

Antioxidant response of a common herbivorous fish species (*Sarpa salpa*): Seasonal variation

Respuesta antioxidante de una especie de pez herbívora (*Sarpa salpa*): Variación estacional

K Bellassoued^{1,2*}, A Hamza², A Abdelmouleh², J van Pelt³, A Elfeki¹

¹ Laboratory of Animal Ecophysiology, Science Faculty, University of Sfax, BP 1171, 3018 Sfax, Tunisia.

² National institute of Sciences and Technologies of the Sea, Sfax, Tunisia.

³ Liver Research Facility/Laboratory of Hepatology, University Hospital Gasthuisberg, 3000 Leuven, Belgium.

* Corresponding author. E-mail: khaledbra@yahoo.fr, khaledbra3@gmail.com

ABSTRACT. Within the framework of a biosurveillance of marine species on Tunisian coasts, we studied the salema *Sarpa salpa*, a fish that is consumed by the people living in this region. There is a seasonal occurrence of hallucinogen effects observed when this fish is consumed by humans. The aim of this work was to determine the seasonal variation in the composition of this fish's diet and to correlate this variation with the antioxidant activity found in its tissues. The salema that lives around the Island of Kerkennah is primarily a herbivorous fish during all seasons. We observed an increased expression of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in certain organs compared to the control fish, *Diplodus annularis*. There was a "season-depending" cumulative effect, appearing in the organs starting with the liver, followed by the brain, and finally the flesh. Moreover, it increases according to the size of the animal and thus to the amount of food it consumes. The hallucinogen effect that the consumption of salema has on humans is parallel to the seasonal variation in the epiphytes that are co-ingested by these fish with their food. A significant correlation ($P < 0.01$) was also observed between the total toxic dinoflagellates and the antioxidant response: CAT and GPx in liver, brain, and flesh for all seasons and all sizes together.

Key words: *Sarpa salpa*, toxic dinoflagellate, antioxidant enzyme, catalase, glutathione peroxidase.

RESUMEN. En el marco de un muestreo biológico de las especies marinas en las costas de Túnez, se estudió la salema *Sarpa salpa*, un pescado que es consumido por los habitantes de esta región. Se ha observado un acontecimiento estacional de efectos alucinógenos en los seres humanos después de consumir este pescado. El objetivo de este trabajo fue determinar la variación estacional de la composición de la dieta de *S. salpa* y correlacionar esta variación con la actividad antioxidante observada en los tejidos. La salema que se encuentra alrededor de la isla de Kerkennah es principalmente un pez herbívoro durante todas las estaciones del año. Se observó un incremento de la expresión de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) en ciertos órganos en comparación con el pez control, *Diplodus annularis*. Se encontró un efecto acumulativo dependiente de la estación, que apareció primero en el hígado, después en el cerebro y por último en la carne. Además, se incrementa según el tamaño del animal y, por tanto, la cantidad de alimento que consume. El efecto alucinógeno que el consumo de la salema tiene en el ser humano se relaciona con la variación estacional de las epifitas que son coingeridas por estos peces con su comida. También se observó una correlación significativa ($P < 0.01$) entre el total de dinoflagelados tóxicos y la respuesta antioxidante: CAT y GPx en el hígado, el cerebro y la carne para todas las estaciones y tallas en conjunto.

Palabras clave: *Sarpa salpa*, dieta, dinoflagelados tóxicos, enzima antioxidante, catalasa, glutatión peroxidasa.

INTRODUCTION

Eutrophication of marine coastal water and global warming have led to an important proliferation of microalgae and particularly toxic dinoflagellates, producing a large variety of toxins that contaminate tissues of shellfishes and fishes. The concentration of human population in coastal areas increases the dependence on sea food consumption, resulting in increased occurrence of sea food poisoning (Wu *et al.* 2005). Salema *Sarpa salpa* (Linnaeus 1758) is a herbivorous sea fish that preferentially feeds on *Posidonia oceanica* throughout the year (Peirano *et al.* 2001) and is used for human consumption. Due to its low cost, this fish is

INTRODUCCIÓN

La eutrofización de las aguas marinas costeras y el calentamiento global han causado una proliferación importante de microalgas y dinoflagelados particularmente tóxicos, los cuales producen una gran variedad de toxinas que contaminan los tejidos de los moluscos, los crustáceos y los peces. La concentración de la población humana en las zonas costeras ha aumentado la demanda de productos del mar y, por tanto, los casos de intoxicación por mariscos (Wu *et al.* 2005). La salema *Sarpa salpa* (Linnaeus 1758) es un pez herbívoro que se alimenta preferentemente de *Posidonia oceanica* durante todo el año (Peirano *et al.* 2001) y se utiliza para el

predominantly on the menu of the lower income class. An important observation is the presence of ciguateric species that live as epiphytes on the leaves of *P. oceanica* (Ben Brahim *et al.* 2010); they are co-ingested by the salema as part of their diet (Velimirov 1984). Indeed, the consumption of salema is inadvisable in certain periods of the year (especially in summer and autumn) because this fish causes a hallucinatory syndrome and central nervous system disorders, which for a long time were attributed to the presence of caulerpin in the Chlorophyceae alga *Caulerpa prolifera* (Haro *et al.* 1994).

Epiphytes are important contributors to the primary production of seagrass ecosystems and exhibit significant seasonal fluctuations in biomass and productivity (Mazzella *et al.* 1992). Epiphyte growth is influenced by the same abiotic factors that influence the seagrass host (e.g., irradiance, temperature, and dissolved inorganic nutrients; Williams and Ruckelshaus 1993). In addition, biotic factors play a significant role in shaping the epiphyte community, notably leaf turnover of the seagrass host (Romero 1989) and grazing (Neckles *et al.* 1993, Williams and Ruckelshaus 1993), since algal epiphytes have been found to be a more attractive food for herbivores than the seagrass leaves themselves (Kitting *et al.* 1984). In this context, the Gulf of Gabes (southern Tunisia, 35–33° N), which has been put under environmental pressure due to industrial and urban activities (Hamza-Chaffai *et al.* 1997, Zairi and Rouis 1999), has experienced a substantial proliferation of microalgae and particularly toxic dinoflagellates (Turki *et al.* 2006). The proliferation of unwanted microalgae has been widely shown to be an increasing problem in both coastal and estuarine environments (Smayda 1997, Leong and Taguchi 2005). In the open sea in the Gulf of Gabes, nutrient inputs have been shown to be influenced by both the frontal and the Atlantic-Mediterranean water circulation (Estrada *et al.* 1985, Font *et al.* 1995). This is associated with degradation of the *P. oceanica* seagrass meadows and, as a result, the decline of fish resources in the Gulf of Gabes.

Ciguatera food poisoning is due to the presence in fish of a toxin produced by the benthic alga *Gambierdiscus toxicus* and other coral microalgae, most of them belonging to three genera: *Prorocentrum*, *Ostreopsis*, and *Amphidinium*. A less common form is ichthyallyeinotoxism, characterized by the development of central nervous system disturbances, especially hallucinations and nightmares. Ichthyallyeinotoxism has been reported in many locations around the world (Halstead 1988, Chateau-Degat 2003), and is widespread in tropical and temperate areas of the Indian and Pacific Oceans as well as in the Mediterranean Sea. Fish species described as hallucinogenic in the literature belong to the following eight families: Acanthuridae, Kyphosidae, Mugilidae, Mullidae, Pomacentridae, Serranidae, Siganidae, and Sparidae. *Sarpa salpa* nourishes mainly on *P. oceanica* leaves, which show high colonization by epiphytes (Peirano *et al.* 2001). *Posidonia oceanica* leaves and the epiphytes they support

consumo humano. Debido a su bajo costo, la salema aparece principalmente en el menú de la clase trabajadora de bajos ingresos. Se ha documentado la presencia de especies que causan la ciguatera y que viven como epifitas en las hojas de *P. oceanica* (Ben Brahim *et al.* 2010), las cuales son coingeridas por la salema como parte de su dieta (Velimirov 1984). Inclusive, el consumo de la salema no es recomendable en ciertos periodos del año (especialmente en verano y otoño) ya que causa un síndrome alucinatorio y trastornos del sistema nervioso central, que durante mucho tiempo fueron atribuidos a la presencia de caulerpina en el alga verde *Caulerpa prolifera* (Haro *et al.* 1994).

Las epifitas son importantes contribuyentes a la producción primaria de los ecosistemas de pastos marinos y presentan importantes fluctuaciones estacionales de la biomasa y la productividad (Mazzella *et al.* 1992). El crecimiento de las epifitas se ve influenciado por los mismos factores abióticos que afectan la planta huésped (e.g., irradiación, temperatura y nutrientes inorgánicos disueltos; Williams y Ruckelshaus 1993). Los factores bióticos también juegan un papel importante en la conformación de la comunidad epifítica, sobre todo en el cambio de hojas de los pastos marinos (Romero 1989) y el pastoreo (Neckles *et al.* 1993, Williams y Ruckelshaus 1993), ya que las epifitas algales suelen ser un alimento más atractivo para los herbívoros que las mismas hojas de los pastos marinos (Kitting *et al.* 1984). En este contexto, el golfo de Gabes (sur de Túnez, 35–33° N), que ha sido sujeto a presiones ambientales debido a actividades industriales y urbanas (Hamza-Chaffai *et al.* 1997, Zairi y Rouis 1999), ha experimentado una proliferación importante de microalgas y dinoflagelados particularmente tóxicos (Turki *et al.* 2006). Se ha demostrado que la proliferación de microalgas no deseadas es un problema creciente en ambientes tanto costeros como estuarinos (Smayda 1997, Leong y Taguchi 2005). Mar adentro en el golfo de Gabes, los aportes de nutrientes son influenciados por la circulación frontal y de agua atlántica y mediterránea (Estrada *et al.* 1985, Font *et al.* 1995). Esto se asocia con la degradación de las praderas marinas de *P. oceanica* y, consecuentemente, con la declinación de los recursos pesqueros en el golfo de Gabes.

