



## La chromatographie liquide à haute performance dans la détection du thiocyanate chez les poissons de récif capturés à l'aide de cyanure: application pratique en conditions réelles

Nicole Herz<sup>1,2,3</sup>, Sebastian Ferse<sup>1</sup>, Yustian Rovi Alfiansah<sup>1,4</sup> et Andreas Kunzmann<sup>1</sup>

### Introduction

Dans le cadre du commerce de poissons d'aquariophilie, des techniques de pêche extrêmement destructrices pour les récifs coralliens sont employées, ce qui suscite des inquiétudes depuis plus de 30 ans (Barber and Pratt 1998 ; Johannes and Riepen 1995 ; Jones 1997 ; Mak *et al.* 2005 ; Sadovy and Vincent 2002 ; Wabnitz *et al.* 2003). Il n'en reste pas moins que cette filière prospère dans le monde entier. Malgré l'absence de données économiques à jour et de statistiques commerciales complètes, les données relatives aux importations et aux exportations donnent à penser que ce secteur pèserait chaque année entre 200 et 300 millions de dollars des États-Unis d'Amérique (Wabnitz *et al.* 2003 ; Larkin and Degner 2001).

Les poissons d'ornement sont souvent capturés de façon illicite à l'aide de cyanure, une méthode efficace, mais dévastatrice (Barber and Pratt 1997 ; Johannes and Riepen 1995) qui vise à paralyser les poissons. Cependant, si la dose utilisée est excessive, les poissons ciblés et non ciblés risquent de ne pas survivre (Cervino *et al.* 2003). Dans bon nombre de pays du Sud-Est asiatique, la pêche au cyanure est interdite (Barber and Pratt 1998 ; Mak *et al.* 2005). En Indonésie, l'usage de cyanure est prohibé depuis 1985.<sup>5</sup> Entre 1995 et 2005, les scientifiques comme les médias se sont beaucoup intéressés au commerce de poissons d'ornement et à son lien avec les pratiques de pêche destructrices. Il demeure toutefois difficile de détecter efficacement la présence de cyanure chez les poissons pêchés et, ces dernières années, l'intérêt porté par les milieux scientifiques et médiatiques au secteur a décliné, et ce, malgré son essor.

Il existe plusieurs méthodes de détection du cyanure : colorimétrie, titrimétrie ou électrodes spécifiques des ions cyanures (Ikebukuro *et al.* 2013). Néanmoins, aucune de ces techniques ne semble adaptée aux poissons d'ornement pêchés de

manière illicite. En effet, elles prennent beaucoup de temps et impliquent de sacrifier le poisson. Elles nécessitent en outre de prétraiter les échantillons par acidification, chauffage et reflux pour que se forme le cyanure d'hydrogène (HCN) (Mak *et al.* 2004). Le test de détection pour l'heure le plus répandu et prometteur a été mis au point, en 1992, par l'International Marinelife Alliance (IMA) des Philippines et le service philippin des pêches et des ressources aquatiques (BFAR) (IMA 2006). Il utilise les électrodes spécifiques des ions cyanures pour détecter les concentrations de cyanure dans les organes homogénéisés des poissons de récif attrapés par ce biais (Bruckner and Roberts 2008). Bien que le cyanure présente une demi-vie assez brève et se transforme rapidement en thiocyanate (Mak *et al.* 2005), ce test s'est révélé concluant, avec la détection de cyanure dans 19 % des 3 950 échantillons (Barber and Pratt 1997). Malgré les résultats obtenus, cette méthode a été abandonnée en 2001, car, comme toutes les autres techniques, elle nécessitait de sacrifier le poisson et était relativement chronophage (Mak *et al.* 2005 ; Graber and Siegel 2012).

Une méthode de détection de l'ion thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a été récemment mise au point à l'université d'Aveiro (Portugal) par Silva *et al.* (2011). Le thiocyanate est un métabolite de HCN, transformé par l'enzyme sulfotransférase rhodanase (EC 2.8.1.1) et excrété par les poissons empoisonnés au cyanure (Isom *et al.* 2010). Un autre groupe de chercheurs de l'université d'Aveiro a montré que la technique CLHP modifiée permettait de détecter des niveaux de SCN<sup>-</sup> supérieurs à 3,16 mg L<sup>-1</sup> excrétés par des poissons conservés dans de l'eau de mer artificielle (Vaz *et al.* 2012). Des poissons clowns (*Amphiprion clarkii*) empoisonnés au cyanure ont été conservés pour purification dans des bocaux en verre de 1 litre pendant quatre semaines, et des échantillons d'eau

<sup>1</sup> Leibniz-Zentrum für Marine Tropenökologie (ZMT), Brême (Allemagne)

<sup>2</sup> Université de Brême

<sup>3</sup> Auteur à contacter : Courriel : herz.nicole@gmx.de. Tél. : +49 4-5739602009

<sup>4</sup> LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Institut indonésien des sciences)

<sup>5</sup> Loi sur la pêche : UU No. 9 tahun 1985 juncto UU no. 31 tahun 2004 Tentang Perikanan

recueillis quotidiennement pour analyse. Chaque jour, les poissons ont été nourris à satiété et l'eau des bocal remplacée par de l'eau de mer fraîchement préparée. L'analyse des échantillons a montré que chaque poisson excrétaient en moyenne quelque 7 à 9,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{SCN}^-$  au total au cours des 28 journées de purification. Cette nouvelle méthode semble très efficace pour détecter de faibles concentrations de thiocyanate. Certaines questions restent toutefois en suspens. Lors de la capture des poissons en mer, des facteurs tels que la concentration en cyanure et la durée d'exposition varient ; or, ils sont susceptibles d'influer sur les taux d'excrétion des poissons. Le taux de purification de thiocyanate peut fluctuer selon l'espèce, la taille et le poids. On sait que les diverses espèces de poisson – tout comme les poissons de différentes tailles – n'ont pas les mêmes taux métaboliques ni la même fréquence respiratoire (Jobling 1994). On peut donc en conclure que, d'une espèce et d'une taille à l'autre, les quantités de cyanure et les taux de transformation du cyanure varient, ce qui entraîne de multiples taux d'excrétion de  $\text{SCN}^-$ . De plus, les caractéristiques de l'eau de mer naturelle, comme le pH, la salinité, les niveaux de nutriments et les traces de métaux lourds (Gerdes 2001 ; Greenwood *et al.* 1997), ainsi que les taux de cyanure et de thiocyanate (Silva *et al.* 2011), peuvent différer selon les récifs. On ignore la mesure dans laquelle ces facteurs limitent l'efficacité de la technique CLHP.

