

### Essai d'utilisation des Eponges comme bioindicateurs des teneurs en métaux des eaux

E. RICHELLE\*, H. NEYBERG\*\*, E. ROYAUX\*\*, G. VAN DE VYVER\* et Z. MOUREAU\*\*\*

\*Laboratoire de Biologie animale et cellulaire, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles (Belgique)  
 \*\*Service Géologique de Belgique (Belgique)  
 \*\*\*Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique (Belgique)

Dans ce travail, nous avons déterminé la teneur en brome, cerium, cuivre, chrome, fer, manganèse, rubidium, strontium, titane, zinc, zirconium et yttrium dans trois espèces d'éponges d'eau douce communes en Belgique, *Ephydatia mulleri*, *Eunapius fragilis* et *Spongilla lacustris*.

Les éponges sont des filtres très actifs, consommateurs de bactéries et de matière organique dissoute, colloïdale et particulaire. Les quelques études qui ont été effectuées en milieu marin ont révélé que les éponges sont accumulateurs d'éléments trace : métaux, organochlorés, etc... (ZAHN et al., 1981 ; PATEL et al., 1985). Dans cette optique, les éponges pourraient servir de modèle pour établir l'impact des hydrocarbures, des détergents et des déchets industriels sur le milieu aquatique ("Sponge Watch").

Aucune étude n'a porté sur les éponges d'eau douce qui pourtant pourraient se révéler très utiles pour la surveillance de la pollution dans les eaux douces. En effet, elles présentent l'avantage sur les autres organismes bioaccumulateurs de pouvoir être facilement transplantées dans divers milieux et de s'y développer massivement. Ceci est rendu possible grâce à la technique de culture *in vitro*.

La capacité des éponges à accumuler des métaux a été établie par dosage de la teneur de différents métaux dans les éponges et l'eau ambiante.

Nous avons dosé les éléments par fluorescence-X au moyen d'un spectromètre à vide Philips PW 1540. Les conditions d'analyse ont été : anode en Rhodium, 50 Kv 40 mA ; cristal analyseur LiF 200 ; temps de comptage, 100 secondes ; collimateurs en position fine et compteur à scintillation à 845 v pour Br, Cu, Fe, Rb, Sr, Zn, Zr, Y et collimateurs en position large et compteur à flux gazeux à 855 v pour Ce, Cr, Mn, Ti. La concentration finale de chaque élément est calculée par rapport à des standards internationaux (seuil de détection : 10 ppm).

Le choix des éléments à analyser a été établi au départ d'une dizaine de spectres réalisés à partir des trois espèces d'éponges d'eau douce, *E. mulleri*, *E. fragilis* et *S. lacustris*.

Ce screening a permis de déterminer que Br, Ce, Cr, Cu, Fe, Mn, Rb, Sr, Ti, Zn, Zr et Y étaient présents en quantité suffisante pour permettre une première évaluation de leur bioaccumulation par les éponges.

Les éponges ont été récoltées en Fagne et Ardenne occidentale (RICHELLE et al., 1989). Elles ont été rincées, égouttées, débarrassées de leurs épibiontes et conservées dans l'alcool.

La confection des pastilles pour la fluorescence-X s'effectue de la manière suivante : les échantillons d'éponges sont séchés pendant 48 heures à 60°C puis broyés finement ; la poudre ainsi obtenue est couverte d'acétone additionnée d'évacite, séchée et comprimée à 5 tonnes pendant 10 minutes dans un moule cylindrique.

Les résultats de l'analyse de 19 échantillons, exprimés par rapport au poids sec, permettent de classer les métaux en 3 grandes catégories :

1 - Fe, Mn, Zn et Ti se distinguent des autres éléments par le niveau de leur accumulation chez les trois espèces. Les valeurs sont particulièrement élevées pour Fe (0,15% à 3,6%) et pour Mn (0,05% à 1,1%), soit plusieurs milliers de fois supérieures à celles du milieu environnant. Les teneurs en Zn varient de 51 ppm à 430 ppm et celles de Ti de 13 ppm à 1439 ppm.