La intoxicación alimentaria por ciguatera se debe a la presencia en el pescado de una toxina producida por el alga bentónica *Gambierdiscus toxicus* y otras microalgas coralinas, la mayoría pertenecientes a tres géneros: *Prorocentrum*, *Ostreopsis* y *Amphidinium*. Una forma menos común de ictiotoxismo es la intoxicación alucinógena (ichthyallyeinotoxism), caracterizada por el desarrollo de trastornos del sistema nervioso central, especialmente alucinaciones y pesadillas. Se ha documentado este tipo de intoxicación en varios lugares del mundo (Halstead 1988, Chateau-Degat 2003) y es muy común en las zonas tropicales y templadas de los océanos Índico y Pacífico, así como en el mar Mediterráneo. Las especies ícticas descritas como

represent important food items for different grazer species such as the echinoderm *Paracentrotus lividus* (Kirkman and Young 1981), and the school-forming sparid fish *S. salpa* (Velimirov 1984). It should be noted that toxicity in all species varies according to fishing location, season, and method of preparing the fish for food (Helfrich and Banner 1960). These toxins are increased to dangerous levels for humans during their transmission through herbivorous and carnivorous fish, various species being contaminated (Vaillant *et al.* 2001).

Cellular oxidative metabolism is a continuous source of reactive oxygen species (ROS); resulting from univalent reduction of O₂, these highly reactive species can damage most cellular components. The cellular antioxidant system involves enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase that act by detoxifying the ROS generated. Nevertheless, in many cases, the rate of generation of ROS exceeds that of their removal, inducing an oxidative stress and increasing oxidative markers. It is well established that pollutants, such as various pesticides (Sayeed *et al.* 2003) and metals (Almeida *et al.* 2002), as well as hyperoxic exposure (Lushchak and Bagnyukoca 2006) stimulate protective mechanisms against ROS. In a natural environment like the sea, intoxication of the aquatic organisms by toxic phytoplankton species occurs. It is thus relevant to study oxidative stress in fish because of the possible effects on organisms and in relation to fish consumption by humans.

Contaminants in exposed aquatic organisms increase the production of ROS, leading to oxidative damage (Shi *et al.* 2005, Livingstone 2001). Changes in the levels of endogenous antioxidant defenses have been proposed as biomarkers of aquatic pollution (Camus *et al.* 2004, Livingstone 2001). Activation of the antioxidant enzymatic system suggests that the defense system plays an important role in the response to an increased oxidative situation. The determination of antioxidant enzyme activities in fish organs allows detecting the presence of pollutants and toxins (Suredda *et al.* 2006), such as ciguatoxin, present in epiphytes of *P. oceanica* seagrass meadows. This study aimed to specify the seasonal trend of the food sources and antioxidant activities in liver, brain, and flesh of *S. salpa*, and correlate them.

MATERIAL AND METHODS

Collection and sampling

The study was carried out off the Island of Kerkennah (Gulf of Gabes, southeastern Tunisia). This archipelago is characterized by extensive *P. oceanica* seagrass meadows. Specimens of *S. salpa* were collected between January 2006 and January 2007, at different points of time in each season; 59 specimens were collected in winter, 57 in spring, 57 in summer, and 55 in autumn. Sizes ranged from 12.8 to 28 cm. Fish were measured for total length (TL) to the nearest

alucinógenas en la literatura pertenecen a las siguientes ocho familias: Acanthuridae, Kyphosidae, Mugilidae, Mullidae, Pomacentridae, Serranidae, Siganidae y Sparidae. *Sarpa salpa* se alimenta principalmente de las hojas de *P. oceanica*, las cuales muestran un alto grado de colonización de epifitas (Peirano *et al.* 2001). Las hojas de *P. oceanica* y las epifitas que mantienen representan una fuente de alimento importante para las distintas especies que pastorean como el equinodermo *Paracentrotus lividus* (Kirkman y Young 1981) y *S. salpa*, un pez espárido que forma cardúmenes (Velimirov 1984). Cabe señalar que la toxicidad de todas las especies varía según la zona de pesca, la temporada y el método de preparar el pescado para su consumo (Helfrich y Banner 1960). Las toxinas se incrementan a niveles peligrosos para los seres humanos durante su transmisión mediante peces herbívoros y carnívoros, y varias especies resultan contaminadas (Vaillant *et al.* 2001).

El metabolismo oxidativo celular es una fuente continua de especies reactivas de oxígeno (ERO); producidas por la reducción univalente de O₂, estas especies altamente reactivas pueden dañar la mayoría de los componentes celulares. El sistema antioxidante celular incluye enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa que actúan mediante la detoxificación de las ERO generadas. No obstante, en muchos casos, la tasa de generación de ERO excede la de su remoción, provocando el estrés oxidativo e incrementando los marcadores oxidativos. Es bien conocido que los contaminantes, tales como varios pesticidas (Sayeed *et al.* 2003) y metales (Almeida *et al.* 2002), así como la exposición hiperóxida (Lushchak y Bagnyukoca 2006) estimulan mecanismos de protección contra ERO. En un ambiente natural como el mar, existe la intoxicación de organismos acuáticos por especies de fitoplancton tóxicas. Por ende, es importante estudiar el estrés oxidativo en peces debido a los posibles efectos sobre los organismos y en relación con el consumo de pescado por los seres humanos.

Los contaminantes en organismos acuáticos incrementan la producción de ERO, provocando daño oxidativo (Shi *et al.* 2005, Livingstone 2001). Se han propuesto los cambios en los niveles de defensa antioxidante endógena como marcadores biológicos de la contaminación acuática (Camus *et al.* 2004, Livingstone 2001). La activación del sistema enzimático antioxidante sugiere que el sistema de defensa juega un papel importante en la respuesta a una elevada situación oxidativa. La determinación de las actividades de las enzimas antioxidantes en los órganos de peces permite detectar la presencia de contaminantes y toxinas (Suredda *et al.* 2006), tales como la ciguatoxina, que se presenta en las epifitas de las praderas de *P. oceanica*. El objetivo de este trabajo fue especificar los patrones estacionales de las fuentes de alimento y las actividades antioxidantes en el hígado, el cerebro y la carne de *S. salpa* y correlacionarlos.

0.1 cm and weighed to the nearest 0.1 g. Immediately after capture, fish were dissected and the guts were removed and preserved in a 4% formalin solution. In the laboratory, prey identification was carried out to the lowest possible taxonomic level. Species abundance and wet weight were recorded to the nearest ± 0.001 g, after removal of surface water by blotting on tissue paper. We also immediately removed the liver, brain, and flesh, rinsed them with ice-cold saline and kept them at -30°C in the same conserving conditions as those used for the control fish, the annular seabream *Diplodus annularis* (Linnaeus 1758), belonging to the same biotope and to the same family.

Stomach content analysis

To assess possible changes in diet with respect to size, fish were divided into two size classes according to Pallaoro *et al.* (2008): adults (3–7 years), $\text{TL} > 20$ cm (large size); and subadults (2 years), $17 \text{ cm} < \text{TL} < 20$ cm (medium size).

For each specimen whose stomach was filled with sea-grass leaves and epiphytes, we further examined the composition and determined the food source. The stomach contents were washed in a Petri dish and studied under a microscope. The food items were sorted into large taxonomic groups and, when possible, identified to species level according to Fischer *et al.* (1987). The diet of the salema was characterized using the vacuity index (VI), the relative mass of item i , and the percentage gravimetric composition (% C_w , the wet weight of prey items in the total wet weight of non-empty stomachs), according to the following formulas:

$$\text{VI} = \frac{\text{Number of empty stomachs}}{\text{Number of stomachs studied}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ (relative mass)} = \frac{\text{Mass of item } i}{\text{Total mass of stomach contents}} \times 100 \quad (2)$$

$$C_w = \frac{\text{Mass of item } i}{\text{Total mass of prey}} \times 100 \quad (3)$$

Analysis of the vacuity index over time could inform us about the dietary behavior of fish and allow us to formulate seasonal or monthly rhythms.

Item i can be a group, a family, a genus, or a species depending on the degree of food source determination.

Analysis of the micro-epiphytic species in the stomach contents

The stomach contents were put in a beaker and 500 mL of seawater were added. The whole mixture was then shaken and filtered. The filtered water was preserved in 3% formol.

Phytoplankton was identified from live cells to avoid cell destruction. Phytoplankton enumeration was performed using an inverted microscope following the method proposed

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y muestreo

Este estudio se realizó en las inmediaciones de la isla de Kerkennah (golfo de Gabes, sureste de Túnez). Este archipiélago se caracteriza por extensas praderas de *P. oceanica*. Los especímenes de *S. salpa* se recolectaron entre enero de 2006 y enero de 2007, en diferentes momentos de cada estación del año. Se recolectaron 59 especímenes en invierno, 57 en primavera, 57 en verano y 55 en otoño. Las tallas variaron entre 12.8 y 28 cm. A cada organismo se le midió la longitud total (LT) con una precisión de 0.1 cm y el peso total con una precisión de 0.1 g. Inmediatamente después de su captura, los peces fueron disecados y los intestinos fueron retirados y preservados en una solución de formalina al 4%. En el laboratorio, las presas se identificaron hasta el nivel taxonómico más bajo posible. La abundancia de las especies y el peso húmedo se registraron con una precisión de ± 0.001 g, después de eliminar el agua superficial con un papel secante. Asimismo, inmediatamente se retiraron el hígado, el cerebro y la carne, y se lavaron con una solución salina helada y se conservaron a -30°C en las mismas condiciones en las que se mantuvo el pez control, el raspallón *Diplodus annularis* (Linnaeus 1758), que pertenece al mismo biotopo y a la misma familia.

