

TOXICITE D'UN DESHERBANT, L'ATRAZINE-SIMAZINE, SUR LES JEUNES STADES
LARVAIRES DE *CRASSOSTREA GIGAS* ET SUR DEUX ALGUES FOURRAGES,
ISOCHRYSIS AFF-GALBANA ET *CHAETOCEROS CALCITRANS*.

par

René ROBERT, Edouard HIS et Danièle MAURER
Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer,
63, Boulevard Deganne - 33120 Arcachon.

ABSTRACT : Effects of atrazine-simazine upon larvae of *Crassostrea Gigas* and two unicellular marine algae, *Isochrysis aff-galbana* and *Chaetoceros Calcitrans*.

Corn culture has developed considerably around the Bay of Arcachon (France). Related to this expansion is an increase in the use of Atrazine-Simazine, a herbicide spray. Because Arcachon is an important spat catching area for the Japanese oyster, the toxicity of this compound on the formation and the growth of young larvae of *Crassostrea gigas* was studied. In addition, its action on the growth of two algae, *Isochrysis aff-galbana* and *Chaetoceros calcitrans*, which are used as food for the veligers was analysed. This herbicide may directly disturb the development of the larvae and it may also play an indirect role on the veligers by curbing growth of the nanoplankton.

RESUME.

La culture du maïs s'est fortement développée en Aquitaine (France) ces dernières années; elle a induit l'utilisation accrue de pesticides et herbicides. Une des formulations les plus utilisées sur le pourtour du bassin d'Arcachon, zone traditionnelle de captage du naissain, est le mélange Atrazine-Simazine. Les limites d'action de ce produit sont définies sur les larves de *Crassostrea gigas* et sur deux souches test du nanoplancton utilisées en milieu contrôlé pour leur alimentation, *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. En effet l'herbicide peut affecter directement les larves, mais avoir aussi une action défavorable en perturbant le développement des algues fourrages indispensables à la croissance des véligères.

MOTS CLES : Ecotoxicologie, Atrazine, Simazine, larves, *Crassostrea gigas*, algues unicellulaires, *Isochrysis aff-galbana*, *Chaetoceros calcitrans*.

KEY WORDS : Ecotoxicology, Atrazine, Simazine, larvae, *Crassostrea gigas*, unicellular marine algae, *Isochrysis aff-galbana*, *Chaetoceros calcitrans*.

INTRODUCTION.

Centre autonome de production, d'élevage et de commercialisation de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, le bassin d'Arcachon assure une part importante de l'approvisionnement en naissain des régions conchylicoles françaises.

Deux facteurs sont à l'origine de cette activité : un potentiel de production élevé estimé à 5 millions de naissains pour l'ensemble de la baie et une bonne qualité du produit grâce au captage réalisé sur tuiles chaulées (His et Robert, 1985).

Cependant, le maintien de cette activité est étroitement lié à la qualité biologique du milieu marin. Or, de part ses caractéristiques physiques, le bassin d'Arcachon est une zone particulièrement sensible à l'action des facteurs anthropiques. Il ne possède qu'une seule zone d'échange avec l'océan, et malgré l'importance des masses d'eau en mouvement, le renouvellement de celles-ci ne se fait pas aisément dans les différentes parties de la baie. Une surveillance

de la qualité biologique de ses eaux est donc nécessaire. Les seuils de toxicité de différents produits, utilisés sur le pourtour du bassin d'Arcachon, susceptibles de perturber la reproduction de *Crassostrea gigas*, doivent être recherchés.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail.

Depuis une dizaine d'années, la maïssiculture s'est fortement développée en Gironde, où elle occupe actuellement 36.000 ha, et s'accompagne de l'utilisation de pesticides et herbicides. Parmi ces derniers, un composé d'Atrazine et de Simazine est le plus employé. Les traitements se font en fin de printemps, à raison de 4 - 6 l. par ha et donc 180.000 litres en moyenne de produits, comprenant 50 % de composés actifs, sont épandus chaque année.

MATERIEL ET METHODE.

