



ICES C.M. 1991

PAPER CM 1991/ E : 26
Réf. K (Shellfish committee)

MESURE DE L'EFFET BIOLOGIQUE DE LA QUALITE D'UN MILIEU

PAR LE BIOESSAI EMBRYON DE BIVALVE MARIN

Françoise QUINIOU, France TOULARASTEL
IPREMER Centre de BREST - BP 70 - 29280 PLOUZANE - FRANCE

*Measurement of the biological effect of water quality
of an bioassay of marine bivalve embryos.*

RESUME

Chez les bivalves le développement embryonnaire est très sensible à la qualité du milieu. Le stade larve "D" est atteint en 48 heures chez *Mytilus edulis* et en 24 heures chez *Crassostrea gigas*.

Après obtention des gamètes par stimulation thermique, la fécondation est réalisée directement dans l'eau à tester (50 000 ovocytes.l⁻¹) et l'incubation se fait à 20° C pour la moule et 24° C pour l'huître. La toxicité globale des milieux est mesurée par le pourcentage de larves "D" anormales et comparé à celui obtenu dans une eau de référence.

Les résultats des tests réalisés avec un rejet urbain provenant d'une station d'épuration biologique montrent que la sensibilité de l'huître et de la moule est similaire. L'effet de la filtration du rejet est aussi observé dans ces expériences. Des bioessais avec des concentrations croissantes d'eau ou d'extrait de sédiment provenant de la Seine montrent la contamination de cette zone. Le même type de test est employé pour suivre la toxicité d'une culture de *gyrodinium cf aureolum*.

Le bioessai, embryon de bivalve, n'est pas difficile à mettre en place et peut être utilisé comme "indicateur" de la toxicité globale d'une rivière, d'un extrait de sédiment ou d'un effluent urbain ou industriel avant son rejet en mer.

ABSTRACT

In bivalves, embryonic development is very sensitive to water quality. The D larvae stage is reached after 48 hours for *Mytilus edulis* and 24 hours for *Crassostrea gigas*.

Fertilization is directly realized in water to be bioassayed at a density of about 50 000 eggs per one liter container and incubated at 20°C for mussels and 24°C for oysters. The global toxicity of tested water is evaluated by comparing the percentage of specimens to successfully reach the D larvae stage to those fertilized in a control sea water sample.

Results of tests on urban waste water from a biological treatment plant show that oysters and mussels have a similar sensitivity. Moreover, in this experiment the effect of filtration rate is observed.

Bioassays with an increasing concentration of water or extract of sediment from the river Seine show the contamination of this area.

The same test has been used to assess change in toxicity of *gyrodinium aureolum* culture.

Marine bivalve embryo-bioassay is not very difficult to initiate and could be used as an "indicator" of the global toxicity of a river, an extract of sediment or urban or industrial sewage before discharge into the environment.

1. INTRODUCTION

Les dosages chimiques dans l'eau, le sédiment ou la matière vivante ne sont pas suffisants pour déterminer, à eux seuls, les effets des contaminants sur les organismes. Par ailleurs, les observations sur la structure des communautés, ne donnent pas, elles non plus, toutes les réponses (CHAPMAN ET LONG, 1983).

WOELKE (1972) préconise l'emploi de bioessais sur le développement embryonnaire et larvaire de *Crassostrea gigas* pour surveiller la qualité biologique de l'eau de mer ; test repris par BOURNE *et al* (1981), NELSON *et al* (1989) et LONG ET BUCHMAN (1989).

Nous avons utilisé le même type de bioessai pour mesurer les effets biologiques : d'un rejet urbain, d'une culture de dinoflagellé (*Gyrodinium aureolum*), l'eau de la Seine ou un extrait de sédiment de la même rivière. L'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) et la moule (*Mytilus edulis*) ont été choisies et les fécondations ont été réalisées directement dans les milieux à tester.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Origine des milieux testés

2.1.1. L'eau de référence

L'eau de mer de référence provient de l'écloserie d'IFREMER à Argenton ou de la rade de Brest (carte 1). Cette eau est utilisée fraîche après filtration sur cartouche stérile de type millipore de 0.22 μm de vide de maille.

