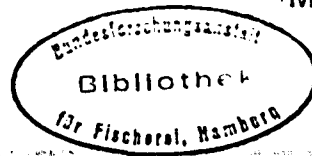


ICES STATUTORY MEETING 1993

C M. 1993/ E : 25
Marine Environmental Quality Committee
Sess. Q

EFFET DE SEDIMENTS MARINS ET DE LEURS EXTRAITS AQUEUX, SUR LA BIOLUMINESCENCE D'UNE BACTERIE (MICROTOX ®) ET SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE BIVALVES.

Françoise QUINIOU, Edith LE SQUER-ANDRÉ et Nicolas DAMÉE.
IFREMER Centre de Brest. B.P. 70 - 29280 - PLOUZANÉ - FRANCE -

RÉSUMÉ

- Afin de rechercher la toxicité potentielle globale de neuf sédiments marins et estuariens de la rade de Brest (Bretagne, France) un screening a été réalisé par l'intermédiaire du test Microtox (*Photobacterium phosphoreum*) et du bio-essai "développement embryonnaire de bivalve" (*Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*) en présence des sédiments et de leurs extraits aqueux, en eau de référence d'une salinité de 30‰.

- Les résultats montrent que les extraits aqueux de sédiment (10g/l, équivalent poids sec) entraînent un effet d'hormèse sur la bioluminescence bactérienne ainsi que sur le taux de réussite du stade larve D de l'huître creuse en eau de mer de référence après pré traitement du sperme. Par contre, quand la fécondation et le développement embryonnaire se déroulent dans les extraits, le taux d'anomalies larvaires est supérieur à 50% pour six des sites étudiés et jusqu'à 100% pour les trois situés à proximité de la ville de Brest et du Port. L'extrait aqueux du Port, à 0,1g/l de sédiment, provoque encore plus de 35% d'anomalies.

- Lorsque les essais sont réalisés en "sédiment-contact" (10g/l), la CE50 du Microtox est proche de 10g/l pour quatre sédiments correspondant aux zones agricoles et, inférieur à 7,4g/l pour quatre autres dont le Port de Brest (1,6g/l) et le port de plaisance (Moulin-Blanc =2,4g/l). Pour les tests sur les bivalves, les pourcentages de larves D anormales sont supérieurs à 83 avec 10g/l de sédiment, quelque soit leur origine, et restent supérieurs à 25 avec 0,1g/l de sédiment en provenance du Port et du Moulin-Blanc.

- Ces résultats montrent que, même s'ils risquent de sous-estimer un effet à long terme, ces tests de toxicité aiguë donnent une réponse rapide permettant d'évaluer la toxicité globale intrinsèque d'un sédiment et de son extrait aqueux qui n'est pas toujours décelable ou quantifiable par les méthodes physico-chimiques existantes. En effet, les sites pour lesquels les tests ont détecté la toxicité potentielle la plus élevée, correspondent aux secteurs où les indices des communautés benthiques montrent que le milieu est perturbé.

INTRODUCTION

- Le sujet entre dans le cadre du "Contrat de baie" de la rade de Brest (Bretagne, France) dont l'objectif est de proposer des outils d'aide à la décision aux aménageurs afin d'améliorer la qualité du milieu et notamment maintenir ou favoriser le développement des espèces exploitables.

- Les sources de pollution sont variées : activités urbaines (eaux usées), agricoles (excès de nutriments et pesticides), industrielles, militaires et de loisir (métaux lourds, peintures antifouling...) (SAUM, 1980 ; RNO, 1988.). Les rivières sont les voies de transport d'une partie de ces apports et les sédiments le lieu privilégié de piégeage, de transformation et de complexation de tous les éléments provenant de ces activités (CARR et al., 1988 ; PAQUET et LACAZE, 1988 ; BROUWER et al, 1990 ; CHAPMAN, 1990 ; CABRIDENC, 1991 ; JOUANY, 1991 ; TAY et al, 1992.).

- Cette étude a pour but d'évaluer la toxicité potentielle globale de neuf sédiments marins et estuariens de la rade de Brest (Carte 1). Les effets des sédiments et de leurs extraits aqueux ont été évalués par la mesure de l'inhibition de la bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* (Microtox) ainsi que par le taux de réussite du stade larve D de *Mytilus edulis* (48h) ou de *Crassostrea gigas* (24h) lorsque le développement embryonnaire se déroule entièrement dans les milieux à tester ou en eau de référence après pré traitement du sperme.