S'inscrivant dans le prolongement des recherches menées par Vaz *et al.* (2012), les présents travaux avaient pour but de tester une technique CLHP modifiée en conditions réelles : utilisation d'eau de mer naturelle, concentrations de cyanure inconnues et durées d'exposition indéterminées. Deux études distinctes ont été réalisées : effets de conditions naturelles variables sur l'excrétion de thiocyanate

par des poissons de cinq espèces différentes capturés par des pêcheurs (étude 1), et comparaison des taux d'excrétion de thiocyanate entre deux espèces, dans des conditions contrôlées en aquarium, et éventuelle incidence de l'eau de mer naturelle sur l'efficacité de l'appareil d'analyse CLHP (étude 2).

## Matériel et méthodes

### Étude 1

L'échantillonnage s'est déroulé en janvier 2013 dans la région de Banyuwangi, à l'est de Java (Indonésie), dans les locaux d'une grande société d'exportation. Le cyanure demeure très largement utilisé dans le pays, faute de services répressifs efficaces. Apportés chaque jour par les pêcheurs des villages avoisinants, les poissons sont conservés dans des bassins, puis placés dans des sacs en plastique avant d'être transportés jusqu'aux installations principales de Bali et de Jakarta. Aux fins de l'étude, les espèces ont été sélectionnées en fonction de leurs taux de capture et de la probabilité d'emploi de cyanure. En règle générale, les pêcheurs utilisent du cyanure pour les espèces solitaires et rapides, ainsi que pour les poissons de petite taille capables de se dissimuler dans les anfractuosités du corail (G. Reksodihardjo-Lilley, LINI, Indonesian Nature Foundation, le 19 décembre 2013, comm. pers., et un pêcheur balinais). Le choix s'est donc porté sur le poisson demoiselle *Pomacentrus vaiuli*, le centropyge bicolore *Centropyge bicolor*, le gobie *Gobiodon quinquestrigatus* et le poisson clown *Amphiprion ocellaris*.

La procédure d'échantillonnage retenue pour détecter le thiocyanate est celle qui a été décrite par Vaz *et al.* (2012). Chaque poisson devant être soumis à un test d'excrétion de thiocyanate a été placé dans son propre bocal en verre aéré rempli



**Figure 1.** Disposition de l'expérience à Banyuwangi (Indonésie). Tous les bocaux en verre ont été placés dans un bassin étroit doté d'un système de circulation de l'eau, et chaque bocal équipé d'un tuyau d'aération (photo : Nicole Herz).

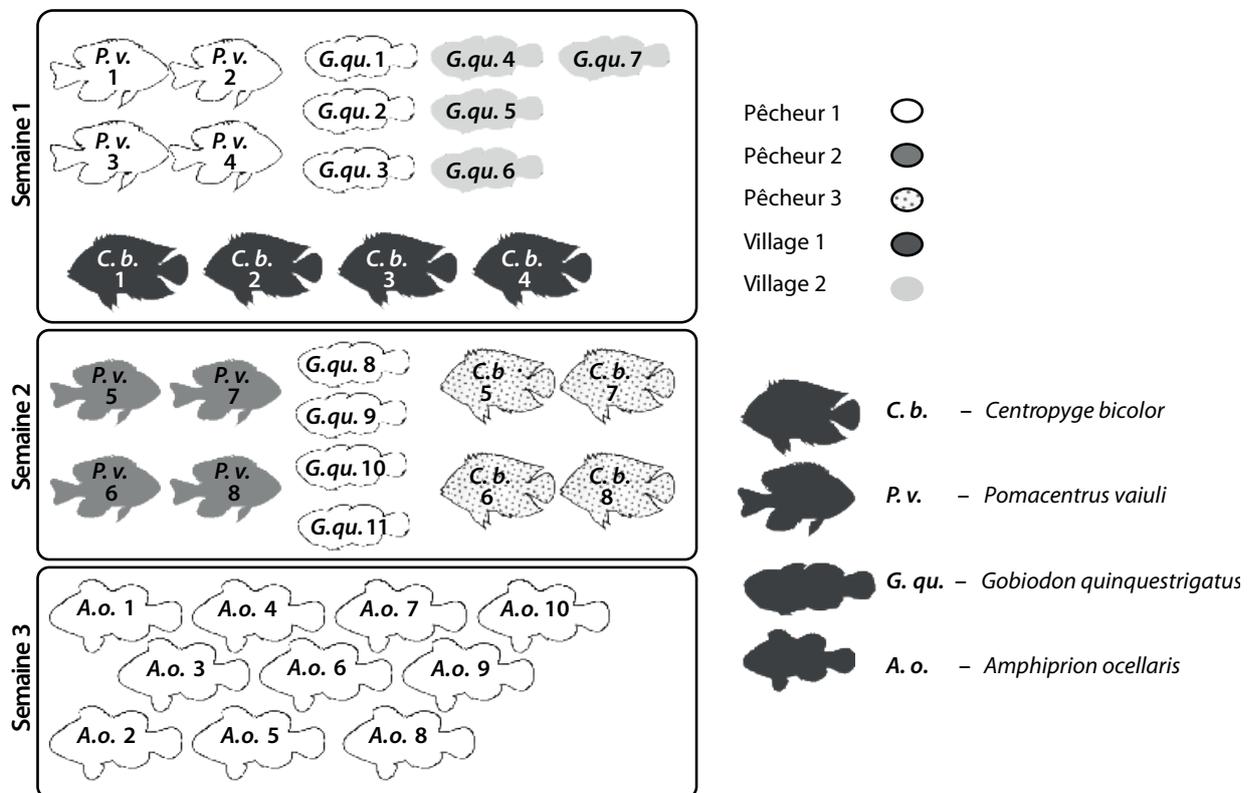
d'eau de mer filtrée, puis installé dans un bassin doté d'un système de circulation de l'eau pour que la température reste stable (figure 1). Les poissons ont été exposés à un rythme naturel d'alternance jour-nuit, avec environ 12,5 heures de soleil dans un hall semi-ouvert. Tous les poissons ont été conservés six jours, ce qui correspondait à un cycle d'échantillonnage. Chaque jour, 1,5 ml d'eau a été prélevé et conservé à -20 °C dans un congélateur, les poissons ont été nourris à satiété avec des granulés Sera Marin Granulates et des nauplii d'artémias (Mackay Marine, États-Unis d'Amérique) et l'eau a été intégralement remplacée par de l'eau de mer fraîche. Au vu de la disponibilité limitée des poissons, trois cycles d'échantillonnage de six jours ont été réalisés. Pour chaque cycle, trois à quatre individus par espèce ont été conservés et soumis à un test d'excrétion : 8 poissons demoiselles, 8 centropyges bicolores, 11 gobies et 10 poissons clowns (figure 2).