2.2.2. Les milieux testés

Le rejet urbain étudié est échantillonné à la station d'épuration à traitement biologique de la ville de Morlaix (carte 1). Des volumes de 1 à 10 % de ce rejet sont ajoutés à l'eau de référence et la salinité des solutions testées est ajustée à 30.10^{-3} avec de l'eau distillée pour éliminer l'action du facteur salinité (HIS et ROBERT, 1989). Le rejet urbain testé est prélevé après purification mais non chloré.

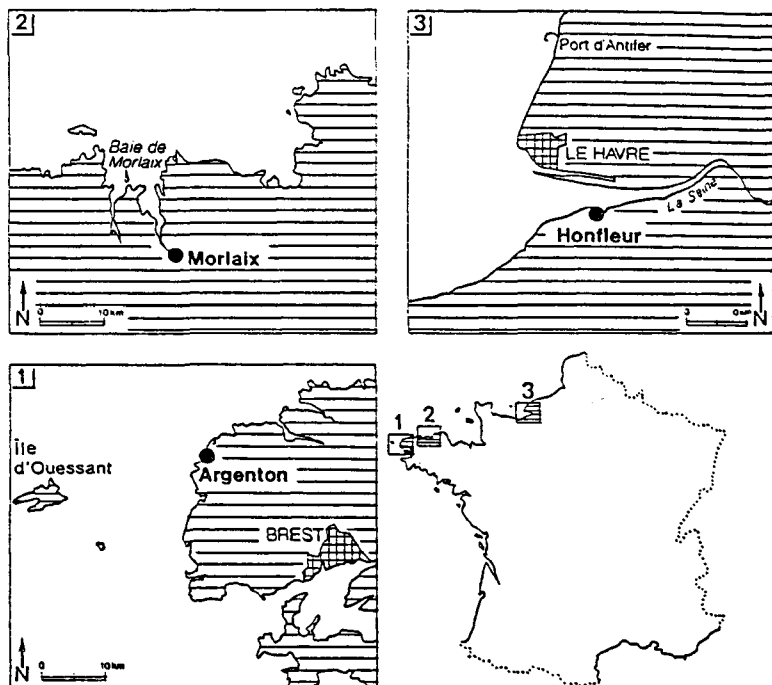
La culture de dinoflagellé ($2.10^6 \text{ cell.l}^{-1}$) est testée pure, filtrée sur 0.22 μm et après détoxification à travers des cartouches de C18 et Florisil afin d'éliminer les composés lipophyles ainsi que les composés plus polaires comme les exotoxines de *Gyrodinium aureolum* (GENTEN *et al*, 1991).

L'eau de la Seine testée a été prélevée, en mai 1988, à Honfleur (carte 1) puis stockée un mois à -20°C . Les milieux testés sont constitués d'eau de la Seine ajoutée à de l'eau de référence afin d'obtenir des solutions contenant de 2.5 à 20 % d'eau de la Seine. La salinité est ajustée à 30.10^{-3} et les milieux testés sont préfiltrés à 0.22 μm afin d'observer uniquement l'effet de substances toxiques dissoutes.

Le sédiment étudié a été échantillonné à Honfleur, à basse mer de vive eau, en mai 1988 et stocké à -20°C avant les bioessais. L'extrait de sédiment est réalisé en mélangeant 100 g de sédiment dans un litre d'eau de mer de référence pendant une heure. Après décantation (une heure), le surnageant est récupéré et filtré à 0.22 μm . Le filtrat est additionné à de l'eau de référence afin d'obtenir des milieux de concentrations croissantes de 5 à 100 g.l^{-1} .

2.2. Protocole expérimental

Les géniteurs d'huîtres ou de moules employés proviennent de la nature pendant la période naturelle de ponte ou d'une écloserie où ils ont été conditionnés.