Análisis del contenido estomacal

Para evaluar los posibles cambios en la dieta en relación con la talla, los individuos se dividieron en dos clases de talla según Pallaoro *et al.* (2008): adultos (3–7 años), $\text{LT} > 20$ cm (talla grande); y subadultos (2 años), $17 \text{ cm} < \text{LT} < 20$ cm (talla mediana).

Se analizó la composición y fuente de la dieta de cada espécimen cuyo estómago estaba lleno de hojas y epifitas. El contenido estomacal se lavó en una caja de Petri y se examinó debajo de un microscopio. Los componentes tróficos se clasificaron en grandes grupos taxonómicos y, cuando fue posible, se identificaron hasta nivel de especie de acuerdo con Fischer *et al.* (1987). La dieta de la salema se caracterizó usando el índice de vacuidad (IV), la masa relativa del componente i y la composición gravimétrica (% C_p , el peso húmedo de los componentes en el peso húmedo total de los estómagos no vacíos), según las siguientes fórmulas:

$$\text{IV} = \frac{\text{Número de estómagos vacíos}}{\text{Número de estómagos analizados}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ (masa relativa)} = \frac{\text{Masa de la componente } i}{\text{Masa total de los contenidos}} \times 100 \quad (2)$$

$$C_p = \frac{\text{Masa de la componente } i}{\text{Masa total de las presas}} \times 100 \quad (3)$$

by Utermöhl (1958) after fixation with Lugol's iodine solution (4%) (Bourrelly 1985). Phytoplankton samples were identified according to Tregouboff and Rose (1957), Huber-Pestalozzi (1968), Dodge (1973, 1975, 1982, 1985), Balech (1988, 1995), and Tomas *et al.* (1993, 1996). The same protocol was carried out in all four seasons (winter, spring, summer, and autumn).

The concentration of phytoplankton cells (non-toxic diatoms) and toxic epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning (e.g., *Prorocentrum* sp., *Ostreopsis* sp., *Coolia* sp., and *Amphidinium* sp.) was recorded.

Preparation of cytosolic extracts

The frozen liver, brain, and flesh cell samples were homogenized (Ultra Turrax T25, Germany; 1:2, w/v) in an ice cold buffer (TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) and centrifuged (5000 g, 30 min, 4 °C); supernatants were frozen at -30 °C.

Biochemical assays

In fish tissues, catalase activity was measured by the UV colorimetric method described by Aebi (1984), using H₂O₂ as substrate; glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was measured by a modification of the colorimetric method proposed by Flohe and Günzler (1984), using H₂O₂ as a substrate along with a GSH reduction. The protein content of tissue extracts was determined according to Bradford (1976).

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ standard deviation. The determinations were performed from five animals per group and the differences were examined by a two-way analysis of variance (fixed factors: size and season), followed by the Fisher test (Stat View), and the significance was accepted at $P < 0.05$. Also, correlation coefficients (R) were calculated for all sizes and all seasons together using the Pearson correlation.

RESULTS

Nature of the salema stomach contents

Throughout the year of study, the diet of large- and medium-sized *S. salpa* was composed of a variety of marine flora (table 1). In spite of the abundance of *Caulerpa prolifera* in the biotope, this species did not appear in the stomach contents.

Vacuity index

For our study of the dietary behavior of salema, we examined 228 stomachs, 104 of which contained macrophyte

El análisis del índice de vacuidad a través del tiempo nos proporciona información del comportamiento alimentario y nos permite obtener ritmos estacionales o mensuales.

El componente *i* puede ser un grupo, una familia, un género o una especie según el grado de determinación.

Análisis de las especies microepifíticas en el contenido estomacal

El contenido estomacal se introdujo en un frasco al cual se añadieron 500 mL de agua de mar. El frasco se agitó y la mezcla se filtró. El agua filtrada se preservó en formol al 3%.

El fitoplancton se identificó a partir de células vivas para evitar la destrucción de células. La enumeración de las células se realizó con un microscopio invertido, siguiendo el método propuesto por Utermöhl (1958), después de la fijación con una solución de yodo (Lugol) al 4% (Bourrelly 1985). Las muestras fitoplanctónicas se identificaron de acuerdo con Tregouboff y Rose (1957), Huber-Pestalozzi (1968), Dodge (1973, 1975, 1982, 1985), Balech (1988, 1995) y Tomas *et al.* (1993, 1996). Se siguió el mismo protocolo en las cuatro estaciones (invierno, primavera, verano y otoño).

Se registró la concentración de células fitoplanctónicas (diatomeas no tóxicas) y de dinoflagelados epifitos tóxicos asociados con la intoxicación por ciguatera (e.g., *Prorocentrum* sp., *Ostreopsis* sp., *Coolia* sp. y *Amphidinium* sp.).

Preparación de los extractos citosólicos

Las muestras congeladas de las células del hígado, el cerebro y la carne se homogeneizaron (Ultra Turrax T25, Alemania; 1:2, p/v) en un tampón helado (TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) y se centrifugaron (5000 g, 30 min, 4 °C). Los sobrenadantes se congelaron a -30 °C.

Ensayos bioquímicos

En los tejidos, se midió la actividad enzimática de la catalasa mediante el método colorimétrico (con luz UV) descrito por Aebi (1984), usando H₂O₂ como sustrato; la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) se midió mediante una modificación del método colorimétrico propuesto por Flohe y Günzler (1984), usando H₂O₂ como sustrato junto con una reducción de GSH. El contenido proteico de los extractos de tejido se determinó de acuerdo con Bradford (1976).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias $\pm$ desviación estándar. Las determinaciones se realizaron a partir de cinco animales por grupo y las diferencias se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (factores fijos: talla y estación), seguido por la prueba de Fisher (Stat View); el nivel de significancia se fijó en $P < 0.05$. Asimismo, se

Table 1. Diet composition of *Sarpa salpa*, determined from the stomach contents (different varieties of marine flora) of large- and medium-sized salema throughout the year of study.

Tabla 1. Composición de la dieta de *Sarpa salpa*, determinada a partir del contenido estomacal (variedades diferentes de flora marina) de los peces de talla grande y mediana a lo largo del año de estudio.

Marine phanerogam:	<i>Posidonia oceanica</i> (seagrass)
Algae:	<i>Petiolis stipulaceae</i> (red alga) <i>Grateloupia</i> spp. (red alga) <i>Ceramium</i> spp. (red alga) <i>Sphacelaria pluma</i> (red alga) <i>Dictyota dichotoma</i> (brown alga) <i>Cytoseira</i> spp. (brown alga)
Cyanophyta:	<i>Lyngbia</i> spp.

species. Around the Island of Kerkennah (Gulf of Gabes), *S. salpa* was captured at night, which is when the fish are most active generally because they are feeding. The individuals caught were hauled onboard the following morning, so some of them may have remained in the net for several hours, and their capture may have occurred before the ingestion of prey or after digestion. As a result, many specimens had an empty stomach at the moment they were collected.

The seasonal variation of the mean vacuity index for the medium and large size classes showed a decrease in spring (31.57%) and summer (40%) relative to autumn (66.10%), indicating that *S. salpa* fed more in the first two periods.

Seasonal variation coefficient of mass (%) for *Posidonia oceanica*

The percentage gravimetric composition for grazing on *P. oceanica* leaves by *S. salpa* increased gradually from winter to autumn: 18.94% in winter, 48.95% in spring, 59.92% in summer, and 74.8% in autumn. This shows that *P. oceanica* leaves are the preferred food source for the salema in almost all seasons. Algae are a complementary food source according to their availability in the milieu. The epibiont is occasional or complementary for a size class in extreme cases. The diet is not only conditioned by the availability of food but also by the territorial and refuge-seeking behavior of this species.

Diet of the salema

During winter, adult salema generally fed less on *P. oceanica* leaves, which comprised 7.34% of the diet. We noticed an increase in salema grazing of red algae (87.18%) and brown algae (5.77%) (fig. 1). Unlike the adults, for the medium-sized fish we recorded a seasonal grazing on *P. oceanica* leaves reaching 97.34% (fig. 1).

calcularon coeficientes de correlación (R) para todas las tallas y estaciones en conjunto usando la correlación de Pearson.

RESULTADOS

Contenido estomacal de la salema

Durante el año de estudio, la dieta de adultos y subadultos de *S. salpa* consistió de una variedad de flora marina (tabla 1). A pesar de la abundancia de *Caulerpa prolifera* en el biotopo, esta especie no apareció en los contenidos estomacales.

Índice de vacuidad

Para el análisis del comportamiento alimentario de *S. salpa* se examinaron 228 estómagos, de los cuales 104 contenían especies de macrófitos. Los peces se capturaron alrededor de la isla de Kerkennah (golfo de Gabes) durante la noche, ya que es cuando generalmente se están alimentando y están más activos. Los individuos capturados se trasladaron a bordo la mañana siguiente, por lo que algunos podrían haber permanecido en la red durante varias horas y su captura pudo haber sucedido antes de la ingesta de presas o después de la digestión. Consecuentemente, varios de los especímenes tenían el estómago vacío al momento de su recolección.

La variabilidad estacional del índice de vacuidad promedio para las clases de talla grande y mediana mostró un decremento en primavera (31.57%) y verano (40%) en relación con otoño (66.10%), lo que indica que *S. salpa* se alimentó más en los primeros dos periodos.