2 - Br, Cu, Rb, Sr, Zr, Y sont accumulés par les trois espèces à un taux moindre, fort variable d'un échantillon à l'autre et souvent proche de la limite de détection.

3 - Ce et Cr ne sont décelés que dans certains échantillons et très rarement chez *Eunapius fragilis*.

Ces résultats préliminaires indiquent que les éponges d'eau douce sont capables d'accumuler, en quantité variable, des métaux présents à l'état de trace ou en faible quantité dans le milieu ambiant.

Ils ne nous permettent cependant pas d'établir, à ce stade, l'existence ou non d'une sélectivité spécifique et/ou d'une relation entre les teneurs métalliques des éponges et la contamination du milieu environnant.

Les teneurs en métaux dosées chez les éponges d'eau douce sont du même ordre de grandeur que celles observées chez les éponges marines à l'exception du manganèse (BOWEN et SUTTON, 1951 ; PATEL et al., 1985 ; VERDENAL, 1986). Les éponges d'eau douce étudiées en contiennent, en moyenne, 50 fois plus.

BOWEN V.T. and SUTTON D., 1951. Comparative studies of mineral constituents of marine sponges. J. Mar. Res., 10 ; 153-167.  
 ZAHN R.K., ZAHN G., MULLER W.E.G., KURELEC B., RIJAVEC M., BATEL R. and GIVEN R., 1981. Assessing consequences of marine pollution by hydrocarbons using sponges as model organisms. Sci. Total Environ., 20 ; 147-169.  
 PATEL B., BALANI M.C. and PATEL S., 1985. Sponge sentinel of heavy metals. Sci. Total Environ., 41 ; 143-152.  
 VERDENAL B., 1986. Spongiculture en Méditerranée nord-occidentale : aspects culturels, molysmologiques et économiques. Thèse de doctorat.  
 RICHELLE E., MOUREAU Z., HUYSECOM J. et VAN DE VYVER G., 1989. Distribution des éponges d'eau douce dans la Fagne et l'Ardenne occidentale. Comptes Rendus du "Symposium Invertébrés de Belgique" ; 9-14.

### Pathology of *Mytilus galloprovincialis* L. reproductive organs produced by Nitrogen-compounds

P.-E. MIHNEA

Romanian Marine Research Institute, Bd Lenin 300, 8700 Constanta (Romania)

Many of mineral and organic compounds or breakdown products may affect the natural environment; LC50, ETSO (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949) as well as several methods of growth potential estimation or marine bioassay (BERLAND et al. 1972; MAESTRINI et al. 1984 a, b) were applied to get knowledge concerning their effects on marine living beings. There are only few data on their behaviour and pathways through the ecosystems. SOLBE (1988) defined "the study of the pathways, fate and effects of chemicals to and in environment: ECOTOXICOLOGY". And we emphasize: any physical or chemical parameter must be included as potential harmful factors, when it reaches a critical size or concentration level. This is a new tool that helps us to understand biological effects of pollutant and learn how to protect our natural resources. Heavy eutrophicated environments present high levels of N-NH<sub>4</sub> and N-urea. N-NH<sub>4</sub> and N-urea reached into Romanian inshore area a significant increase as the process of eutrophication grown up in the last years. Ammonia reached in 1989 maximum values of 240-1,417 µg l<sup>-1</sup> and urea 201-2,200 µg l<sup>-1</sup> (PECHEANU, personal communication). Both N-compounds were found to be toxic - on *Mytilus galloprovincialis* in long term exposure - when they reach a high concentration level.