CARTE 1

Situation des points où eau et sédiment ont été échantillonnés

1 Eau de référence : Argenton et Brest

2 Rejet urbain : Morlaix.

3 Eau et sédiment de la Seine : Honfleur.

FIGURE 1

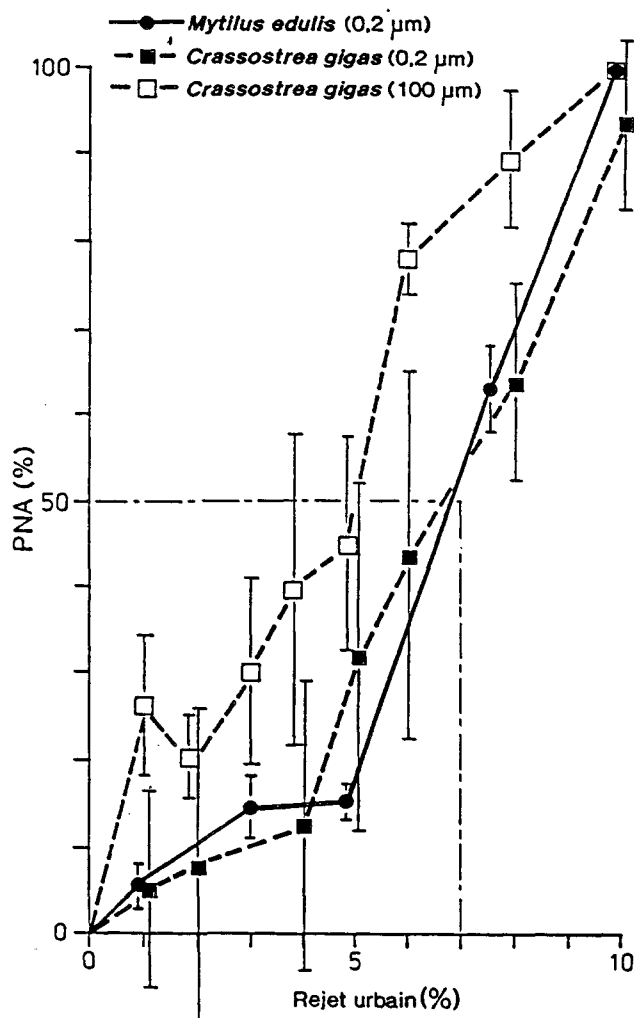
Effet du rejet urbain de Morlaix sur le développement embryonnaire de l'huître et de la moule au début du mois de juin 1989.

1 et 2 Rejet filtré à $0.2 \mu\text{m}$

3 Rejet filtré à $100 \mu\text{m}$

Pourcentage Net de larves D

Anormales : $\text{PNA} = \bar{x} \pm \text{écart type}$



L'émission des gamètes des géniteurs matures est induite par stimulation thermique (LOOSANOFF et DAVIS, 1963 ; HIS et ROBERT, 1986). Les ovocytes émis sont tamisés sur 100 µm, pour éliminer les débris, puis récupérés sur un tamis de 32 µm avant répartition dans les milieux à tester à une densité de 50 000 ovocytes.l⁻¹. Après élimination des débris sur tamis de 100 µm, 1.5 ml.l⁻¹ de sperme concentré est immédiatement ajouté aux ovocytes.

Seul un couple de géniteurs est employé et la fécondation est réalisée directement dans les milieux à tester : HIS et ROBERT (1980) ont montré que les contaminants peuvent avoir une action directe sur les gamètes.

Après fécondation, les milieux testés (2 à 5 répliquats de 30 ml en pots stériles de polystyrène cristal) sont incubés sans aération ni lumière : 24 heures à 24 °C pour les huîtres et 48 heures à 20 °C pour les moules.

A la fin de l'incubation, les larves sont : soit observées immédiatement, soit fixées au formol neutre pour examen ultérieur.

La toxicité des milieux testés est évaluée par le pourcentage d'embryons et de larves anormales dénombrées sur 800 à 1500 individus pour chaque concentration. Les résultats sont exprimés en pourcentage net d'anomalies (PNA) selon la formule de ABBOTT (Anonyme, 1980).

$$\text{PNA} = \frac{\% \text{ anomalies du bioessai} - \% \text{ anomalies des témoins}}{100 - \% \text{ anomalies des témoins}} \times 100$$

Une larve est considérée normale si les deux valves ont la forme d'un D régulier et si le manteau peut se rétracter entièrement entre les valves.