- Les réponses des deux types d'organismes montrent un effet très fortement toxique des sédiments sous l'influence des activités urbaines et portuaires lorsque l'on emploie le sédiment-contact. Le bio-essai "embryon de bivalve" est plus sensible aux sédiments correspondant aux apports agricoles et surtout aux composés hydrophiles puisque la majorité des extraits aqueux (10g/l) entraîne une embryotoxicité supérieure ou égale à 50% alors que l'on observe un effet d'hormèse (STEBBING, 1982) pour le Microtox.

MATERIEL ET METHODES

Milieux testés

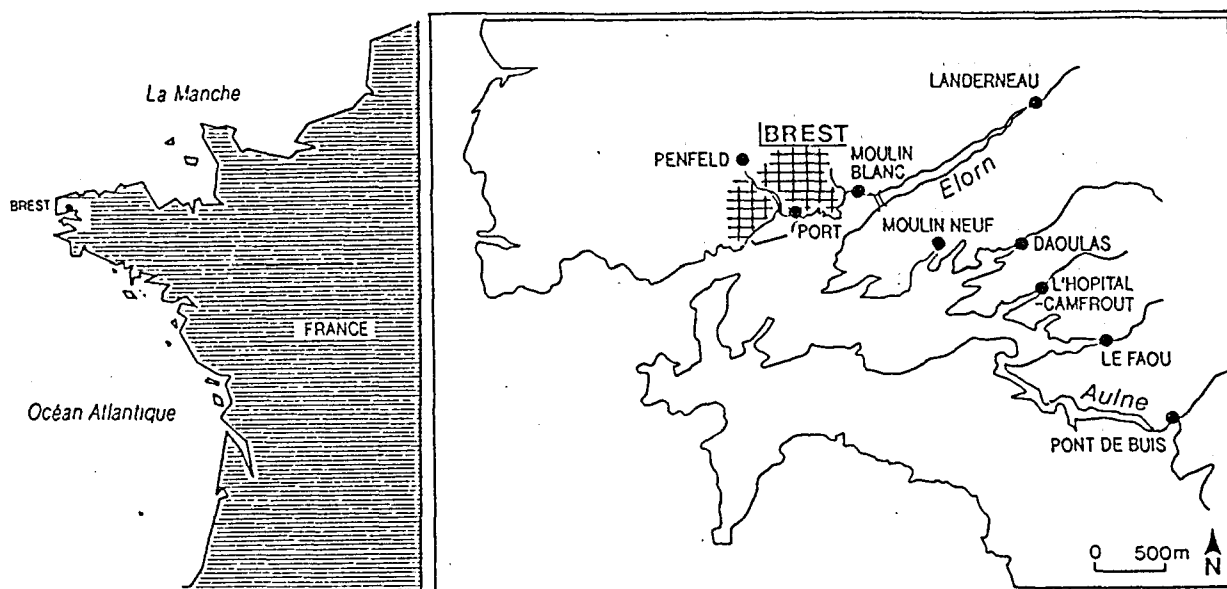
- Les sédiments superficiels (1 à 2 cm) ont été prélevés, à basse mer, au débouché des principaux cours d'eau de la rade de Brest et dans le Port (Carte 1). Stockés à +4°C et à l'obscurité, ils ont été testés 10 à 15 jours après l'échantillonnage.

- Deux types de milieux ont été testés :

- **le sédiment-contact** : le sédiment humide est déposé en eau de référence et testé après homogénéisation et décantation à des concentrations de 0 à 100g/l (équivalent poids sec) pour le Microtox et 10, 1 ou 0,1g/l pour les bivalves.

- **L'extrait aqueux** : 10g/l de sédiment (équivalent poids sec) sont agités pendant 12h en eau de mer de référence. Le surnageant est testé, tel quel, après trois heures de décantation.

- L'eau de mer de référence est utilisée fraîche, elle est préfiltrée sur membrane Sartorius de vide de maille de 0,2 μ m et ramenée à une salinité de 30 ‰. La salinité de 30 ‰ et le pH des milieux étudiés (7,0 à 7,8) sont compatibles avec un bon développement embryonnaire des bivalves (DAVIS, 1958 ; CALABRESE et DAVIS, 1966.) et la réalisation des tests Microtox (MICROBICS CORPORATION, 1992 ; QUINIOU et LE SQUER-ANDRE, 1993).



CARTE 1 :
Situation des points de prélèvement de sédiment.