#### MATERIAL AND METHODS

Mussels were collected from an area less influenced by the outfalls, cleaned out of periphyton and acclimated at laboratory conditions for 30 days. They were experimented in static renewal, continuous air supply, 20 - 22°C, light/darks : 16/8 hrs., each vessel (10 l) containing 32 individuals (height 6-7 cm). There were used 8 experimental vessels representing duplicates for : control ; 1‰, 5‰, and 10‰ (in mg) N-NH<sub>4</sub> and N-urea. The sea water was changed every day and then contaminated with N-compounds up to experimental level. Mussels were fed with *Chloromonas* : 1.25 x 10<sup>6</sup> cel/mussel/8 times a day. Algae were separated from culture medium by centrifugation and rinsed with clean sea water. Mussels were sacrificed after 72 days of exposure. Gonad cycles was determined and numerical ranking of a sample was valued : 0 - resting ; 1 - immature ; 2 - developing ; 3A - ripe ; 3B - spawning ; 3C - redeveloping ; 3D - spent. Both gonad squash observations and histological preparations were performed.

#### RESULTS

Ovula and sperm release was observed only in control, during August. The follicles size did not show great differences between controls and variants, except NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> exposures (Table 1).

Table 1 :  
The size class frequency of follicles after 72 days of experimentation (N-compounds as mg % and size in µ)

Analyzed sample	no. of samples	X	Follicles size			Follicles size class (%)			
			SD	min.	max.	1-100	100-200	200-400	400-600
Control	32	225	127	71	550	9.37	46.87	28.12	15.63
Urea 1‰	32	204	107	57	471	15.15	45.45	33.33	6.06
Urea 5‰	32	152	152	71	385	21.87	62.50	15.62	0
Urea 10‰	32	304	128	143	607	0	25.00	59.37	15.63
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> 1‰	32	223	89	64	407	2.63	47.37	47.37	2.6
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> 10‰	32	265	79	164	499	0	25.00	71.87	3.13

The gonad stages (Table 2) proved that urea and NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> produced an interrupting of reproductive cycle, but what stage, it depended on the nitrogen species and their concentrations.

Table 2 :  
The gonads stages

Analyzed sample	no. of samples	Frequency of each stage (%)							
		0	1	2	3A	3B	3C	3D	3E
Starting point of experiment	100	0	0	0	2	4	20	74	0
Control	32	0	100	0	0	0	0	0	0
Urea 1‰	32	0	0	0	0	0	28.89	71.11	0
Urea 5‰	32	0	0	0	0	0	16.67	83.33	0
Urea 10‰	32	0	0	0	0	0	0	3.12	90.62
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> 1‰	32	0	0	0	0	0	31.25	68.75	0
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> 10‰	32	0	0	0	0	0	5.77	94.28	0

At the end of experiment, 100% of the control individuals resumed the reproductive cycle as they were found to be immature : gonads presented islands of rudimentary reproductive tissue in the matrix. All variants showed in different percentages either 3C : developing (new oocytes being found at the margin of the follicle ; male follicles show a reformation of the lamellae of sperm), or 3D : spent (in females residual oocytes resorbed ; follicles in the males decrease in size and the remaining sperm are broken down by amoebocytes) stages.

When 10 mg‰ urea was used, a stage (3E) beyond the 3D was observed ; 90.62% of individuals presented follicles completely spent, and they looked like big and irregular holes with no tendency of recovering.

In conclusion, the increase of nitrogen compounds in an eutrophicated environment could produce a pathology of gonads.

LITCHFIELD J.T.Jr. and WILCOXON F., 1949 - A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 96 ; 99-113.  
 BERLAND B.R., BONIN D.J., MAESTRINI S.Y. et POINCIER J.F., 1972 - Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. 1 : Comparaison des méthodes d'estimation. Int. Revue ges. Hydrobiol., 57, 6 ; 933-944.  
 MAESTRINI S.Y., DROOP M.R. and BONIN D.J., 1984 a - Algae as ecological indicators. 4 : Phytoplankton as indicators of sea water quality : bioassay approaches and protocols. Acad. Press London, ed. L.Elliot Shubert ; 71-132.  
 MAESTRINI S.Y., DROOP M.R. and BONIN D.J., 1984 b - Algae as ecological indicators : Test algae as indicators of sea water quality : prospects. Acad. Press London, ed. L. Elliot Shubert ; 134-188.  
 SOLBE J., 1988 - Pre-marketing tests on chemicals and the protection of freshwater life. International Conference "Domestic and industrial wastes", Sherkin Island Marine Station ; 66-73.