Tout altéragène peut avoir une influence néfaste sur un organisme vivant, soit directement, soit en perturbant son alimentation. L'action du produit a donc été testée sur l'embryogénèse et les larves de *Crassostrea gigas* ainsi que sur deux souches du nanoplancton utilisées pour leur nutrition en milieu contrôlé. Dans ce dernier cas, seules les concentrations inférieures à celles qui perturbent la croissance larvaire ont été retenues afin de déterminer si ces faibles teneurs, sans action directe sur les organismes, peuvent nuire à leur développement par le biais de perturbations des algues fourrage.

Elevage larvaire.

Les techniques utilisées ont déjà été exposées (Robert et al., 1982; His et Robert, 1985) aussi, nous n'en rappellerons que les grandes lignes. La maturation des géniteurs est réalisée pendant 3 à 4 semaines en circuit fermé à la température de $20^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Les émissions sont obtenues par chocs thermiques et stimulation chimique. Les fécondations sont réalisées en double exemplaire en eau de mer filtrée ($0,2 \mu\text{m}$) contaminée ou non (témoins). Après incubation (24 heures), 8.000 larves/l sont réparties dans des béciers stériles de 2 l. contenant de l'eau de mer filtrée aux différentes concentrations en toxiques. Un apport quotidien de 100 cellules/ μl d'un mélange d'*Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros calcitrans* assure la nutrition de végétaux maintenues à la température de 24°C . Le renouvellement de l'eau des élevages et du micropolluant s'effectuent 24 heures après la fécondation, puis tous les deux jours et s'accompagne d'un échantillonnage larvaire. Les observations poursuivies pendant 10 jours portent sur les pourcentages de larves D formées, de larves anormales et de mortalités. La croissance des végétaux est étudiée par mensuration de la hauteur de 50 individus par élevage à $1,5 \mu\text{m}$ près, sur clichés photographiques. Les moyennes sont calculées avec un intervalle de confiance de 95 %.

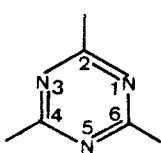
Développement phytoplanctonique.

Les cultures utilisées pour ces expériences sont fréquemment employées en laboratoire pour la nutrition des bivalves marins. Il s'agit de *Chaetoceros calcitrans*, Baccillariophycée et d'*Isochrysis aff. galbana* (= T.iso), Prymnesiophycée. La salinité de l'eau de mer est ramenée à $25 \text{‰} \pm 1 \text{‰}$. Elle est filtrée à $0,2 \mu\text{m}$, enrichie en sels minéraux et vitamines, puis autoclavée.

Le milieu de croissance employé est celui de Conway (Walne 1966) auquel il convient d'ajouter 2 ml/l de métasilicate $\text{Na}_2 \text{Si}_7 \text{O}_3$ pour les diatomées (Laing 1979). Puis le toxique est rajouté stérilement dans chacun des erlenmeyers de 2 l, contenant 1 l de milieu et inoculé à l'aide de 100 ml d'algue issue d'une même culture. A chaque concentration deux erlenmeyers sont ensemencés et sont maintenus à la température de $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$. sous éclairage permanent pendant 20 jours. Deux prélèvements de 20 ml par semaine sont réalisés. La croissance phytoplanc- tonique est établie par comptage de cellules au compteur de particules modèle ZB.ZBI. équipé d'un tube à orifice de 100 μm d'ouverture.

Préparation du toxique.

L'Atrazine, $\text{C}_{18} \text{H}_{14} \text{Cl} \text{N}_5$ et la Simazine, $\text{C}_7 \text{H}_{12} \text{Cl} \text{N}_5$ sont deux composés appartenant au groupe des triazines dont la structure de base est la suivante :



une faible solubilité dans l'eau, ainsi qu'une persistance de plusieurs mois dans le sol caractérisent ces herbicides. En maïssiculture, une formulation contenant 250 g/l d'Atrazine et 250 g/l de Simazine, soit 500 g/l de produit actif, est la plus utilisée. C'est ce mélange qui est retenu pour les expériences.