Bio-essais

- Le test Microtox a été réalisé, sur des prélèvements de mai 1993, en milieu aqueux et en sédiment-contact selon les techniques décrites antérieurement (MICROBICS CORPORATION, 1992). La toxicité aiguë est exprimée par la valeur de la CE50 pour le sédiment-contact (quantité de sédiment provoquant une diminution de 50% de la luminescence initiale) ou par le pourcentage d'inhibition de la luminescence en présence des extraits aqueux (BULICH, 1979). Les essais ont été réalisés au minimum deux fois.

- Le bio-essai "développement embryonnaire" de bivalve a été réalisé sur les différents milieux selon le protocole décrit par QUINIOU et TOULARASTEL

(1991) découlant des techniques de LOOSANOFF et DAVIS (1963), HIS et ROBERT (1980, 1986) et THAIN(1991).

Pour les sédiments du Port et du Moulin-Blanc, prélevés en avril 1993, la fécondation et le développement embryonnaire de *Mytilus edulis* (48h à 20°C) ont été réalisés directement dans les milieux à tester pour des concentrations de 0,1, 1 et 10g/l.

Pour les autres sites, échantillonnés en mai, les essais ont été réalisés avec *Crassostrea gigas* : soit en embryotoxicité (fécondation et développement embryonnaire dans les milieux à tester, 24h à 24°C), soit en spermioxicité (fécondation et développement en eau de référence après un pré traitement du sperme de 15mn dans les milieux). Les essais sur les extraits aqueux ont été effectués avec 10g/l de sédiment, l'embryotoxicité du sédiment-contact a été réalisée avec 0,1, 1 et 10g/l de sédiment.

Les résultats sont exprimés en pourcentage net d'anomalie (PNA) selon la formule de Abbott (ANONYME, 1980). Les observations sont faites sur un à deux prélèvements de 100 larves sur au moins deux répliquats.

RESULTATS

- Les extraits aqueux de sédiment entraînent une augmentation de la bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* (pourcentages d'inhibition négatifs, Tableau 1). Ceci semble indiquer que la concentration des contaminants hydrosolubles est trop faible pour affecter la bactérie, mais provoque un effet d'hormèse (STEBBING, 1982) que l'on retrouve pour les essais réalisés sur le sperme de *Crassostrea gigas* (spermioxicité, Tableau 1). Notons, cependant, que pour l'échantillon de Penfeld les 15mn de contact suffisent à affecter de 3% le taux de réussite du stade larvè D.

Sédiment / Bio-essai	PENFELD	ELORN	MOULIN NEUF	DAOULAS	HOPITAL CAMFROUT	LE FAOU	AULNE
MICROTOX extrait aqueux	-19,6	-10,6	-4,7	-6,1	-8,5	-7,2	-16,8
SPERMIOXICITE extrait aqueux	-5,2	-5,0	-9,5	-5,3	-9,1	-2,8	-6,5
SPERMIOXICITE sédiment contact	+3,1	-2,7	-7,9	-7,9	-8,5	-7,5	-4,2

TABLEAU 1 :

- Pourcentage d'inhibition de la bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* (Microtox) en présence d'extraits aqueux de sédiments (10g/l).
- Pourcentages Nets d'Anomalies des larves "D" de *Crassostrea gigas* après pré traitement du sperme (Spermioxicité) avec les sédiments et leurs extraits aqueux (10g/l).

