

## Sensitivity of Colonial Hydroids to heavy metal contaminations

S. PIRAINO\* and M. de NICOLA GIUDICI

\*New address : Istituto sperimentale Talassografico C.N.R., Via Roma 3, 74100 Taranto (Italia)  
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e Molecolare dell'Università, Via Mezzocannone 8, 80134 Napoli (Italia)

Comparably to larval bioassays, hydroid sensitivities to contaminants have been shown to be more relevant respect to other test organisms (3, 4). Results of experimental growth data with a single clone of the athecate hydroid *Clavopsella michaeli* (Berrill, 1948) exposed to single heavy metal contaminations (Hg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>) are provided here. The stock colony was collected at Ischia (Gulf of Naples) in May 1988, first record in Mediterranean Sea. One-week laboratory experiments and data analysis were carried out according to Stebbing (4), with few modifications (2).

Before the appearance of morphological abnormalities or colony death (1), chemical stresses cause variations in growth rate depending on concentrations and relative toxicities of pollutants. Exposure to different concentrations of three metal ions (Hg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>) resulted in recognizable, reproducible variations of the hydroid growth rate of *C. michaeli* colonies (Fig.1). Firstly, hormesis appeared: growth significantly increased in the presence of very low concentrations of copper (0.5, 1 µg/l) and cadmium (1 µg/l) ions while there was only a transient stimulation of growth rate after a 24h-exposure to 0.1 and 1.0 µg/l of mercuric ions. Threshold concentrations causing *C. michaeli* growth rate inhibition were consistent with environmental levels of many polluted coastal ecosystems. In fact, significant reduction in growth rate occurred with exposure to about 0.5-1.5 µg/l Hg<sup>++</sup> (Fig.1a), 2-3 µg/l Cu<sup>++</sup> (Fig.1b) or 25-30 µg/l Cd<sup>++</sup> (Fig.1c). Nevertheless, in these cases, resilience was still maintained: K values quickly rose to control levels, after restoration of uncontaminated conditions (3). Full degeneration of colonies, without possibility of recovery, occurred after exposure to 5 µg/l Hg<sup>++</sup>, 10 µg/l Cu<sup>++</sup>, or 100 µg/l Cd<sup>++</sup>. Here, different stages of hydranth degeneration have been observed, comparable to those described by Karbe (1) in *Eirene viridula*.

The process of growth of colonial hydroids appears to be controlled by homeostatic mechanisms which regulate the co-operation of multi-interacting cellular systems during colonial morphogenesis and morphostasis. Such mechanisms counteract the possible inhibitory effect of any external disturbance of low intensity thus maintaining colonial growth at an optimal, preferred rate. When the counteractive capacity is overloaded, inhibition of growth rate occurs (2, 3, 4). The physiological basis of the control mechanisms of hydroid development still remain unclear. Nevertheless, alterations in hydroid growth rate resulted as early and highly sensitive indexes of environmental stresses (2, 3, 4) and they can constitute a useful tool for the assessment of sublethal episodes of water pollution.