De plus, seuls les bioessais où les témoins présentent au moins 80 % de larve D normales sont exploités.

3. RESULTATS

3.1. Effet d'un rejet urbain

Le rejet urbain échantillonné ponctuellement dans l'après midi est stocké au réfrigérateur (0 à + 4 °C) à l'abri de la lumière et testé dans les dix jours.

La figure 1 montre les résultats des bioessais réalisés au début du mois de juin 1989, sur la moule et l'huître, avec un rejet filtré à 0.22 ou 100 µm. Notons que pour un rejet filtré à 0.22 µm, l'effet sur le développement embryonnaire de *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* est similaire. Par contre, pour l'huître, la figure 1 montre que le PNA est supérieur lorsque le rejet n'est filtré qu'à 100 µm : la toxicité semble ici liée aux matières en suspension.

Le rejet testé à la fin du mois de juin présente une toxicité plus forte qu'en début de mois (figure 2) : le pourcentage net d'anomalies 100 (PNA) est atteint avec 7.5 % de rejet urbain contre 10 % début juin.

Si début juin, la filtration du rejet à 0.22 µm diminue la toxicité (figure 1) ; à la fin du mois, la série de bioessais réalisés sur différents filtrats (figure 3) indique que si la toxicité est plus forte à cette date (figure 2, expérience 2), elle n'est pas associée aux particules en suspension. L'effet toxique serait dû aux contaminants contenus dans la phase dissoute, peut être des détergents anioniques en quantités importantes dans les rejets (LASSUS *et al.*, 1990).