Coeficiente de variación estacional de la masa (%) para *Posidonia oceanica*

La composición gravimétrica (%) del pastoreo de las hojas de *P. oceanica* por *S. salpa* incrementó gradualmente de invierno a otoño: 18.94% en invierno, 48.95% en primavera, 59.92% en verano y 74.8% en otoño. Esto muestra que las hojas de *P. oceanica* son el alimento preferencial de la salema en casi todas las estaciones. Las algas son un alimento complementario según su disponibilidad en el ambiente. El epibionte es un alimento ocasional o complementario para una clase de talla en casos extremos. La dieta no sólo está condicionada por la disponibilidad de alimentos, sino también por el comportamiento territorial y de búsqueda de refugio de la especie.

Dieta de la salema

En invierno, los adultos de *S. salpa* consumieron menor cantidad de hojas de *P. oceanica*, constituyendo 7.34% de la dieta, e incrementaron su consumo de algas rojas (87.18%) y pardas (5.77%) (fig. 1). A diferencia de los adultos, para los

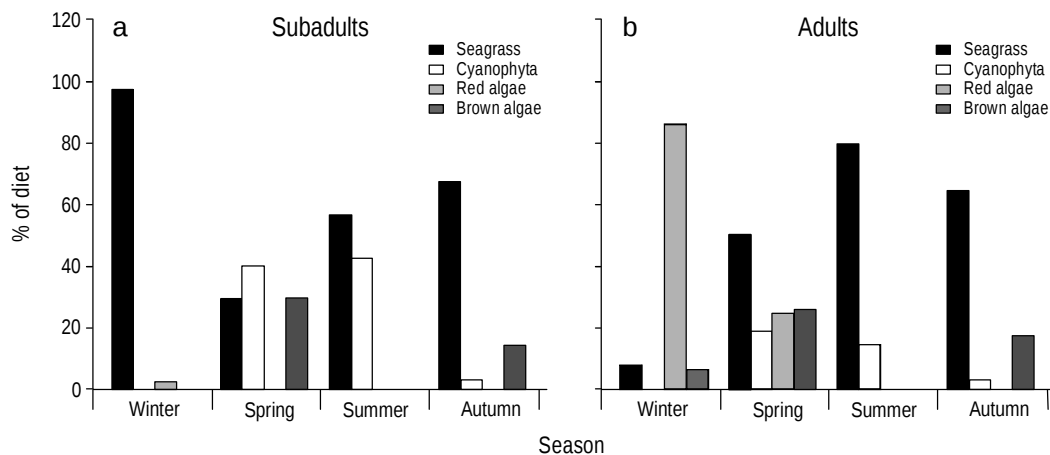


Figure 1. Grazing behavior of *Sarpa salpa*. Diet composition was determined from the stomach content for two size classes, (a) subadults (TL < 20 cm) and (b) adults (TL > 20 cm), in terms of percentage of seasonal grazing.

Figura 1. Comportamiento alimentario de *Sarpa salpa*. La composición de la dieta se determinó a partir del contenido estomacal de dos clases de talla, (a) subadultos (LT < 20 cm) y (b) adultos (LT > 20 cm), en términos del porcentaje de pastoreo estacional.

During spring, we obtained a lower coefficient of the vacuity index since the animal tended to eat more. The grazing rates by salema on *P. oceanica* leaves were rather high for both size classes. The medium-sized fish included the Cyanophyta *Lyngbia* sp. in their diet (up to 40%), certainly not because they prefer them but rather because of the abundance of these algae in the environment (fig. 1).

Summer is the season preceding the reproductive period of large-sized salema. Adult fish increased their grazing of *P. oceanica* leaves, reaching 79.5% during this season, whereas the subadults incorporated more *Lyngbia* sp. into their diet, and the percentage of *Lyngbia* sp. (42.18%) was significant (fig. 1).

During autumn, the reproductive period of this species, the animal does not feed sufficiently; however, we noticed that its food spectrum was much diversified by a multitude of algae. The brown alga *Cytoseira* sp. was identified only in this season, with a percentage of 4.24%. Both adults and subadults attained maximum grazing of *P. oceanica* leaves (64.31% and 67.20%, respectively) (fig. 1).

Evaluation of the phytoplankton composition

The evaluated phytoplankton corresponded to the epiphytic algal microflora digested by the salema. Seasonal variation of the toxic phytoplankton was assessed in terms of the full number of phytoplankton. The toxic phytoplankton species observed in the stomach contents were the dinoflagellates *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum*, *Ostreopsis siamensis*, *Coolia monotis*, and *Amphidinium carterae*. The proportions of toxic species increased in parallel with the total phytoplankton population (fig. 2).

subadults se registró un pastoreo estacional de *P. oceanica* de casi 97.34% (fig. 1).

En primavera, el coeficiente del índice de vacuidad fue menor ya que el animal tiende a comer más. Las tasas de pastoreo de las hojas de *P. oceanica* fueron bastante altas para las dos clases de talla. Los peces de talla mediana incluyeron a *Lyngbia* sp. en su dieta (hasta 40%), ciertamente no por motivos preferenciales sino más bien debido a la abundancia de esta alga en el medio ambiente (fig. 1).

El verano es la estación que precede el periodo reproductivo de los peces de talla grande. Los adultos incrementaron su consumo de las hojas de *P. oceanica*, alcanzando 79.5% durante esta temporada, mientras que los subadultos incluyeron un mayor porcentaje de *Lyngbia* sp. en su dieta, y el porcentaje de *Lyngbia* sp. (42.18%) fue significativo (fig. 1).

En otoño, el periodo reproductivo de esta especie, el animal no consume lo suficiente; sin embargo, se observó que su espectro trófico resultó muy diversificado por una gran cantidad de algas. El alga parda *Cytoseira* sp. (4.24%) sólo se identificó en esta estación. Tanto los adultos como los subadultos alcanzaron su máximo pastoreo de las hojas de *P. oceanica* (64.31% y 67.20%, respectivamente) (fig. 1).

Evaluación de la composición fitoplanctónica

El fitoplancton evaluado correspondió a la microflora epifítica algal digerida por *S. salpa*. La variación estacional del fitoplancton tóxico se evaluó en función del número total de fitoplancton. Las especies de fitoplancton tóxico en los contenidos estomacales fueron los dinoflagelados *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum*, *Ostreopsis siamensis*, *Coolia monotis* y *Amphidinium carterae*. Las proporciones de las especies tóxicas incrementaron en conjunto con la población total de fitoplancton (fig. 2).

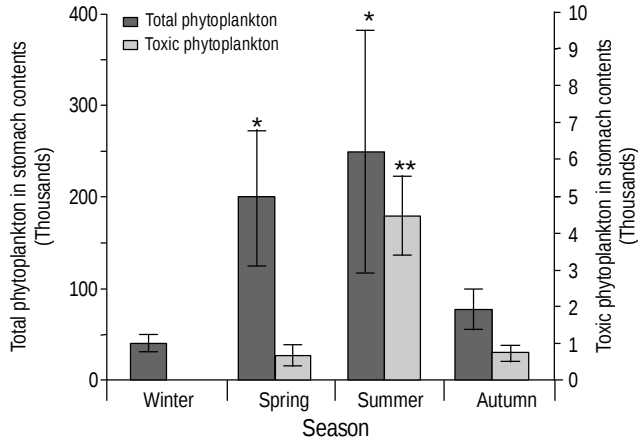


Figure 2. Seasonal variation of the toxic phytoplankton. The total number of phytoplankton counted in 1 L of water from the stomach contents of *Sarpa salpa* was analyzed. The difference between seasons is statistically different for total phytoplankton (* $P < 0.05$ compared to autumn or winter) and for toxic phytoplankton (** $P < 0.05$ compared to autumn, winter, or spring).

Figure 2. Variación estacional del fitoplancton tóxico. Se analizó el número total de fitoplancton en 1 L de agua del contenido estomacal de *Sarpa salpa*. La diferencia entre estaciones es estadísticamente diferente para el fitoplancton total (* $P < 0.05$ en comparación con otoño o invierno) y para el fitoplancton tóxico (** $P < 0.05$ en comparación con otoño, invierno o primavera).

Seasonal variation of the ciguateric species

To evaluate the possible effect of the toxicity of ciguateric species on fish and consequently on its consumers, we observed that the mean seasonal variation of toxic phytoplankton increased significantly ($P < 0.05$) in the salemma stomach contents during summer as compared to autumn, winter, or spring (fig. 2). The amount of ciguateric species co-ingested by the salemma as part of their diet gradually increased from spring to summer, and is suspected to accumulate in the organs of these fish (fig. 2). For this reason, the consumption of salemma is unadvisable in certain periods of the year (especially in summer and autumn) because it causes a hallucinatory syndrome and central nervous system disorders.

Seasonal variation of antioxidant activities for the salemma

Antioxidant enzyme activities in several organs and compartments of the salemma specimens were studied. The results obtained were compared with those found for the control fish, the annular seabream *Diplodus annularis* (from the same biotope). This enabled us to note several specificities.

In winter, no significant variation ($P > 0.05$) was observed for the antioxidant activity of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in the adult and subadult size classes of *S. salpa* as well as in *D. annularis* (figs. 3, 4).

Variación estacional de las especies que causan ciguatera

Para evaluar el posible efecto de la toxicidad de las especies asociadas con la ciguatera en peces y, consecuentemente, sus consumidores, se observó que la variación estacional media del fitoplancton tóxico incrementó significativamente ($P < 0.05$) en el contenido estomacal de la salemma durante el verano en comparación con el otoño, el invierno y la primavera (fig. 2). La cantidad de especies ciguatéricas coingeridas por *S. salpa* como parte de su dieta incrementó gradualmente de la primavera al verano, y se supone que se acumulan en los órganos de esta especie (fig. 2). Por tal razón, el consumo de la salemma no es recomendable en ciertos periodos del año (especialmente en verano y otoño) ya que causa un síndrome alucinatorio y trastornos del sistema nervioso central.