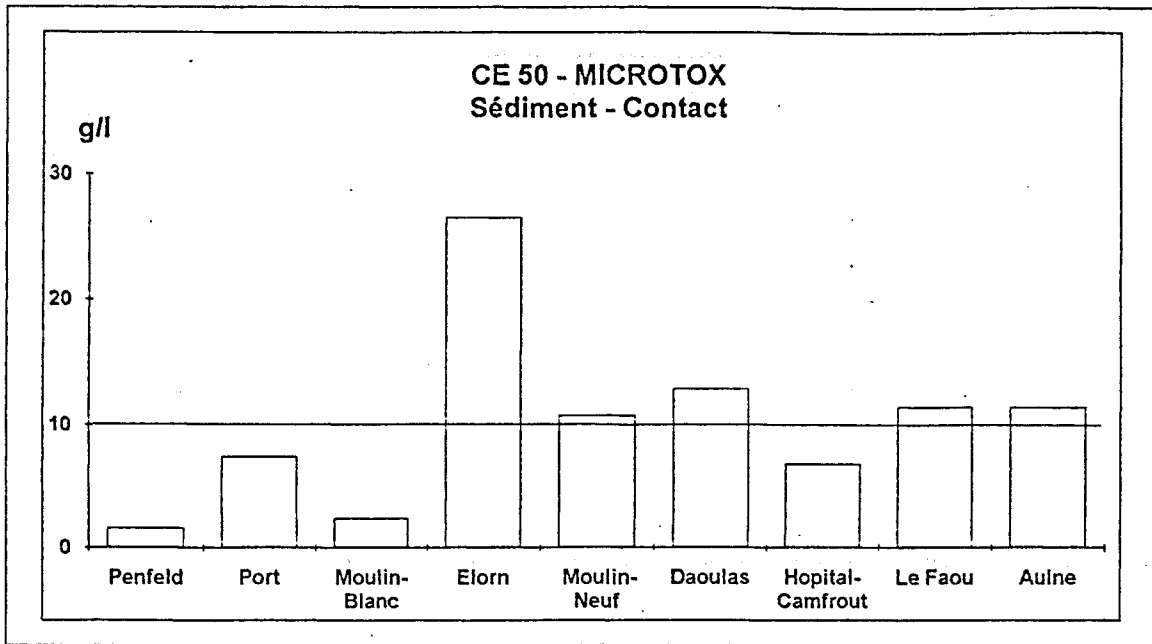


FIGURE 1

Concentration efficace de sédiment-contact entraînant 50 % d'inhibition de bioluminescence (CE50) de *Photobacterium phosphoreum* (MICROTOX)

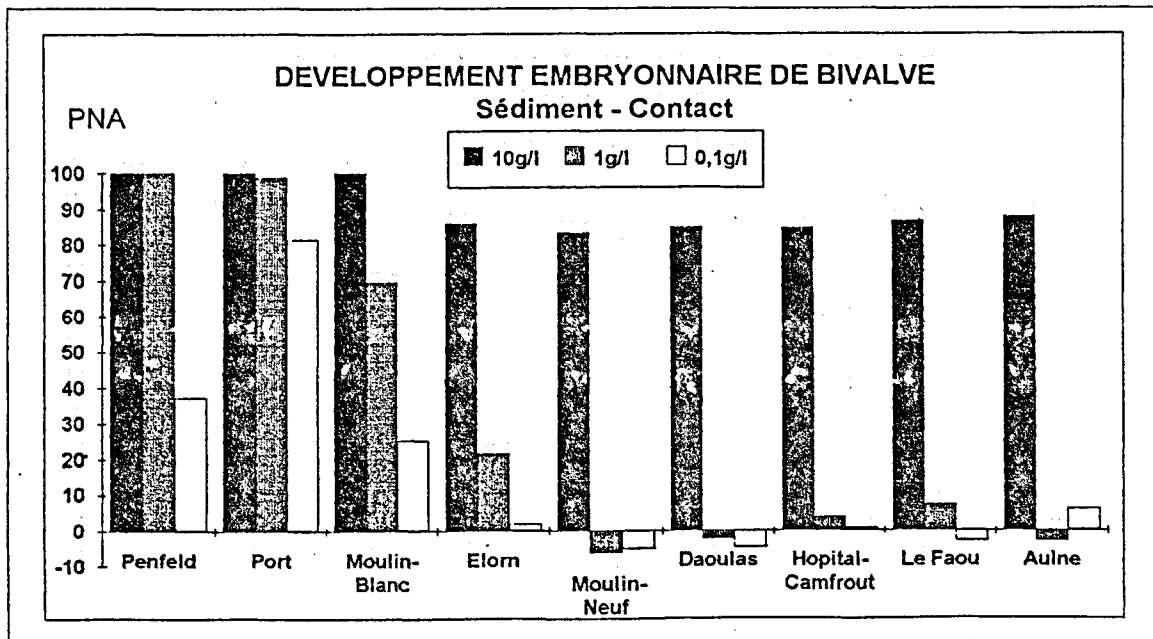


FIGURE 2

Pourcentages Nets d'Anomalies (PNA) du développement embryonnaire de Bivalves en présence de sédiment