**Étude 2**

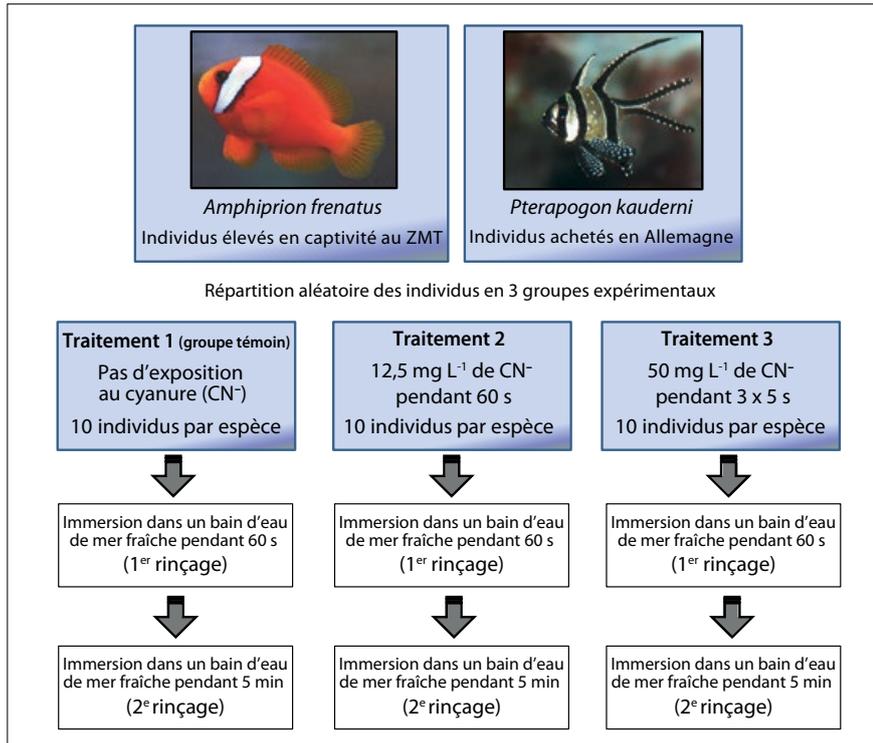
La seconde expérience a été réalisée dans l'aqualab MAREE du Leibniz-Zentrum für Marine Tropenökologie (ZMT) de Brême (Allemagne). Elle visait à comparer les taux d'excrétion de thiocyanate

de deux espèces différentes et à déterminer l'incidence de l'eau de mer naturelle sur l'efficacité de la technique CLHP. Le poisson clown *Amphiprion frenatus* a été utilisé comme espèce de référence par rapport à l'expérience de Vaz *et al.* (2012), tandis que le poisson cardinal d'Indonésie *Pterapogon kauderni* a été inclus pour son appartenance à un genre différent, car seuls des poissons du genre *Amphiprion* avaient jusqu'alors été testés. Tous les poissons utilisés dans le cadre de cette étude avaient été élevés en captivité en Allemagne, afin d'éviter toute exposition au cyanure.

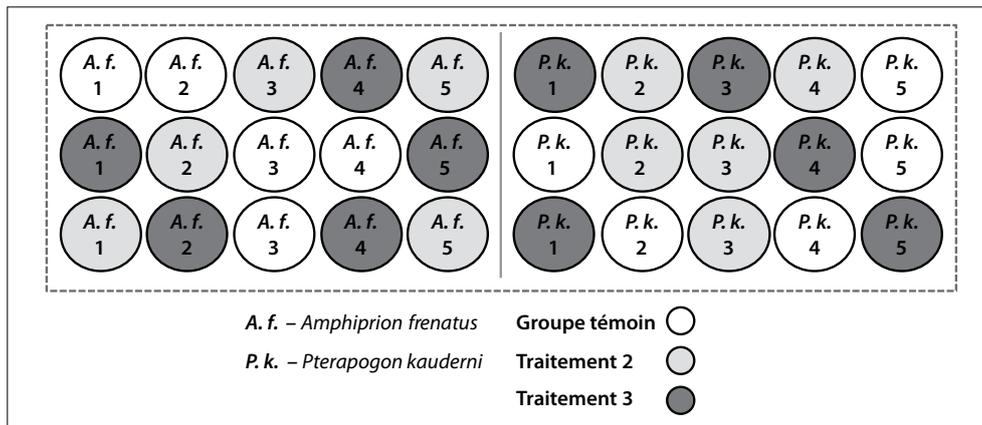
Dix individus des deux espèces ont été soumis à deux traitements distincts, et un troisième groupe, servant de groupe témoin, n'a pas été exposé au cyanure. Quarante poissons ont donc été exposés à une solution de cyanure (KCN, pure à 97 %) de soit 12,5 mg L<sup>-1</sup> pendant 60 secondes, soit 50 mg L<sup>-1</sup> trois fois 5 secondes (figure 3). Le second traitement avait pour but de reproduire les conditions dans lesquelles les pêcheurs étourdissent et attrapent les poissons de récif. Une fois les traitements réalisés, les poissons ont tous été nettoyés dans deux bacs successifs, puis placés séparément dans des bocaux en verre de 1,7 litre pour purification (figures 4 et 5).