Variación estacional de la actividad antioxidante en la salemma

Se estudió la actividad de las enzimas antioxidantes en varios órganos y compartimientos de los especímenes de *S. salpa* examinados. Los resultados se compararon con los obtenidos para el pez control, *Diplodus annularis* (del mismo biotopo). Esto nos permitió observar varias especificidades.

En invierno, no se observó una variación significativa ($P > 0.05$) para la actividad antioxidante de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) en los adultos y subadultos de *S. salpa* así como en *D. annularis* (figs. 3, 4).

En primavera, se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) de la actividad antioxidante de CAT y GPx, el cual afectó sólo el hígado de los adultos y subadultos de *S. salpa* (figs. 3, 4).

En verano, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) de la actividad de CAT en el hígado de los adultos y subadultos de *S. salpa*. También se registró una variación significativa ($P < 0.05$) de la actividad de GPx en el hígado de ambas clases de talla, así como una variación significativa ($P < 0.05$) de las actividades de CAT y GPx en el cerebro de sólo los peces de talla grande (figs. 3, 4).

En otoño, se observó una variación significativa ($P < 0.05$) de la actividad de CAT en el hígado de los peces de talla grande y mediana. También se registró una variación significativa ($P < 0.05$) en la actividad enzimática antioxidante en el cerebro y la carne de los adultos de *S. salpa*. La actividad de GPx se observó en los tres órganos de los adultos de *S. salpa* ($P < 0.05$) (figs. 3, 4).

Correlación interestacional entre el porcentaje de especies ciguatéricas y los perfiles de estrés oxidativo para la salemma

A fin de justificar y consolidar nuestras observaciones, se realizó una serie de pruebas para determinar la correlación entre el total de dinoflagelados tóxicos y los perfiles del

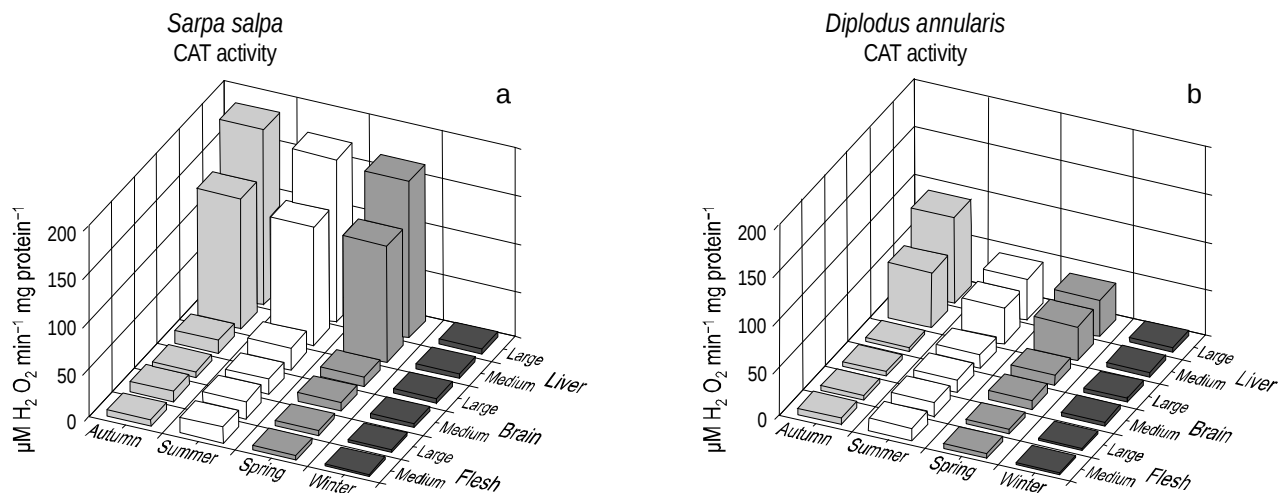


Figure 3. Catalase activity ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) in the liver, brain, and flesh of (a) *Sarpa salpa* compared to (b) the control fish *Diplodus annularis* for the medium (subadult) and large (adult) size classes. The values represent the mean. The standard deviation was smaller than 10% of the mean in all cases and was therefore not included for clarity.

Figura 3. Actividad de la catalase ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$) en el hígado, el cerebro y la carne de (a) *Sarpa salpa* en comparación con (b) el pez control *Diplodus annularis* para las clases de talla mediana (subadultos) y grande (adultos). Los valores representan la media. La desviación estándar fue menor que 10% de la media en todos los casos y, por tanto, no se muestra.

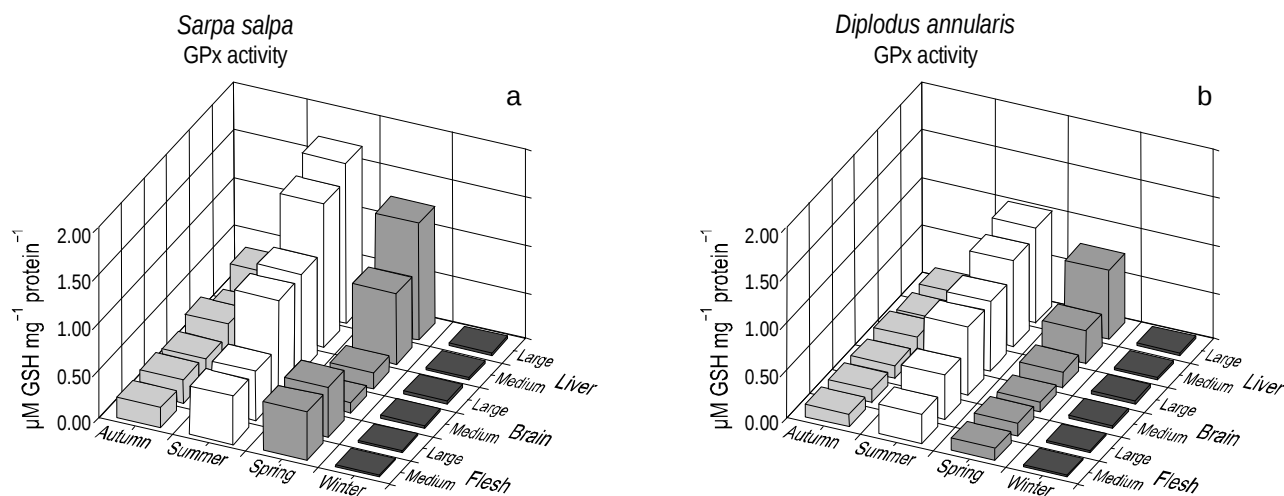


Figure 4. Glutathione peroxidase activity ($\mu\text{M GSH min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) in the liver, brain, and flesh during winter, spring, summer, and autumn in (a) *Sarpa salpa* compared to (b) the control fish *Diplodus annularis* for the medium (subadult) and large (adult) size classes. The values represent the mean. The standard deviation was smaller than 10% of the mean in all cases and was therefore not included for clarity.

Figura 4. Actividad de la glutatión peroxidasa ($\mu\text{M GSH min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$) en el hígado, el cerebro y la carne de (a) *Sarpa salpa* en comparación con (b) el pez control *Diplodus annularis* para las clases de talla mediana (subadultos) y grande (adultos). Los valores representan la media. La desviación estándar fue menor que 10% de la media en todos los casos y, por tanto, no se muestra.

In spring, there was a significant increase ($P < 0.05$) in the antioxidant activity of CAT and GPx, which affected only the liver of the large- and medium-sized salema (figs. 3, 4).

In summer, there was a significant increase ($P < 0.05$) in the liver CAT activity of both the large- and medium-sized salema. Moreover, we observed a significant variation

estrés oxidativo en los diferentes órganos examinados para todas las estaciones y todas las tallas en conjunto. Se observó una correlación significativa ($P < 0.01$) entre el total de dinoflagelados y las actividades antioxidantes de CAT y GPx en el hígado, el cerebro y la carne para todas las estaciones y tallas en conjunto (tabla 2).

($P < 0.05$) in the liver GPx activity for both size classes, as well as a significant variation ($P < 0.05$) in CAT and GPx activities in the brain only for the large size class (figs. 3, 4).

In autumn, we observed a significant variation ($P < 0.05$) in liver CAT activity of the large and medium size classes. There was also a significant variation ($P < 0.05$) in antioxidant enzyme activity in the brain and flesh of the large-sized salema. The activity of GPx is expressed in the three organs of the large-sized salema ($P < 0.05$) (figs. 3, 4).

Inter-seasonal correlation between the percentage of ciguateric species and the profiles of oxidative stress for the salema

To justify and consolidate our previous observations, we carried out a series of tests to determine the correlation between the total toxic dinoflagellates and the profiles of oxidative stress at the level of different organs studied for all seasons and all sizes together. We observed a significant correlation ($P < 0.01$) between the total toxic dinoflagellates and the CAT and GPx antioxidant activities in liver, brain, and flesh for all seasons and all sizes together (table 2).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The mean vacuity index for *S. salpa* (54.38%) remained rather weak throughout the year, whereas *D. annularis* had a very high mean vacuity coefficient: 91.48% (Derbal *et al.* 2007). In addition, we noted that this coefficient showed a decrease in spring and summer; consequently, *S. salpa* fed more in these two seasons. The vacuity index was low for the period before egg-laying, indicating that the salema nourished and stored lipids for the sake of their genital product maturation. The studied species had one period of maximum spawning: from mid-September to mid-October. The period of intensive settlement occurred at the end of November.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El índice de vacuidad promedio para *S. salpa* (54.38%) fue algo débil a lo largo del año, mientras que para *D. annularis* se registró un coeficiente de vacuidad promedio bastante alto: 91.48% (Derbal *et al.* 2007). Además, se observó que tal coeficiente decreció en primavera y verano; consecuentemente, *S. salpa* consumió más alimento en estas dos estaciones. El índice de vacuidad fue bajo en el periodo antes de la puesta de huevos, lo que indica que la salema se alimentó y almacenó lípidos para el proceso de maduración de los productos genitales. La salema presentó un periodo de desove máximo, de mediados de septiembre a mediados de octubre. El periodo de asentamiento intensivo se observó a finales de noviembre. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Quignard *et al.* (1984).

