de nourriture aux éponges ou adhérant à leur surface.

#### REFERENCES

- BERTRAND J.C. et J. VACELET 1971. C.R. Acad. Sc. Paris 273 : 638-641.  
FROST T.M. 1976. Hydrobiol. 50 (2) : 145-149.  
GILBERT J.J. et H.L. ALLEN 1973. Verh. Int. Ver. Limnol. 18 : 1413-1420.  
MADRI P.P., G. CLAUSS, S.M. KUNNEN and E.E. MOSS 1967. Life sci. 6 : 889-894. Perg. Press Ltd GB.  
VACELET J. 1975. J. Microsc. Biol. Cell. 23 : 271-288.  
VACELET J. et C. DONADEY 1977. J. exp. mar. Biol. Ecol. 30 : 301-314.  
VAN WEEL P.B. 1949. Physiol. Comp. 1 : 110-128.  
WILKINSON C.R. 1978. Mar. Biol. 49 : 169-176.  
WILKINSON C.R., M. NOWAK, B. AUSTIN and R.R. COLWELL 1981. Microb. Ecol. 7 : 136-141.  
WILKINSON C.R., R. GARRONE and J. VACELET 1984. Proc. R. Soc. Lond. B 220 : 519-528.  
WILLENZ Ph. and G. VAN DE VYVER 1982. J. Ultrastruct. Res. 79 : 294-306.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 31, 2 (1988).