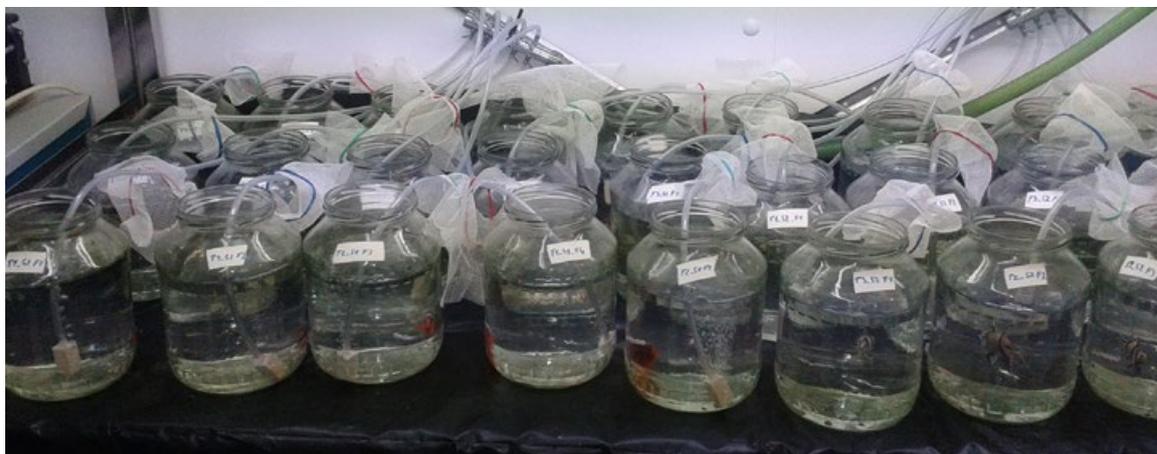
**Figure 2.** Des individus des espèces *Pomacentrus vaiuli* (*P. v.*), *Centropyge bicolor* (*C. b.*), *Gobiodon quinquestrigatus* (*G. qu.*) et *Amphiprion ocellaris* (*A. o.*) ont été conservés pendant six jours, et des échantillons d'eau prélevés quotidiennement. Les poissons ont été attrapés par le Pêcheur 1, le Pêcheur 2 ou le Pêcheur 3, originaires du Village 1 ou du Village 2. Durant les trois cycles d'échantillonnage (semaine 1, 2 ou 3), 8 individus de l'espèce *P. v.*, 8 spécimens *C. b.*, 11 *G. qu.* et 10 *A. o.* ont été étudiés.



**Figure 3.** Illustration graphique de l'expérience menée dans le cadre de l'étude 2. Les individus du groupe Traitement 1 n'ont pas été exposés au cyanure (CN<sup>-</sup>), ceux du groupe Traitement 2 ont été exposés à 12,5 mg L<sup>-1</sup> de CN<sup>-</sup> pendant 60 s et ceux du groupe Treatment 3 à 50 mg L<sup>-1</sup> de CN<sup>-</sup> pendant 3 x 5 s.



**Figure 4.** Illustration de l'agencement dans la pièce climatisée du ZMT. Tous les individus de chacun des trois groupes ont été placés séparément et de manière aléatoire dans des bocaux en verre de 1,7 L pour deux semaines de purification.



**Figure 5.** Agencement de l'expérience dans la pièce climatisée du ZMT. Au total, 60 bocaux en verre contenant 30 individus de chaque espèce (10 poissons par espèce et par groupe) ont été conservés pendant 14 jours. Chaque bocal était équipé d'un tuyau d'aération. Des échantillons d'eau ont été prélevés dans les bocaux et dans le bassin d'eau de mer (échantillon témoin) les jours 2, 5, 8, 11 et 14 (crédit photo : N. Herz).

Après avoir été exposés au cyanure, tous les poissons ont été répartis de manière aléatoire dans des bocaux en verre contenant 1 225 ml d'eau de mer naturelle filtrée provenant de Wilhelmshaven. Chaque bocal a été équipé d'un tuyau d'aération assurant l'oxygénation, puis entreposé dans une pièce climatisée à 26 °C ( $\pm 1$  °C) (figure 5). Une lumière artificielle a été utilisée entre 8 h et midi et de 14 h à 20 h. Les poissons ont été conservés ainsi 14 jours. Ils ont été nourris à satiété et leur eau a été changée tous les jours.

Les jours 2, 5, 8, 11 et 14, des échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide d'une seringue dans chaque bocal et dans le bassin d'eau de mer (échantillon témoin), puis conservés à -20 °C.

À la fin de la période d'échantillonnage de 14 jours, tous les poissons ont été mesurés et pesés (balance PLS 1200-3A de Kern & Sohn GmbH, Bahlingen, Allemagne). Des analyses de variance à un critère de classification ont été réalisées afin de déterminer si des différences notables en termes de longueur ou de poids étaient observées entre les deux espèces pour chacun des deux traitements expérimentaux. Des valeurs-p inférieures à 0,05 ont été jugées significatives.

#### Paramètres de l'eau

Les paramètres de l'eau provenant de Wilhelmshaven ont été analysés à deux reprises, au début puis à la fin de la période de conservation des poissons, par dosage colorimétrique des phosphates ( $\text{PO}_4$ ) et des nitrates ( $\text{NO}_3$ ), ainsi qu'à l'aide d'un spectrophotomètre DR/2010 (Hach Company, Loveland, États-Unis d'Amérique). La température, la salinité et le pH ont été contrôlés grâce à un multimètre numérique (Multi 3430 Set F de WTW GmbH, Weilheim, Allemagne).