Durante el verano, a diferencia del invierno, *S. salpa* aumentó su pastoreo de las hojas de *P. oceanica*, alcanzando un porcentaje de 79.65%, una tasa comparable con los resultados obtenidos por Alcoverro *et al.* (1995). En otoño, la mayoría de los especímenes de las dos clases de talla consumieron hojas de *P. oceanica*, por lo que este alimento fue el mayor componente en los contenidos estomacales de la salema (>50% en otoño). Por tanto, a pesar de la regresión en las últimas décadas, la pradera está en equilibrio con el medio ambiente y *P. oceanica* muestra un ciclo regular de crecimiento así como de la sucesión de colonización epifítica. Las hojas adultas, que mostraron mayor colonización por epifitas, fueron preferentemente consumidas por los herbívoros durante todo el año en todas las profundidades. De junio a septiembre *S. salpa* realiza el pastoreo en grandes cardúmenes que se alimentan activamente de *P. oceanica* a fin de acumular reservas para el periodo invernal cuando comen menos y de preparar los peces adultos para la reproducción. En marzo, cuando los adultos de *S. salpa* emigran

Table 2. Correlation matrix (Pearson test) between the total toxic dinoflagellates and the antioxidant activities of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) for all seasons and all sizes together (** $P < 0.01$; number of parameters, 3; number of samples analyzed, 48).

Tabla 2. Matriz de correlación (prueba de Pearson) entre el total de dinoflagelados tóxicos y las actividades antioxidantes de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) para todas las estaciones y tallas en conjunto (** $P < 0.01$; número de parámetros, 3; número de muestras analizadas, 48).

	Total toxic dinoflagellates	CAT activity in brain	CAT activity in flesh	CAT activity in liver	GPx activity in brain	GPx activity in flesh	GPx activity in liver
Total toxic dinoflagellates	1						
CAT activity in brain	0.643**	1					
CAT activity in flesh	0.503**	0.689**	1				
CAT activity in liver	0.506**	0.481**	0.428**	1			
GPx activity in brain	0.513**	0.752**	0.727**	0.353**	1		
GPx activity in flesh	0.455**	0.677**	0.708**	0.446**	0.818**	1	
GPx activity in liver	0.564**	0.820**	0.667**	0.519**	0.739**	0.742**	1

These results are comparable to those found by Quignard *et al.* (1984).

In summer, unlike winter, *S. salpa* increased their grazing on *P. oceanica* leaves, reaching a percentage of 79.65%, a rate comparable to the results found by Alcoverro *et al.* (1995). In autumn, almost all the specimens belonging to the two size classes examined consumed *P. oceanica* leaves. For this reason, this food attained the highest level in the salem stomach contents (>50% in autumn). Hence, notwithstanding regression during the last decades, the meadow is in equilibrium with the environment and *P. oceanica* shows a regular cycle in both plant growth and succession of epiphyte colonization. Adult leaves, which showed the greatest colonization by epiphytes, were preferred by herbivores throughout the year at all depths. Grazing by *S. salpa* from June to September is done in massive schools that actively feed on *P. oceanica* to accumulate reserve for the winter period when they eat less, and to prepare adult fish for reproduction. In March, when *S. salpa* adults migrate to deep waters, juveniles live and feed in shallow, rocky bottoms (Peirano *et al.* 2001).

Along with the algae and *Posidonia*, we noticed that the epiphytic toxic dinoflagellates present an important diversity and remarkable seasonal fluctuations. In addition to the diatoms, the toxic dinoflagellate species were identified as *Prorocentrum mexicanum*, *P. concavum*, *P. lima*, *Ostreopsis siamensis*, *Coolia monotis*, and *Amphidinium carterae*. *Prorocentrum mexicanum* produces haemolytic toxins (Nakajima *et al.* 1981) and water-soluble, fast-acting toxins (Tindall *et al.* 1989). *Prorocentrum concavum* produces three okadaic acid diesters (Hu *et al.* 1993) and a fast-acting toxin; this species is also accused of causing the ciguatera syndrome. *Prorocentrum lima* is known for producing DSP (diarrhetic shellfish poisoning) toxins (Bomber and Aikman 1989) and causing the ciguatera syndrome (Faust 1991); the production of fast-acting toxins is also noticed. *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* are ciguatera-causing species (Steidinger and Baden 1984). This implies that toxic dinoflagellate algae exist, supporting the results obtained by Raikhlín-Eisenkraft *et al.* (1988). The proportions of the toxic species increased in the same direction as the total phytoplankton population. The dinoflagellate at the level of *Posidonia oceanica* leaves becomes very important at the end of spring and in summer. These species were also the most abundant dinoflagellates in the water column during summer 2001 in Lake Bizerte (northern coast of Tunisia) (Turki *et al.* 2006). This increase is primarily due to the increase in leaf area as a result of leaf growth in this period (Alcoverro *et al.* 1995). Indeed, the consumption of *S. salpa* is inadvisable in certain periods of the year (especially in summer and autumn) because it causes a hallucinatory syndrome and central nervous system disorders, which for a long time have been attributed to the presence of caulerpin in the green alga *Caulerpa prolifera* (Haro *et al.* 1994). This assumption was not confirmed until recently since this alga is rarely detected

a aguas profundas, los jóvenes habitan y se alimentan en fondos rocosos y poco profundos (Peirano *et al.* 2001).

Se observó que, junto con las algas y *Posidonia*, los dinoflagelados tóxicos presentan una gran diversidad y notables fluctuaciones estacionales. Además de las diatomeas, las especies de dinoflagelados tóxicos fueron identificadas como *Prorocentrum mexicanum*, *P. concavum*, *P. lima*, *Ostreopsis siamensis*, *Coolia monotis* y *Amphidinium carterae*. *Prorocentrum mexicanum* produce toxinas hemolíticas (Nakajima *et al.* 1981) y toxinas solubles en agua de acción rápida (Tindall *et al.* 1989). *Prorocentrum concavum* produce tres ésteres diólicos del ácido okadaico (Hu *et al.* 1993) y una toxina de acción rápida, y se le acusa de causar el síndrome de ciguatera. *Prorocentrum lima* produce toxinas diarreicas (intoxicación diarreica por mariscos) (Bomber y Aikman 1989), el síndrome de ciguatera (Faust 1991) y toxinas de acción rápida. *Ostreopsis siamensis* y *Coolia monotis* son especies que causan la ciguatera (Steidinger y Baden 1984). Esto indica que existen los dinoflagelados tóxicos y sustenta los resultados obtenidos por Raikhlín-Eisenkraft *et al.* (1988). Las proporciones de las especies tóxicas incrementaron en la misma dirección que la población total de fitoplancton. El dinoflagelado al nivel de las hojas de *Posidonia oceanica* adquiere mucha importancia a finales de primavera y en verano. Estas especies también fueron los dinoflagelados más abundantes durante el verano de 2001 en la columna de agua del lago de Bizerte (costa norte de Túnez) (Turki *et al.* 2006). Este aumento se debe principalmente al aumento de la superficie foliar, como resultado del crecimiento de las hojas en este periodo (Alcoverro *et al.* 1995). De hecho, el consumo de *S. salpa* no es recomendable en ciertos periodos del año (especialmente en verano y otoño) ya que causa un síndrome alucinatorio y trastornos del sistema nervioso central, los cuales por mucho tiempo fueron atribuidos a la presencia de caulerpina en el alga verde *Caulerpa prolifera* (Haro *et al.* 1994). Esta suposición no fue confirmada hasta hace poco ya que rara vez se detecta tal alga en el contenido estomacal de peces. Por tanto, según el presente estudio, las especies ciguatéricas son las causantes más que la caulerpina.

Los radicales oxidativos se generan continuamente como resultado del metabolismo normal y pueden aumentar como productos secundarios de las reacciones de biotransformación de las toxinas o los xenobióticos. Los sistemas antioxidantes celulares han demostrado una gran adaptación al estrés oxidativo para contrarrestar la producción excesiva de ERO (Alvarez y Boveris 1993, Niwa *et al.* 1996, Sureda *et al.* 2004). Se utiliza el estatus antioxidante de la célula a fin de evaluar la capacidad de los organismos para resistir el estrés ambiental inducido por algunos contaminantes marinos (Frenzilli *et al.* 2004).

En invierno, no se observó una variación significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes en los diferentes órganos examinados de *S. salpa* en comparación con el pez control, *D. annularis*. Pareciera ser que esta ausencia de

in fish stomach contents. Thus, according to this work, ciguateric species are the culprits rather than caulerpin.

Oxidative radicals are continuously generated as a result of normal metabolism and can increase as by-products of biotransformation reactions of toxins or xenobiotics. Cellular antioxidant systems have demonstrated a great adaptation to oxidative stress in order to counteract excessive ROS production (Alvarez and Boveris 1993, Niwa *et al.* 1996, Sureda *et al.* 2004). Cellular antioxidant status is used to evaluate the ability of organisms to resist the environmental stress induced by some marine pollutants (Frenzilli *et al.* 2004).