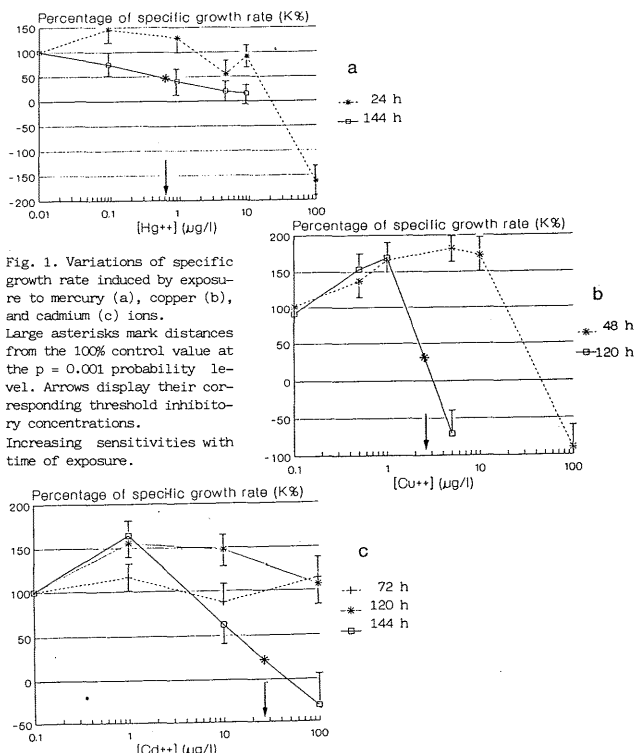


Fig. 1. Variations of specific growth rate induced by exposure to mercury (a), copper (b), and cadmium (c) ions. Large asterisks mark distances from the 100% control value at the  $p = 0.001$  probability level. Arrows display their corresponding threshold inhibitory concentrations. Increasing sensitivities with time of exposure.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. A.R.D. Stebbing for his invaluable advice and for introducing the first author to hydroid bioassay procedures.

## REFERENCES

- KARBE, L., 1972. Marine Hydroiden als Testorganismen zur Prüfung der Toxizität von Abwassertoffen. Die Wirkung von Schwermetallen auf Kolonien von *Eirene viridula*. *Mar. Biol.*, 12, 316-28.
- PIRAINO, S., 1990. Biologia ed ecologia di idroidi coloniali, Tesi di Dottorato di Ricerca, Università di Napoli.
- PIRAINO, S., in press. The adaptive pattern of growth and reproduction of *Clavopsella michaeli* (Berrill, 1948). *Hydrobiologia*, 5th I.C.C.B., Southampton, 1989.
- STEBBING, A.R.D., 1976. The effects of low metal levels on a clonal hydroid. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 56, 977-94.

## Analyse d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans l'Environnement Marin Côtier par Chromatographie Liquide / Spectrofluorimétrie

C. RAOUX et P. GARRIGUES

Laboratoire de Photophysique et Photochimie Moléculaire, UA 348 CNRS, Université de Bordeaux I, Talence (France)

## INTRODUCTION

Certains Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présentent une forte toxicité et/ou des propriétés mutagènes ou cancérogènes. Seize d'entre eux ont été retenus comme polluants prioritaires par l'U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). Ces composés, essentiellement d'origine anthropogénique sont présents dans tous les compartiments du milieu marin (eau, sédiment, organismes vivants). Les principales sources de contamination<sup>(1)</sup> du milieu marin sont les retombées atmosphériques (22%) et les déversements de pétrole (74%). Cependant dans les zones peu contaminées, les quantités présentes dans l'environnement sont généralement faibles (eau: 0,1 ng/l; sédiment: 1 ng/g); aussi est-il nécessaire d'utiliser une technique analytique suffisamment sensible, mais également sélective car les HAP doivent être recherchés dans l'extrait organique total de matrices souvent complexes (sédiment riche en matière organique, tissus biologiques). Le couplage Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) et spectrofluorimétrie (FLUO) permet de réunir ces deux notions fondamentales: sensibilité, sélectivité.

## EXTRACTION DES HAP DES DIFFERENTES MATRICES

Une extraction solvant-solvant au pentane est effectuée sur les échantillons d'eau de mer. Les échantillons lyophilisés de sédiments et d'organismes marins sont extraits en extracteur Soxhlet<sup>(2,3,4)</sup> (sédiment: dichlorométhane, organismes: pentane). Les extraits purifiés sur Florisil (pendant l'extraction pour les organismes, après l'extraction pour les sédiments) sont ensuite directement analysés par CLHP/FLUO.

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ET SPECTROFLUORIMETRIE (CLHP/FLUO)

La chromatographie liquide sur phase à polarité inversée (colonne Vydac 201 TP 54, phase C<sub>18</sub> polymérique, 5µm, 300Å) permet la séparation des seize HAP retenus par l'US EPA<sup>(5)</sup>. Un gradient de solvant acétonitrile/eau (pompe Milton Roy CM 4000) permet d'optimiser cette séparation. Cependant seulement douze composés sont présentés dans cette étude; en effet le dosage des HAP de faible masse moléculaire (5164) est délicat à cause des pertes éventuelles de tels composés lors des différentes étapes d'extraction et/ou purification. La détection fluorimétrique (Perkin Elmer LS5) à longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ ) variables permet d'exciter les HAP et d'observer leur fluorescence, ceci de façon sélective en fonction de leur ordre d'éluion. En général les couples ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) correspondent à des maxima d'absorption et d'émission des HAP recherchés afin d'obtenir la meilleure sensibilité. Parfois cependant, un choix judicieux du couple ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) permet pour des composés coélus (benzo(b)fluoranthène et pérylène par exemple), de ne détecter que le composé recherché et ce sans interférence (ici le pérylène).