#### Analyse du thiocyanate

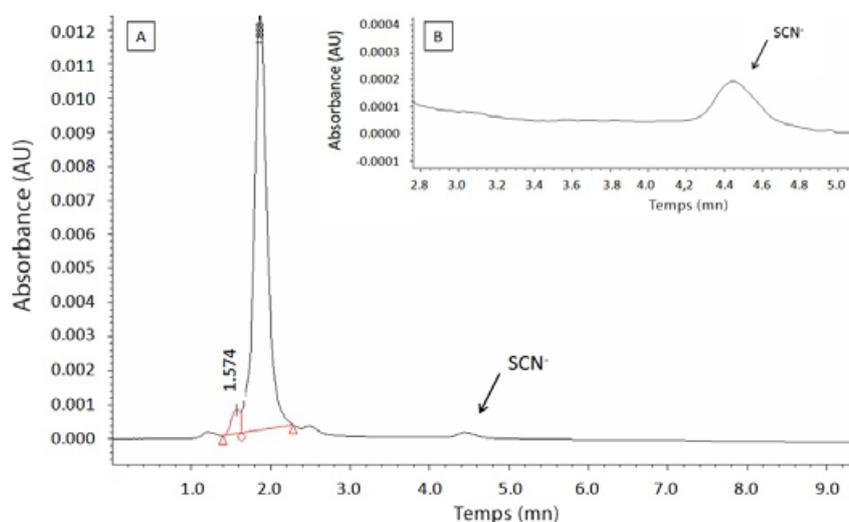
Les échantillons d'eau des deux études ont été analysés par CLHP, notamment avec le module de séparation Waters 2695 et le détecteur UV double longueur d'ondes Waters 2487 (Waters Portugal, Lisbonne, Portugal). La colonne C30 a été légèrement modifiée avec 5 % de polyéthylène glycol (PEG) et un détecteur de photodiode plus sensible. Les échantillons d'eau ont été transférés dans des fioles en verre de 1,5 ml et introduits dans l'injecteur. La colonne a utilisé une phase mobile de 300 mmol L<sup>-1</sup> de sulfate de sodium et de 50 mmol L<sup>-1</sup> de chlorure de sodium.

Comme décrit par Vaz *et al.* (2012), des solutions étalon de  $\text{SCN}^-$  (4, 50, 100, 200, 300 et 400 g L<sup>-1</sup>) ont servi à établir une courbe d'étalonnage. La limite de détection calculée est fixée à 3,16 mg L<sup>-1</sup> ; le temps de rétention du thiocyanate est de 4 à 5,5 minutes.

Chaque échantillon a été testé trois fois afin de calculer l'écart-type du pic de  $\text{SCN}^-$ . Lorsque le pic de  $\text{SCN}^-$  d'un échantillon se révélait très faible, une quantité donnée de solution de thiocyanate était ajoutée dans l'échantillon, puis le test de nouveau réalisé. La quantité ajoutée de thiocyanate était alors déduite de la valeur finale, afin de calculer la quantité réelle de thiocyanate dans l'échantillon hors ajout.

#### Résultats

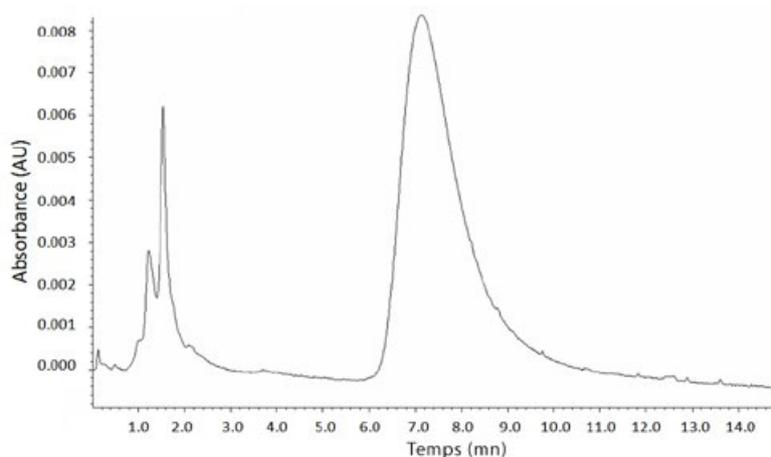
Il n'a pas été possible de déterminer la présence de thiocyanate dans les échantillons d'eau provenant des deux études. Les chromatogrammes produits par l'appareil d'analyse CLHP n'ont en effet pas été concluants. Contrairement aux échantillons d'eau de mer artificielle, dans lesquels du thiocyanate avait été ajouté (figure 6), aucun pic de thiocyanate n'était détectable à la minute 4,5 dans les échantillons