Les différentes concentrations sont établies en tenant compte de la faible solubilité de ces herbicides dans l'eau. Une suspension de 10 ml/l en eau distillée stérile est homogénéisée pendant 1 heure à l'agitateur magnétique. Les concentrations en produits actifs inférieures à 0,25 mg/l sont établies par adjonction dans l'eau des élevages de volumes adéquats de la suspension. Une dilution de la solution mère permet l'obtention des plus faibles concentrations, 0,1 mg/l et 0,05 mg/l. Huit concentrations comprises entre 10 mg/l et 0,1 mg/l de produits actifs ont été testées sur les oeufs et les larves de *Crassostrea gigas*. Quatre concentrations inférieures ou égales à 1 mg/l ont été expérimentées sur les algues.

RESULTATS.

Action sur l'embryogénèse et la formation de larves D.

24 heures après les fécondations, les larves D sont observées dans tous les élevages. Les taux d'anomalies sont peu importants (5 %) pour les concentrations inférieures ou égales à 1 mg/l. Par contre, au dessus de cette valeur, ils augmentent avec la teneur en toxique. Ainsi, 15 à 20 % de véligères anormales sont dénombrées à 2,5 mg/l et 5 mg/l, et 75 % le sont à 10 mg/l. Les anomalies se caractérisent principalement par des charnières concaves et un vélum boursoufflé.

Action sur les mortalités et les croissances larvaires.

La teneur de 1 mg/l représente encore une limite au-delà de laquelle des mortalités importantes apparaissent dans les élevages. Elles sont progressives et atteignent des taux de 80 à 100 % aux concentrations supérieures ou égales à 7,5 mg/l dès le sixième jour. Les larves soumises aux teneurs supérieures ou égales à 2,5 mg/l meurent dès le huitième jour. En dessous de cette valeur les mortalités sont peu importantes tout au long de l'expérience.

L'action de l'Atrazine-Simazine sur la croissance larvaire de *Crassostrea gigas* est représentée dans le tableau 1. La représentation graphique ne concerne que les élevages soumis

aux concentrations de 0 mg/l (témoins), 0,5 mg/l, 1 mg/l et 2,5 mg/l (fig 1). A 10 mg/l, les végétaux présentent une très faible croissance jusqu'au 4ème jour, au-delà duquel les élevages n'ont pu être poursuivis (mortalités). De 7,5 mg/l à 2,5 mg/l, un ralentissement puis un arrêt de la croissance larvaire est observé au-delà du deuxième jour d'élevage. A 1 mg/l la croissance larvaire est affectée dès le 4ème jour.

Par contre aux concentrations inférieures, aucune différence significative de taille n'est observée comparativement aux témoins.

La teneur de 0,50 mg/l représente donc un seuil au-delà duquel la croissance larvaire est anormale.

Age des larves en jours	CONCENTRATIONS en mg/l								
	0	0,1	0,25	0,5	1	2,5	5	7,5	10
1	61,25 ±0,57	61,80 ±0,72	61,54 ±0,85	61,96 ±0,80	58,65 ±0,87	59,98 ±0,89	59,94 ±0,74	59,20 ±0,59	59,76 ±0,88
2	67,88 ±0,59	68,30 ±0,68	70,71 ±0,60	67,89 ±0,64	68,97 ±0,60	68,69 ±0,61	67,00 ±0,65	67,36 ±0,58	63,23 ±0,64
4	79,20 ±0,96	----	80,43 ±0,91	81,18 ±1,27	77,10 ±1,02	75,15 ±0,85	74,07 ±1,02	72,01 ±0,72	64,96 ±0,77
6	94,81 ±4,33	102,44 ±3,13	97,78 ±2,75	98,56 ±2,44	82,95 ±2,10	76,24 ±1,37	73,30 ±1,60	/////	/////
8	107,61 ±5,22	115,69 ±3,72	110,87 ±3,30	111,89 ±3,02	104,41 ±4,52	/////	/////	/////	/////
10	127,79 ±6,77	132,10 ±5,01	130,92 ±6,64	131,42 ±3,46	109,79 ±4,84	/////	/////	/////	/////

-----Pas de mesure

///// Arrêt des élevages

Tableau 1 : Hauteurs moyennes exprimées en µm avec intervalle de confiance au seuil de sécurité de 95 % des larves de *Crassostrea gigas* élevées à différentes concentrations en Atrazine-Simazine.