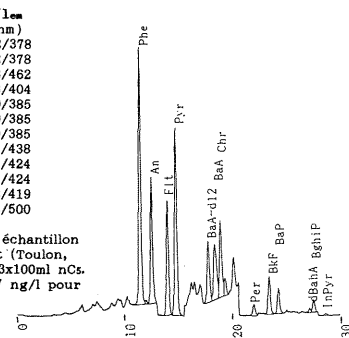
L'intensité de fluorescence des HAP en solution est inhibée par la présence d'oxygène dissous dans le solvant (effet dit du "quenching" de fluorescence par l'O<sub>2</sub><sup>(6)</sup>), aussi faut-il dégazer les solvants utilisés en CLHP/FLUO par l'hélium jusqu'à saturation, et de maintenir les solvants sous pression réduite d'He pour éviter toute redissolution de l'O<sub>2</sub><sup>(6)</sup>.

## ANALYSE QUALITATIVE

Les rendements de fluorescence des HAP étudiés étant différents, il est nécessaire de déterminer les facteurs de réponse de chaque composé relativement à un étalon interne (ici le benzo(a)anthracène deutéré) qui sera ensuite ajouté en quantité connue à chaque extrait d'échantillon à analyser. Le calcul des facteurs de réponse (intégrateur Shimadzu CR4A) est effectué à partir d'un mélange standard de référence (SRM 1647a)<sup>(7)</sup> qui contient les HAP étudiés en concentrations certifiées dans l'acétonitrile.

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)
Phe: Phénanthrène	252/378
An: Anthracène	252/378
Flt: Fluoranthène	288/462
Pyr: Pyrène	333/404
BaA: Benzo(a)Anthracène	269/385
BaA-d12: BaA perdeutééré	269/385
Chr: Chrysène	269/385
Per: Pérylène	407/438
BkF: Benzo(k)Fluoranthène	297/424
BaP: Benzo(a)Pyrène	297/424
BghiP: Benzo(ghi)Pérylène	298/419
InPyr: Indéno(123-cd)Pyrène	303/500

Chromatogramme CLHP/FLUO d'un échantillon d'eau de mer de la baie du Lazaret (Toulon, novembre 1989): 3,75 l extrait par 3x100ml n.c.s. Les concentrations varient de 0,17 ng/l pour le Per à 7,5 ng/l pour le Pyr.



## CONCLUSION

La méthode CLHP/FLUO sur phase à polarité inversée permet de doser les HAP polluants prioritaires sans ambiguïté dans des matrices souvent complexes grâce à sa grande sélectivité. Elle se caractérise également par une sensibilité élevée: pour un échantillon de 100g d'un sédiment très peu contaminé, la CLHP/FLUO permet de déterminer les teneurs des douze HAP dont la somme est inférieure à 3 ng/g<sup>(7)</sup> (certaines teneurs individuelles étant inférieures à 0,1 ng/g).

## Références:

- J.M. Neff, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment, Applied Science publishers, London (1979), pp. 262.
- P. Garrigues, H. Soclo, M.P. Marniesse and M. Ewald, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 28, 121 (1987).
- M.M. Schantz, B.A. Benner, S.N. Chesler, B.J. Koster, S.F. Stone, R. Zeisler, and S.A. Wise, *Fresenius. Z. Anal. Chem.*, à paraître.
- P. Michel, dans: Manuel des analyses chimiques en milieu marin, préparé par A. Aminot et M. Chaussepied, CNEOX, Brest (1983), p. 337.
- W. Karcher, R.J. Fordham, J.J. Dubois, P.G.J.M. Claude and J.A.M. Lightart, Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds, D. Riedel publishing company, C.E.C. Brussels (1985).
- C.A. Parker, Photoluminescence of Solutions, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1968), pp. 544.
- Certificate of Analysis, Standard Reference Material 1647a, National Institut for Standard and Technology (NIST), Gaithersburg USA (1988).
- P. Garrigues, C. Raoux, D. Ribera, J.F. Narbonne, P. Lemaire, A. Mathieu and M. Lafaurie, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 38, 379 (1990).