Port et Moulin-Blanc : *Mytilus edulis*
 Autres localités : *Crassostrea gigas*

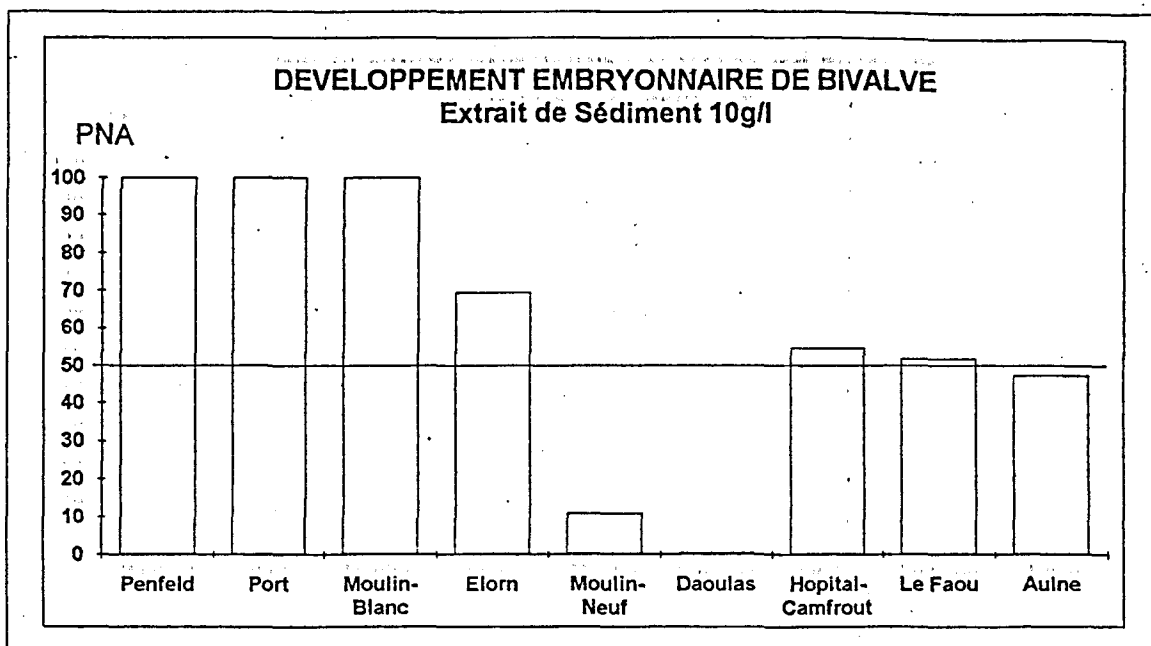


FIGURE 3

Pourcentages Nets d'Anomalies (PNA) du développement embryonnaire de Bivalves en présence d'extrait aqueux de sédiment

Port et Moulin-Blanc : *Mytilus edulis*

Autres localités : *Crassostrea gigas*

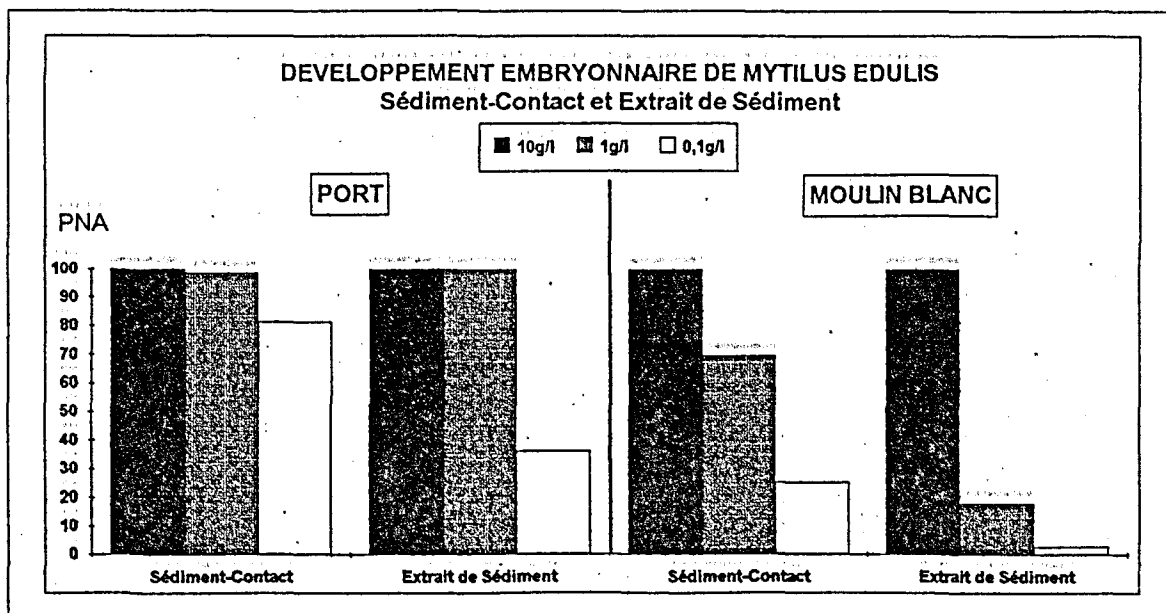


FIGURE 4

Comparaison de l'effet de différentes concentrations de sédiment et d'extraits aqueux de sédiment du Port et du Moulin-Blanc sur le développement embryonnaire de *Mytilus edulis*