Action sur la croissance de 2 souches phytoplanctoniques

Deux séries expérimentales ont été réalisées avec chacune des deux algues testées. Les réponses ont été similaires. L'action de l'Atrazine-Simazine sur les croissances d'*Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros calcitrans* est représentée dans la figure 2. Chez les deux espèces, la teneur de 0,1 mg/l représente un seuil au-delà duquel une inhibition de la croissance phytoplanctonique et des mortalités cellulaires sont observées. Une réponse différente est obtenue à la concentration de 0,1 mg/l. Un léger ralentissement de la croissance est observée chez *Isochrysis aff. galbana*. A l'inverse, celle-ci semble stimulée chez *Chaetoceros calcitrans*.

Figure 1 : Croissances larvaires de *Crassostrea gigas* soumises à des concentrations croissantes en Atrazine-Simazine.

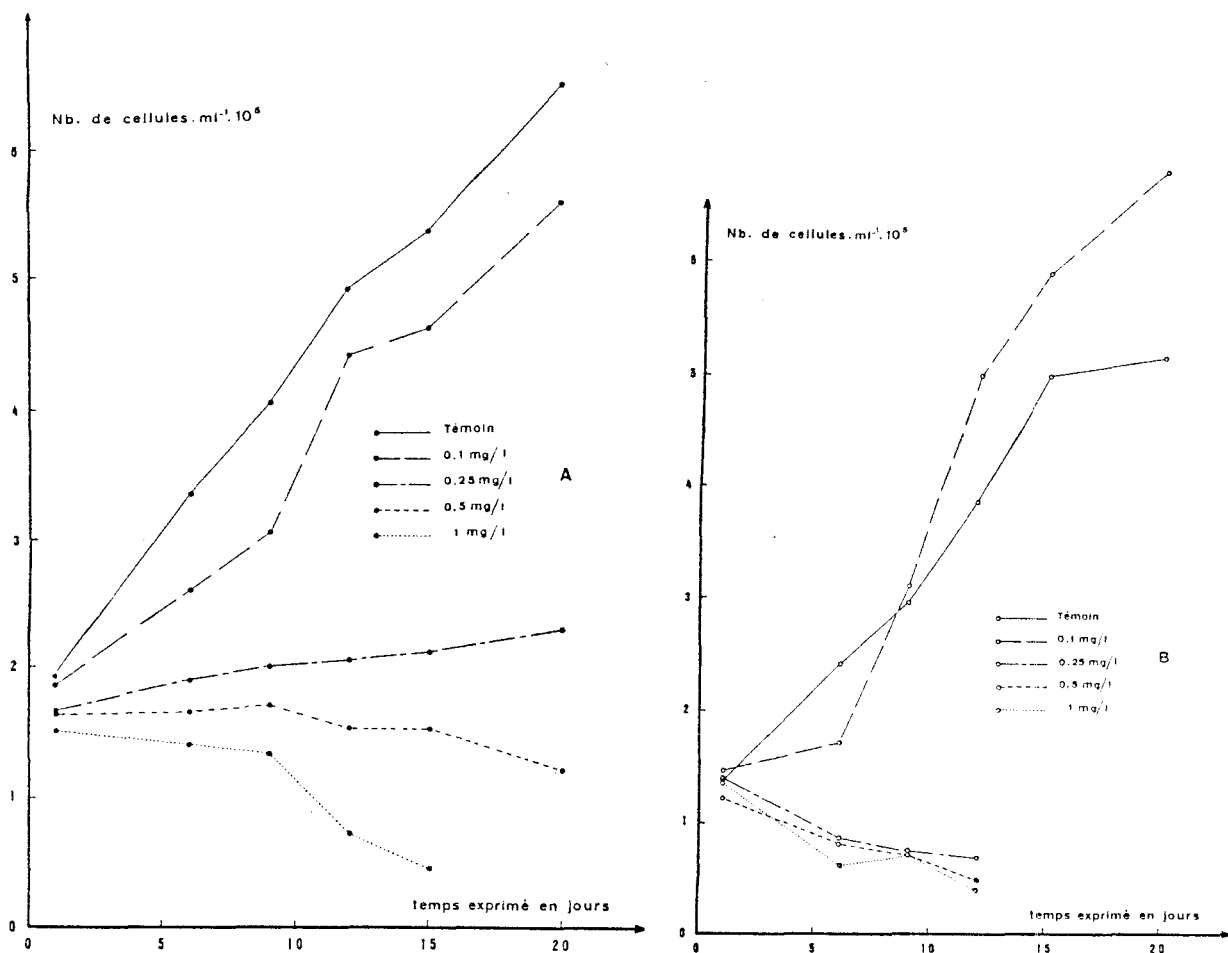
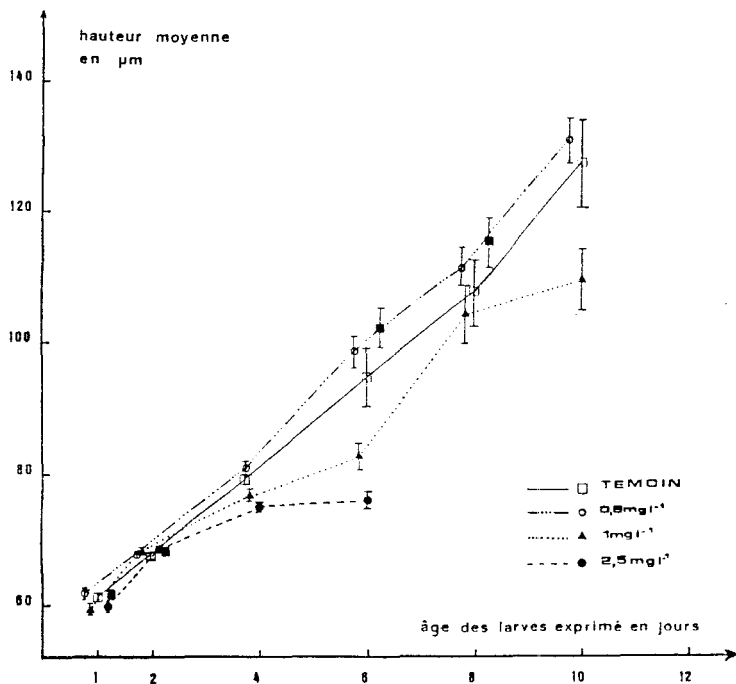


Figure 2. : Croissances d'*Isochrysis aff. galbana* (A) et *Chaetoceros calcitrans* (B) exposées à des teneurs croissantes en Atrazine-Simazine.

DISCUSSION - CONCLUSION.

L'Atrazine-Simazine n'a aucune action sur le développement embryonnaire de *Crassostrea gigas* jusqu'à la teneur de 1 mg/l. Au-delà, les perturbations de l'embryogénèse se manifestent par un taux croissant d'anomalie larvaire, en fonction de la teneur en toxique. C'est encore dès cette teneur que l'on note un ralentissement des croissances des véligères, s'accompagnant de mortalité.

Le seuil de sensibilité de *Crassostrea gigas* à l'Atrazine-Simazine est donc égal à 0,5 mg/l puisqu'à cette valeur les développements embryonnaires et larvaires ne sont pas affectés. Par contre, à cette concentration, aucune croissance phytoplanctonique n'est observée chez *Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. Il faut descendre à 0,1 mg/l pour lever cette inhibition.