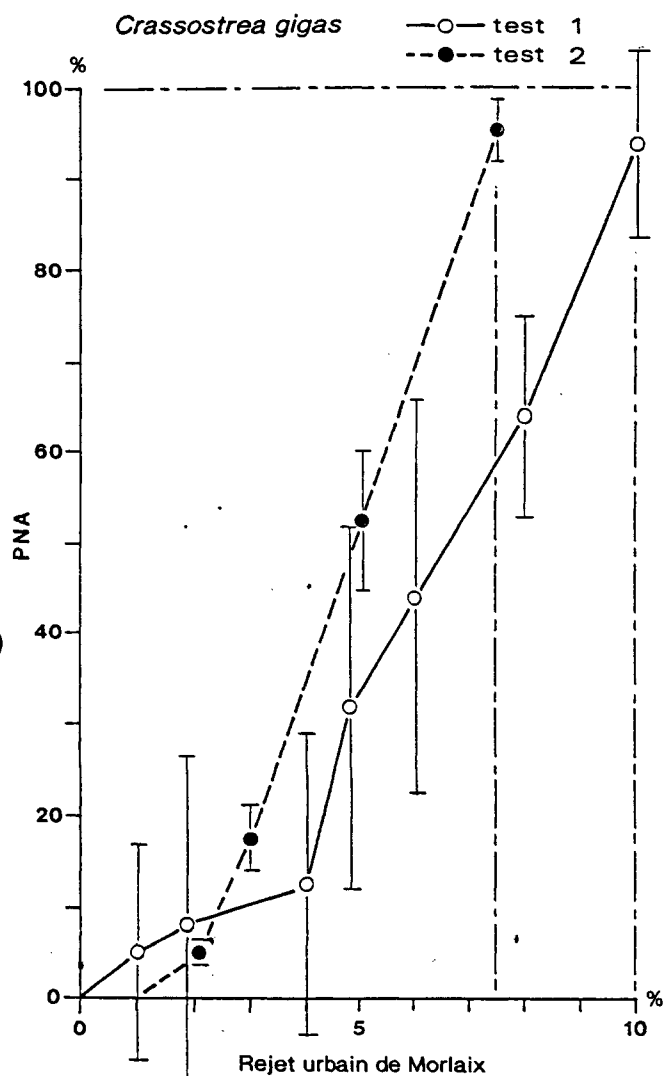


FIGURE 2

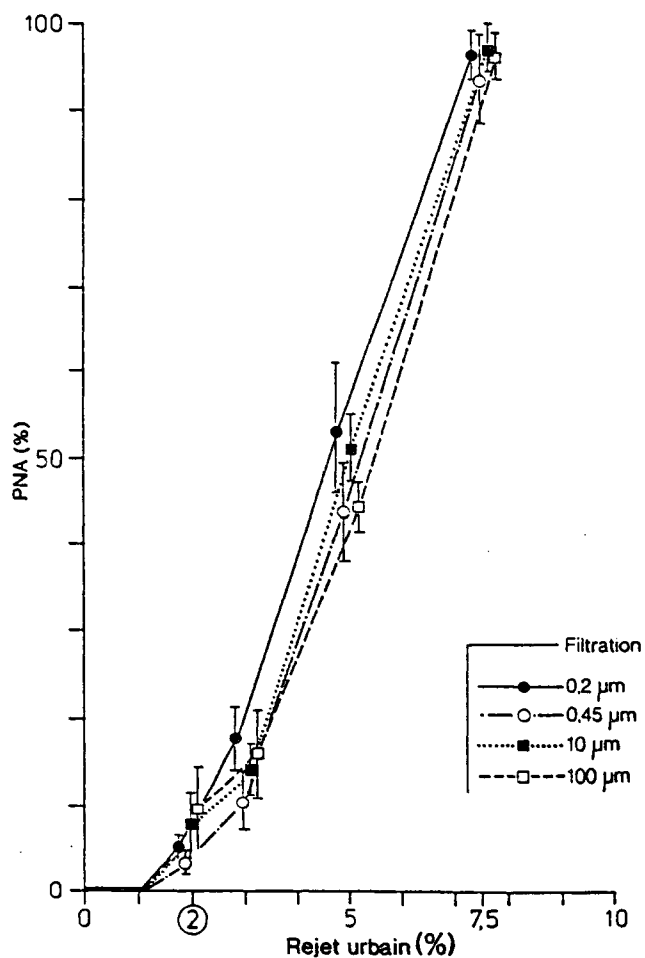
Bioessais réalisés sur
Crassostrea gigas avec du
rejet urbain filtré
1 - début juin 1989
2 - fin juin 1989

Pourcentage Net de larves D
Anormales :

$$PNA = \bar{x} \pm \text{écart type}$$

FIGURE 3

Effet de la filtration du
rejet urbain sur le dévelop-
pement embryonnaire de
l'huître japonaise.
Rejet de la fin du mois de
juin 1989.
 $PNA = \bar{x} \pm \text{écart type}$.



Notons que les effets biologiques sont visibles dès qu'il y a 2 % de rejet urbain dans le milieu, ce qui est une concentration observable dans le milieu (SALOMON *et al.*, 1990).

3.2. Effet d'une culture de *Gyrodinium cf aureolum*

Dans ces expériences, l'eau de mer de référence provient de la rade de Brest et les bioessais ont été réalisés sur des moules, à la lumière du jour et à 20 °C, pendant les mois de septembre, octobre et novembre 1990.

En octobre, l'utilisation d'une culture automatisée en semi continu a permis de diminuer le taux de phosphore dans le milieu de culture du dinoflagellé (GENTIEN *et al.*, 1991).

Les résultats des trois tests (tableau 1) montrent que "la toxicité de ce dinoflagellé résulte de deux processus différents :

- * une toxicité de contact : plus de 87 % de larves anormales avec la culture pure.
- * une toxicité par production de composés dissous qui est accentuée par la diminution de phosphore : 3.5 % de larves anormales en novembre contre 40 % en octobre" (GENTIEN *et al.*, 1991).

TABLEAU 1

Pourcentage Net de larves D Anormales (PNA) dans trois bioessais sur le développement embryonnaire de la moule en présence :

- d'une culture de *Gyrodinium aureolum* employée pure
- du milieu de culture filtré sur 0.2 µm ou détoxifié

Date	11.09.90	24.10.90	02.11.90
Culture pure	87.5	89.3	100
Milieu de culture filtré	-	39.8	3.5
Milieu de culture détoxifié	-	5.4	3.5

3.3. Effet de l'eau et du sédiment de la Seine

L'eau de la Seine a été testée sur le développement embryonnaire de la moule. Le PNA (figure 4) est supérieur à 30 % dès que le milieu contient 7.7 % d'eau de la Seine. Il dépasse 50 % avec 10 % d'eau de la rivière, ce qui n'est pas une très forte dilution pour un tel estuaire.