- Le test Microtox réalisé en sédiment-contact montre (Figure 1) que la CE50 est atteinte pour quatre des neuf sédiments à moins de 8g/l : le sédiment de Penfeld, le plus toxique, est contaminé par les rejets d'une décharge urbaine (CE50

=1,6g/l), celui du Moulin-Blanc (CE50 =2,4g/l), prélevé à la sortie d'un émissaire de station d'épuration est situé dans le Port de plaisance ; viennent ensuite les sédiments de l'Hopital-Camfrout en zone agricole (CE50 =6,8g/l) et celui du Port de Brest.

- Les bio-essais sur les bivalves réalisés en présence de 10g/l de sédiment (Figure 2) montrent que tous les échantillons de sédiment provoquent des taux d'anomalies (PNA) de 83 à 100% : à cette concentration toutes les anomalies correspondent à des embryons qui n'ont pas atteint le stade coquiller. Les trois stations sous l'influence de rejets urbains et portuaires présentent des PNA de 100% : Penfeld, Port et Moulin-Blanc.

Testés à 1g/l les sédiments de Penfeld et du Port sont toujours aussi toxiques (PNA =100) ; pour le Moulin-Blanc l'effet est moindre (PNA =69,7), l'Elorn provoque toujours 21,6% d'anomalies alors qu'en direction du bassin sud les prélèvements voient leur toxicité diminuer fortement. Notons cependant qu'elle reste sensible à l'Hopital-Camfrout et au Faou. La majorité des anomalies observées à cette concentration sont des malformations de coquille et quelques excroissances du manteau.

Les sédiments déterminés comme les plus potentiellement toxiques en sédiment-contact à 1g/l sont ceux dont les extraits aqueux à 10g/l (Figure 3) entraînent des PNA supérieurs à 50 : Penfeld, Port, Moulin-Blanc, Elorn, Hopital-Camfrout et le Faou. A l'exception du Faou ce sont les mêmes qui donnent une CE50 inférieure à 10g/l avec le test Microtox (Figure 1).

- La figure 4 montre les résultats d'une comparaison des effets des sédiments du Port et du Moulin-Blanc sur le développement embryonnaire de la moule : les concentrations de 10, 1 et 0,1g/l ont été testés en sédiment-contact et extraits de sédiment. Les résultats montrent que le Port beaucoup plus toxique que le Moulin-Blanc contient aussi plus de contaminants hydrophiles puisque les extraits aqueux provoquent encore 36% d'anomalies à 0,1g/l contre 2,6% au Moulin-Blanc. De plus remarquons qu'au Moulin-Blanc les effets obtenus en sédiment-contact à 0,1g/l se rapprochent de ceux de l'extrait aqueux à 1g/l.

DISCUSSION

- La bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* n'est pas inhibée par les extraits aqueux et montre même des phénomènes d'hormèse (STEBBING, 1982) pour tous les sites alors que les PNA des bio-essais "embryon de bivalve" sont supérieurs à 50 pour six des neuf sédiments. Les molécules et les ions peuvent être plus ou moins insolubilisés par adsorption sur des matières organiques solides ou par complexation par d'autres matières organiques (JOUANY, 1991) et divers facteurs influencent le pouvoir fixateur des solides en ce qui concerne les métaux lourds (BOURG, 1991) ; de plus les composés organiques sont susceptibles d'affecter la toxicité des métaux trace (HANNAN et al, 1979), mais non la plus part des contaminants organiques (CARR et al, 1989). Ceci indique que la phase embryonnaire des bivalves est plus sensible que le test Microtox aux composants

organiques et polluants hydrosolubles libérés lors des extractions aqueuses de sédiments réalisées au laboratoire

- Les tests de spermiotoxicité en sédiment-contact ou extraits aqueux de sédiment ont donné des réponses faiblement négatives après 15mn de pré traitement du sperme de *Crassostrea gigas* : on peut parler ici encore d'hormèse à l'exception du sédiment de Penfeld qui en contact à 10g/l entraîne 3.1% d'anomalies.

- Si les extraits aqueux de sédiment permettent de détecter la toxicité des contaminants hydrosolubles susceptibles d'être remis en solution dans le milieu naturel lors d'un cycle de marée (12 heures), les essais en sédiment-contact prennent en compte l'action synergique des différents contaminants hydrophobes comme les PCBs et les hydrocarbures polyaromatiques (BROUWER et al, 1990 ; TAY et al, 1992) ainsi que les ions métalliques adsorbés et/ou complexés sur les particules solides (JOUANY, 1991 ; BOURG, 1991 ; HANNAN et al, 1979).