In winter, no significant variation in antioxidant enzyme activities was observed in salema at the level of the various organs studied as compared to the control fish, *D. annularis*. It would seem that this absence of significant variation is due to the absence of toxic epiphytic dinoflagellates on the leaves of *P. oceanica* consumed by *S. salpa*. In spring, there was a significant increase in CAT and GPx activities in the liver of the salema. The increase in the percentage of *P. oceanica* as the food source of large- and medium-sized fish could explain the difference found between the antioxidant enzyme responses at the hepatic level in the different size ranges. Moreover, we noticed an increase in antioxidant enzyme activities that is certainly due to the presence of toxic dinoflagellates in the stomach contents of salema with a percentage equal to 1.14%. The responses of CAT and superoxide dismutase activity often have similar profiles; however, the increase in CAT activity is stronger and earlier than that of the latter (Di Giulio *et al.* 1993).

In summer, *P. oceanica* leaves showed greatest colonization by epiphytes owing to the fact that the surrounding water was calmer. *Sarpa salpa* had maximum periods of grazing on *P. oceanica* leaves during summer and autumn. This has an effect on the resulting antioxidant activities. We also noticed a significant variation of CAT and GPx activities in the liver of both large- and medium-sized fish. This proves that the main CAT is highly expressed during the period of contamination by toxic phytoplankton because of the elimination of ROS, supporting the results obtained by Di Giulio *et al.* (1993). There was also a significant variation of CAT and GPx activities in the brain of the large-sized salema.

In autumn, the percentage of ciguateric species compared to the other seasons was most important (5.26%). During this season, fish from both size classes consumed *P. oceanica* leaves as the preferential food source (>50%), which is in agreement with the results found by Peirano *et al.* (2001). Differences in grazing might be explained by different behavior of the grazers. Massive schools of *S. salpa* actively feed on *P. oceanica* leaves in summer to accumulate reserves for reproduction during autumn. This behavior is reflected in the rate of antioxidant activities, and both size classes showed significant variation in liver CAT activity.

The activities of GPx were expressed in the three organs of the large-sized salema. These results enabled us to conclude that there was a peak in toxicity in autumn, and that

una variación significativa se debe a la ausencia de dinoflagelados tóxicos en las hojas de *P. oceanica* consumidas por *S. salpa*. En primavera, se observó un aumento significativo en las actividades de CAT y GPx en el hígado de la salema. El aumento en el porcentaje de *P. oceanica* como fuente alimentaria de los adultos y subadultos podría explicar la diferencia encontrada entre las respuestas de las enzimas antioxidantes a nivel hepático en las dos clases de talla. Además, se observó un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes que ciertamente se debe a la presencia de dinoflagelados tóxicos en el contenido estomacal de *S. salpa* con un porcentaje igual a 1.14%. Las respuestas de la actividad de CAT y de la superóxido dismutasa frecuentemente tienen perfiles similares; sin embargo, el aumento de la actividad de CAT es más fuerte y sucede antes que la de la superóxido dismutasa (Di Giulio *et al.* 1993).

En verano, las hojas de *P. oceanica* mostraron una mayor colonización de epifitas debido a que el agua circundante estaba más tranquila. Los periodos de máximo consumo de las hojas de *P. oceanica* por *S. salpa* se registraron en verano y otoño. Esto afecta las actividades antioxidantes resultantes. Asimismo, se observó una variación significativa de las actividades de CAT y GPx en el hígado de los peces de talla grande y mediana. Esto demuestra que la CAT principal es altamente expresada durante el periodo de contaminación por fitoplancton tóxico debido a la eliminación de ERO, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Di Giulio *et al.* (1993). También se observó una variación significativa de las actividades de CAT y GPx en el cerebro de los adultos de *S. salpa*.

En otoño, el porcentaje de especies asociadas con la ciguatera fue más importante (5.26%) que en las otras temporadas. Durante el otoño, los peces de ambas clases de talla consumieron las hojas de *P. oceanica* como la fuente de alimento preferencial (>50%), lo cual concuerda con los resultados de Peirano *et al.* (2001). Las diferencias en pastoreo pueden ser explicadas por un comportamiento diferente de los herbívoros. Los cardúmenes masivos de *S. salpa* se alimentan activamente de las hojas de *P. oceanica* durante el verano a fin de acumular reservas para la reproducción durante el otoño. Este comportamiento se refleja en la tasa de actividad antioxidante, y ambas clases de talla mostraron una variación significativa de la actividad hepática de CAT.

Las actividades de GPx se expresaron en los tres órganos de los adultos de *S. salpa*. Estos resultados nos permitieron concluir que hubo un pico en la toxicidad en otoño, y que la toxicidad aumentó notablemente en el cerebro en otoño e inclusive se acumuló en la carne de los peces de talla grande. El metabolismo de compuestos tóxicos con frecuencia resulta en la formación de ERO, lo cual contribuye a su toxicidad (Chovanec *et al.* 2003).

La inducción del aumento de la respuesta antioxidante es una respuesta lógica a la exposición a sustancias tóxicas generadas por los dinoflagelados. En este contexto, el

toxicity increased enormously in the brain in autumn and even accumulated in the flesh of the large-sized fish. The metabolism of toxic compounds frequently results in the formation of ROS, which significantly contribute to their toxicity (Chovanec *et al.* 2003).

The induction of the increase in antioxidant response was a logical answer to the exposure to toxic substances generated by toxic dinoflagellates. In this context, phytoplankton was responsible for the activation of antioxidant activities or acts parallel to other stress factors such as seasonal influence and water temperature and oxygen saturation. These factors may intervene, but phytoplankton is most influential because of the toxic dinoflagellates consumed by salema. The control fish, *D. annularis*, does not consume toxic dinoflagellates and does not show an antioxidant response like *S. salpa*. It appears that antioxidant activities are generally increased in the presence of toxic phytoplankton in the stomach contents of salema.

We observed a significant correlation ($P < 0.01$) between the total toxic dinoflagellates and the antioxidant activities of CAT and GPx in liver, brain, and flesh for all seasons and all sizes together. Therefore, the effects of ciguateric species induce antioxidant activity, which starts to increase in spring and to decrease in winter. These results also confirm that reported by Rodríguez-Ariza *et al.* (1993), who found a parallel increase in GPx, CAT, and superoxide dismutase in polluted mullet (*Mugil* sp.).

In summary, we have shown that antioxidant activities for *S. salpa* from the Island of Kerkennah undergo a season-dependent cumulative effect, appearing first in the liver, then in the brain, and finally the flesh. This effect increases with the size of the animal and, therefore, possibly with the amount of *P. oceanica* leaves consumed, which are rich in toxic epiphytic phytoplankton of a seasonal nature.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the research unit "Oxidative Stress and Health" headed by A El Feki, professor of the Science Faculty at the University of Sfax (Tunisia). The authors are grateful to A Rebai (Center of Biotechnology, Sfax, Tunisia).

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121–126.
- Alcoverro T, Durate CM, Romero, J. 1995. Annual growth dynamics of *Posidonia oceanica*: Contribution of large-scale versus local factors to seasonality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120: 203–210.
- Almeida JA, Diniz YS, Marques SF, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli EL. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination. *Environ. Int.* 27: 673–679.
- Alvarez S, Boveris A. 1993. Induction of antioxidant enzymes and D-diaphorase in human blood mononuclear cells by light stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 305: 247–251.
- Balech E. 1988. Los dinoflagelados del Atlántico sudoccidental. *Publicaciones Especiales del Instituto Español de Oceanografía*, Madrid, 310 pp.
- Balech E. 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). *Special publication*, Sherkin Island Marine Station, Cork.
- Ben Brahim M, Hamza I, Hannechi M, Rebai A, Jarbou O, Bouain A, Aleya L. 2010. Variability in the structure of epiphytic assemblages of *Posidonia oceanica* in relation to human interferences in the Gulf of Gabes, Tunisia. *Mar. Environ. Res.* 70: 411–421.
- Bomber JW, Aikman KE. 1989. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanogr.* 6: 291–311.
- fitoplancton es responsable de la activación de la actividad antioxidante o actúa en paralelo con otros factores de estrés como la influencia estacional y la saturación de oxígeno y la temperatura del agua. Estos factores pueden intervenir, pero el fitoplancton es el más influyente debido a los dinoflagelados tóxicos que consume la salema. El pez control, *D. annularis*, no consume dinoflagelados tóxicos y no presenta una respuesta antioxidante como *S. salpa*. Pareciera ser que las actividades antioxidantes se incrementan en presencia de fitoplancton tóxico en el contenido estomacal de la salema.
- Se observó una correlación significativa ($P < 0.01$) entre el total de dinoflagelados tóxicos y las actividades antioxidantes de CAT y GPx en el hígado, el cerebro y la carne para todas las estaciones y tallas en conjunto. Por tanto, los efectos de las especies ciguatéricas inducen la actividad antioxidante, la cual comienza a incrementar durante la primavera y a decrecer durante el invierno. Estos resultados confirman lo documentado por Rodríguez-Ariza *et al.* (1993), quienes observaron un aumento paralelo de GPx, CAT y superóxido dismutasa en *Mugil* sp. contaminado.
- En resumen, se ha mostrado que las actividades antioxidantes en *S. salpa* de la isla de Kerkennah presentan un efecto acumulativo dependiente de la temporada, apareciendo primero en el hígado, luego en el cerebro y por último en la carne. Este efecto aumenta con el tamaño del animal y, por ende, posiblemente con la cantidad de hojas de *P. oceanica* consumidas, sobre las que abundan epifitas fitoplanctónicas según la estación del año.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la unidad de investigación "Estrés Oxidativo y Salud" encabezado por A El Feki, profesor de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sfax (Túnez). Los autores agradecen a A Rebai (Centro de Biotecnología, Sfax, Túnez).