Ces derniers résultats sont difficilement comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs. Ainsi Neuville et al. (1974) estiment le seuil de sensibilité de *Navicula ostrearia* et *Phaeodactylum tricornutum* à l'Atrazine respectivement à 1 et 2 mg/l. A 2,2 mg/l une importante réduction de la photogénèse, de la croissance et de la teneur en chlorophylle est observée chez *Navicula sigma* et *Thalassiosira fluviatilis* (Plumley & Davis, 1980). Une réduction de 50% du dégagement d'oxygène a été démontrée chez *Chlorella pyrenoidosa* à la très faible teneur en Atrazine de 0,04 mg/l. (Lefebvre & Calvet, 1980). Seules les observations d'Hollister et Walsh (1973) sont en accord avec nos résultats puisqu'à la teneur de 0,1 mg/l, une réduction de 50% de la consommation d'oxygène est obtenue chez *Isochrysis galbana*. Chez les baccillariophyceae une plus grande résistance au toxique est notée par ces mêmes auteurs.

Les conditions expérimentales, les algues utilisées et les méthodes d'analyse expliquent, à notre avis, l'hétérogénéité des résultats. Ainsi pour une inhibition de 50 % du dégagement d'oxygène, la sensibilité de *Chlorella pyrenoidosa* varie de 0,04 à 0,73 mg/l selon les conditions expérimentales proposées par les différents auteurs (Lefebvre & Calvet, 1980). Les travaux de Ukeless (1962) et plus précisément, ceux d'Hollister & Walsh (1973) démontrent que la réponse à un même toxique varie selon les organismes phytoplanctoniques. Rappelons que 2 séries expérimentales pour chacune des algues testées ont été réalisées et que les réponses obtenues ont été les mêmes.

En dessous de 1 mg/l, aucune toxicité directe à l'Atrazine-Simazine n'est observée sur les oeufs et les véligères de *Crassostrea gigas*. Par contre, en inhibant dès la concentration de 0,25 mg/l la croissance du nanoplancton nourricier, le développement larvaire de *Crassostrea gigas* peut être fortement perturbé. 0,1 mg/l représente donc le seuil d'action par toxicité indirecte de l'Atrazine-Simazine sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* puisqu'à cette valeur, la croissance phytoplanctonique n'est pas affectée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- HIS, E. et ROBERT, R., 1985. Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marti.*, 47 (1 et 2) : 63-88.

- HOLLISTER, T.A. et WALSH, G.E., 1973. Differential responses of marine phytoplankton to herbicides : oxygen evolution.
Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, Vol.9, n° 5 : 291-295.
- LAING, I., 1979. Recommended procedures for the culture of *Chaetoceros calcitrans*. *Fisheries Research Technical Report* 53 : 8-12.
- LEFEBVRE - DROUET, E. et CALVET, R., 1978. La détection et le dosage des herbicides à l'aide des chlorelles : recherches sur les conditions expérimentales optimales et application à l'analyse de plusieurs herbicides. *Week. Research*, Vol. 18 : 33-39
- NEUVILLE, D., DASTE, P. et LONGCHAMP, R., 1974. Toxicité comparée de divers pesticides à l'égard de deux espèces de diatomées utiles à l'ostréiculture.
C.R. Acad. Sc. Paris, t. 279. Série D : 675-678.
- PLUMLEY, G.F. et DAVIS, D.E., 1980. The effects of a photosynthesis inhibitor atrazine on salt marsh edaphic algae, in culture, microecosystems and in the field.
Estuaries, Vol.3., n° 4 : 271-277.
- ROBERT, R., HIS, E. et MAURER, D., 1982. L'unité d'écophysiologie et de molysmologie larvaire des bivalves d'intérêt commercial du laboratoire I.S.P.T.M. d'Arcachon.
Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45 (3) : 197-209.
- UKELESS, R., 1962. Growth of pure cultures of marine phytoplankton in the presence of toxicants
Applied Microbiology, Vol. 10, n° 6 : 532-537.
- WALNE, P.R., 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L.
Fishery Invest. Cond., Ser. 2, 26 (5) : 1-62.