L'eau étant filtrée à 0.22 µm, les effets sont dus aux contaminants dissous provenant des rejets industriels, urbains et agricoles (IFREMER, 1986).

L'extrait de sédiment a été testé sur le développement embryonnaire de l'huître et de la moule (figure 5). Notons que les deux espèces donnent une réponse similaire et que le PNA 50 % est obtenu avec un extrait correspondant pour environ 35 g l⁻¹ et qu'avec 50 g/l⁻¹ il n'y a pratiquement plus de larves D normales.

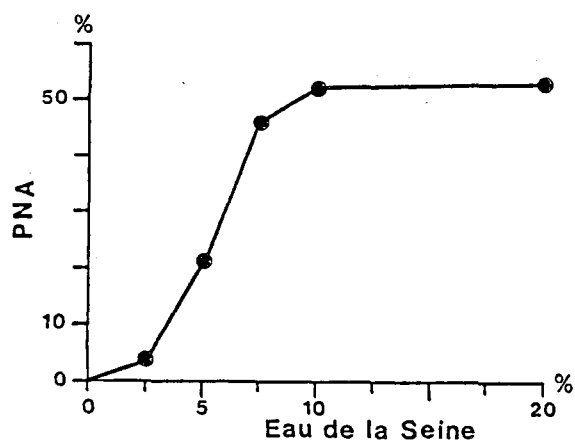


FIGURE 4

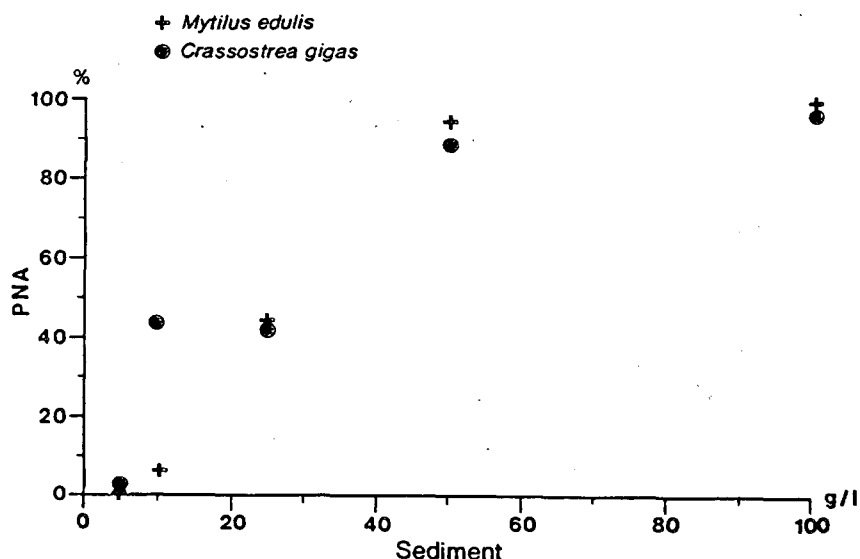
Effet de l'eau de la Seine sur le développement embryonnaire de la moule.

PNA = Pourcentage Net de larves D Anormales.

FIGURE 5

Effet de l'extrait de sédiment de la Seine sur le développement embryonnaire de l'huître et de la moule.

PNA : Pourcentage Net de larves D Anormales



3. CONCLUSION

Les résultats de ces différents tests montrent que *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis* répondent d'une façon similaire en présence de rejet urbain de la station d'épuration de Morlaix ou de l'extrait de sédiment provenant de la Seine. Notons cependant que les effets sont observés au bout de 24 heures pour l'huître contre 48 heures pour la moule.

Par ailleurs, en accord avec WOELKE (1972), BOURNE *et al* (1981), NELSON *et al* (1983), LONG ET BUCHMAN (1989) et THAIN (1991), nous pouvons dire que ce type de bioessai peut être employé comme "indicateur" de la toxicité potentielle globale d'un rejet en mer, d'une phytotoxine, d'une rivière ou d'un extrait de sédiment.