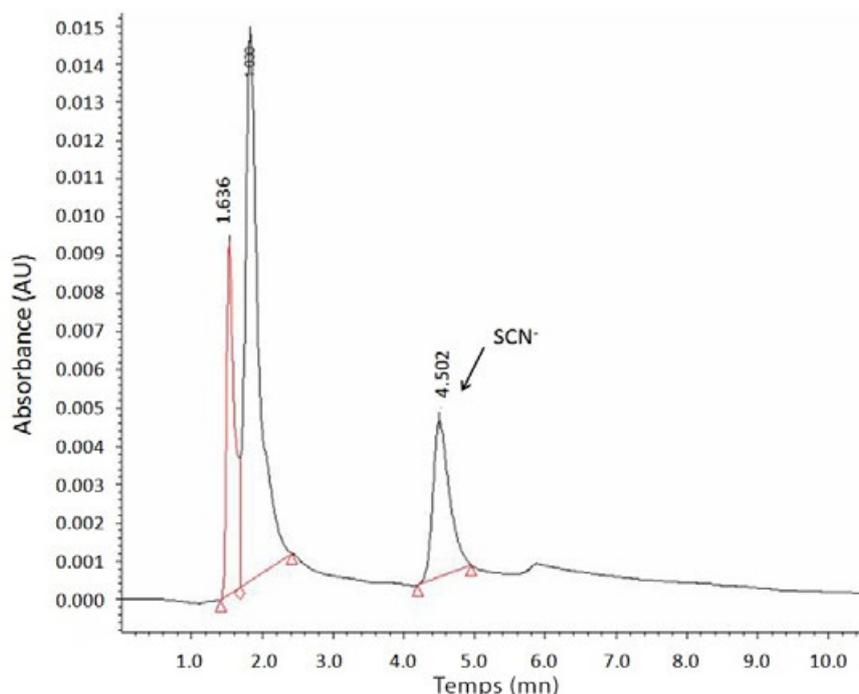
**Figure 6.** Chromatogramme par CLHP d'eau de mer artificielle enrichie d'une quantité donnée de solution de thiocyanate (KSCN). Le graphique A montre un pic de chlorure à la minute 2 et un pic de thiocyanate à la minute 4,5 ; le graphique B représente le pic de  $\text{SCN}^-$  sur le chromatogramme à une résolution plus élevée.

d'eau de mer naturelle, pour la première comme la seconde étude. Les chromatogrammes de tous les échantillons analysés présentaient un pic très élevé de 0,822 unité d'absorbance (AU) entre les minutes 6,5 à 9, pic qui n'a pu être lié à aucune substance (figure 7). Une quantité donnée de thiocyanate a été ajoutée dans certains échantillons de l'étude 1 et de l'étude 2, sans qu'un pic supplémentaire de thiocyanate ne soit détecté pour autant. Plusieurs tests ont été réalisés afin de déterminer les facteurs qui auraient pu interférer avec les échantillons

de  $\text{SCN}^-$ . Une solution de chlorure de fer (III) (Merck S.A., Algés, Portugal) a été ajoutée dans un échantillon contenant une concentration connue de thiocyanate, afin de vérifier si la contamination de l'eau pouvait influencer sur les résultats obtenus pour  $\text{SCN}^-$  (figure 8). Comme il s'agit d'un pseudohalogénure, le thiocyanate est capable de former des complexes avec des métaux ayant pu empêcher la détection de thiocyanate. Le chromatogramme montre néanmoins un pic manifeste de thiocyanate à la minute 4,5 (figure 8).



**Figure 7.** Profil d'absorbance d'un échantillon, prélevé le 17 janvier 2013, obtenu par CLHP. L'échantillon se compose d'eau au 6<sup>e</sup> jour de conservation d'un poisson clown *Amphiprion ocellaris* très probablement capturé à l'aide de cyanure. On observe un pic de chlorure biaisé à la minute 1,5 et un pic inconnu vers les minutes 7 et 8. Contre toute attente, aucun pic de  $\text{SCN}^-$  n'a été enregistré à la minute 4,5.



**Figure 8.** Chromatogramme (CLHP) présentant le profil d'absorbance d'un échantillon d'eau de mer artificielle auquel une concentration donnée de thiocyanate et d'ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a été ajoutée. Un pic de thiocyanate est là encore observé à la minute 4,5.

Les paramètres de l'eau (pH, salinité,  $\text{PO}_4$  et  $\text{NO}_3$ ) testés durant l'étude 2 présentaient tous des taux normaux.

## Discussion

Des travaux précédemment menés par Rong et Takeuchi (2004) et par Silva *et al.* (2011) ont montré que la méthode CLHP permettait de détecter le thiocyanate comme sous-produit d'excrétion du poisson à condition que les concentrations soient supérieures à  $3,16 \text{ mg L}^{-1}$  et que de l'eau de mer artificielle soit utilisée. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de thiocyanate sur les chromatogrammes CLHP des échantillons analysés. Toutefois, la principale raison est peut-être que, au vu de ses nombreux composés et de ses paramètres variables, l'eau de mer naturelle serait trop complexe pour l'analyse de  $\text{SCN}^-$ .

Des contaminations, des composés inconnus ou des paramètres variables peuvent influencer les résultats de la CLHP, en empêchant la détection de  $\text{SCN}^-$  ; il est possible que des complexes se soient formés à partir d'ions de métaux de transition, tels que le fer (III) (Gerdes 2001 ; Greenwood *et al.* 1997). Outre le fer,  $\text{SCN}^-$  peut également réagir avec le cobalt (Co(II)), le cuivre (Cu(I)), l'or (Au(I)), le mercure (Hg(II)) ou l'argent (Ag(I)) (Greenwood *et al.* 1997). Dans une forme liée de ce type,  $\text{SCN}^-$  risque de ne pas être détectable par le système UV-Vis à  $\lambda = 220 \text{ nm}$  ou présente simplement un temps de rétention et un comportement inconnu vers la colonne C30 (M.C.M. Vaz, université d'Aveiro, 4 août 2013, comm. pers., et B. Meyer-Schlosser, université de Brême, 11 décembre 2013, comm. pers.). Le thiocyanate et le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ), par exemple, forment du thiocyanate ferrique ( $\text{FeSCN}^{2+}$ ) de couleur rouge foncé, dont l'absorbance maximale est à  $\lambda = 447 \text{ nm}$  (Hovinen *et al.* 1999). Dans les deux expériences menées, l'eau utilisée pour conserver les poissons provenait de zones portuaires avoisinantes : Banyuwangi et la baie de Wilhelmshaven. Ces deux sites sont probablement pollués par les eaux de ballast des navires ainsi que par les rejets agricoles et industriels.