Les sédiments potentiellement les plus toxiques pour les deux types d'organismes sont ceux du bassin nord de la rade de Brest qui sont sous l'influence des activités urbaines (décharge et eaux usées : Penfeld et Moulin-Blanc) et des activités industrielles, militaires et de loisir (métaux lourds, PCB et peintures antifouling : Port et Moulin-Blanc). Les sédiments du bassin nord sont caractérisés par de fortes teneurs en PCB et cuivre et un peu de mercure (Port et Moulin-Blanc) ainsi que du cadmium pour l'Elorn (SAUM, 1980 ; RNO, 1988 ; MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ET IFREMER, 1988, 1990, 1992)

La toxicité du bassin sud, principalement situé en zone agricole sans épuration des rejets, est moins élevée (Hopital-Camfrout, Le Faou et Aulne) pour les deux bio-essais. Sous l'influence principale du débit de l'Aulne, le bassin sud de la rade de Brest se caractérise par des teneurs importantes en matières organiques, matières en suspension, nitrites, nitrates, cadmium et plomb dans la rivière (MOUVET, 1992). Les teneurs en TBT sont élevées dans le bassin nord et plus particulièrement dans le port militaire, le port de commerce et le port de plaisance du Moulin-Blanc (SAUM, 1980 ; MICHEL, 1993 données non publiées.), les concentrations en TBT entraînent des niveaux d'imposex tels chez *Nucella lapilus* que l'espèce a disparu dans l'ensemble des installations portuaires (PAULET, 1993 données non publiées).

- Les sédiments les plus toxiques pour le test Microtox sont ceux qui provoquent les taux d'anomalies les plus élevés lors du développement embryonnaire des bivalves avec les extraits aqueux (10g/l) et le sédiment-contact (1g/l). Ceci vérifie la corrélation établie par WILLIAMS et al (1986) entre la réponse du Microtox et les bio-essais sur les embryons de bivalves. De plus, ces toxicités élevées concordent avec les secteurs où les indices biotiques montrent que les communautés benthiques sont perturbées : dégradation du milieu dans le bassin nord et déséquilibre au niveau de certains estuaires du bassin sud (SAUM, 1980 ; GLEMAREC, 1993 données non publiées) ; ce qui confirme les résultats de BECKER et al (1989).

- Beaucoup de contaminants persistants peuvent avoir un effet toxique à long terme (CHAPMAN, 1990) qui risque d'être sous estimé par des tests de toxicité aiguë (HIS et SEAMAN, 1993). Cependant l'association de ce type de bio-essais (Microtox et développement embryonnaire de bivalve) ont l'intérêt d'évaluer rapidement (15mn à 48h) la toxicité globale intrinsèque de sédiments et de leurs extraits aqueux en prenant en compte les actions synergiques des contaminants

hydrophiles et/ou hydrophobes. Ces essais sont une étape indispensable dans l'évaluation de pollution marine (CHAPMAN, 1988) et permettent d'apporter une aide à la décision des aménageurs en corrélant les effets observés par les tests *in vitro* à ceux observés *in situ*.

BIBLIOGRAPHIE

ANONYME, 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater, *American Public Health Association*. 15 th ed. Washington, D.C. 301 p.

BECKER, D.S., T.C. GINN & G.R. BILYARD, 1989. Comparisons between sediment bioassays and alterations of benthic macroinvertebrate assemblages as measures of sediment toxicity. *Oceans' 89, An International Conference addressing methods for understanding the global Ocean*. 18-21 Sept. 1989. Seattle, Washington USA. Vol 2 : ocean Pollution. p. 461-466.

BOURG. A., 1991. Echanges Eaux-Sédiments. In *L'Ecotoxicologie des Sédiments*. Rapport et communications du congrès international de La Rochelle. Juin 1991. SEFA. p 96.

BULICH. A. A., 1979. Use of Luminescent Bacteria for Determining Toxicity. In *Aquatic Environments*. Aquatic Toxicology. ASTM STP 667. L.L. Marking and R.A. Kimerle, Eds., American Society for Testing and Materials, p 98-106.

BROUWER. H., T. MURPHY & L.A. MC.ARDLE., 1990. A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 9. p 1353-1358.