Ce bioessai a aussi permis de suivre l'évolution dans le temps de la toxicité du rejet urbain de Morlaix et d'une culture de *Gyrodinium aureolum*. Il permettrait d'établir une cartographie des toxicités relatives de l'eau et/ou des sédiments de diverses zones côtières.

De plus, ces bioessais répondant aux critères de STEBBING *et al* (1980) sont assez faciles à réaliser, peu onéreux et donnent une indication assez rapide (24 à 48 heures) du niveau de toxicité du milieu étudié.

Enfin, l'intérêt de ces tests est accru par le fait que la fécondation est réalisée directement dans les milieux à tester. Ceci permet de prendre en compte l'effet des contaminants dès leur mise en contact avec les gamètes (HIS et ROBERT, 1980).

BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME, 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater, 15 th ed. American Public Health Association. Washington, D.C. 301 p.
- BOURNE, N., H. ROGERS, H. MAHOOD, D. NEIL, 1981. Water quality study of Ladysmith Harbour, British Columbia. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1026 : 1-27 p.
- CHAPMAN, P.M. and E.R. LONG, 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution. Mar. Pollut. Bull. 14(3) : 81 - 84.
- GENTIE, P., G. ARZUL and F. TOULARASTEL, 1991. Modes of action of the toxic principle of *Gyrodinium cf aureolum*. Marine Biotoxins. Paris janvier 91. 4 p. (to be published).
- HIS, E. and R. ROBERT, 1980. Action d'un sel organo-métallique l'acétate de tributyl-étain sur les oeufs et les larves D de *Crassostrea gigas* (Thunberg). C.I.E.M., C.M. 1980/F. 27.10 p.
- HIS, E. and R. ROBERT, 1986. Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. Haliotis. 15 : 301-308.
- HIS, E. and R. ROBERT, 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 100 : 455-463.
- IFREMER, 1986. La Baie de Seine. Groupe de recherches coordonnées "Manche" (grecomanche). Colloque national du CNRS. In : Actes de colloques n°4. Edited by Ifremer (SDP). Centre de Brest BP 70 PLOUZANE 29280 FRANCE.
- LASSUS, P., G. BOGE, P. GENTIE, R. LOARER, G. PAGANO and F. QUINIOU, 1990. Toxicité des rejets urbains 171-186. In : La Mer et les rejets urbains. (Bendor, 13-15 juin 1990). Ed. by Ifremer - Actes de colloques. 11 : 171-186.
- LONG, E., M.F. BUCHMAN, 1989. An evaluation of candidate measures of biological effects for the national status and trends program. NOAA. Technical Memorandum NOS. OM A45. 106 p + Annexes.
- LOOSANOFF, V.L and N.C. DAVIS, 1963. Rearing of bivalve mollusks. Adv. mar. biol. 1 : 1-136.
- NELSON, D., J. MILLER, J. PEREIRA, A. CALABRESE, 1983. Monitoring water quality at a dredge spoil dump site using oyster larvae. I.C.E.S., C.M. 1983/E:59. 9 p.
- SALOMON, J.C., M. BRETON, M. POMMEPUY, 1990. Intérêt d'un modèle de transport dissous pour les rejets urbains en zone estuarienne. In : La Mer et les rejets urbains. (Bendor, 13-15 juin 1990). Ed. by Ifremer - Actes de colloques. 11 : 191-204.
- STEBBING, A.R.D., B. AKESSON, A. CALABRESE, J.H. GENTILE, A. JENSEN and R. LLOYD, 1980. The role of bioassays in marine pollution. Bioassay panel report. Rapp. P.V. Réunion. Cons. Inst. Explor. Mer. 179 : 322-332.
- THAIN J., 1991. Biological effects of contaminants : oyster (*Crassostrea gigas*) embryo bioassay. ICES. Techniques in Marine Environmental Sciences. 11. 12 p.
- WOELKE, C.H., 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hours Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Washington Department of fisheries. Technical report N° 9. 93 p.