Traducido al español por Christine Harris.

- Bourrelly P. 1985. Les Algues d'Eau Douce. Initiation à la Systématique. Tome II. Les Algues Bleues et Rouges. Les Euglénins, Peridiniens et Cryptomonadines. Société Nouvelle des Editions Boubée, 57 pp.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7: 248–254.
- Camus L, Pampanin DM, Volpato E, Delaney E, Sanni S, Nasci C. 2004. Total oxyradical scavenging capacity responses in *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the Venice Lagoon (Italy) to measure the biological impact of anthropogenic activities. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 801–808.
- Château-Degat ML. 2003. Les toxines marines: Problèmes de santé en émergence. *Vertigo* 4: 1–11.
- Chovanec A, Hofer R, Schiemer F. 2003. Fish as bioindicators. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds.), *Bioindicators and Biomonitoring*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Derbal F, Nouacer S, Kara MH. 2007. Composition et variations du régime alimentaire du sparailon *Diplodus annularis* (Sparidae) du Golf d'Annaba. *Cybio* 31: 443–450.
- Di Giulio RT, Habig C, Gallagher EP. 1993. Effects of rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 16: 311–320.
- Dodge JD. 1973. *The Fine Structure of Algal Cells*. Academic Press, London, 261 pp.
- Dodge JD. 1975. The Prorocentrales (Dinophyceae). II. Revision of taxonomy within the genus *Prorocentrum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 71: 103–125.
- Dodge JD. 1982. Marine Dinoflagellates of the British Isles. Her Majesty's Stationery Office, London, 303 pp.
- Dodge JD. 1985. *Atlas of Dinoflagellates. A Scanning Electron Microscope Survey*. Ferrand Press, London, 119 pp.
- Estrada M, Vives F, Alcaez M. 1985. Life and productivity of the open sea. In: Marglef R (eds.), *Western Mediterranean*. Pergamon Press, Oxford, pp. 150–200.
- Faust MA. 1991. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. *J. Phycol.* 27: 642–648.
- Fischer W, Bauchot ML, Schneider M. 1987. Identification index of species for fishing needs. Review 1399, Mediterranean and black sea. Volume I. plants and aquatic Vertebrates. Pub. FAO Project GCP/INT422/EEC, Rome, 760.
- Flohe L, Günzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114–121.
- Font J, Garcia-Ladona E, Gorris EG. 1995. The seasonality of mesoscale motion in the Northern Current of the western Mediterranean: several years of evidence. *Oceanol. Acta.* 18: 207–219.
- Frenzilli G, Bocchetti B, Pagliarecci R, Nigro MM, Annarumma F, Scarcelli V, Fattorini D, Regoli F. 2004. Time-course evaluation of ROS mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar. Environ. Res.* 58: 609–613.
- Halstead BW. 1988. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. Darwin Press, Princetown, New Jersey, 1168 pp.
- Hamza-Chaffai A, Amiard-Triquet C, El Abed A. 1997. Metallothionein-like protein, is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33: 53–62.
- Haro L, Jouglard DE, Thomas MJ, David JM. 1994. Intoxications de type ciguatérique après ingestion de Sparidae de Méditerranée. In: Boudouresque CF, Meunier A, Gravez V (eds.), *First International Workshop on Caulerpa taxifolia*. GIS Posidonie Publ. France, pp. 271–274.
- Helfrich P, Banner A. 1960. Hallucinatory mullet poisoning. *J. Trop. Med. Hyg.* 1: 86–89.
- Hu TA, De Freitas SW, Doyle J, Jackson D, Marr J, Nixon E, Pleasances S, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC. 1993. New DSP toxin derivatives isolated from toxic mussels and the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *concovum*. In: Smayda T, Shimizu Y (eds.), *Toxic Phytoplankton in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 507–512.
- Huber-Pestalozzi G. 1968. *Das Phytoplankton des Süßwassers*. 1. Hälfte, Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae. E. Schweizerbart Verlag, Stuttgart, 322 pp.
- Kirkman H, Young PC. 1981. Measurement of health and echinoderm grazing on *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Aquat. Bot.* 10: 329–338.
- Kitting CL, Fry B, Morgan MD. 1984. Detection of inconspicuous epiphytic algae supporting food webs in seagrass meadows. *Oecologia (Berlin)*, 62: 145–149.
- Leong SCY, Taguchi S. 2005. Optical characteristics of the harmful dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources. *Harmful Algae* 4: 211–219.
- Livingstone DR. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656–666.
- Lushchak VI, Bagnyukova TV. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 144: 283–289.
- Mazzella L, Buia MC, Gambi MC, Lorenti M, Russo GF, Scipione MB, Zupo V. 1992. Plant-animal trophic relationships in the *Posidonia oceanica* ecosystem of the Mediterranean Sea: A review. In: John DM, Hawkins SJ, Price JH (eds.), *Plant-Animal Interactions in the Marine Benthos*. Clarendon Press, Oxford, pp. 165–187.
- Nakajima I, Oshima Y, Yasumoto T. 1981. Toxicity of benthic dinoflagellates in Kinawa. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47: 1029–1033.
- Neckles HA, Wetzel RL, Orth RJ. 1993. Relative effects of nutrient enrichment and grazing on epiphyte-macrophyte (*Zostera marina* L.) dynamics. *Oecologia (Berlin)* 93: 285–295.
- Niwa Y, Ozaki T, Kanoh T, Akamatsu H, Kurisaka M. 1996. Role of cytokines, tyrosine kinase and protein kinase C on production of superoxide and induction of scavenging enzymes in human leukocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 79: 303–313.
- Pallaoro A, Dulic S, Matic-Skoko M, Kraljevic M, Jarda I. 2008. Biology of the sea slug *Sarpa salpa* (L. 1758) (Pisces, Sparidae) from the middle eastern Adriatic. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 276–281.
- Peirano A, Niccolai I, Mauro R, Bianchi CN. 2001. Seasonal grazing and food preference of herbivores in a *Posidonia oceanica* meadow. *Sci. Mar.* 367–374.
- Quignard JP, Man Wai R, Vianet R. 1984. Les poissons de l'étang de Mauguio (Hérault, France): Inventaire, structure du peuplement, croissance et polymorphisme des tailles. *Vie Milieu* 34: 173–183.
- Raikhlin-Eisenkraft B, Finkelstein Y, Spanier E. 1988. Ciguatera-like poisoning in the Mediterranean. *Vet. Hum. Toxicol.* 30: 352–353.
- Rodríguez-Ariza A, Peinado JC, Pueyo C, López-Barea J. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50: 2568–2573.
- Romero J. 1989. Epífitos de las hojas de *Posidonia oceanica*: Variaciones estacionales y batimétricas de biomasa en la pradera de las islas Medes (Girona). *Oecol. Aquat.* 9: 19–25.
- Sayed I, Parvaez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to

- deltamethrin in a freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56: 295–301.
- Shi HH, Sui YX, Wang XR, Luo Y, Ji LL. 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140: 115–121.
- Smayda TJ. 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1137–1153.
- Steidinger KA, Baden DG. 1984. Toxic marine dinoflagellates. In: Spector DL (ed.), *Dinoflagellates*. Academic Press, Orlando, pp. 201–249.
- Sureda A, Batle JM, Tauler P, Cases N, Aguiló A, Tur JA, Pons A. 2004. Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. *Free Radic. Res.* 38: 1003–1009.
- Sureda A, Box A, Ensenat M, Alou E, Tauler P, Deudero S, Pons A. 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpenyne. *Comp. Biochem. Physiol. C* 144: 191–196.
- Tindall DR, Miller DM, Bomber JW. 1989. Culture and toxicity of dinoflagellates from ciguatera endemic regions of the world. *Toxicon* 27: 8–86.
- Tomas CR, Throndsen J, Heimdal BR. 1993. *Marine Phytoplankton: A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids*. Academic Press, 263 pp.
- Tomas CR (ed.), Hasle GR, Syvertsen EE, Steidinger AK, Tangen K. 1996. *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, 598 pp.
- Tregouboff G, Rose M. 1957. *Manuel de Planctonologie Méditerranéenne*. Vol. II, CNRS, Paris, 587 pp.
- Turki S, Harzallah A, Sammari C. 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: The Lake of Bizerte and the Gulf of Gabes. *Cah. Biol. Mar.* 47: 1–7.
- Utermöhl H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1–38.
- Vaillant V, Caumes E, De Valk H, Mesnage V, Griffon AM. 2001. Intoxication alimentaire à la ciguatera: Savoir l'évoquer même en l'absence de voyage. *Bull. Epidémiol. Hebd.* 38.
- Velimirov B. 1984. Grazing of *Sarpa salpa* L. on *Posidonia oceanica* and utilization of soluble compounds. In: Boudouresque CF, Jeudy de Grissac A, Olivier J (eds.), *International Workshop on Posidonia oceanica Beds*. GIS Posidonie Marseille, France, pp. 381–387.
- Williams SL, Ruckelshaus MH. 1993. Effects of nitrogen availability and herbivory on eelgrass (*Zostera marina*) and epiphytes. *Ecology* 74: 904–918.
- Wu JY, Zheng L, Wang JH. 2005. Contamination of shellfish from Shanghai seafood markets with paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning toxins determined by mouse bioassay and HPLC. *Food Addit. Contam.* 22: 647–651.
- Zairi M, Rouis MJ. 1999. Impacts environnementaux du stockage du phosphogypse à Sfax (Tunisie). *Bull. Lab. Ponts Chaussées* 219: 29–40.

*Received July 2010,
received in revised form February 2011,
accepted May 2011.*