CABRIDENC. R., 1991. Dégradation et transformation dans les sédiments. In : *L'écotoxicologie des sédiments*. Rapport et communications du congrès international de La Rochelle Juin 1991. SEFA. p 59-85.

CALABRESE . A. & H.C. DAVIS., 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull. mar. biol. Lab.* , Woods Hole 131. p 427-436.

CARR. R.S., J.W. WILLIAMS & C.T.B. FRAGATA. ,1989. Developpement and evaluation of a novel marine sediment porewater toxicity test with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 8, p 533-543.

CHAPMAN. P.M.,1988. Marine Sediment Toxicity Tests. In : *Chemical and Biological Characterization of Sludges, Sediments, Dredge Spoils and Drilling Muds*. ASTM. STP 976. J.J. Lichtenberg, F.A. Winter, C.I. Weber & L. Fradkin. Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p 391-402.

CHAPMAN P.M., 1990. The sediment triad approach to determining pollution-induced degradation. *The Science of the Total Environment*, 11p.

DAVIS. H. C., 1958. Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities. *Biol. Bull. mar. biol. Lab.*, Woods Hole. 114, p 296-307.

HANNAN. P.& C. PATOUILLET., 1979. Results of an algal toxicity test applied to sediment elutriates. *Naval Research Laboratory Memorandum Report* , 3952, 27p.

HIS. E. & 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). *CIEM. C.M. 1980/F* : 27. 10p.

HIS. E.& R. ROBERT, 1986. Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis*. 15, p 301-308.

HIS.E.& M. SEAMAN, 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*).

JOUANY. J.M., 1991. Impact des contaminants sur la microfaune des sédiments. In : *L'écotoxicologie des sédiments*. Rapport et communications du congrès international de La Rochelle, Juin 1991, SEFA., p 97-105.

LOOSANOFF. V.L. & N.C. DAVIS, 1963. Rearing of bivalve mollusks..1, *Adv. mar. biol.* p 1-136.

MICROBICS CORPORATION, 1992. Microtox ® manual. A Toxicity Testing Handbook. Vol 2 : Detailed protocols and Vol 3 : Condensed protocols. Carsbad, A.A.

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ET IFREMER, 1988. Surveillance du milieu marin. *Travaux du RNO*. Edition 1988. 35p.

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ET IFREMER, 1990. Surveillance du milieu marin. *Travaux du RNO*. Edition 1989-1990. 32p.

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ET IFREMER, 1991. Surveillance du milieu marin. *Travaux du RNO*. Edition 1991. 32p.

MOUVET. C., 1992. Etude des métaux lourds sur les mousses aquatiques. Campagne 1991. Agence de l'eau Loire-Bretagne et BRGM., 17p.

PAQUET . F. & J.C. LACAZE., 1988. Evaluation de la qualité des sédiments marins au moyen d'essais sublétaux. Effets sur la production larvaire et le comportement alimentaire du copépode *Tigriopus brevicornis*. *J.R.O.*, Vol 13,(34), p 111-114.

QUINIOU. F. & F. TOULARASTEL., 1991. Mesure de l'effet biologique de la qualité d'un milieu par le bio-essai embryon de bivalve marin. *CIEM. CM. 1991/ E* : 26. Ref. K. 8p.

QUINIOU. F. & E. LE SQUER-ANDRE., 1993. Comparison of the variation of bioluminescence by *Photobacterium phosphoreum* (microtox ®) between aqueous extracts and solid-phase on marine sediments. Toxicity assessment and on-line monitoring - SETAC. 6th International Symposium, Berlin, 10-14 mai, 1993, (Poster).

RNO, 1988. Réseau National d'Observation de la qualité du milieu. Dix années de surveillance 1974-1984. Documents techniques. IFREMER et Secrétariat d'Etat auprès du Premier Ministre chargé de l'Environnement. 4 volumes.

SAUM, 1980. Schéma d'Aptitude et d'Utilisation de la Mer : rade de Brest. CNEXO et DDE, 197p + pièces complètes.

STEBBING. A.R.B., 1982; Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment*, 22, p 213-234.

TAY K.L., K.G. DOE, S.J. WADE, D.A. VAUGHAN, R.E. BERRIGAN. & M.J. MOORE., 1992. Sediment bioassessment in Halifax Harbour. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 11, p 1565-1581.

THAIN. J., 1991. 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.

WILLIAMS. L.G., P.M. CHAPMAN & T. N. GINN., 1986. A comparative evaluation of marine sediment toxicity using bacterial luminescence, oyster embryo and amphipod sediment bioassay. *Marine Environmental Research* 19, p 225-249.