Les résultats de la CLHP ont également pu être influencés par la demi-vie du thiocyanate dans l'eau de mer et par sa décomposition par des bactéries. On ignore quelle est la demi-vie du thiocyanate dans l'eau de mer (V. Esteves et M.C.M. Vaz, université d'Aveiro, 4 août 2013, comm. pers.). Pour Plumlee *et al.* (1995, cités dans Chaudhari and Kodam 2010), le thiocyanate est un composé stable, non hydrolysable et relativement persistant. Toutefois, il reste encore à déterminer ce que cela implique pour sa détection par CLHP. On sait, en revanche, que la quantité de cyanure dans un échantillon peut évoluer durant la période de

conservation, en fonction de la température à laquelle celui-ci est conservé (Calafat and Stanfill 2002 ; Lindsay *et al.* 2004 ; Lundquist *et al.* 1987) ; il pourrait en être de même pour le thiocyanate. Pour ce qui est des échantillons de l'étude 1, on s'attendait à ce qu'il soit difficile de détecter le thiocyanate, en raison de la conservation prolongée des échantillons, de janvier à août, et de leur transport sur de longues distances à plusieurs reprises. Les échantillons de l'étude 2 n'ont cependant été conservés que trois mois. Les chromatogrammes de thiocyanate des échantillons en question auraient dû donner des résultats différents de ceux de Banyuwangi.

Par ailleurs, dans l'eau de mer, le thiocyanate peut être dégradé par plusieurs espèces de bactéries, notamment *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella pneumoniae* et *Arthrobacter* spp. (Ahn *et al.* 2004 ; Chaudhari and Kodam 2010 ; Ebbs 2004). On ignore toutefois dans quelle mesure et à quelle vitesse les microorganismes le dégradent dans l'eau de mer naturelle. Les études menées jusqu'ici ont uniquement porté sur la réduction artificielle de thiocyanate dans les eaux usées de sites miniers (Akcil and Mudder 2003 ; Boucabeille *et al.* 1994 ; Chaudhari and Kodam 2010 ; Vu *et al.* 2013).

En ce qui concerne l'étude 1, plusieurs autres raisons peuvent expliquer l'absence de résultats concluants. Il est possible que les quantités de cyanure utilisées par les pêcheurs aient été trop faibles pour être détectées par CLHP ou que le temps de purification (six jours) ait été insuffisant. Néanmoins, dans le cas de l'étude 2, les concentrations en cyanure étaient les mêmes ou similaires à celles utilisées par Vaz *et al.* (2012). De plus, les poissons ont été conservés 14 jours, une durée que l'on sait suffisante pour l'excrétion de thiocyanate.

Un autre facteur potentiellement responsable de l'absence de pics de  $\text{SCN}^-$  pourrait bien être la méthode CLHP elle-même. Il est rare de trouver des pics de thiocyanate (figure 6) aussi faibles que ceux observés dans les études de Silva *et al.* (2011) et de Vaz *et al.* (2012). Sa détection est difficile et les pics pourraient n'être que des données bruitées, et non de véritables signaux (K. Bischof et B. Schlosser-Meyer, université de Brême, 12 novembre 2013, comm. pers.). Il convient donc de perfectionner la méthode CLHP pour ce qui est de la détection de faibles concentrations de  $\text{SCN}^-$ . La présente étude montre bien qu'elle n'est pas encore adaptée à une utilisation en conditions réelles.

## Conclusion

Au vu des résultats de l'analyse par CLHP, il apparaît clairement que la méthode décrite par Vaz

*et al.* (2012) n'est pas encore au point pour détecter des activités de pêche illicites sur le terrain ni pour poursuivre des braconniers. Trop d'incertitudes entourent la pléthore de facteurs susceptibles d'influer sur les résultats, et la méthode employée ne permet pas de détecter de thiocyanate dans l'eau de mer naturelle.

D'autres études devront être menées afin de déterminer à quel point l'excrétion de produits cyanurés varie selon l'espèce, la taille du poisson et la technique de pêche. Outre les multiples facteurs d'incertitude, la méthode CLHP est relativement onéreuse et nécessite une forte technicité. Pour la plupart des organismes, il sera donc difficile d'acquiescer et d'entretenir un tel instrument. Pour toutes ces raisons, il semble peu probable qu'une méthode normalisée de détection du thiocyanate par CLHP puisse être mise au point dans un avenir proche. D'autres stratégies et approches doivent donc être envisagées en vue d'endiguer l'utilisation de cyanure.

### Principes éthiques

L'ensemble des expériences menées au sein du laboratoire du ZMT de Brême ont été réalisées dans le strict respect de la loi allemande sur la protection des animaux (§ 8 Abs. 3, TierSchG) et leur conduite a été autorisée par le comité d'éthique des autorités sanitaires allemandes (Senator für Gesundheit de Brême). Les travaux de recherche menés en Indonésie ont été approuvés par le ministère indonésien de la Recherche et de la Technologie (n° d'autorisation : 4299/FRP/SM/IX/2012).

### Remerciements

Nous tenons à remercier sincèrement Ricardo Calado, Valdemar Esteves et Marcela M.C. Vaz de l'université d'Aveiro (Portugal) pour l'analyse des échantillons et leurs explications sur leur méthode CLHP. Nous adressons également nos remerciements à Achim Meyer, du ZMT, qui a appuyé l'obtention de l'autorisation d'expérimentation animale et qui a contribué à la réalisation de l'expérience au centre. Nous exprimons en outre notre gratitude aux responsables et au personnel de la société indonésienne de poissons d'ornement pour leur coopération, les informations qu'ils nous ont données et leur accueil au sein de l'entreprise pour la conduite des expériences. Pour finir, nous souhaitons remercier Gayatri Reksodihardjo-Lilley, de l'Indonesian Nature Foundation (LINI).

### Bibliographie

- Ahn J.H., Kim J., Lim J. and Hwang S. 2004. Biokinetic evaluation and modeling of continuous thiocyanate biodegradation by *Klebsiella* sp. *Biotechnology Progress* 20(4):1069-1075.
- Akcil A. and Mudder T. 2003. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: Process review. *Biotechnology Letters* 25(6):445-450.
- Barber C.V. and Pratt V.R. 1997. Sullied seas: Strategies for combating cyanide fishing in Southeast Asia and beyond. World Resources Institute and International Marinelife Alliance, Philippines. 17 p.
- Barber C.V. and Pratt V.R. 1998. Poison and profits: Cyanide fishing in the Indo-Pacific Environment: Science and Policy for Sustainable Development 40(8):4-9.
- Boucabeille C., Bories A., Ollivier P. and Michel G. 1994. Microbial degradation of metal complexed cyanides and thiocyanate from mining wastewaters. *Environmental Pollution* 84(1):59-67.
- Bruckner A.W. and Roberts G. (eds). 2008. Proceedings of the International Cyanide Detection Testing Workshop. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-40. Silver Spring, MD: National Oceanic and Atmospheric Administration. 164 p.
- Calafat A.M. and Stanfill S.B. 2002. Rapid quantitation of cyanide in whole blood by automated headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography B* 772(1):131-137.
- Cervino J., Hayes R.L., Honovich M., Goreau T.J., Jones S. and Rubec P.J. 2003. Changes in zooxanthellae density, morphology, and mitotic index in hermatypic corals and anemones exposed to cyanide. *Marine Pollution Bulletin* 46(5):573-586.
- Chaudhari A.U. and Kodam K.M. 2010. Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(4):1167-1174.
- Ebbs S. 2004. Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15(3):231-236.
- Gerdes E. 2001. Qualitative anorganische analyse: Ein Begleiter für Theorie und praxis, 2nd edition. Heidelberg, Germany: Springer. 316 p.

- Graber S. and Siegel T. 2012. Interview with Dr. Peter Rubec discussing the non-lethal method for cyanide detection in marine fish. Retrieved from Web 6 August 2013, <http://www.advancedaquarist.com/blog/interview-with-dr-peter-rubec-discussing-the-non-lethal-method-for-cyanide-detection-in-marine-fish>.
- Greenwood N.N., Earnshaw A. and Hüeckann K. 1997. Chemistry of the elements: Second edition. Burlington, MA, USA: Elsevier Butterworth-Heinemann (pp. 225, 319, 778).
- Hovinen J., Lahti M. and Vilpo J. 1999. Spectrophotometric determination of thiocyanate in human saliva. *Journal of Chemical Education* 76(9):1281.
- Ikebukuro K., Nakamura H. and De Gelder L.S.P. 2013. Sub-chapter: Cyanides. p. 365-378. In: Nollet L.M.L. and De Gelder L.S.P. (eds). *Handbook of Water Analysis*, Third edition. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 995 p.
- International Marinelife Alliance 2006. Aquarium trade certifying cyanide caught fish. Retrieved from Web 13 October 2013, <http://www.marine.org/>.
- Isom G.E., Borowitz J.L. and Mukhopadhyay S. 2010. Sulfurtransferase enzymes involved in cyanide metabolism. p. 485-500. In: Charlene A.M. (ed). *Comprehensive toxicology*. Oxford: Elsevier.
- Jobling M., 1994. *Fish bioenergetics*. London : Chapman & Hall. 309 p.
- Johannes R.E. and Riepen M. 1995. Environmental economic and social implications of the live reef fish trade in Asia and the Western Pacific. Arlington, VA, USA: The Nature Conservancy. 83 p.
- Jones R.J. 1997. Effects of cyanide on coral. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin* 3:3-8.
- Larkin S. and Degner R. 2001. The US wholesale market for marine ornamentals. *Aquarium Sciences and Conservation* 3(1-3):13-24.
- Lindsay A.E., Greenbaum A.R. and O'Hare D. 2004. Analytical techniques for cyanide in blood and published blood cyanide concentrations from healthy subjects and fire victims. *Analytica Chimica Acta* 511(2):185-195.
- Lundquist P., Rosling H., Sörbo B. and Tibbling L. 1987. Cyanide concentrations in blood after cigarette smoking, as determined by a sensitive fluorimetric method. *Clinical Chemistry* 33(7):1228-1230.
- Mak K.K., Yanase H. and Renneberg R. 2004. Novel optical biotest for determination of cyanide traces in marine fish using microbial cyanide hydratase and formatedehydrogenase. *Microchimica Acta* 149:131-135.
- Mak K.K., Yanase H. and Renneberg R. 2005. Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 20(12):2581-2593.
- Plumlee G.S., Smith K.S., Mosier E.L., Ficklin W.H., Montour M., Briggs P. and Meier A. 1995. Geochemical processes controlling acid-drainage generation and cyanide degradation at Summitville. p. 23-34. In: *Proceedings of Summitville Forum '95*. Colorado Geological Survey Special Publication 38.
- Rong L. and Takeuchi T. 2004. Determination of iodide in seawater and edible salt by microcolumn liquid chromatography with poly(ethylene glycol) stationary phase. *Journal of Chromatography A* 1042(1):131-135.
- Sadovy Y.J. and Vincent A.C. 2002. Ecological issues and the trades in live reef fishes. p. 391-420. In: Sale P.J. (ed) *Coral reef fishes: Dynamics and diversity in a complex ecosystem*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Silva L.I., Justino C.I., Lopes I., Pereira R., Freitas A.C., Calado R., Rocha-Santos T.A.P., Panteileitchouk T.S.L., Pereira M.E. and Duarte A.C. 2011. Optical fiber based methodology for assessment of thiocyanate in seawater. *Journal of Environmental Monitoring* 13(6):1811-1815.
- Vaz M.C.M., Rocha-Santos T.A.P., Rocha R.J.M., Lopes I., Pereira R., Duarte A.C., Rubec P.J., Calado R. 2012. Excreted thiocyanate detects live reef fishes illegally collected using cyanide—A non-invasive and non-destructive testing approach. *PLoS One* 7(4):e35355.
- Vu H., Mu A. and Moreau J.W. 2013. Biodegradation of thiocyanate by a novel strain of *Burkholderia phytofirmans* from soil contaminated by gold mine tailings. *Letters in Applied Microbiology* 57(4):368-372.
- Wabnitz C., Taylor M., Green E. and Razak T. 2003. *From ocean to aquarium*. Cambridge, UK: United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre.